สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรทีเอส และ ลิกนินเนส ของเชื้อราที่มีประโยชน์

A Study on Beneficial Fungi for Producing Amylase Cellulase Protease and Ligninase

T098902

โดย
กัญชลิกา รัตนเชิดฉาย
Kanchalika Ratanacherdchai

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2547

วพ.
ก382ก
2548
ค.3

98902

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัญหาพิเศษปริญญาโท

เรื่อง

การศึกษาการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรทีเอส และ ลิกนินเนส ของเชื้อราที่มีประโยชน์

A Study on Beneficial Fungi for Producing Amylase Cellulase Protease and Ligninase

โดย

กัญชลิกา รัตนเชิดฉาย

Kanchalika Ratanacherdchai

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ
สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

เรื่อง
การศึกษาการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรทีเอส และ
ลิกนินเนส ของเชื้อราที่มีประโยชน์

A Study on Beneficial Fungi for Producing Amylase
Cellulase Protease and Ligninase

โดย
กัญชลิกา รัตนเชิดฉาย
Kanchalika Ratanacherdchai

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกษม สร้อยทอง)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรเดช จันทรสร)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
วันที่.....เดือน.. .....พ.ศ. .....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง : การศึกษาการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรทีเอส และลิกนินเนส ของเชื้อราที่มีประโยชน์

โดย : นางสาวกัญชลิกา รัตนเชิดฉาย

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช)

สาขา : เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา : 11/พค/48

(รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง)

บทคัดย่อ

จากการทดสอบความสามารถในการสร้าง extracellular degradative enzymes บนอาหารแข็งของเชื้อราที่มีประโยชน์ 20 สายพันธุ์ ได้แก่ *Trichoderma harzianum*, *T. harzianum* (T-01), *T. hamatum*, *T. hamatum* (T-12), *Gliocladium virens*, *Penicillium variabile*, *Aspergillus oryzae*, *A. terreus*, *A. sparsus*, *Mucor hiemalis*, *M. circinelloides*, *Chaetomium lucknowense*, *Achaetomium theilaviopsis*, *Paecilomyces marquandii*, *Emericella nidulans*, *Emericella rugulosa*, *Eurotium chevalieri*, *Eurotium herbariorum*, *Humicola fuscoatra* และ *Arthrobotrys oligospora* โดยทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ อะไมเลส เซลลูเลส โปรทีเอส และลิกนินเนส พบว่าเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ทั้ง 20 สายพันธุ์ มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด โดยพบว่ามีเชื้อรา 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus sparsus*, *Chaetomium lucknowense*, *Achaetomium theilaviopsis*, *Paecilomyces marquandii*, *Emericella nidulans*, *Eurotium herbariorum* และ *Arthrobotrys oligospora* สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรทีเอส และลิกนินเนส ได้ทั้ง 4 ชนิด ในขณะที่มีเชื้อรา 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. oryzae* และ *A. Terreus* สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และโปรทีเอส แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ลิกนินเนส มีเชื้อรา 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Trichoderma hamatum*, *T. hamatum* (T-12), *Mucor hiemalis* และ *M. circinelloides* ที่พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ อะไมเลส เซลลูเลส และลิกนินเนส แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์โปรทีเอส ในขณะที่เชื้อ *T. harzianum* และ *T. harzianum* (T-01) สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โปรทีเอส และลิกนินเนส แต่ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส เชื้อ *Emericella rugulosa* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส โปรทีเอส และลิกนินเนส แต่ไม่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส เชื้อ *Penicillium variabile* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเซลลูเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์โปรทีเอสและลิกนินเนส เชื้อ *Eurotium chevalieri* สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสและโปรทีเอส ไม่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและลิกนินเนส เชื้อ *Gliocladum virens* สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและลิกนินเนส ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลสและโปรทีเอส และเชื้อ *Humicola fuscoatra* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ โปรทีเอสและลิกนินเนส แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	:	A Study on Beneficial Fungi for Producing Amylase Cellulase Protease and Ligninase
By	:	Miss Kanchalika Ratanacherdchai
Degree	:	Master of Science (Plant Pest Management Technology)
Program	:	Plant Pest Management Technology
Advisor	:	..... 11/05/05
		(Assoc.Prof.Dr.Kasem Soytong)

ABSTRACT

Twenty species of beneficial fungi were conducted to produce amylase, cellulase, protease and ligninase as follows: *Trichoderma harzianum*, *T. harzianum* (T-01), *T. hamatum*, *T. hamatum* (T-12), *Gliocladium virens*, *Penicillium variabile*, *Aspergillus oryzae*, *A. terreus*, *A. sparsus*, *Mucor hiemalis*, *M. circinelloides*, *Chaetomium lucknowense*, *Achaetomium theilaviopsis*, *Paecilomyces marquandii*, *Emericella nidulans*, *Emericella rugulosa*, *Eurotium chevalieri*, *Eurotium herbariorum*, *Humicola fuscoatra* and *Arthrobotrys oligospora*. They were screened for their ability to produce extracellular degradative enzymes on solid media. The tested enzymes tested included:- amylase, cellulase, protease and ligninase. All species were positive at least two kinds of enzyme production. Withthis, seven species, *A. sparsus*, *Chaetomium lucknowense*, *Achaetomium theilaviopsis*, *Paecilomyces marquandii*, *Emericella nidulans*, *Eurotium herbariorum* and *Arthrobotrys oligospora* showed a positive reaction for all enzyme assays. *A. oryzae* and *A. terreus* were positive reaction for all enzymes, except for ligninase and *T. hamatum*, *T. hamatum* (T-12), *M. hiemalis* and *M. circinelloides* were positive reaction for all enzymes, except for protease. *T. harzianum* and *T. harzianum* (T-01) were positive reaction for all enzymes, except for amylase. However, *Emericella rugulosa* was positive reaction for all enzymes, except for cellulase. On the other hand, the other four species were positive reaction for only two enzymes as follows: *Penicillium variabile* showed positive reaction to

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

amylase and cellulase, *Eurotium chevalieri* showed positive reaction to amylase and protease, *Gliocladium virens* showed positive reaction to cellulase and ligninase and *Humicola fuscoatra* showed positive reaction to protease and ligninase.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจาก รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง ที่ให้ความกรุณาในการอนุเคราะห์อุปกรณ์ สารที่ใช้ในการทดลอง ตลอดจนให้ความกรุณาให้คำปรึกษาแก้ไขข้อบกพร่องในส่วนต่างๆ ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้จนสำเร็จเรียบร้อยและสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ในด้านต่างๆ ขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

กราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ตลอดจน รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง และครอบครัว ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนทุน และเป็นกำลังใจในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้จนสำเร็จ

กัญชลิกา รัตนเชิดฉาย

มีนาคม 2548

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
คำนิยม	v
สารบัญ	vi
สารบัญตาราง	vii
สารบัญภาพ	viii
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	1
ตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	6
ผลการทดลอง	9
วิจารณ์ผลการทดลอง	85
สรุปผลการทดลอง	87
เอกสารอ้างอิง	89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ผลการศึกษาการสร้าง extracellular degrative enzymes ของเชื้อราที่มีประโยชน์ 20 สายพันธุ์ 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของเชื้อ *Trichoderma harzianum*	10
2	ลักษณะของเชื้อ *Trichoderma harzianum* (T-01)	11
3	ลักษณะของเชื้อ *Trichoderma hamatum*	12
4	ลักษณะของเชื้อ *Trichoderma hamatum* (T-12)	13
5	ลักษณะของเชื้อ *Gliocladium virens*	14
6	ลักษณะของเชื้อ *Penicillium variabile*	15
7	ลักษณะของเชื้อ *Aspergillus oryzae*	16
8	ลักษณะของเชื้อ *Aspergillus terreus*	17
9	ลักษณะของเชื้อ *Aspergillus sparsus*	18
10	ลักษณะของเชื้อ *Mucor hiemalis*	19
11	ลักษณะของเชื้อ *Mucor circinelloides*	20
12	ลักษณะของเชื้อ *Chaetomium lucknowense*	21
13	ลักษณะของเชื้อ *Achaetomium theilaviopsis*	22
14	ลักษณะของเชื้อ *Paecilomyces marquandii*	23
15	ลักษณะของเชื้อ *Emericella nidulans*	24
16	ลักษณะของเชื้อ *Emericella rugulosa*	25
17	ลักษณะของเชื้อ *Eurotium chevalieri*	26
18	ลักษณะของเชื้อ *Eurotium herbariorum*	27
19	ลักษณะของเชื้อ *Humicola fuscoatra*	28
20	ลักษณะของเชื้อ *Arthrobotrys oligospora*	29
21	การไม่สร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Trichoderma harzianum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	32
22	การไม่สร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Trichoderma harzianum* (T-01) เมื่อเปรียบเทียบกับ control	32
23	การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Trichoderma hamatum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

24 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Trichoderma hamatum* (T-12) เมื่อเปรียบเทียบกับ control 33

25 การไม่สร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Gliocladium virens* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 34

26 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Penicillium variabile* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 34

27 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 35

28 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Aspergillus terreus* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 35

29 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Aspergillus sparsus* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 36

30 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Mucor hiemalis* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 36

31 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Mucor circinelioides* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 37

32 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Chaetomium lucknowense* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 37

33 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Achaetomium theilaviopsis* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 38

34 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Paecilomyces marquandii* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 38

35 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Emericella nidulans* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 39

36 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Emericella rugulosa* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
37	การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Eurotium chevalieri* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	40
38	การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Eurotium herbariorum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	40
39	การไม่สร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Humicola fuscoatra* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	41
40	การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Arthrobotrys oligospora* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	41
41	กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับปานกลางของเชื้อ *Trichoderma harzianum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	43
42	กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับปานกลางของเชื้อ *Trichoderma harzianum* (T-01) เมื่อเปรียบเทียบกับ control	44
43	กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Trichoderma hamatum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	45
44	กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Trichoderma hamatum* (T-12)เมื่อเปรียบเทียบกับ control	46
45	กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Gliocladium virens* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	47
46	กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Penicillium variabile* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	48
47	กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับปานกลางของเชื้อ *Aspergillus oryzae* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	49
48	กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Aspergillus terreus* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	50
49	กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Aspergillus sparsus* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

50 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Mucor hiemalis* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 52

51 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Mucor circinelloides* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 53

52 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Chaetomium lucknowens* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 54

53 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Achaetomium theilaviopsis* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 55

54 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับสูงของเชื้อ *Paecilomyces marquandii* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 56

55 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Emericella nidulans* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 57

56 การไม่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ของเชื้อ *Emericella rugulosa* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 58

57 การไม่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ของเชื้อ *Eurotium chevalieri* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 59

58 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับปานกลางของเชื้อ *Eurotium herbariorum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 60

59 การไม่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ของเชื้อ *Humicola fuscoatra* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 61

60 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Arthrobotrys oligospora* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 62

61 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Trichoderma harzianum* บน casein hydrolysis medium 63

62 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Trichoderma harzianum* (T-01) บน casein hydrolysis medium 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
63	การไม่เกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Trichoderma hamatum* บน casein hydrolysis medium	64
64	การไม่เกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Trichoderma hamatum* (T-12) บน casein hydrolysis medium	65
65	การไม่เกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Gliocladium virens* บน casein hydrolysis medium	65
66	การไม่เกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Penicillium variabile* บน casein hydrolysis medium	66
67	การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Aspergillus oryzae* บน casein hydrolysis medium	66
68	การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Aspergillus terreus* บน casein hydrolysis medium	67
69	การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Aspergillus sparsus* บน casein hydrolysis medium	67
70	การไม่เกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Mucor hiemalis* บน casein hydrolysis medium	68
71	การไม่เกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Mucor circinelloides* บน casein hydrolysis medium	68
72	การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Chaetomium lucknowense* บน casein hydrolysis medium	69
73	การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Achaetomium theilaviopsis* บน casein hydrolysis medium	69
74	การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Paecilomyces marquandii* บน casein hydrolysis medium	70
75	การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Emericella nidulans* บน casein hydrolysis medium	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
76	การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Emericella rugulosa* บน casein hydrolysis medium	71
77	การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Eurotium chevalieri* บน casein hydrolysis medium	71
78	การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Eurotium herbariorum* บน casein hydrolysis medium	72
79	การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Humicola fuscoatra* บน casein hydrolysis medium	72
80	การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Arthrobotrys oligospora* บน casein hydrolysis medium	73
81	การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Trichoderma harzianum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	74
82	การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Trichoderma harzianum* (T-01) เมื่อเปรียบเทียบกับ control	75
83	การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Trichoderma hamatum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	75
84	การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Trichoderma hamatum* (T-12) เมื่อเปรียบเทียบกับ control	76
85	การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Gliocladium virens* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	76
86	การไม่สร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Penicillium variabile* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	77
87	การไม่สร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	77
88	การไม่สร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Aspergillus terreus* เมื่อเปรียบเทียบกับ control	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

89 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Aspergillus sparsus* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 78

90 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Mucor hiemalis* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 79

91 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Mucor circinelloides* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 79

92 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Chaetomium lucknowense* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 80

93 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Achaetomium thielaviopsis* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 80

94 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Paecilomyces marquandii* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 81

95 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Emericella nidulans* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 81

96 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Emericella rugulosa* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 82

97 การไม่สร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Eurotium chevalieri* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 82

98 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Eurotium herbariorum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 83

99 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Humicola fuscoatra* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 83

100 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Arthrobotrys oligospora* เมื่อเปรียบเทียบกับ control 84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

เอนไซม์เป็นโมเลกุลของโปรตีน ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในการสร้างโมเลกุลจากโมเลกุลที่เล็กกว่า หรือเปลี่ยนแปลงโมเลกุลต่างๆ โดยการเคลื่อนย้ายอะตอมไปสู่ตำแหน่งอื่นๆ ในโมเลกุล หรือแตกตัวให้ไปเป็นส่วนประกอบโมเลกุลที่เล็กกว่า เชื้อราหลายชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโมเลกุลขนาดใหญ่ให้เป็นหน่วยย่อย ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ amylolytic, lipolytic, cellulolytic และ proteolytic enzyme เชื้อจุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์บางอย่างที่อาจมีผลกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อมกับเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ เช่น pectinase, cellulase ซึ่งจะทำให้ส่วนประกอบของผนังเซื่อมระหว่างเซลล์และผนังเซลล์หลุดแยกจากกัน ส่วน proteinase, amylase, lipase ทำให้เกิดการสลายตัวของสารที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ amylase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง glycogen และ polysaccharides, ในขณะที่ cellulase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย linear glucose polymer ของ cellulose ให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง และในส่วนของ protease เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรตีนให้เป็นหน่วยเล็กๆ เช่น peptides และ amino acid

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์บางชนิดของเชื้อราที่มีประโยชน์ 20 สายพันธุ์ เพื่อนำผลที่ได้มาเป็นแนวทางในการนำเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์บางชนิดไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางการเกษตรต่อไปได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ amylase, cellulase, protease และ ligninase ของเชื้อราที่มีประโยชน์ 20 สายพันธุ์ เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ทางด้านการเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

เอนไซม์ เป็นโมเลกุลของโปรตีน ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในการสร้างโมเลกุลจากโมเลกุลที่เล็กกว่า หรือเปลี่ยนแปลงโมเลกุลต่างๆ โดยการเคลื่อนย้ายอะตอมไปสู่ตำแหน่งอื่นๆ ในโมเลกุล หรือแตกตัวให้ไปเป็นส่วนประกอบโมเลกุลที่เล็กกว่า

มีการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยพบว่าจุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโมเลกุลของสารขนาดใหญ่ให้เป็นหน่วยย่อย มีเอนไซม์ถึง 2000 ชนิดถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ amylolytic, lipolytic, cellulolytic และ proteolytic enzyme (Fogarty and Kelly, 1979) เชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์บางอย่างที่อาจมีผลกระทบทั้งโดยทางตรงและทางอ้อมกับเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ เช่น pectinase, cellulase ตลอดจน hemicellulase สามารถทำให้ส่วนประกอบของผนังเชื่อมระหว่างเซลล์และผนังเซลล์หลุดแยกจากกัน ส่วน proteinase, amylase, lipase ทำให้เกิดการสลายตัวของสารที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

Whitehead และ Smith (1989) ทำการศึกษากิจกรรมของ degradative extracellular enzyme ในเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Botrytis cinerea, Spororichum thermophile* และ *Trichoderma viride* ซึ่งเจริญอยู่บนเซลล์พืช ซึ่งจากการทดลองพบว่าทั้ง 3 ชนิด สามารถสร้าง Cl cellulase, Cx cellulaase, beta-glucosidase และ endopolygalacturonase ได้ แต่พบว่ากิจรรมของเอนไซม์จะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา ระยะเวลาในการบ่เชื้อ ลักษณะของเซลล์พืช และสภาพในการเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่า *S. Thermophile* จะมีกิจกรรมของ Cl cellulase สูงที่สุด ส่วน *T. viride* มีกิจกรรมของเอนไซม์ beta-glucosidase สูงสุด ในขณะที่จะพบกิจกรรมของ Cx cellulase และ endogalacturonase ได้ใน culture filtrates ของเชื้อ *B.cinerea*

Mishra และ Letham (1990) ทำการศึกษาและแยกเอนไซม์ต่างๆ ที่เชื้อรา *Lentinula edodes* สร้างขึ้น เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้เป็นเชื้อราที่เป็นเห็ดที่สามารถรับประทานได้ที่เจริญอยู่บนไม้ ซึ่งเมื่อเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้บนวัสดุที่มี lignocellulose จะสามารถสร้าง extracellular enzymes ได้เป็นปริมาณมาก จากการแยกและจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์ด้วยวิธี anion exchange chromatography รายงานว่าพบเอนไซม์ cellulases, hemicellulase, เอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา, oxidative enzymes (ligninases), acid phosphatases และ acid proteinases

Kubicek และคณะ (1993) พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cellulase ได้จึงได้ทำการศึกษาถึงการสร้างเอนไซม์ cellulases โดยเชื้อ *Trichoderma reesei* และ species อื่นๆ โดยศึกษาขบวนการปลดปล่อย cellulase ของเชื้อรา *Trichoderma* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และศึกษาในระดับ sequence ของ gene ด้วย เนื่องจากให้ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สนใจว่า cellulase ถูกเชื้อราย่อยสลายได้อย่างไร โดยได้ทำแบบจำลอง เริ่มต้นด้วย conidia ของเชื้อราสร้าง cellobiohydrolses ออกมาสลายโมเลกุลของ cellulose หลังจากนั้นเส้นใยจะมีการสร้าง disaccharides ขึ้นมา ได้แก่ cellobiose, cellobiono-1,5-lactone ซึ่งการสร้างสารเหล่านี้ขึ้นมาเป็นการช่วยส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ cellulase ต่อไปได้

Orth และคณะ (1993) รายงานว่าเชื้อราย่อยสลายไม้ *Phanerochaete chrysosporium* สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย lignin คือ manganese peroxidase ได้ในปริมาณที่สูงบนเศษขี้เลื่อยของไม้โอ๊คที่ผสมรำข้าวสาลีและน้ำตาลซูโครส

Castanres และคณะ (1995) รายงานว่าเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* ส ามารถสร้างเอนไซม์ D-xylanase และ alpha-glucuronidase ได้ ในการย่อยสลาย hemicellulose

Tuor และคณะ (1995) ทำการศึกษาการย่อยสลายไม้ของ white-rot fungi ซึ่งพบว่าเชื้อราที่สร้าง ligninolytic enzymes สามารถใช้ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในการจัดจำแนกเชื้อราเหล่านี้ออกจากกันได้ และยังได้ทำการศึกษาด้านสภาพแวดล้อม พบว่าสภาพแวดล้อมน่าจะมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ในการย่อยส่อนประกอบของไม้ของตัวเชื้อรา เช่น กลไกมในการเข้าทำลายผนังเซลล์ของไม้ เชื้อราน่าจะผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย hemicellulose และหลังจากนั้นจึงสร้างเอนไซม์ในการย่อย lignin ซึ่งอาจจะสร้างเป็นพวก oxidative phonolic เป็นต้น

Puchart และคณะ (1999) มีรายงานว่าเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* สามารถสร้างเอนไซม์ xylanase mananase และ pectinase ในการย่อยสลาย polysaccharide โดยศึกษาจากเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 17 สายพันธุ์ พบว่ามี 6 สายพันธุ์ที่สามารถสร้าง xylanase ในปริมาณสูงมาก

Wyk (1999) ศึกษาการใช้เอนไซม์ cellulase ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Penicillium funiculosum* และเชื้อ *Trichoderma reesei* ย่อยกระดาษเหลือใช้ เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของส่วนประกอบของ cellulose ซึ่งจากการทดลองพบว่า cellulase ที่ได้จากเชื้อ *T. reesei* เกิดกิจกรรมการย่อยสลาย cellulose ได้ดีที่สุด

Kvesitadze และคณะ (1999) ได้ศึกษาเชื้อรา 4000 ชนิด ซึ่งรวบรวมได้จากตอนใต้ของคอเคซัส โดยพบว่าเชื้อราส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย biopolymer ของพืชได้ ได้แก่ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โดยพบว่าเชื้อ *Penicillium canescens* มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและ ไซเลเนสสูง และพบว่ากว่า 6 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราทั้งหมดเป็นเชื้อราที่ทนต่อความร้อนได้สูง และมีกิจกรรมของเซลลูเลส และไซเลเนสได้สูงด้วย

Pekkarinen และคณะ (2000) ศึกษาการสร้างเอนไซม์ protease โดยเชื้อสาเหตุโรคในธัญพืช ได้แก่ *Fusarium graminearum* และ *F. poae* โดยเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวบน mineral media และ gluten culture media และบนเมล็ดข้าวบาร์เลย์ ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำการเปรียบเทียบระดับ pH ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมต่อกิจกรรมของ protease ที่สุดด้วย โดยพบว่าเชื้อราทั้ง 3 species ที่เลี้ยงบน gluten medium สามารถสร้าง protease ได้ และ pH ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือ pH 9.0 ในขณะที่ *F. poae* จะสร้าง acid protease ที่ pH 3.0 และ 3.5 และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ protease เมื่อเลี้ยงเชื้อราบน mineral medium และเมื่อเลี้ยงเชื้อราบนเมล็ดข้าวบาร์เลย์ที่ฆ่าเชื้อแล้วนั้น พบว่าเชื้อราทั้ง 3 species สามารถสร้าง protease ได้

Marlida และคณะ (2000) ได้ศึกษาเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ *Gibberella pulicaris, Acremonium* sp., *Synnematous* sp. และ *Nodilusporium* sp. พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายแป้งดิบได้ โดย *Acremonium* sp. มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายได้ดีที่สุด โดยย่อยได้ดีทั้งแป้งที่มีขนาดใหญ่และเล็ก ส่วนเชื้ออื่นๆ ย่อยได้เพียงแป้งที่มีขนาดเล็กเท่านั้น

Machuca และ Ferraz (2001) ศึกษาเชื้อราพวก brown-rot 2 ชนิด และ white-rot 4 ชนิด โดยเลี้ยงบนชิ้นไม้ *Eucalyptus grandis* โดยพบว่าเชื้อราพวก brown-rot มีกิจกรรมของเอนไซม์พวก hydrolytic ในระดับสูงแต่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์พวก phenoloxidase ในขณะที่เชื้อราพวก white-rot จะมีกิจกรรมของ hydrolytic และ ligninilytic enzymes แต่อยู่ในระดับต่ำกว่าพวก brown-rot โดยเชื้อราพวก brown-rot 2 ชนิด ได้แก่ *Laetiporeus sulfurous* และ *Wolfiporia cocos* ช่วยส่งเสริมการผุของไม้ได้ดี

Singh (2002) ทำการศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาเลี้ยงบนฟางข้าวสาลีเพื่อทำปุ๋ยผสม ได้แก่ *Pleurotus sajor-caju, Trichoderma harzianum, Aspergillus niger* และ *Azotobacter chroococcum* จากผลของการนำจุลินทรีย์มารวมกันทำให้เกิดการย่อยสลาย lignocellulosic โดยสามารถย่อยสลายฟางข้าวสาลีได้ในเวลา 40 วัน และจากการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีแสดงให้เห็นการลดลงของ cellulose, hemicellulose และ lignin อย่างชัดเจน

Cabaleiro และคณะ (2002) ศึกษาในเชื้อราพวก white-rot 2 ชนิด ได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium* และ *Phlebia radiate* บนสภาพอาหารแข็ง โดยทำการทดลองหาอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาพในการเลี้ยงให้เหมาะสมในการสร้างเอนไซมี ligninolytic ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อจะทำการเปรียบเทียบกิจกรรมของ manganese peroxidase, lignin peroxidase, laccase และ protease ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเชื้อราที่สร้าง ligninolytic ทั้ง 2 ชนิดสามารถสร้าง protease ได้สูงที่สุดด้วย โดย *P. chrysosporium* จะสร้าง proteolytic enzymes ในช่วงเวลาของ primary metabolism ในขณะที่ *P. radiate* จะสร้างในช่วง secondary metabolism ยิ่งไปกว่านั้นยังใช้ความแตกต่างของชนิดของ protease ที่สร้างขึ้นมาใช้ในการแยกเชื้อราสองชนิดนี้ออกากกันอีกด้วย โดยพบว่า *P. Chrysosporium* จะสร้างพวก mainly thiol และ acidic proteases ส่วน *P. Radiate* จะสร้าง thiol-serin-and metalloproteases

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Germano และคณะ (2003) ทำการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรทีเอสของเชื้อ *Penicillium* sp. wild strain ในสภาพ solid-state fermentation (SSF) โดยใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยพบว่าเชื้อ *Penicillium* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และที่ pH 6.0-9.0 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ขบวนการ solid-state fermentation ในการผลิตเอนไซม์โปรทีเอสโดยใช้กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบนั้นช่วยให้มีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำด้วย

Murase และคณะ (2003) ทำการศึกษาชนิดของโปรตีนที่พบในดินที่เก็บตัวอย่างมาจากเรือนทดลองในที่ต่างๆ 32 ตัวอย่าง โดยนำมาแยกชนิดของโปรตีนโดยวิธี sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยพบว่าตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่างสามารถแยกชนิดของโปรตีนออกมาได้ และแถบโปรตีนที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 35-68 kDa ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่ามีลำดับ N-terminal amino acid หนึ่งชนิดที่พบว่าเป็นชนิดเดียวกันกับเอนไซม์ cellulase ที่เชื้อรา *Humicola* สร้างขึ้นด้วย

Novotny และคณะ (2004) ศึกษาจำนวนและกิจกรรมของ Mn-dependent peroxidase (MnP), lignin peroxidase and laccase (LAC) ในเชื้อราที่สร้าง ligninolytic ชนิดต่างๆ ที่เจริญบนอาหารเหลวและในดิน และผลของการย่อยสลาย polycyclic aromatic hydrocarbons (anthracene และ pyrene) โดยพบว่า *Irpex lacteus* สามารถสร้าง MnP และ LAC ได้ดี ในขณะที่ *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* และ *Pleurotus ostreatus* สามารถสร้าง MnP และ Lac มาย่อย anthracene และ pyrene ได้ โดยจะปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาอยู่ในดิน

Wang และคณะ (2005) ทำการแยกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ protease และ chitinase จากดิน ซึ่งสามารถแยกได้ *Aspergillus fumigatus* Fresenius TKU003 โดยสามารถสร้าง protease และ chitinase ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มีส่วนประกอบของผงเปลือกกุ้งและปู (SCSP) ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของ extracellular protease เท่ากับ 124 kDa ซึ่งแยกได้โดยวิธี odium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงเมื่อมี pH 8.0 และมีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อราที่มีประโยชน์ที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อราที่มีประโยชน์ที่ใช้ในการทดสอบ 20 สายพันธุ์ ได้แก่ *Trichoderma harzianum, T. harzianum* (T-01), *T. hamatum, T. hamatum* (T-12), *Gliocladium virens, Penicillium variabile, Aspergillus oryzae, A. terreus, A. sparsus, Mucor hiemalis, M. circinelloides, Chaetomium lucknowense, Achaetomium theilaviopsis, Paecilomyces marquandii, Emericella nidulans, Emericella rugulosa, Eurotium chevalieri, Eurotium herbariorum, Humicola fuscoatra* และ *Arthrobotrys oligospora* เตรียมโดยเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อเจริญจึงนำไปใช้สำหรับการทดสอบการสร้างเอนไซม์ต่างๆ ต่อไป

ในการทดสอบการสร้าง extracellular degradative enzymes จะสามารถตรวจสอบได้โดยการเติม substrates ลงในอาหารที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิด ตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์จากอาหาร PDA วางชิ้นวุ้นลงบนอาหารที่ใช้ในการทดสอบ ทำการทดลอง 4 ซ้ำในแต่ละการทดลอง และใช้อาหารที่ใช้ในการทดสอบที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อเป็น negative control บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 5-10 วัน จึงตรวจสอบผลการทดลอง ซึ่งระยะเวลาขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ การตรวจสอบด้วยสารเคมีที่เป็น indictor ควรทำเมื่อเชื้อเจริญประมาณ 50-60% ของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ amylase, cellulase, protease **และ** ligninase

2.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ amylase

ทำการย้ายชิ้นวุ้นที่ตัดจากบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบบนอาหาร PDA ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลงบน starch agar ที่เติมแป้ง (soluble starch) เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญของเชื้อ (Paterson and Bridge, 1994) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-10 วัน จึงตรวจผลการทดลองการเกิด clear zone รอบๆ โคโลนีของเชื้อราที่ใช้ทดสอบ เปรียบเทียบกับอาหาร starch agar ที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อ (negative control) เพื่อความชัดเจนในการสังเกตการย่อยสลายแป้งทำได้โดยใช้สารละลายไอโอดีน (Lugol's iodine) เป็น indicator โดยบริเวณที่มีแป้งจะทำปฏิกิริยากับไอโอดีน ทำให้เปลี่ยนเป็นสีม่วง ดังนั้นถ้าบริเวณรอบๆ โคโลนีไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนเป็นสีม่วง (มีสีน้ำตาลอ่อนของไอโอดีนหรือสีใส) แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ amylase มาย่อยแป้งได้ ให้ผลเป็น positive

2.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cellulase

ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase นั้นใช้วิธี Dye diffusion ซึ่งทำได้โดยการใช้ dyed cellulose เป็น substrates ได้แก่ cellulose azure ซึ่ง azure blue dye จะเชื่อมอยู่กับ cellulosic substrate และจะปลดปล่อยออกมาเมื่อ cellulose ถูกย่อยสลายไป (Paterson and Bridge, 1994) วิธีการทดลองทำโดยเทอาหาร cellulose media ลงในขวดแก้ว หลังจากนั้นจึงเททับด้วยอาหาร cellulose media ที่เติมสี cellulose azure ทำให้ได้อาหารที่ใช้ในการทดสอบที่มีลักษณะเป็น 2 ชั้น ด้วยกัน คือส่วนที่ไม่มีสีอยู่ด้านล่างและส่วนที่มีสีน้ำเงินอยู่ด้านบน จากนั้นจึงย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบที่ตัดจากบริเวณขอบโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลงบนอาหาร cellulose media บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-10 วัน สังเกตการแพร่ของสีจากอาหารส่วนบนลงมายังอาหารส่วนล่างที่ไม่มีสีเปรียบเทียบกับ negative control (อาหารที่ใช้ทดสอบที่ไม่มีเชื้อ) ถ้ามีการแพร่ของสีแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ cellulase มาย่อย cellulose ได้ ให้ผลเป็น positive โดยมีการให้ระดับของกิจกรรมการสร้างเอนไซม์เป็น ระดับต่ำ ปานกลาง และสูง เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control

2.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ protease

ทำการย้ายเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบลงบนอาหารทดสอบ Casein hydrolysis medium (Paterson and Bridge, 1994) ซึ่งสามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ protease ได้โดยในอาหารที่ใช้ทดสอบจะมีส่วนประกอบของ skim milk ซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตของเชื้อและทำให้ได้อาหารทดสอบมีสีขุ่น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-10 วัน สังเกต clear zone บริเวณรอบๆ โคโลนีของเชื้อราทดสอบ เปรียบเทียบกับอาหาร Casein hydrolysis medium ที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อ (negative control) ถ้าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ protease มาย่อย skim milk ซึ่งเป็นโปรตีนได้จะทำให้เกิด clear zone รอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ ให้ผลเป็น positive

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ligninase

ในกระบวนการย่อยสลายลิกนินนั้น เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ oxidative enzymes หลายๆ ชนิด รวมทั้ง polyphenol oxidase, tryosinase, peroxidase และ laccase ซึ่งในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อรา 20 สายพันธุ์นี้ได้ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ligninase จากกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ที่เชื้อราทดสอบสร้างขึ้น

วิธีการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ peroxidase ซึ่งเป็นกระบวนการในการย่อยสลาย lignin (Abdel-Raheem and Shearer, 2002) ทำโดยเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบบนอาหาร PYG (Peptone Yeast extract Glucose Agar) ซึ่งเป็นอาหารที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน แหล่งของพลังงานและวิตามิน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อเจริญจึงตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ย้ายลงบนอาหาร CMA (Corn Meal Agar) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการณ์เจริญของเชื้อเมื่อเชื้อราทดสอบเจริญประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ cork borer เจาะวุ้นบริเวณใกล้กันกับขอบโคโลนีให้เป็นหลุม (well) ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ligninase ซึ่งเป็นกิจกรรมของ Peroxidase ได้โดยหยด 1% w/v pyrogallic acid และ 0.4% hydrogenperoxide อย่างละ 1 หยด ลงในแต่ละหลุม สังเกตการเกิดปฏิกิริยา โดยเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบมีกิจกรรมของเอนไซม์ ligninase จะทำให้เกิดปฏิกิริยาเป็นสีเหลืองทองจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ให้ผลเป็น + positive เปรียบเทียบกับอาหาร CMA ที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อซึ่งใช้เป็น negative control

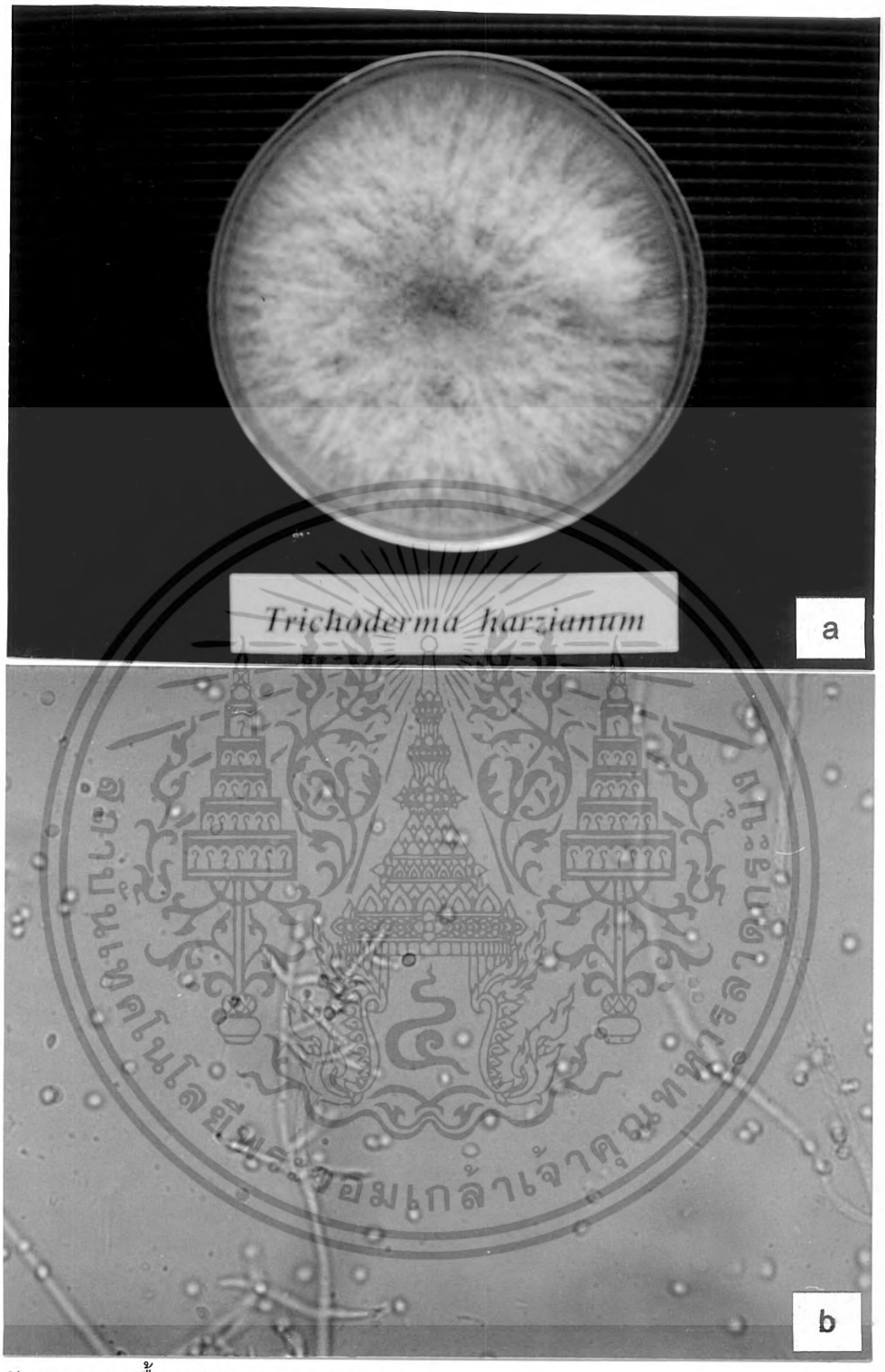
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อราที่มีประโยชน์ที่ใช้ในการทดสอบ

จากการเตรียมเชื้อรา 20 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ amylase, cellulase, protease และ ligninase ได้แก่ *Trichoderma harzianum, Trichoderma harzianum* (T-01), *T. hamatum, T. hamatum* (T-12), *Gliocladium virens, Penicillium variabile, Aspergillus oryzae, A. terreus, A. sparsus, Mucor hiemalis, M. circinellioides, Chaetomium lucknowense, Achaetomium theilaviopsis, Paecilomyces marquandii, Emericella nidulans, Emericella rugulosa, Eurotium chevalieri, Eurotium herbariorum, Humicola fuscoatra* และ *Arthrobotrys oligospora* เตรียมโดยเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ดังภาพที่ 1-20

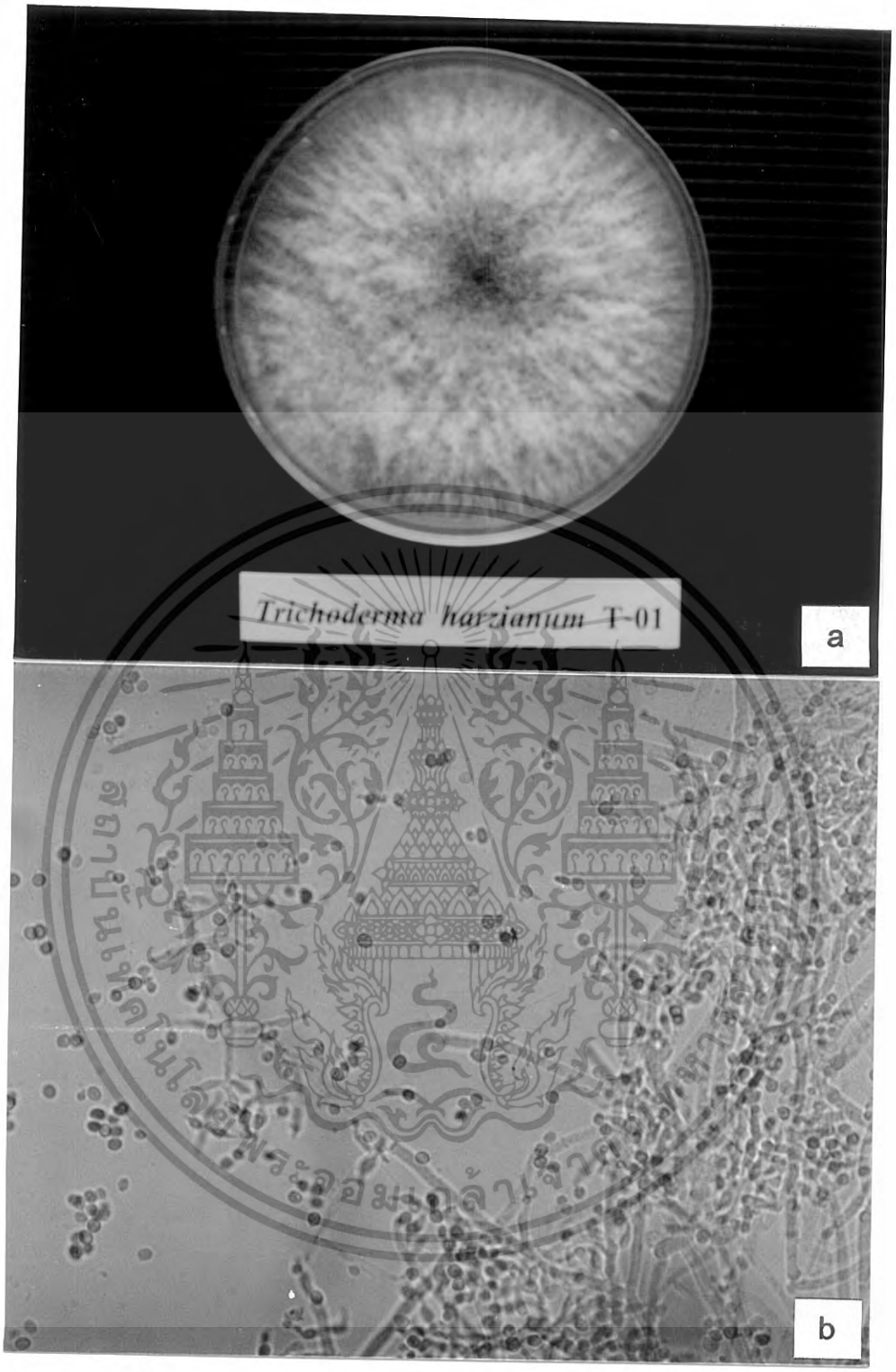
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่1 ลักษณะของเชื้อ *Trichoderma harzianum*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

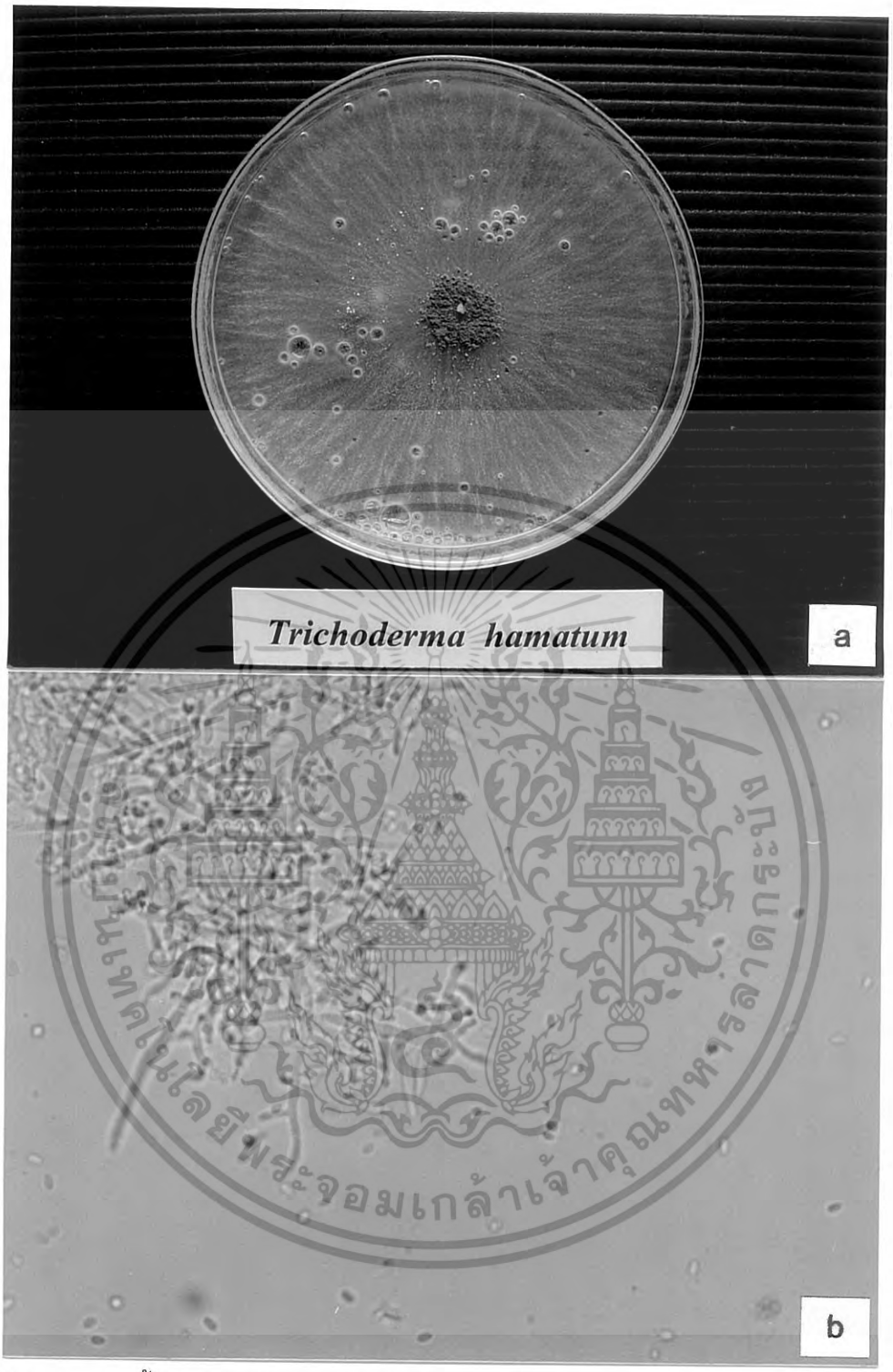
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่2 ลักษณะของเชื้อ *Trichoderma harzianum* (T-01)

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

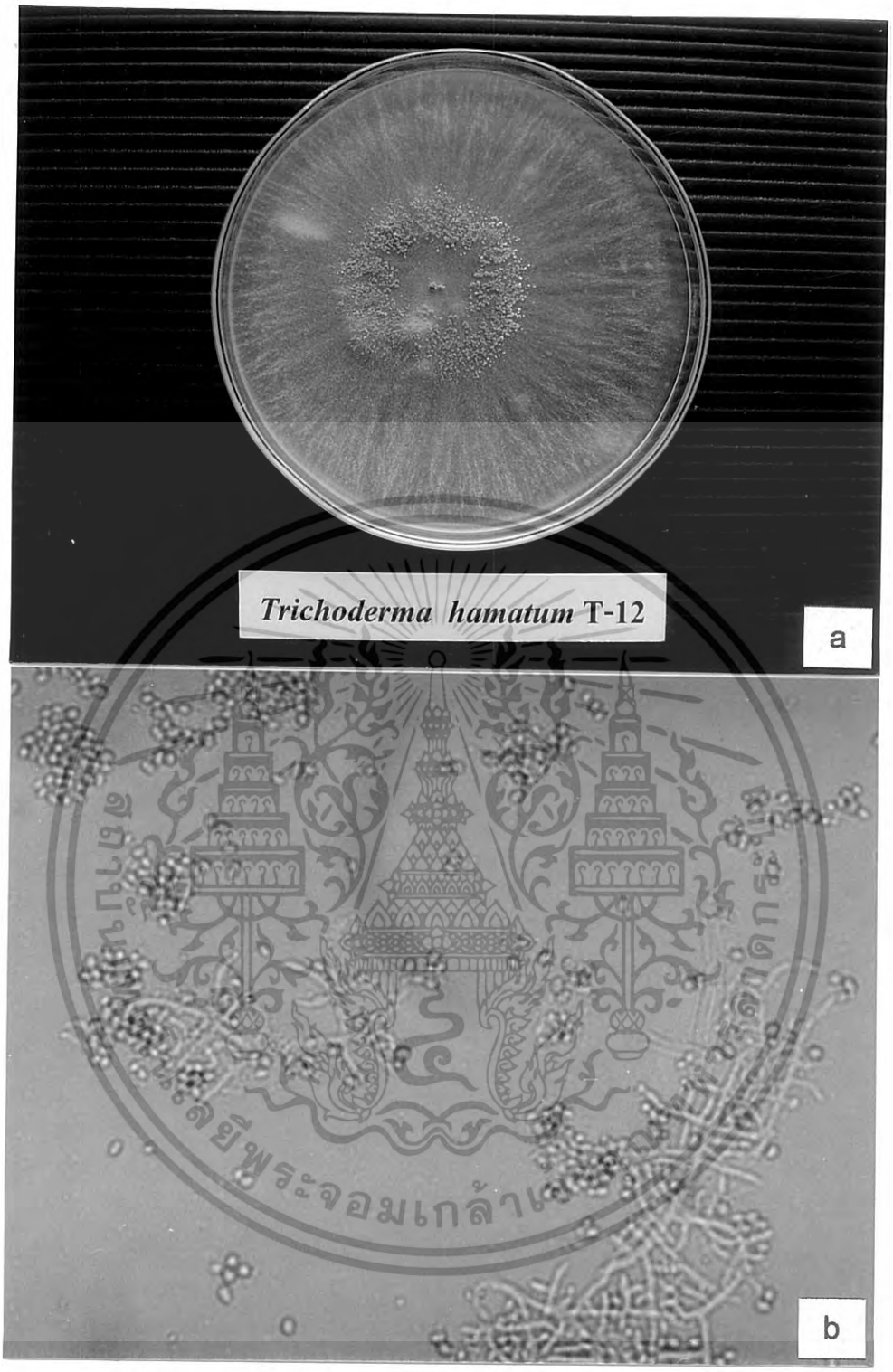
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่3 ลักษณะของเชื้อ *Trichoderma hamatum*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

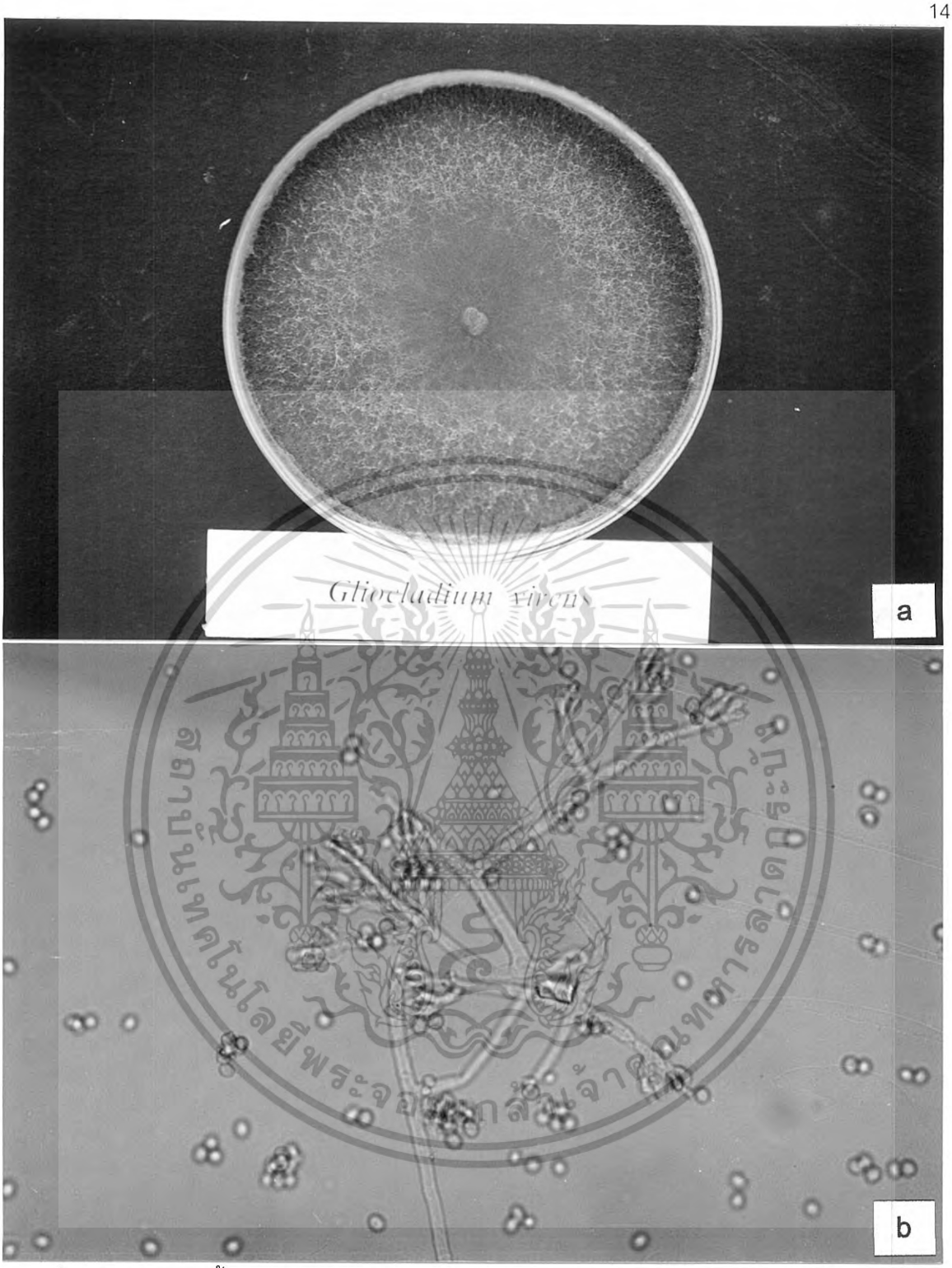
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่4 ลักษณะของเชื้อ *Trichoderma hamatum* (T-12)

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

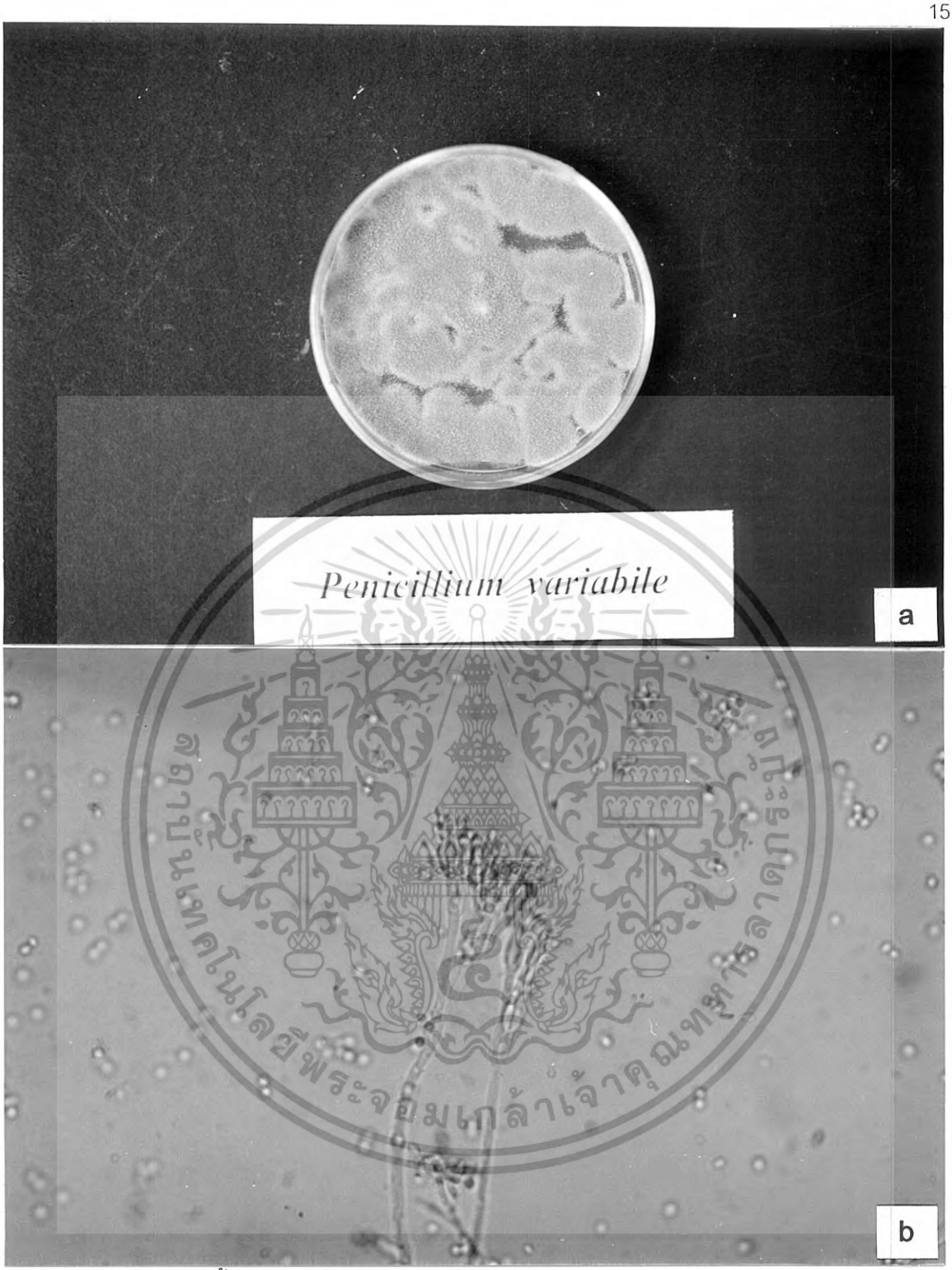
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่5 ลักษณะของเชื้อ *Gliocladium virens*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่6 ลักษณะของเชื้อ *Penicillium variabile*

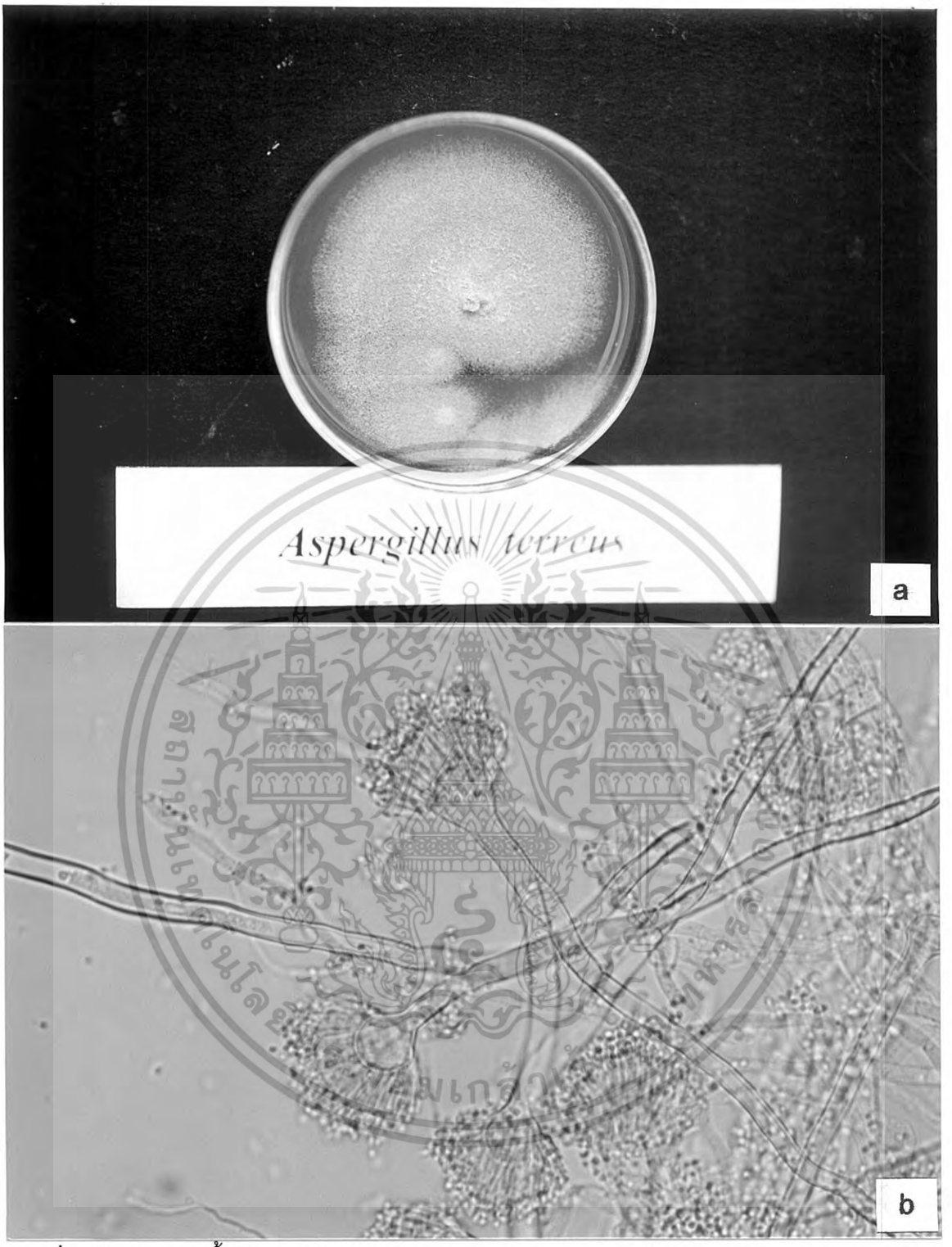
a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่7 ลักษณะของเชื้อ *Apergillus oryzae*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

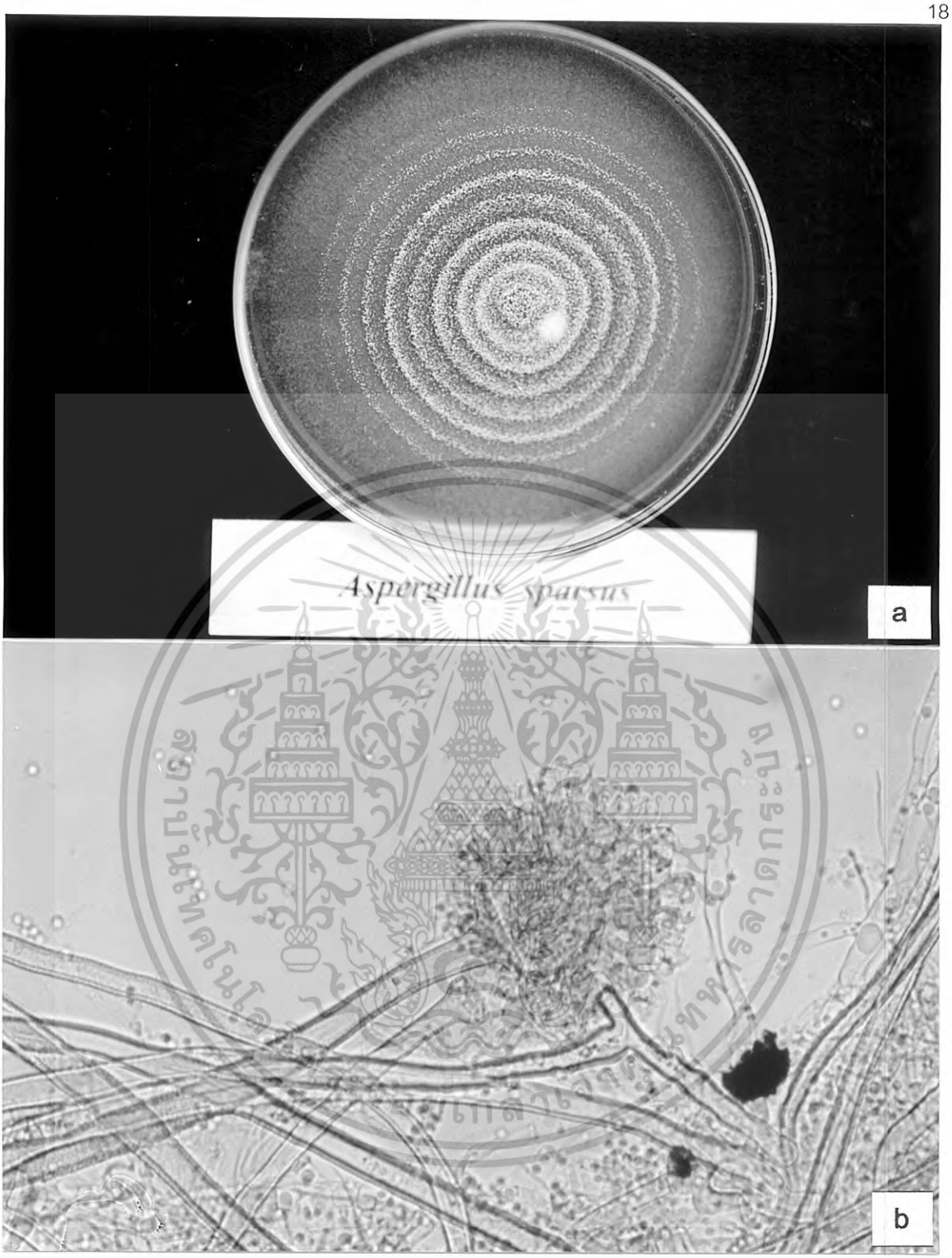
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่8 ลักษณะของเชื้อ *Apergillus terreus*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

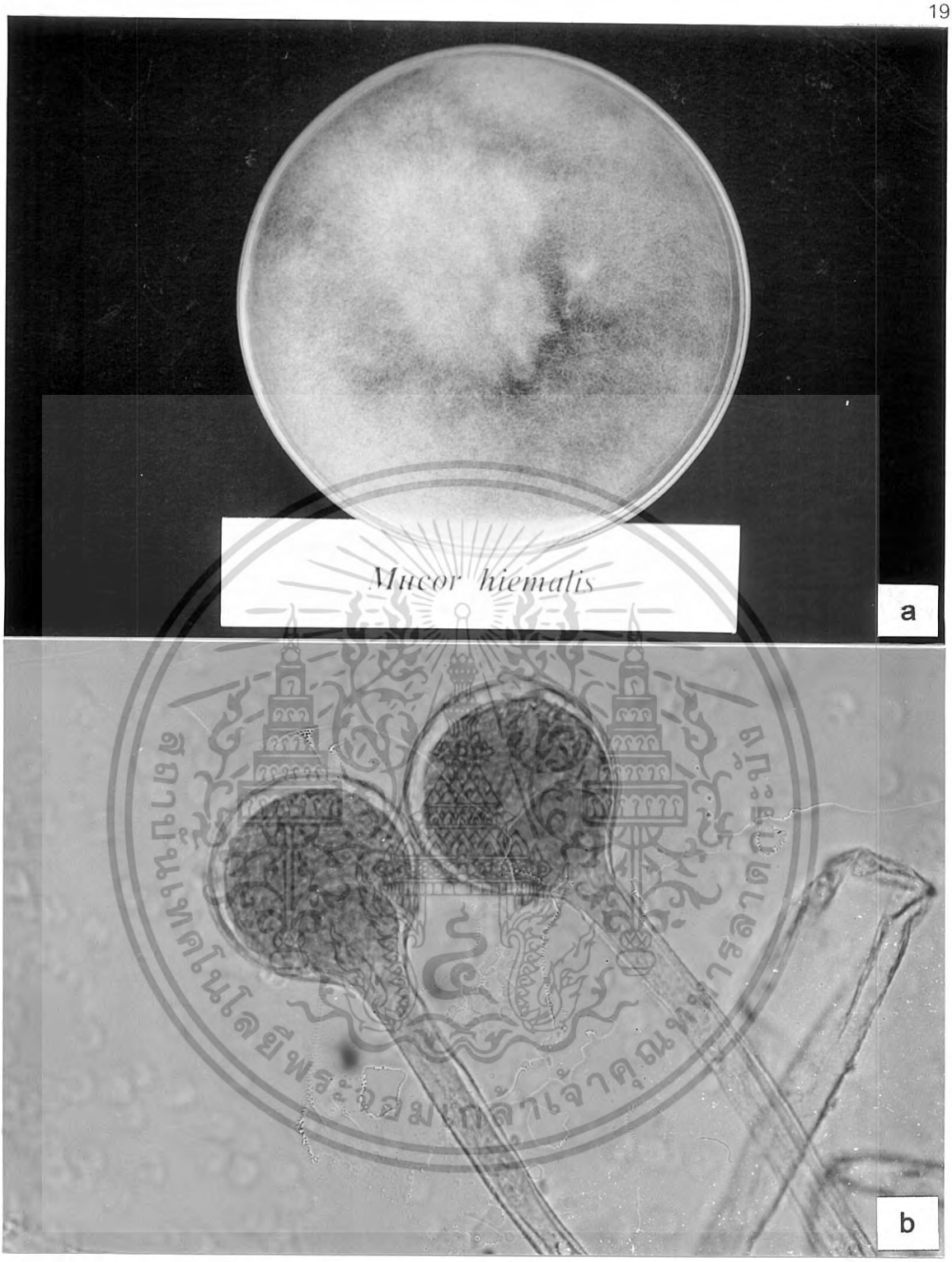
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่9 ลักษณะของเชื้อ *Apergillus sparsus*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

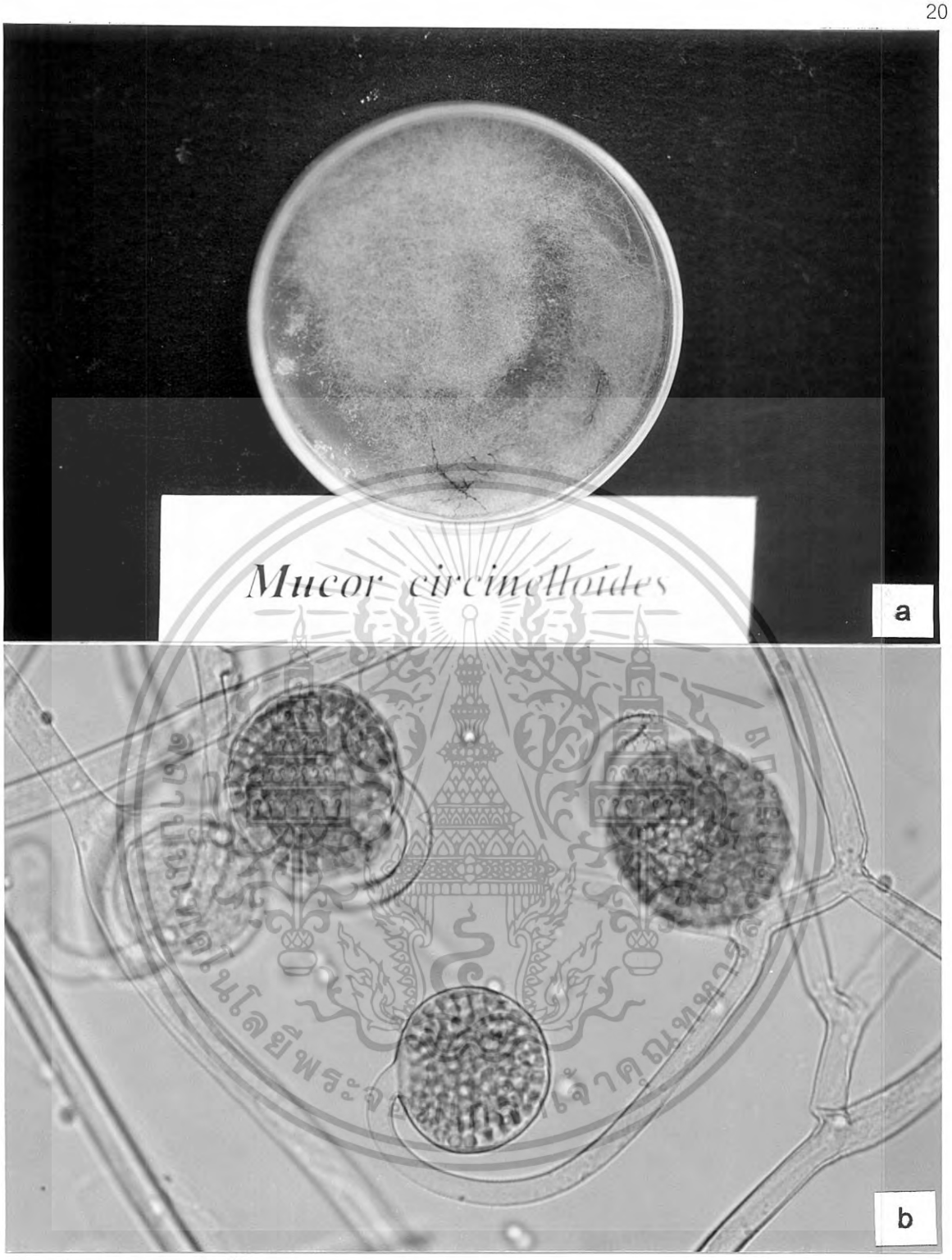
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่10 ลักษณะของเชื้อ *Mucor hiemalis*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



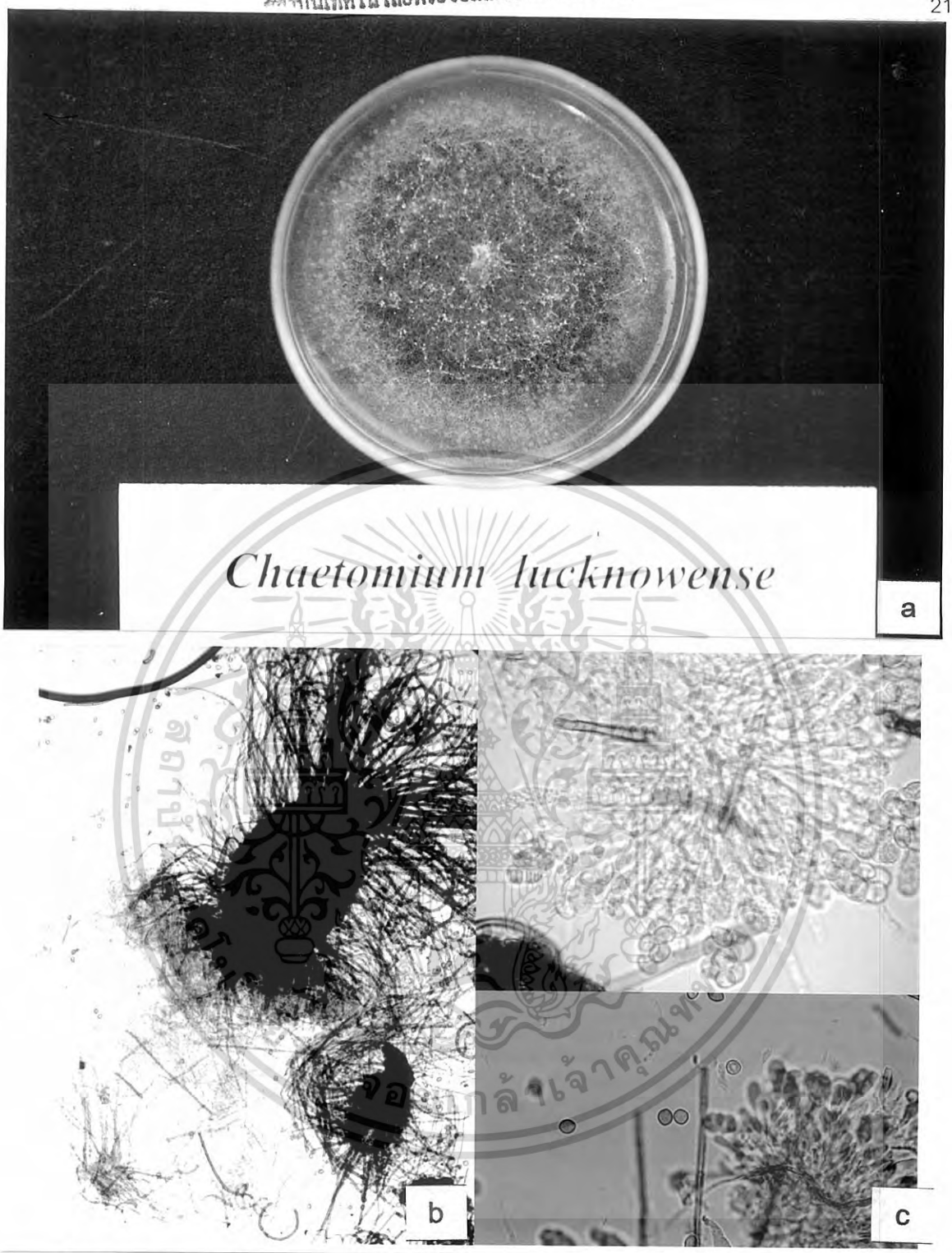
ภาพที่11 ลักษณะของเชื้อ *Mucor circinellioides*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ฉลองกรุงเทพมหานคร

20710



ภาพที่12 ลักษณะของเชื้อ *Chaetomium lucknowense*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะ perithecium (10x)

c. ลักษณะ asci และ ascospores (40x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ฉลองกรุงเทพมหานคร

ภาพที่13 ลักษณะของเชื้อ *Achaetomium theilaviopsis*

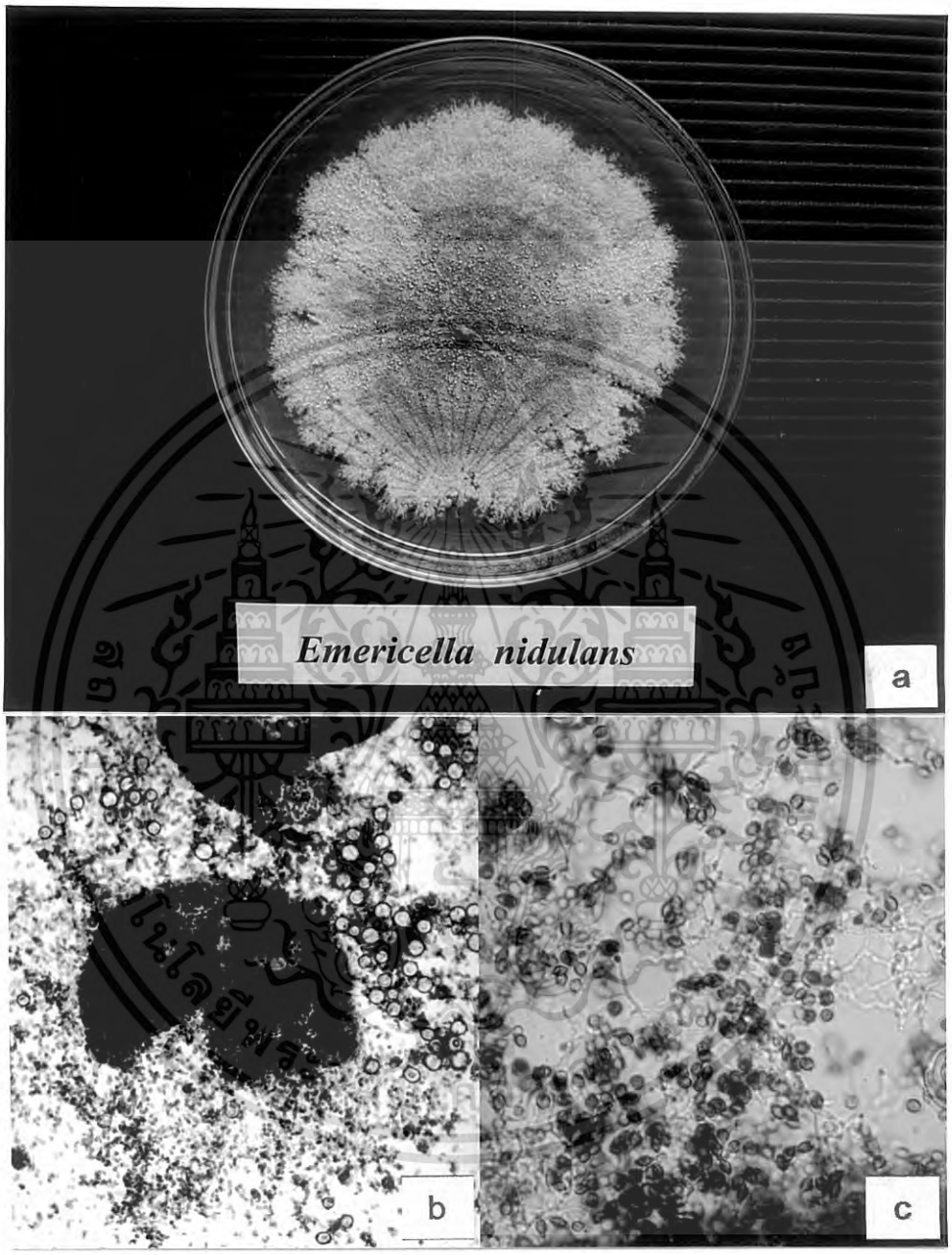
a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะ perithecium และ ascospores (10x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่14 ลักษณะของเชื้อ *Paecilomyces marquandii*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

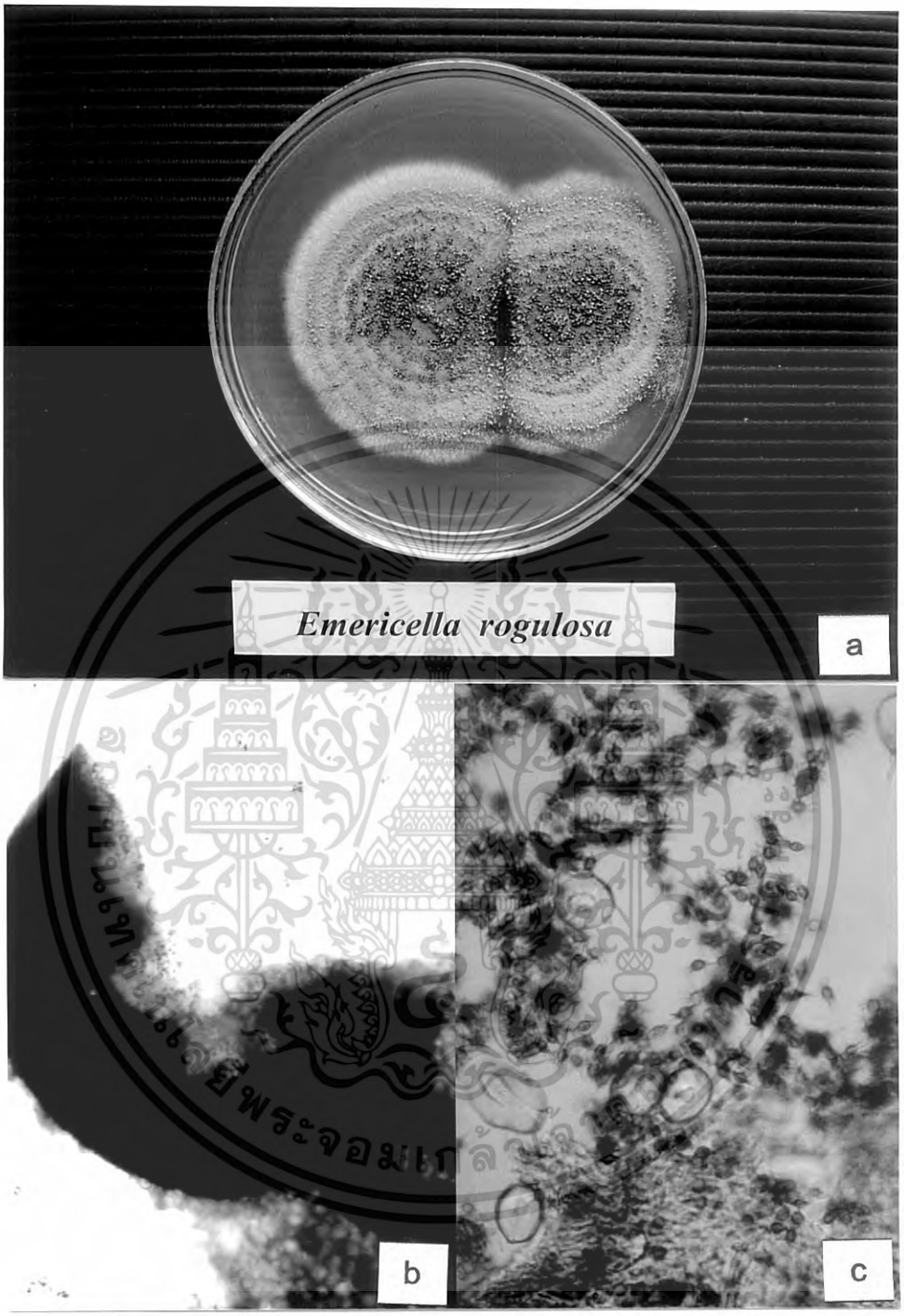


ภาพที่15 ลักษณะของเชื้อ *Emericella nidulans*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะ cleistothecium (10x)

c. ลักษณะ ascospores (40x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

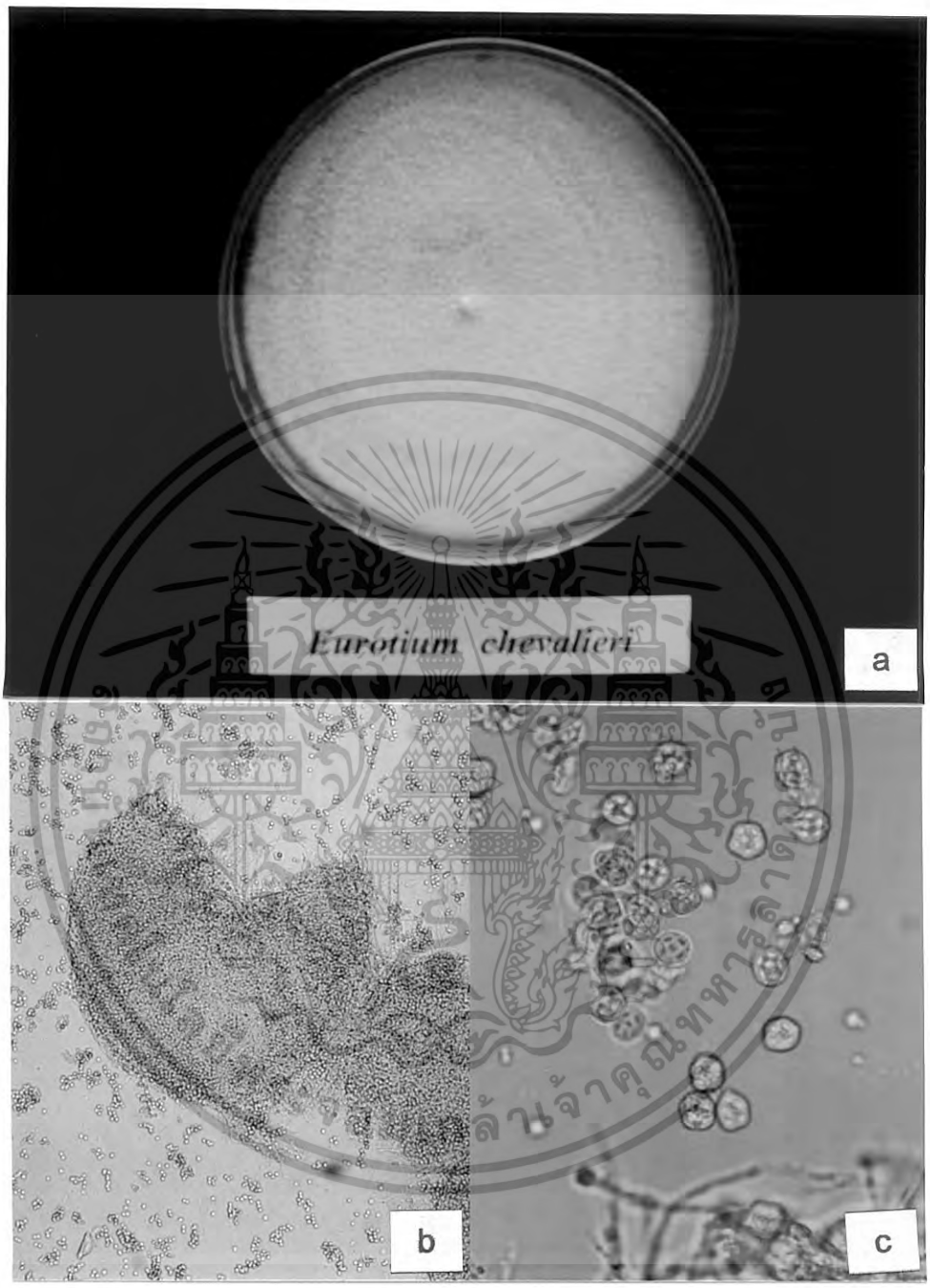


ภาพที่16 ลักษณะของเชื้อ *Emericella rugulosa*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะ cleistothecium (10x)

c. ลักษณะ ascospores (40x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

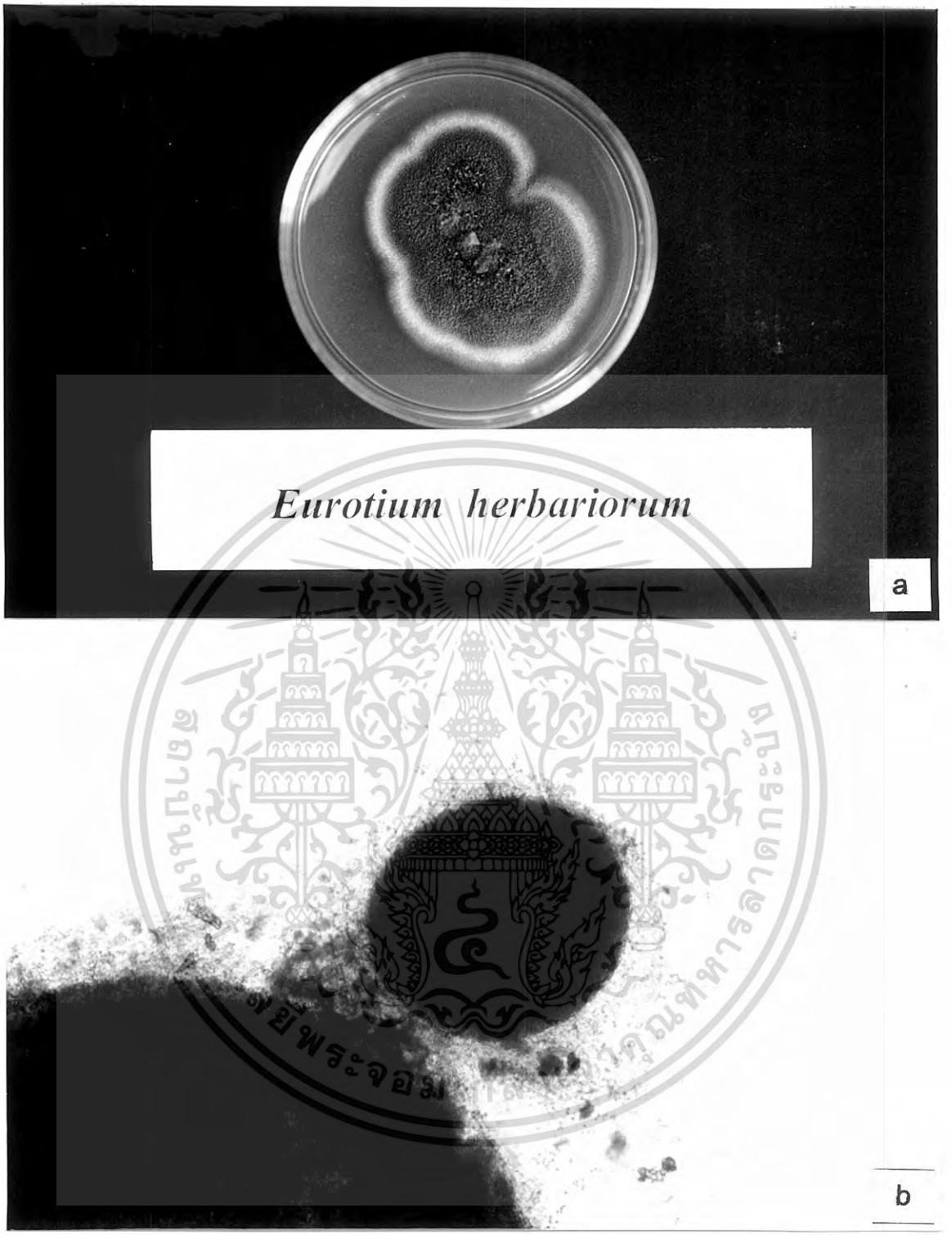


ภาพที่17 ลักษณะของเชื้อ *Eurotium chevalieri*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะcleistothecium (10x)

c. ลักษณะ ascospores (40x)

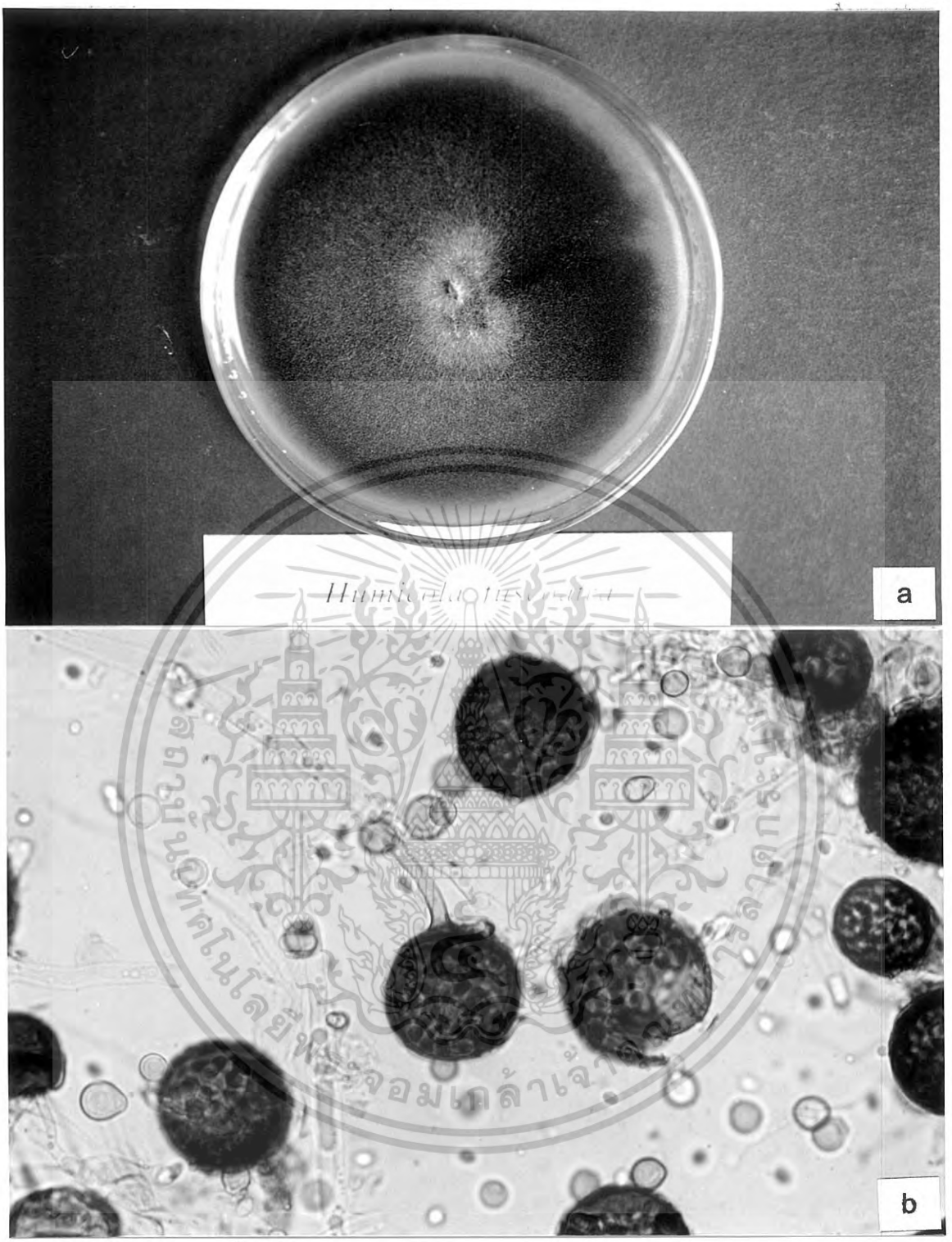
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่18 ลักษณะของเชื้อ *Eurotium herbariorum*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะ cleistothecium (10x)

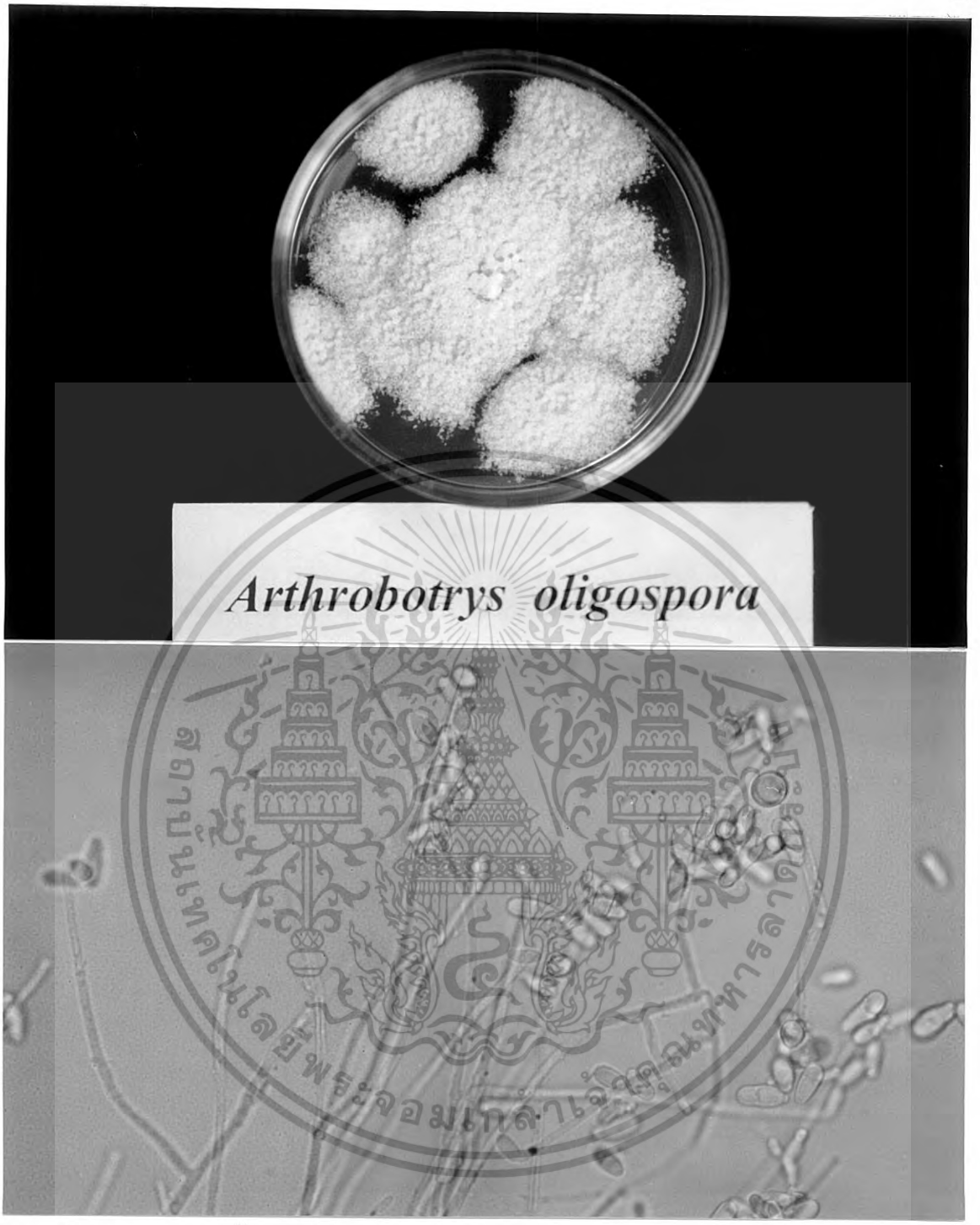
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่19 ลักษณะของเชื้อ *Humicola fuscoatra*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่20 ลักษณะของเชื้อ *Arthrobotrys oligospora*

a. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA b. ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ amylase, cellulase, protease **และ** ligninase

2.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ amylase

จากการเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์บนอาหาร starch agar แล้วทำการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ amylase โดยการสังเกตการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแป้งกับสารละลายไอโอดีน พบว่ามีเชื้อรา 16 สายพันธุ์ที่ให้ผลเป็น + positive คือบริเวณรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อราทดสอบไม่มีการเปลี่ยนสีเนื่องจากเชื้อราทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์ amylase มาย่อยแป้งได้ทำให้ไม่มีแป้งที่จะมาทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีม่วง ได้แก่ เชื้อ *T. hamatum, T. hamatum (T-12), ,Penicillium variabile, Aspergillus oryzae, A. terreus, A. sparsus, , Mucor hiemalis, M. circinelloides, Cheatomium lucknowense, Achaetomium theilaviopsis, Paecilomyces marquandii, Emericella nidulans, Emericela rugulosa, Eurotium chevalieri, Eurotium herbariorum* และ *Arthrobotrys oligospora* ดังตารางที่ 1 และเชื้อรา 4 สายพันธุ์ที่ให้ผลเป็น – negative คือ เมื่อตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ amylase ด้วยสารละลายไอโอดีนแล้วพบว่าเกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างแป้งกับไอโอดีนเกิดเป็นสีม่วงรอบๆ โคโลนีของเชื้อราทดสอบแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยแป้งที่อยู่ในอาหารได้ ได้แก่เชื้อ *T. harzianum, T. harzianum* (T-01), *Gliocladium virens* และ *Humicola fuscoatra* ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 21-40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่1 ผลการศึกษาการสร้าง extracellular degrative enzymes ของเชื้อรา 20 สายพันธุ์

เชื้อราที่มีประโยชน์	การสร้างเอนไซม์			
	Amylase[1/]	Cellulase[2/]	Protease[3/]	Ligninase[4/]
T. harzianum	-	++	+	+
T. harzianum(T-01)	-	++	+	+
T. hamatum	+	+	-	+
T. hamatum (T-12)	+	+	-	+
Gliocladium virens	-	+	-	+
Penicillium variabile	+	+	-	-
Aspergillus oryzae	+	++	+	-
A. terreus	+	+	+	-
A. spasus	+	+	+	+
Mucor hiemalis	+	+	-	+
M. circinelloides	+	+	-	+
Cheatomium lucknowense	+	+	+	+
Achaetomium theilaviopsis	+	+	+	+
Paecilomyces marquandii	+	+++	+	+
Emericella nidulans	+	+	+	+
Emericella rugulosa	+	-	+	+
Eurotium chevalieri	+	-	+	-
Eurotium herbariorum	+	++	+	+
Humicola fuscoatra	-	-	+	+
Arthrobotrys oligospora	+	+	+	+

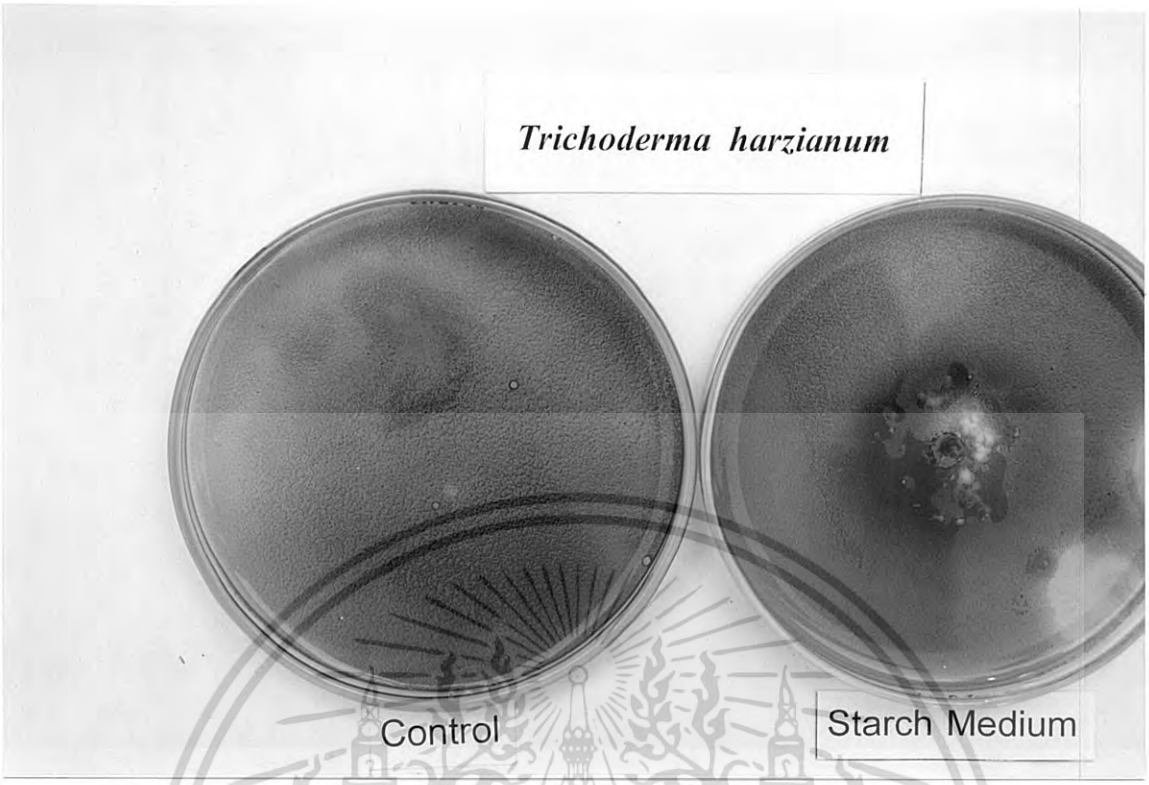
[1/] การสร้างเอนไซม์ amylase: + = positive บริเวณรอบโคโลนีไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วง
- = negative บริเวณรอบโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีม่วง

[2/] การสร้างเอนไซม์ cellulase: + = low positive มีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ control
++ = medium positive มีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ปานกลางเมื่อเทียบกับ control
+++ = high positive กิจกรรมการสร้างเอนไซม์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ control
- = negative ไม่มีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับ control

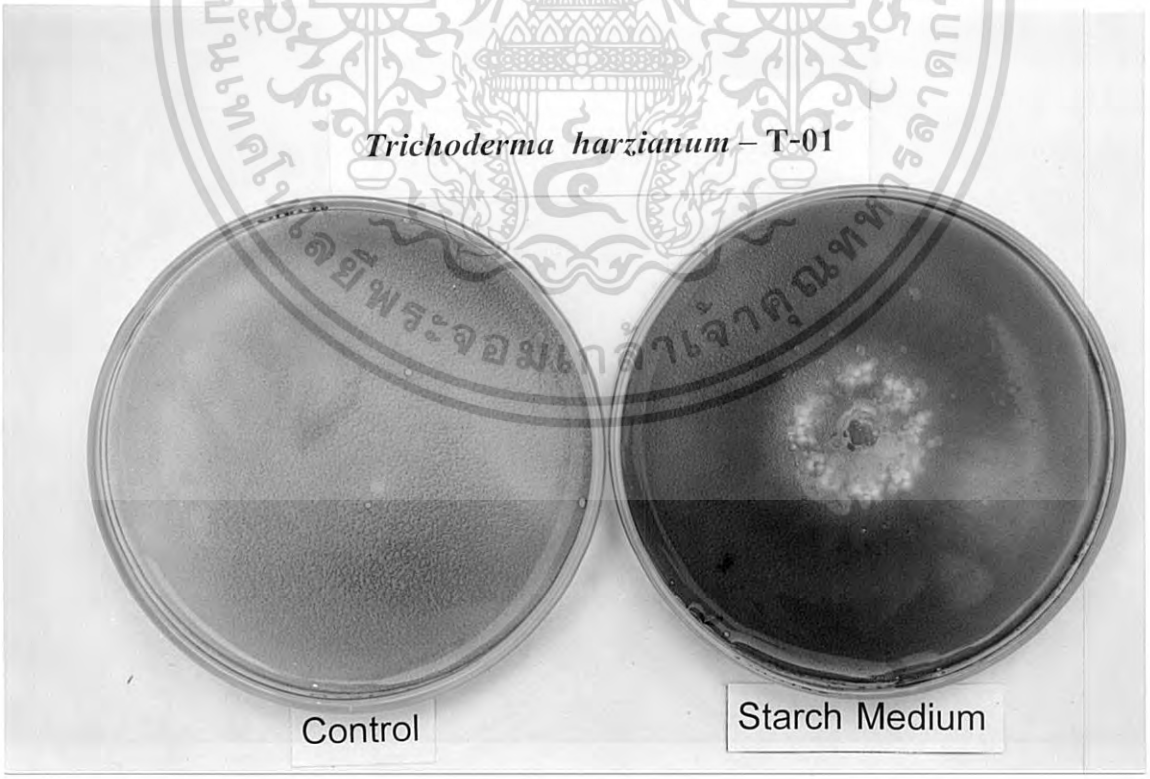
[3/] การสร้างเอนไซม์ protease: + = positive เกิด clear zone รอบโคโลนี
- = negative ไม่เกิด clear zone รอบโคโลนี

[4/] การสร้างเอนไซม์ ligninase: + = positive เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองทอง-น้ำตาลเข้ม
- = negative ไม่เกิดปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

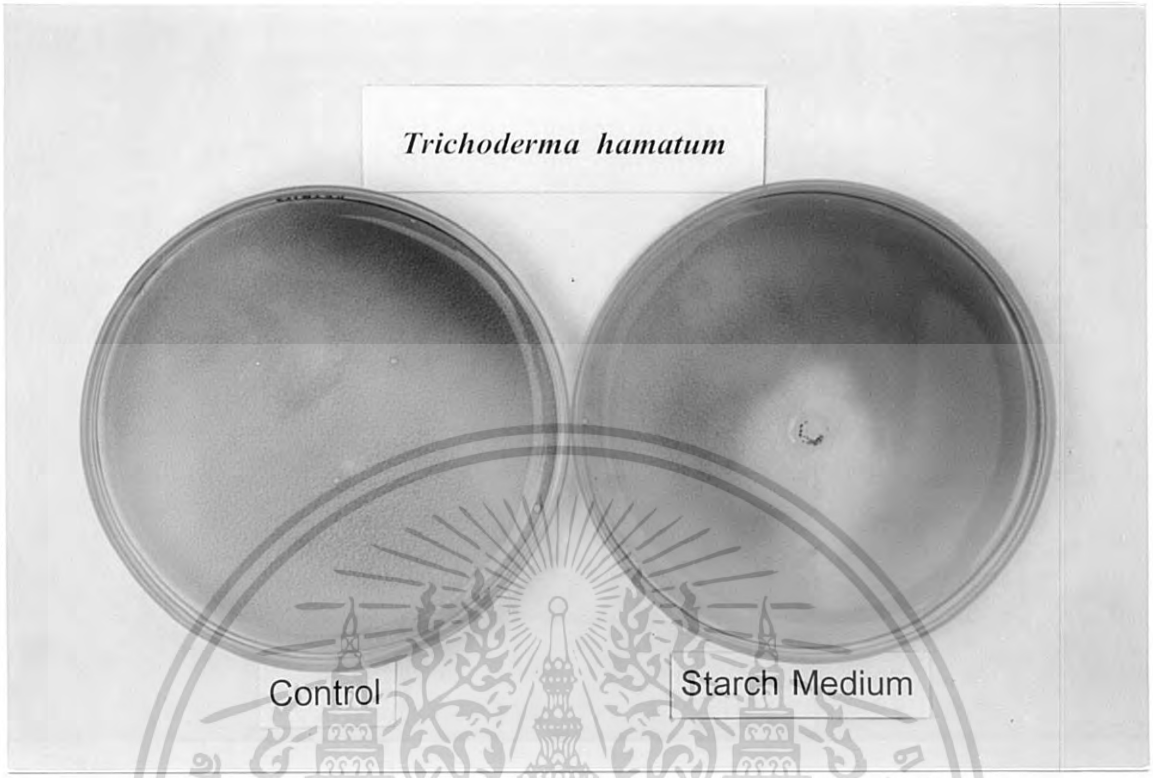


ภาพที่21 การไม่สร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Trichoderma harzianum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

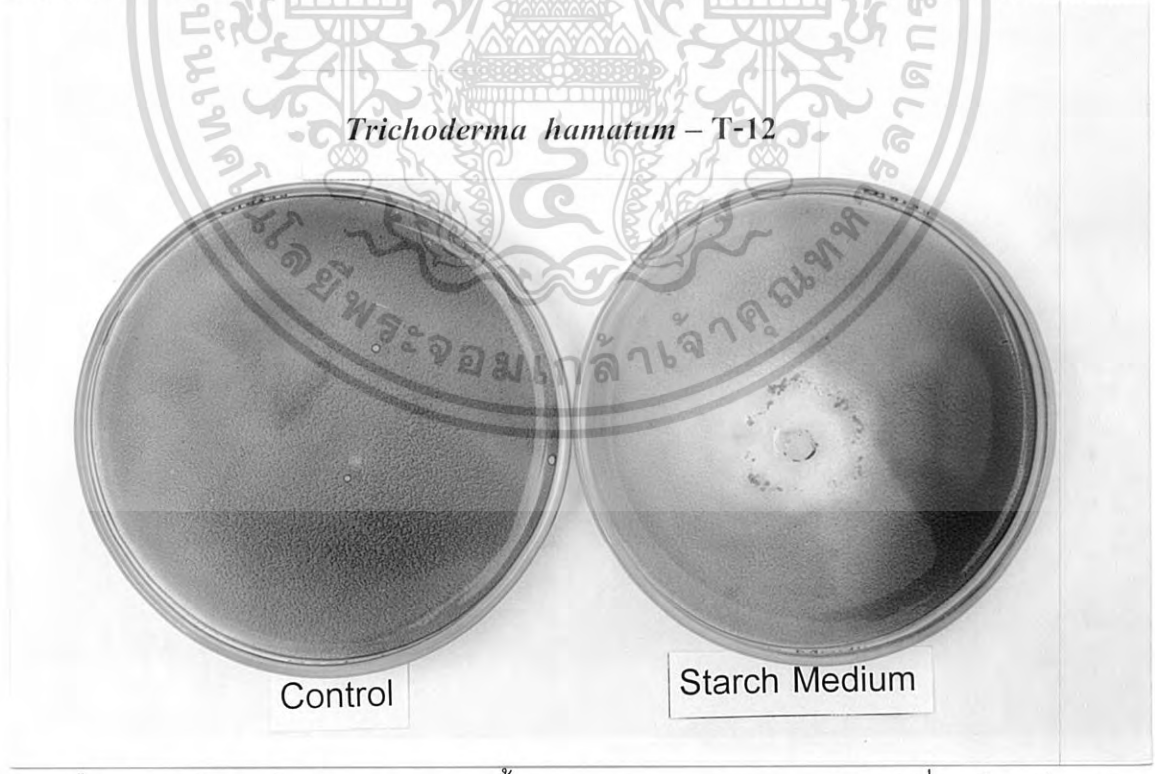


ภาพที่22 การไม่สร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Trichoderma harzianum* (T-01) เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

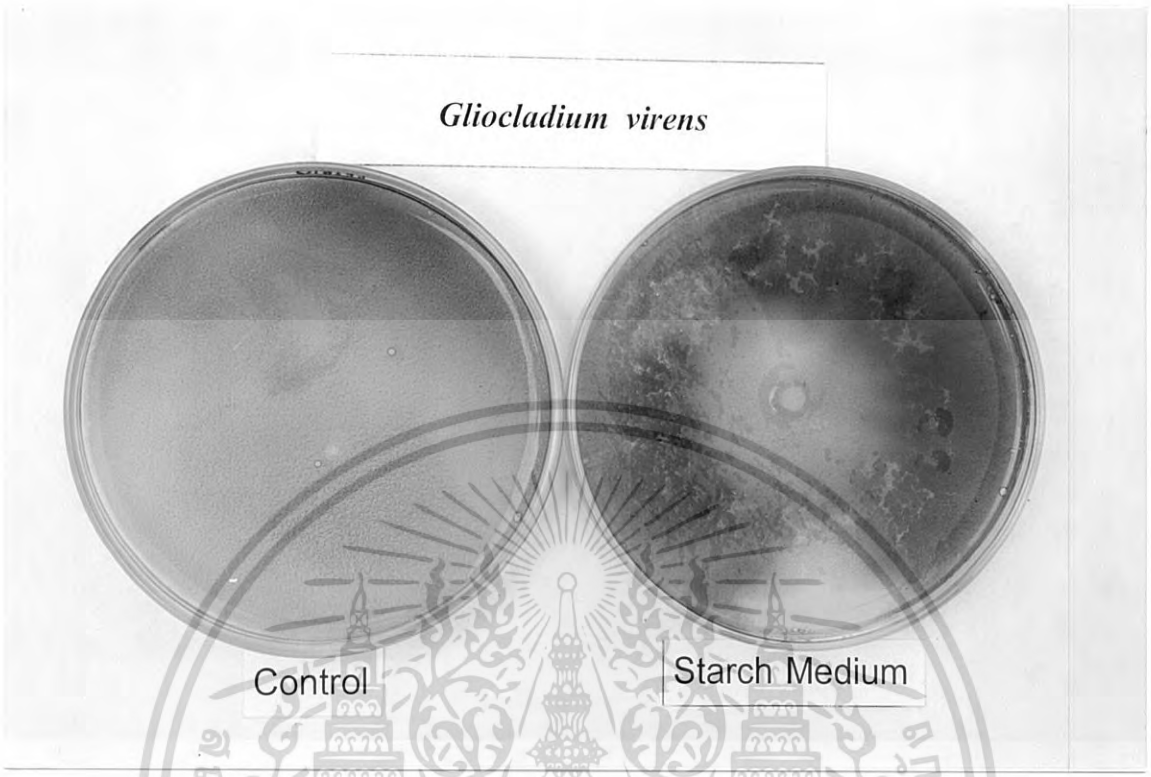


ภาพที่23 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Trichoderma hamatum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

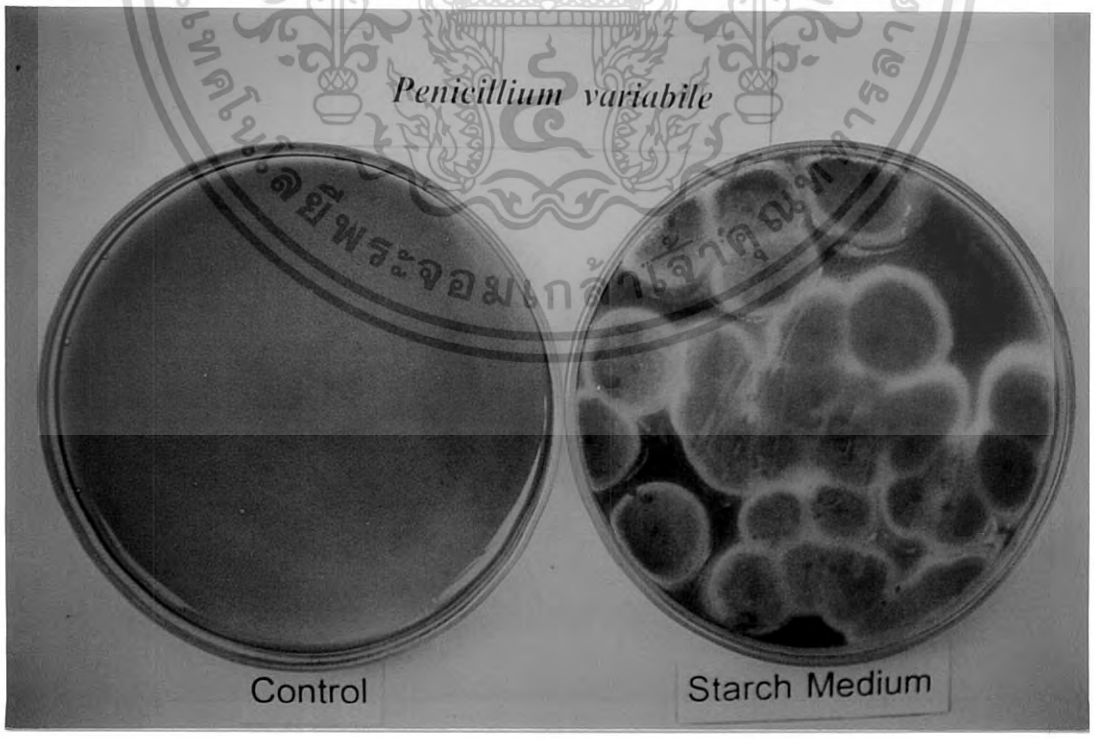


ภาพที่24 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Trichoderma hamatum* (T-12)เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

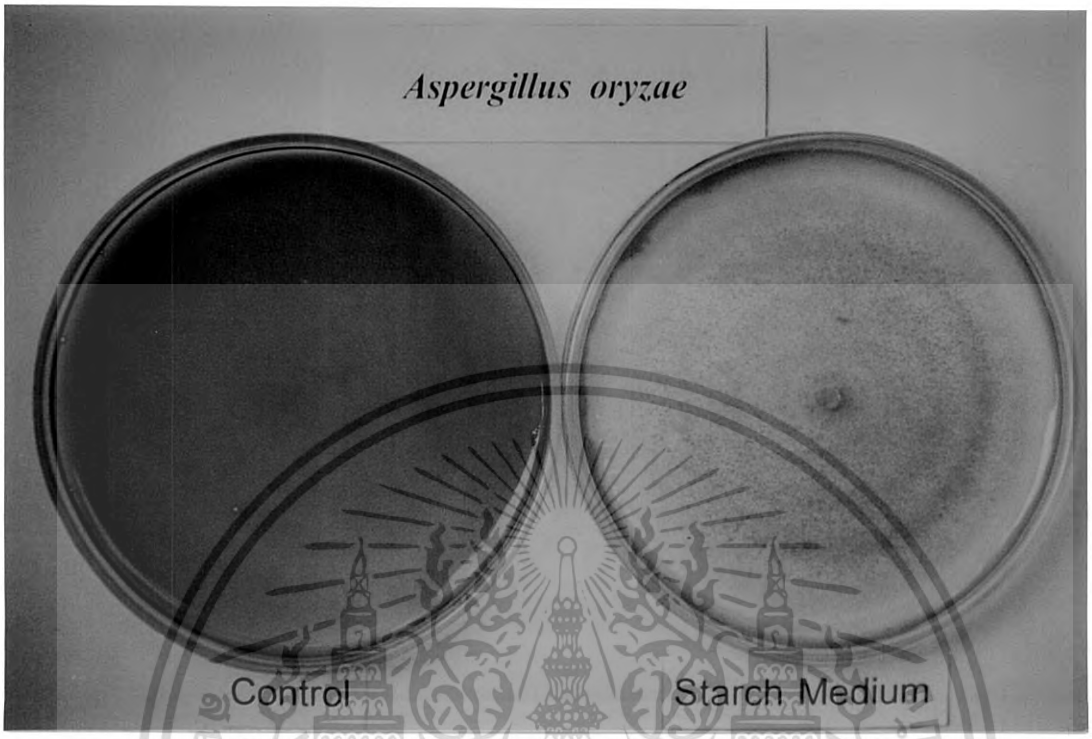


ภาพที่25 การไม่สร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Gliocladium virens* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

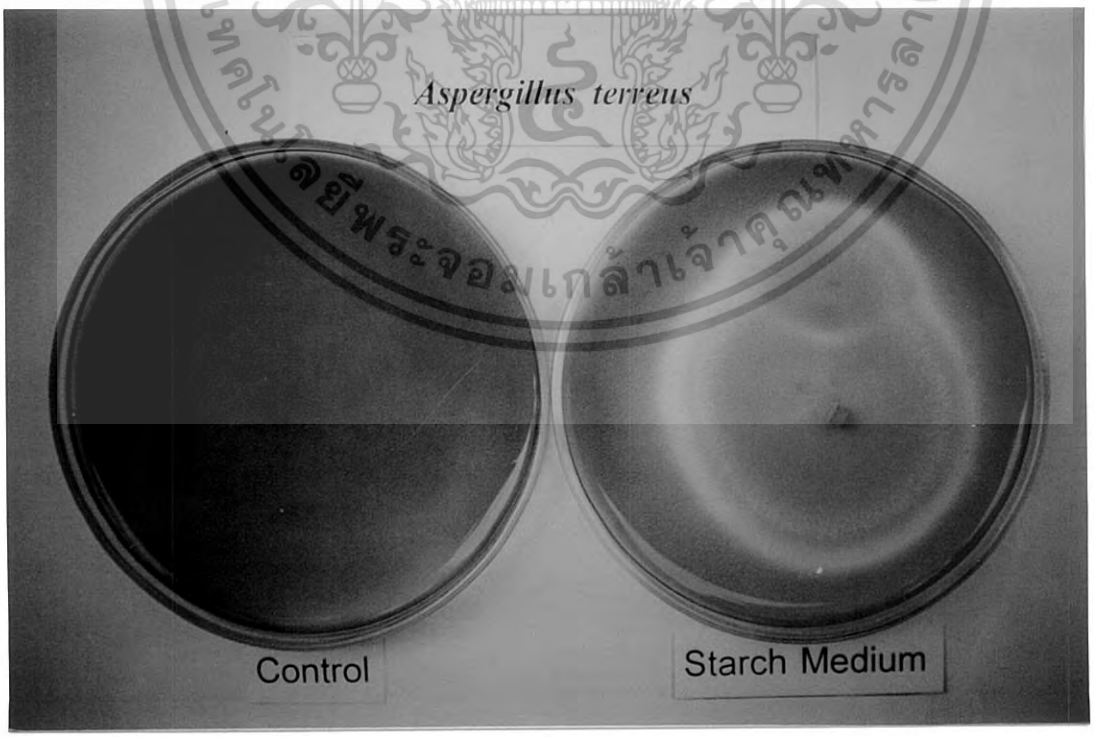


ภาพที่26 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Penicillium variabile* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

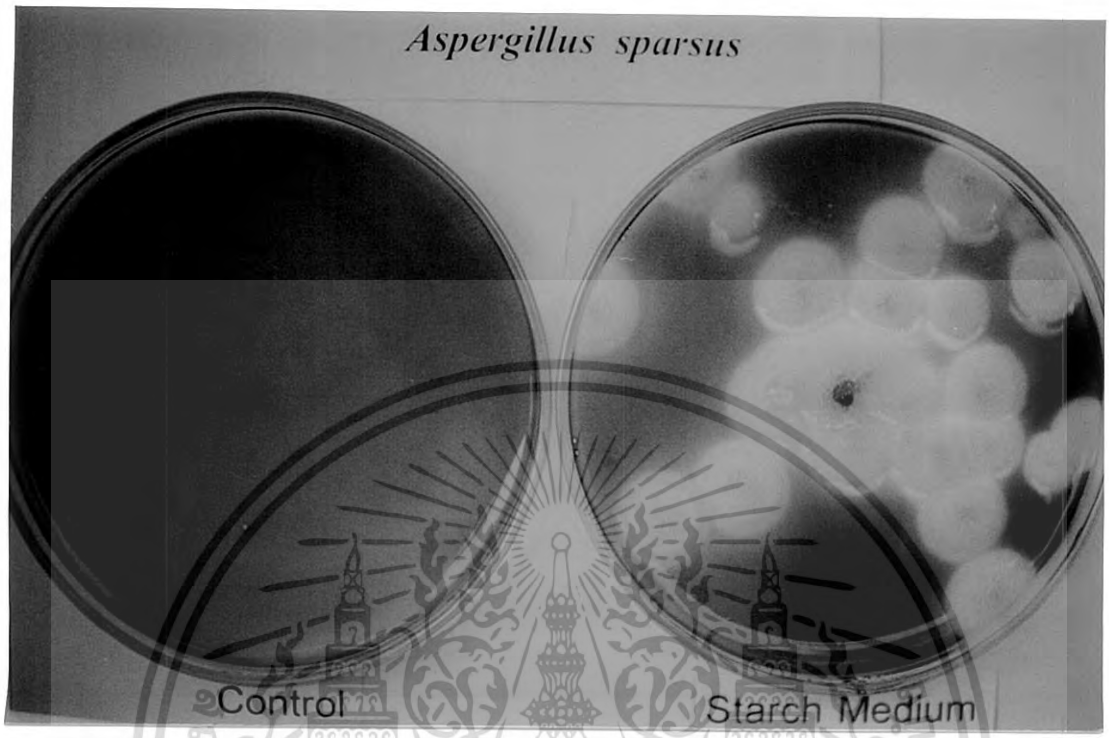


ภาพที่27 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

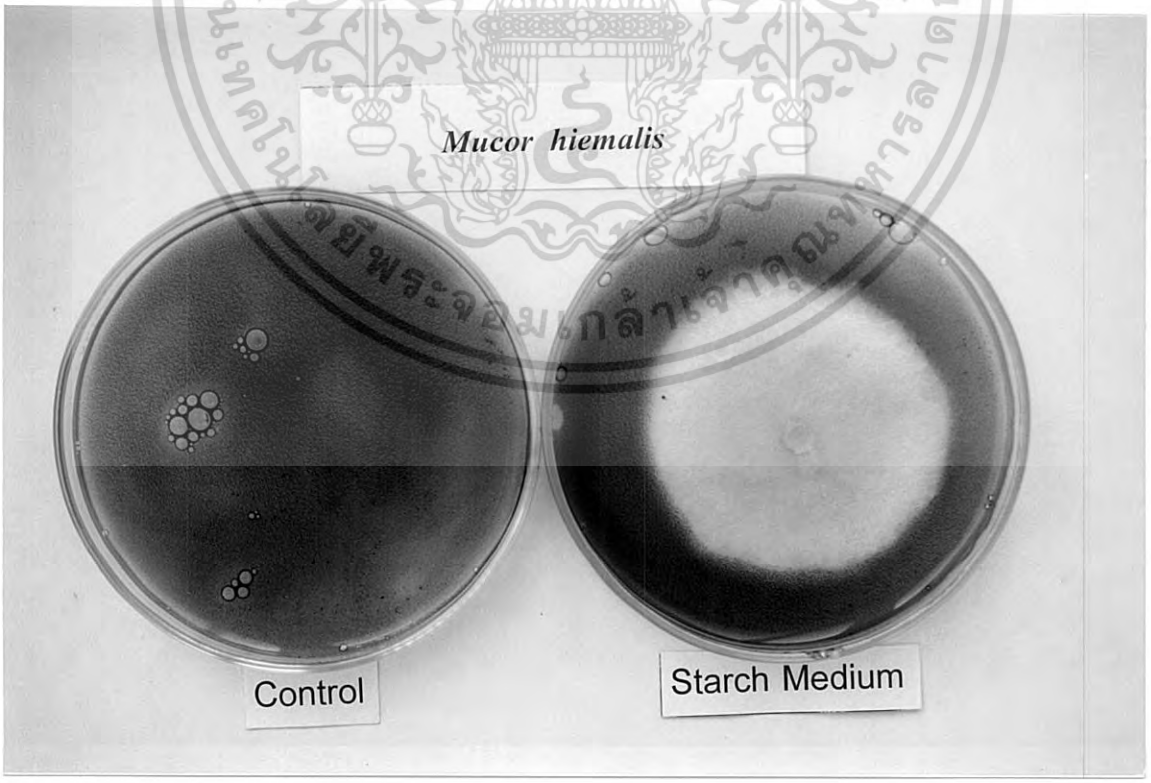


ภาพที่28 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Aspergillus terreus* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

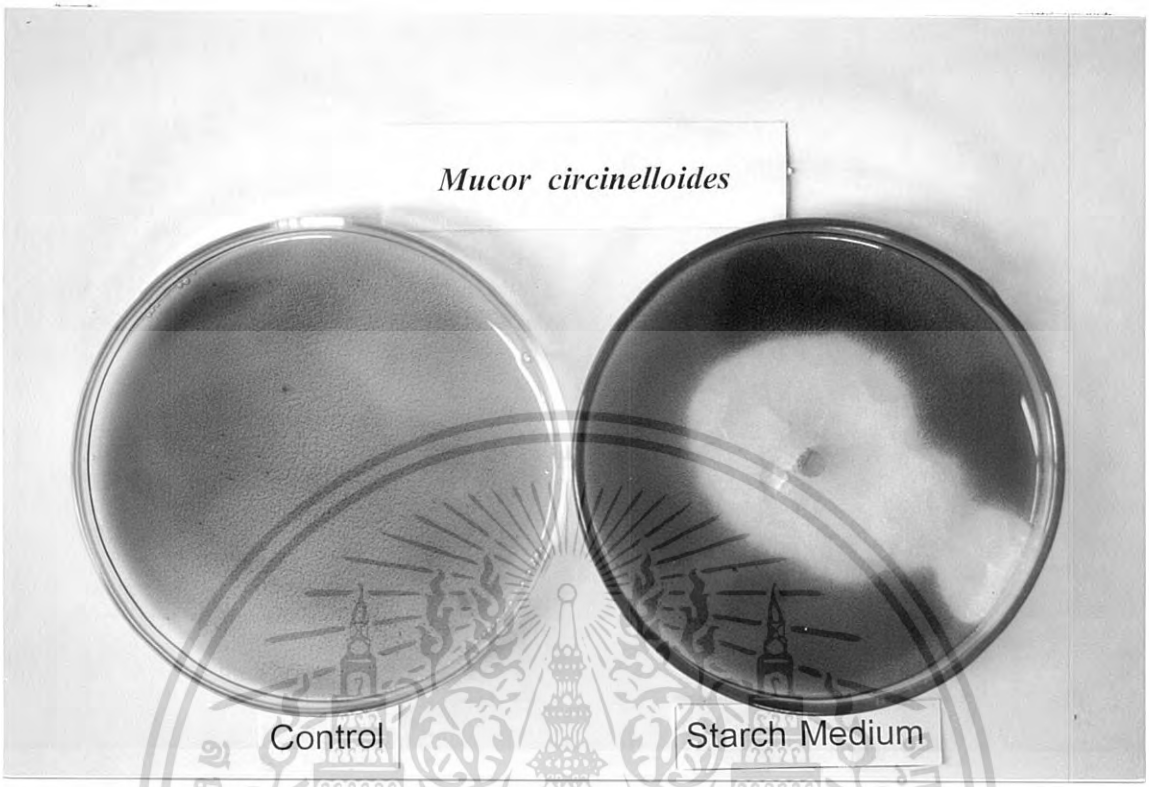


ภาพที่29 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Aspergillus sparsus* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

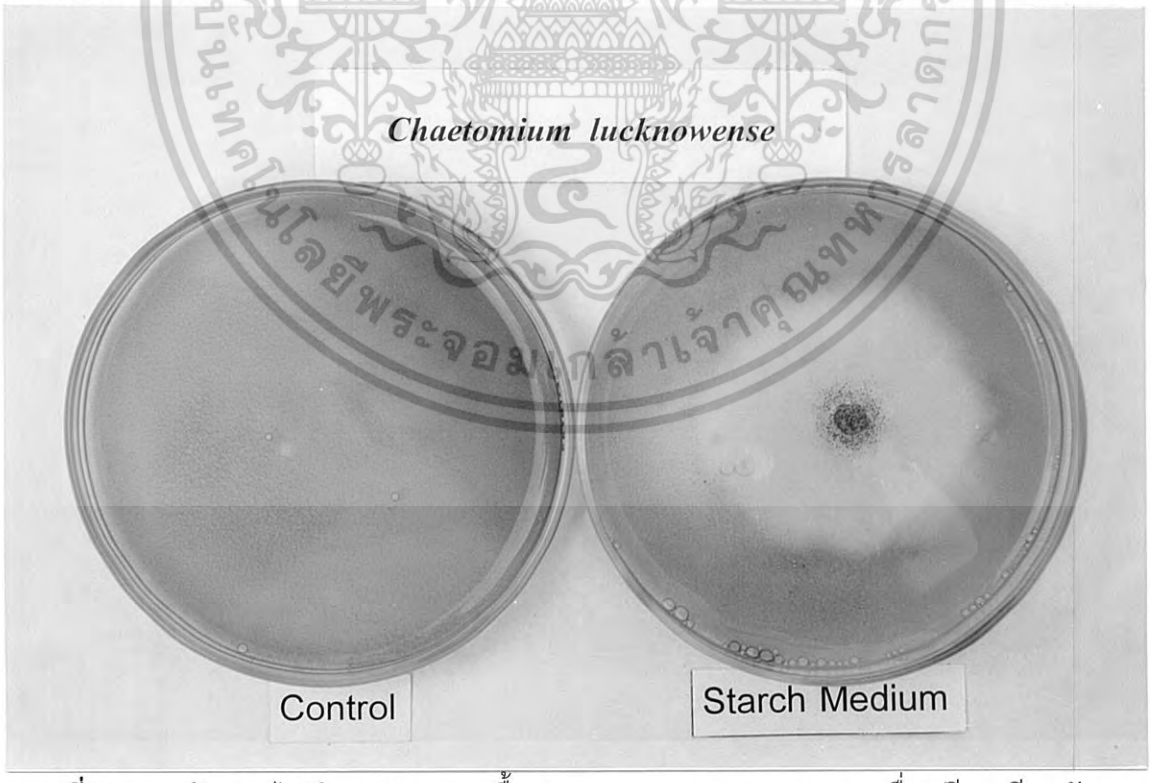


ภาพที่30 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Mucor hiemalis* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

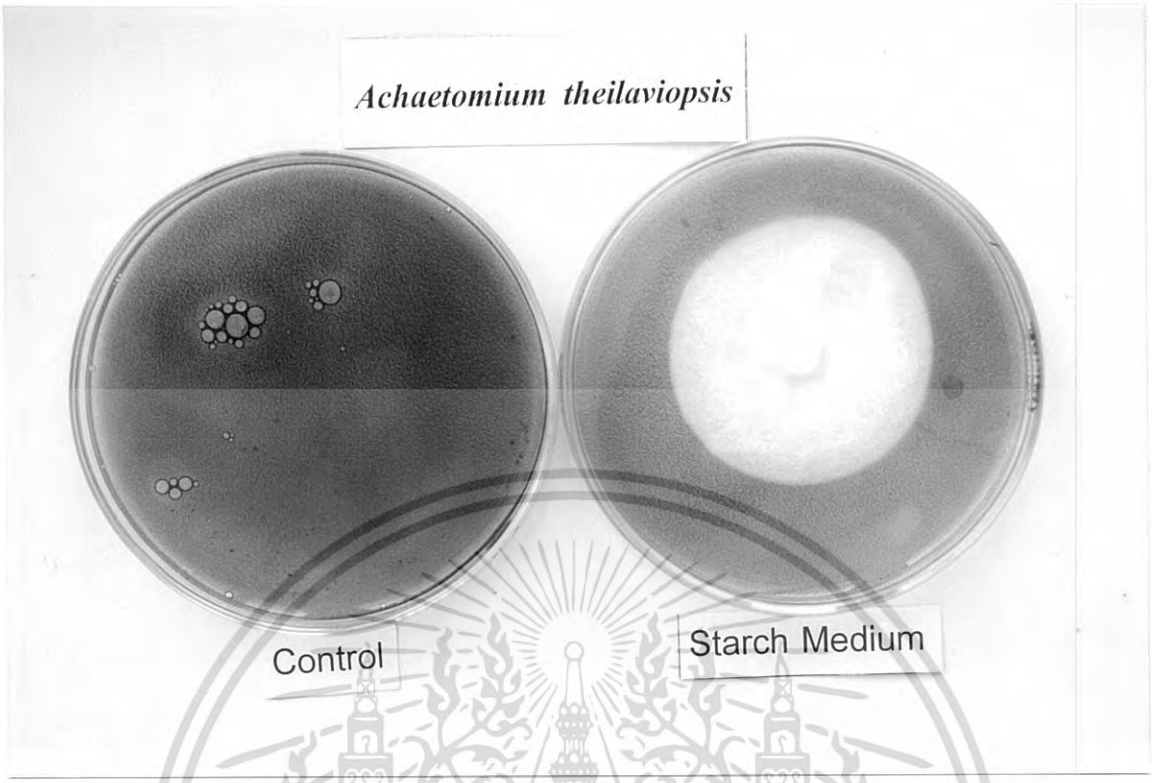


ภาพที่31 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Mucor circinelioides* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

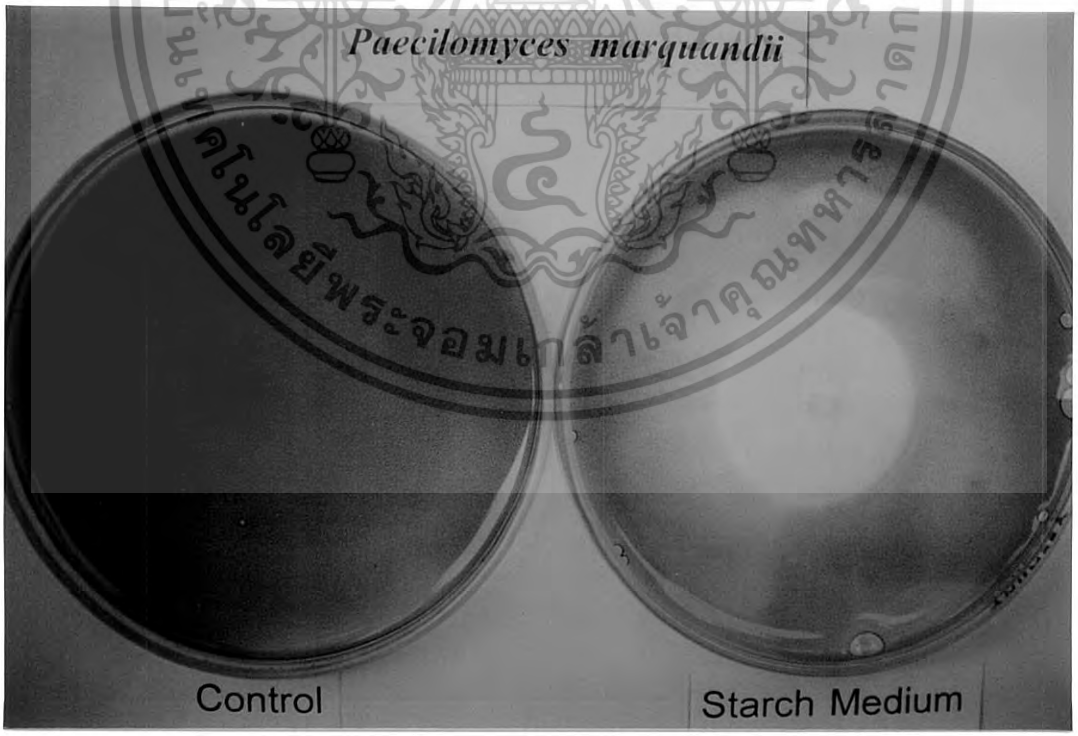


ภาพที่32 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Chaetomium lucknowense* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

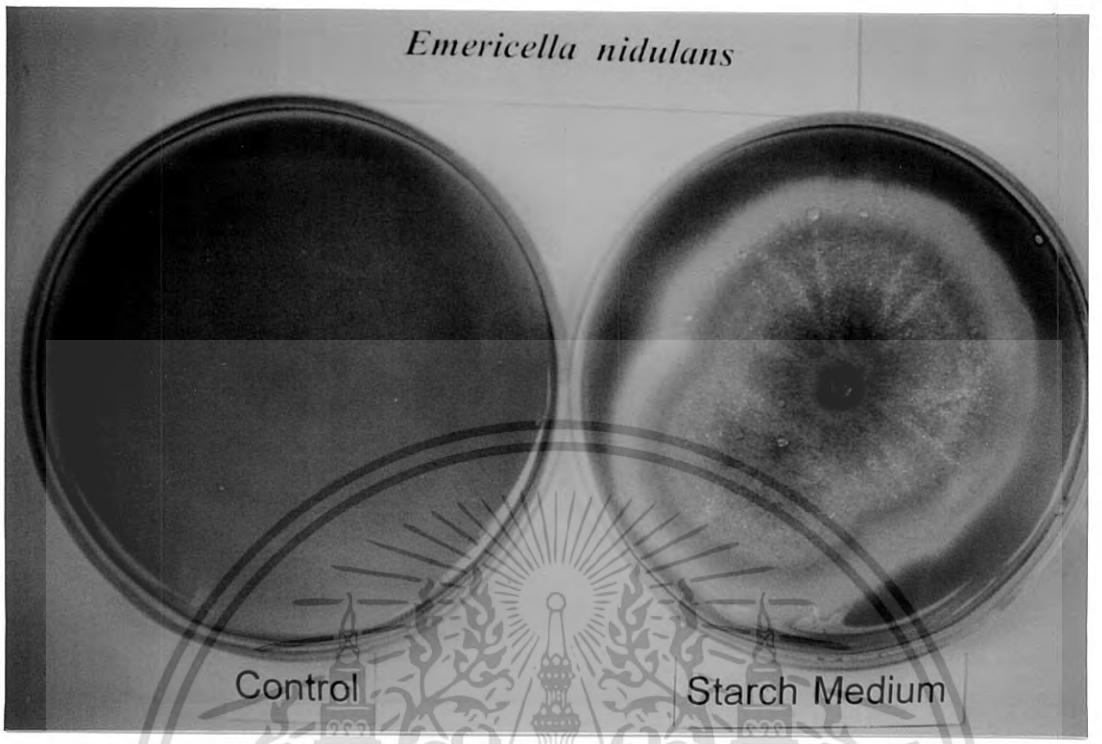


ภาพที่33 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Achaetomium theilaviopsis* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

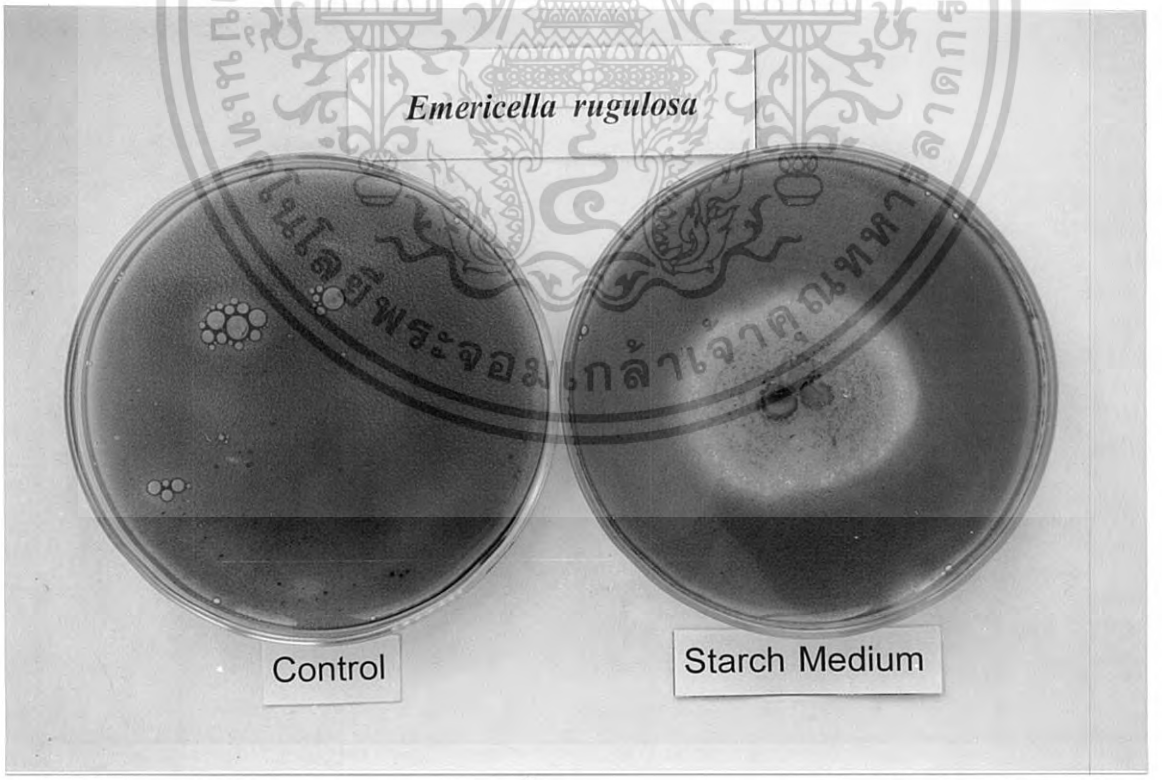


ภาพที่34 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Paecilomyces marquandii* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

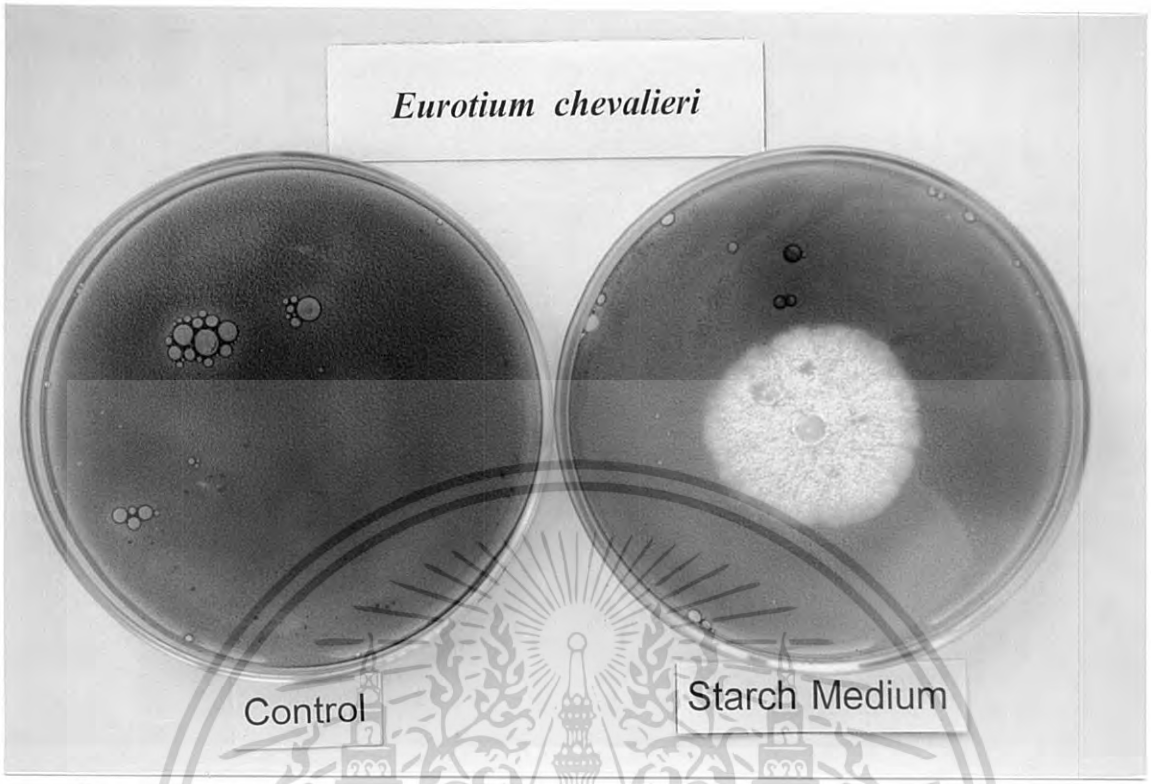


ภาพที่35 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Emericella nidulans* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

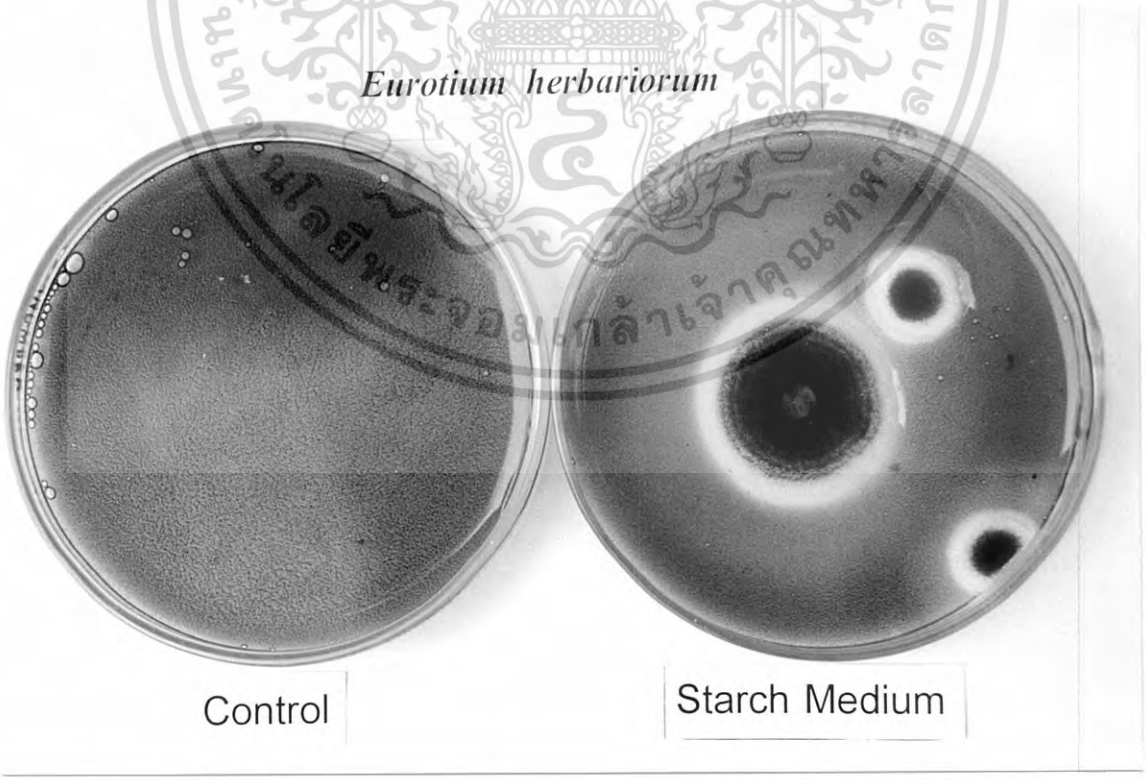


ภาพที่36 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Emericella rugulosa* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

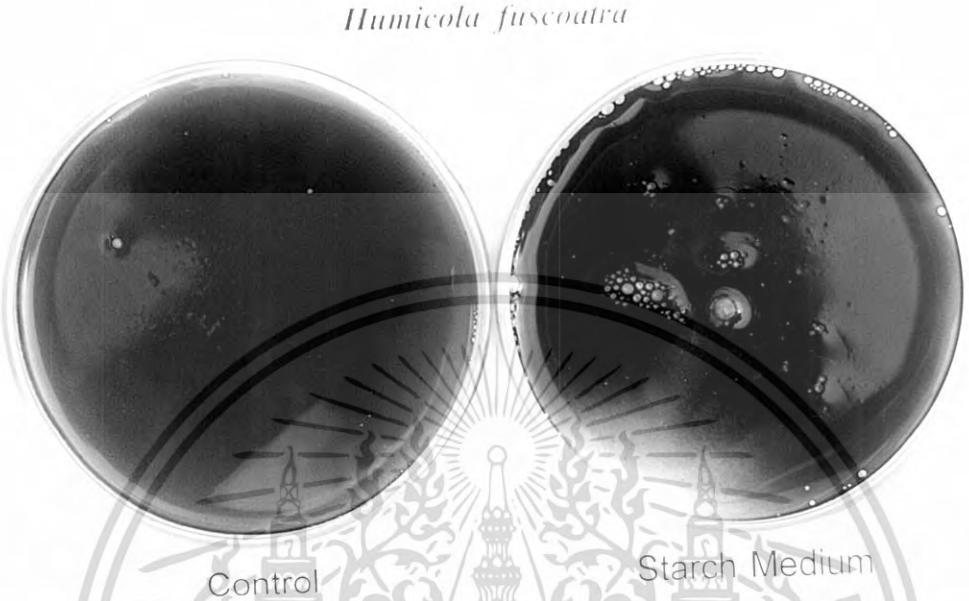


ภาพที่37 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Eurotium chevalieri* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

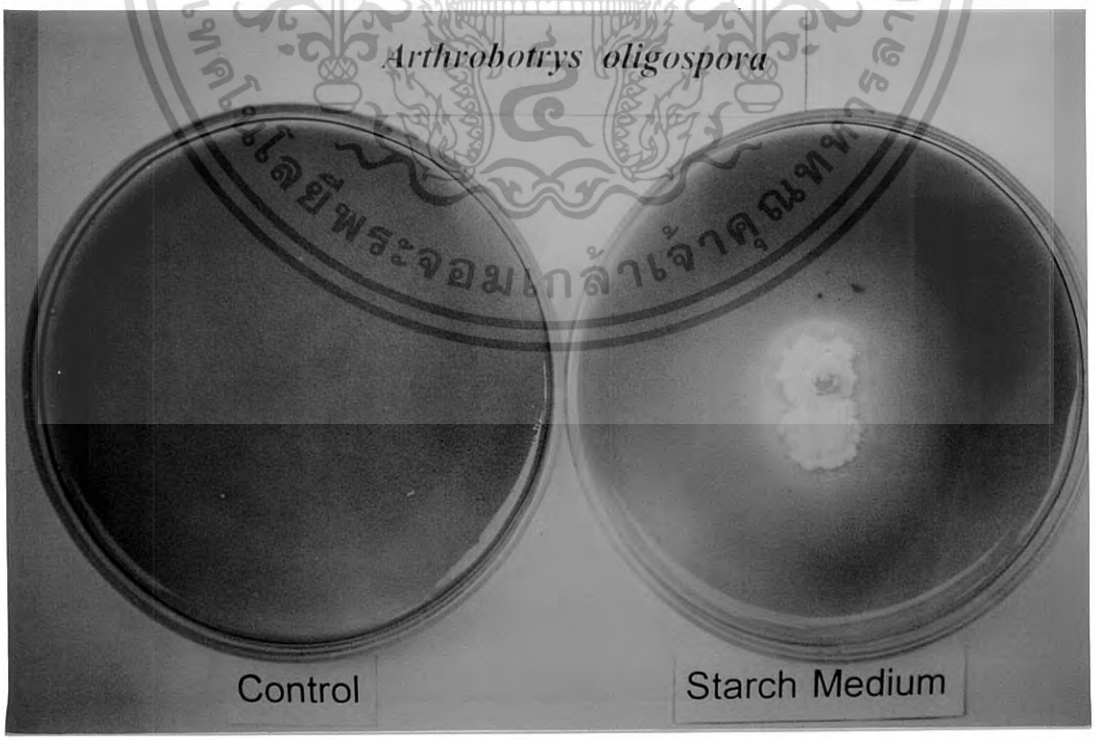


ภาพที่38 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Eurotium herbariorum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่39 การไม่สร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Humicola fuscoatra* เมื่อเปรียบเทียบกับ control



ภาพที่40 การสร้างเอนไซม์ amylase ของเชื้อ *Arthrobotrys oligospora*เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

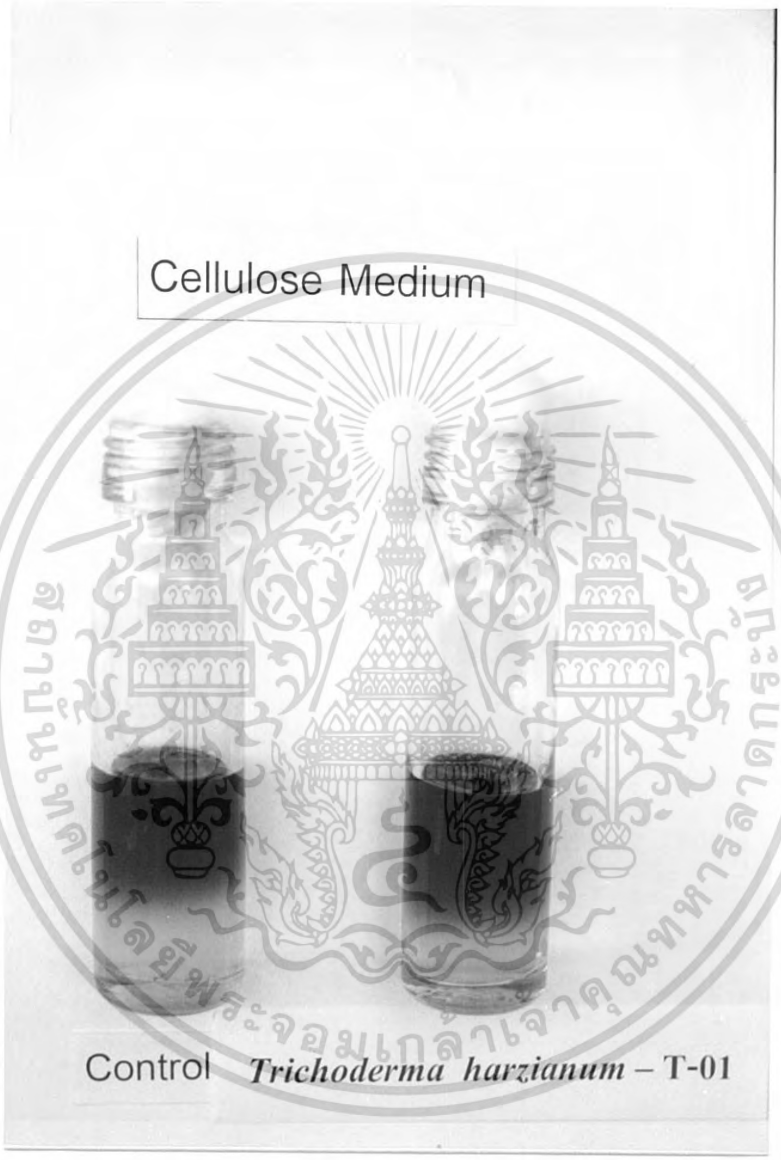
2.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cellulase

จากการเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ทดสอบบน cellulose media แล้วทำการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase ของเชื้อโดยการสังเกตการแพร่ของ azure blue dye จากอาหารส่วนบนลงมายังอาหารส่วนล่างที่ไม่มีสี เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาย่อย cellulose ซึ่งเชื่อมกันอยู่ ทำให้สีถูปลดปล่อยออกมาแพร่ลงข้างล่าง โดยเปรียบเทียบกับ negative control พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับ negative control จึงแบ่งระดับของกิจกรรมของเอนไซม์ออกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ – negative = ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์, + low positive = มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำ, ++ medium positive = มีกิจกรรมของเอนไซม์ปานกลาง และ +++ high positive = มีกิจกรรมของเอนไซม์สูง พบว่ามีเชื้อ 12 สายพันธุ์ ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ ให้ผลเป็น + low positive ได้แก่เชื้อ *T. hamatum, T. hamatum* (T-12), *Gliocladium virens, Penicillium variabile, Aspergillus terreus, A. sparsus, Mucor hiemalis, Mucor. circinelloides, Chaetomium lucknowense, Achaetomium theilaviopsis, Emricella nidulans* และ *Arthrobotrys oligospora* และมีเชื้อ 4 สายพันธุ์ ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับปานกลางให้ผลเป็น ++ positive ได้แก่เชื้อ *T. harzianum, T. harzianum*(T-01), *A. oryzae*และ *Eurotium herbariorum* และมีเชื้อ 1 สายพันธุ์ ที่มี กิจกรรมของเอนไซม์ในระดับสูง เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control ได้แก่เชื้อ *Paecilomyces marquandii* และมีเชื้อ 3 สายพันธุ์ที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase เมื่อเปรียบเทียบกับ control ให้ผลเป็น – negative ได้แก่เชื้อ *Emericella rugulosa, Eurotium Chevalieri* และ *Humicola fuscoatra* ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 41-60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

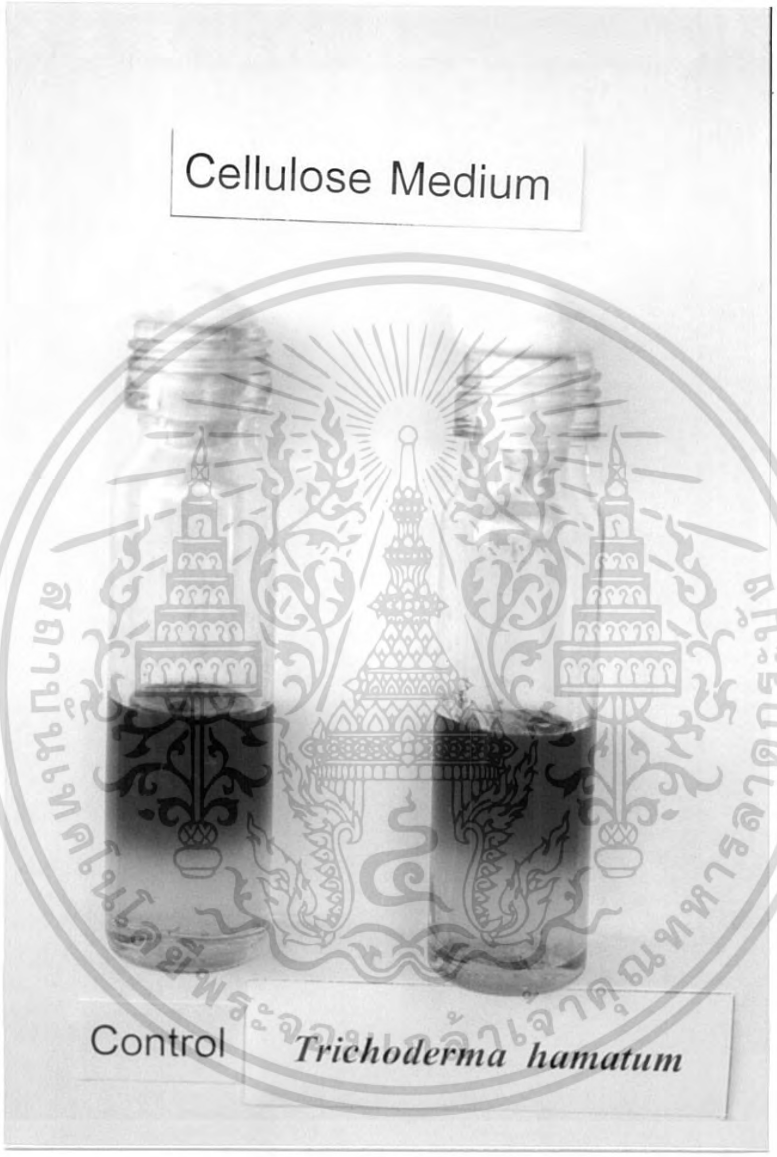
ภาพที่41 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับปานกลางของเชื้อ *Trichoderma harzianum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



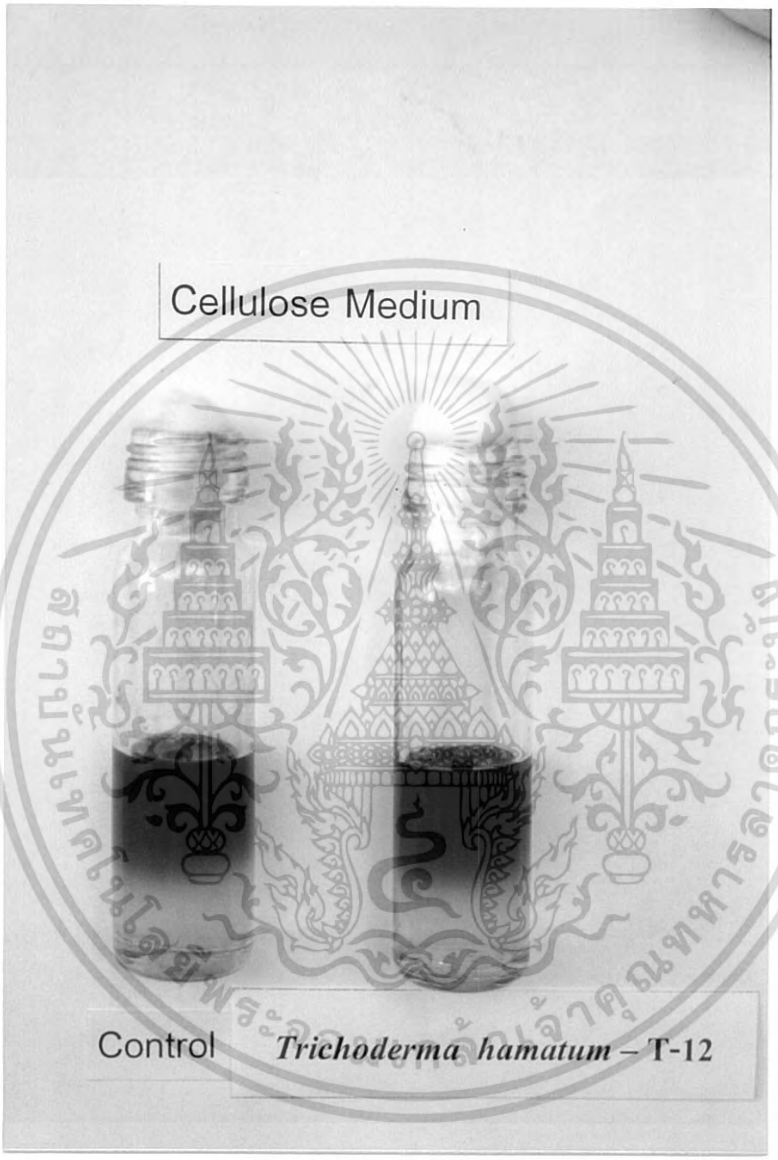
ภาพที่42 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับปานกลางของเชื้อ *Trichoderma harzianum* (T-01) เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่43 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Trichoderma hamatum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่44 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Trichoderma hamatum* (T-12) เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่45 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Gliocladium virens* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่46 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Penicillium variabile* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

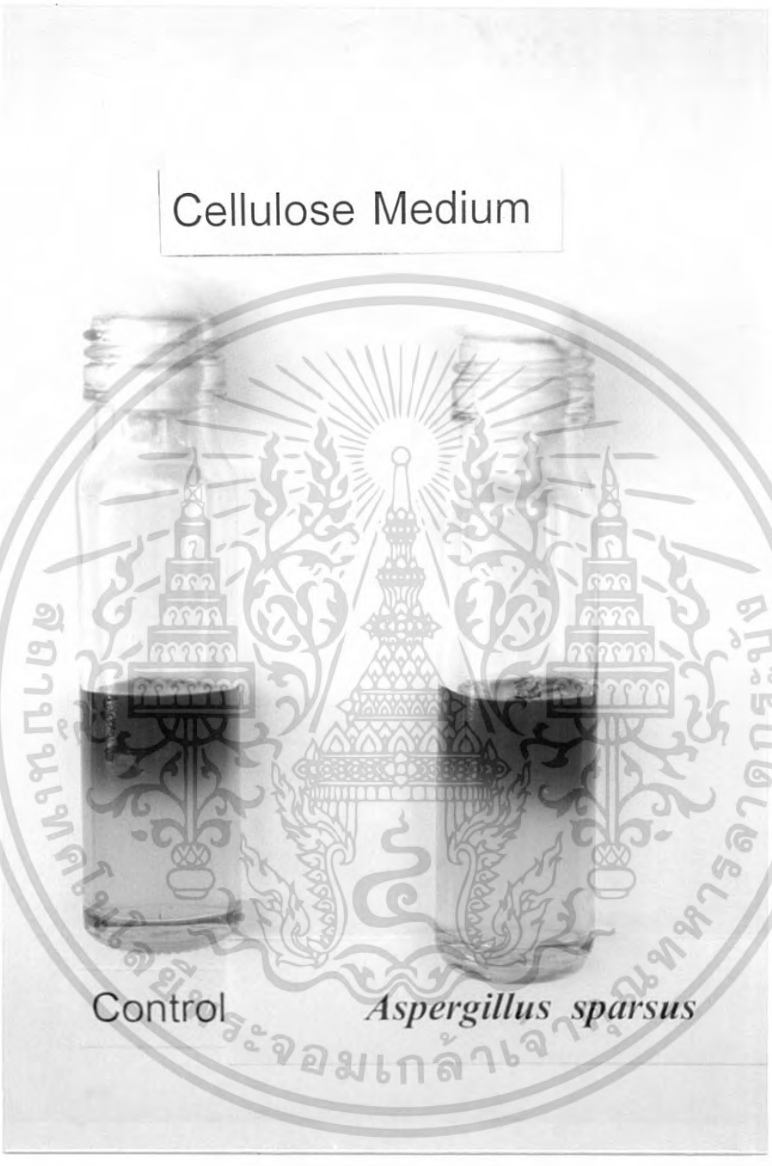
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่47 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับปานกลางของเชื้อ *Aspergillus oryzae* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่48 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Aspergillus terreus* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่49 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Aspergillus sparsus* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่50 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Mucor hiemalis* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่51 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Mucor circinelloides* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่52 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Chaetomium lucknowense* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่53 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Achaetomium theilaviopsis* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่54 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับสูงของเชื้อ *Paecilomyces marquandii* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่55 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Emericella nidulans* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

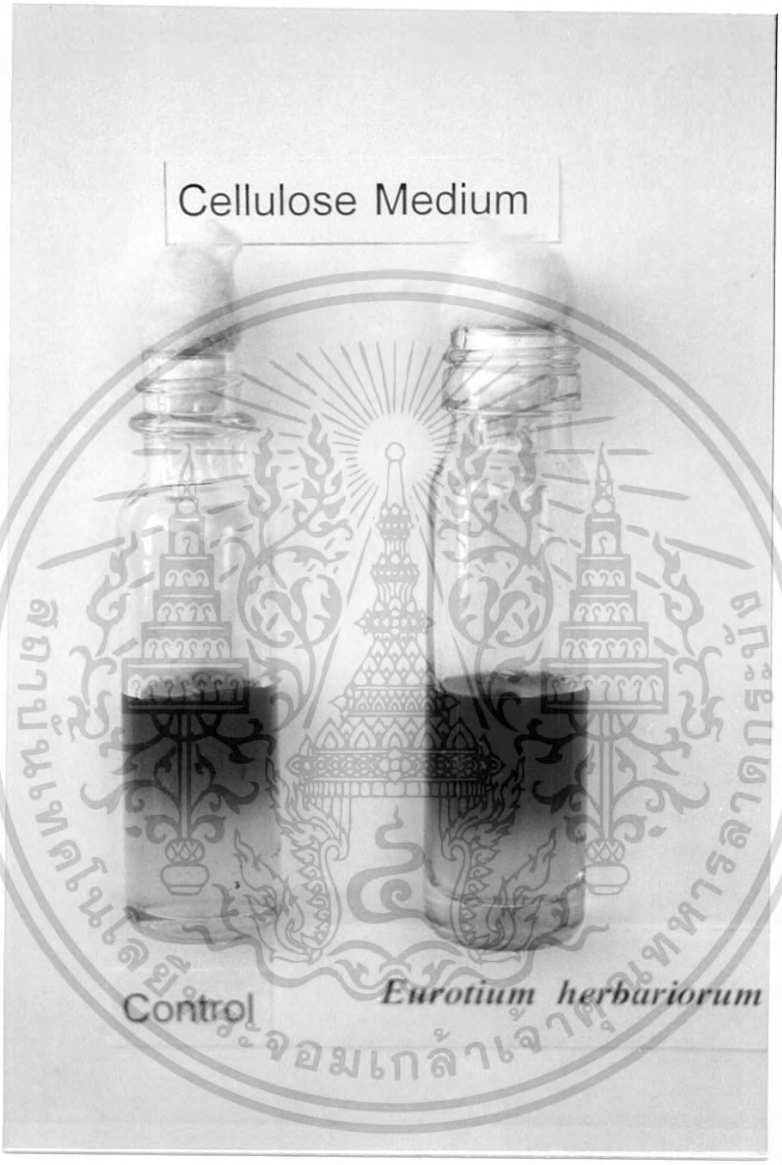
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่56 การไม่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ของเชื้อ *Emericella rugulosa* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่57 การไม่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ของเชื้อ *Eurotium chevalieri* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

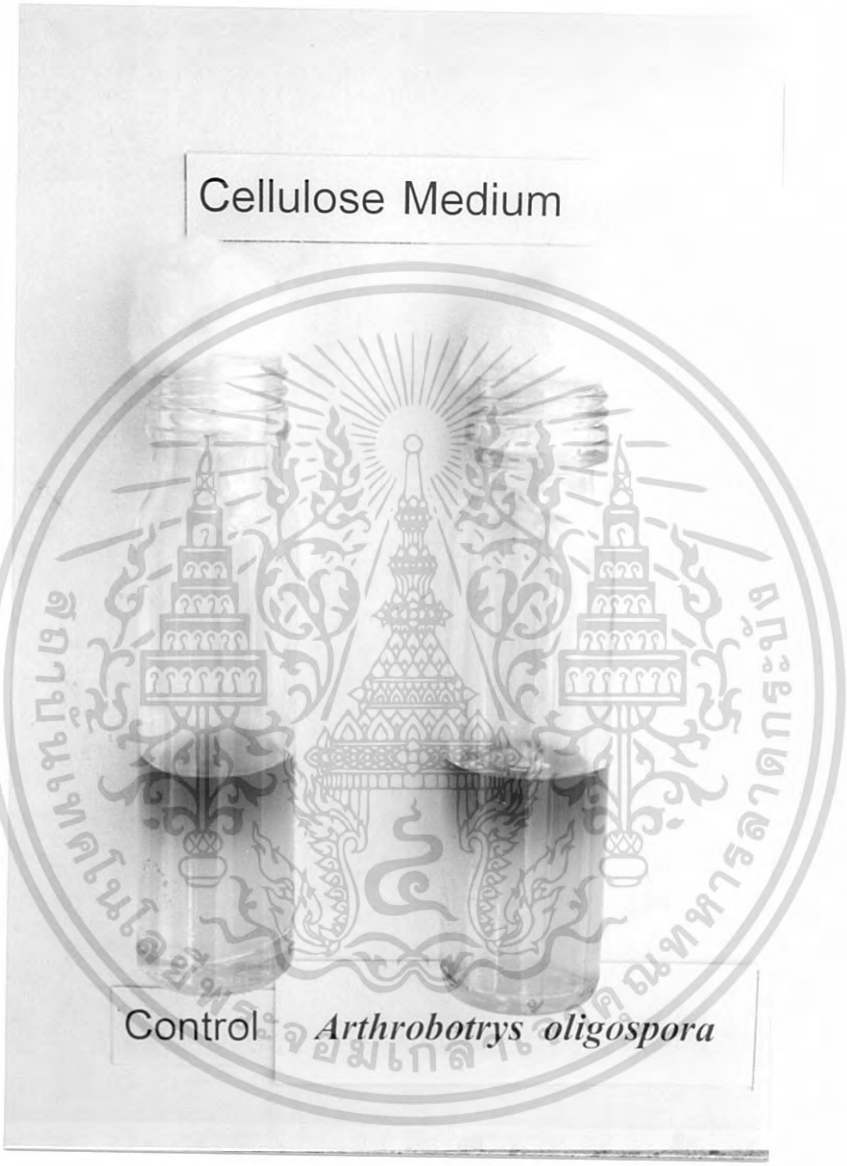


ภาพที่58 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับปานกลางของเชื้อ *Eurotium herbariorum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่59 การไม่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ของเชื้อ *Humicola fuscoatra* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

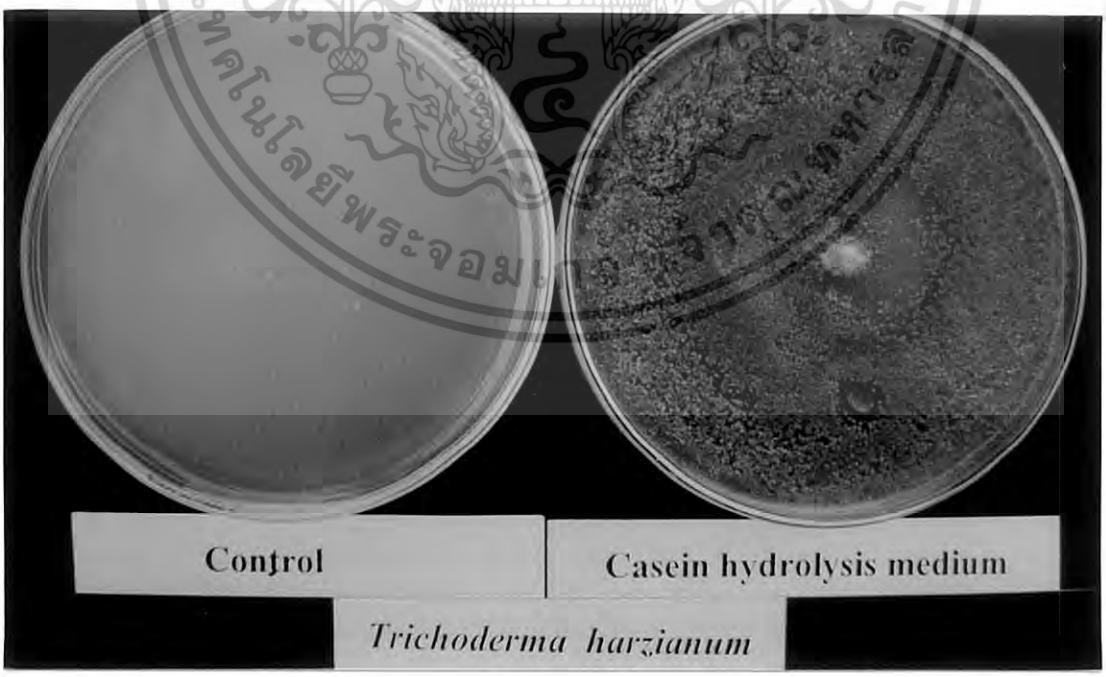


ภาพที่60 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในระดับต่ำของเชื้อ *Arthrobotrys oligospora* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

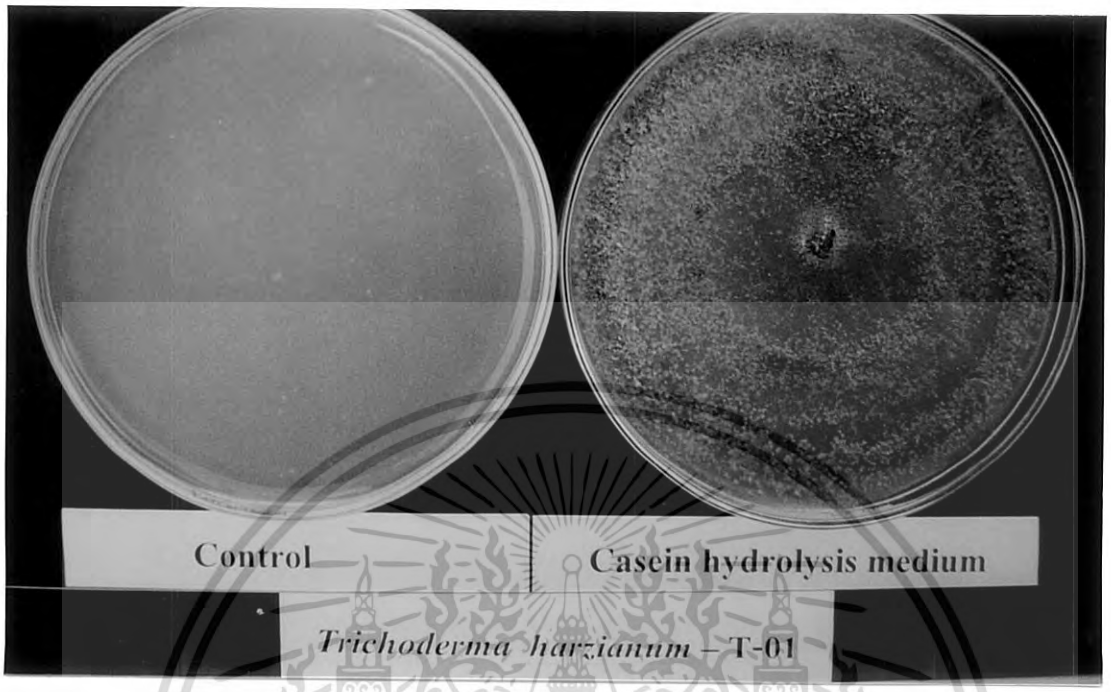
2.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ protease

จากการเลี้ยงเชื้อราทดสอบบน casein hydrolysis medium แล้วทำการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ protease ของเชื้อโดยสังเกตการเกิด clear zone บริเวณรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อราทดสอบ เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยโปรตีนที่เป็นส่วนผสมอยู่ในอาหารทำให้มีสีขุ่นเมื่อโปรตีนถูกย่อยไปแล้วทำให้สังเกตเห็น clear zone ได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ control พบว่ามีเชื้อ 14 สายพันธุ์ที่สังเกตเห็น clear zone รอบ ๆ โคโลนี ให้ผลเป็น + positive ได้แก่เชื้อ *T. harzianum*, *T. harzianum* (T-01), *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. sparsus*, *Chaetomium lucknowense*, *Achaetomium theilaviopsis*, *Paecilomyces marquandii*, *Emericella nidulans*, *Emericella rugulosa*,*Eurotium chevalieri*, *Eurotium herbariorum*, *Humicola fuscoatra* และ *Arthrobotrys oligospora* และมีเชื้อรา 6 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทำให้ไม่เกิด clear zone รอบ โคโลนีของเชื้อ ให้ผลเป็น – negative ได้แก่เชื้อ *T. hamatum*, *T. hamatum* (T-12), *Gliocladium virens*, *Penicillium variabile*, *Mucor hiemalis* และ *Mucor circinelloides* ดังตารางที่1 และภาพที่61-80

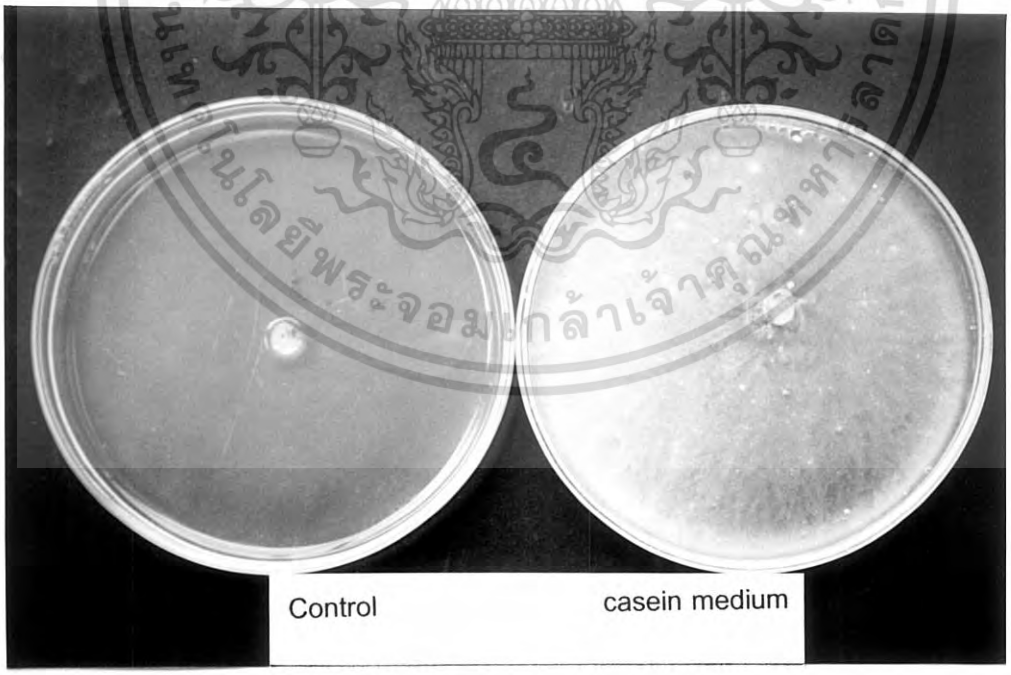


ภาพที่61 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Trichoderma harzianum* บน casein hydrolysis medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

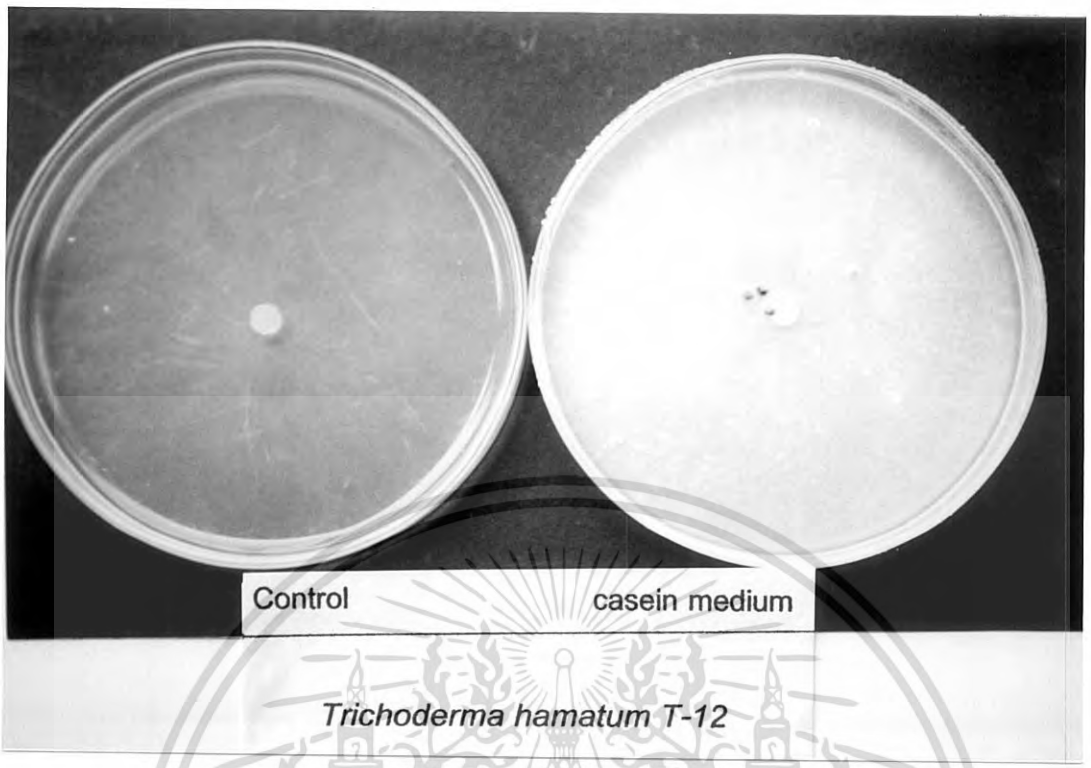


ภาพที่62 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Trichoderma harzianum* (T-01) บน casein hydrolysis medium

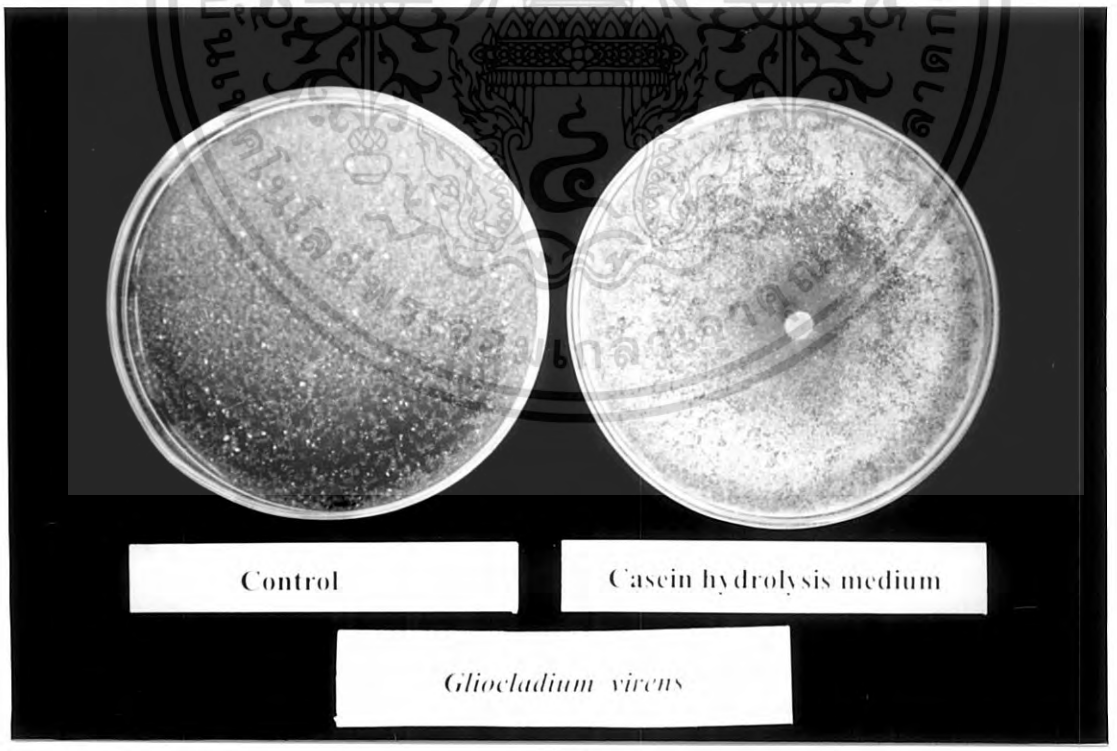


ภาพที่63 การไม่เกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Trichoderma hamatum* บน casein hydrolysis medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

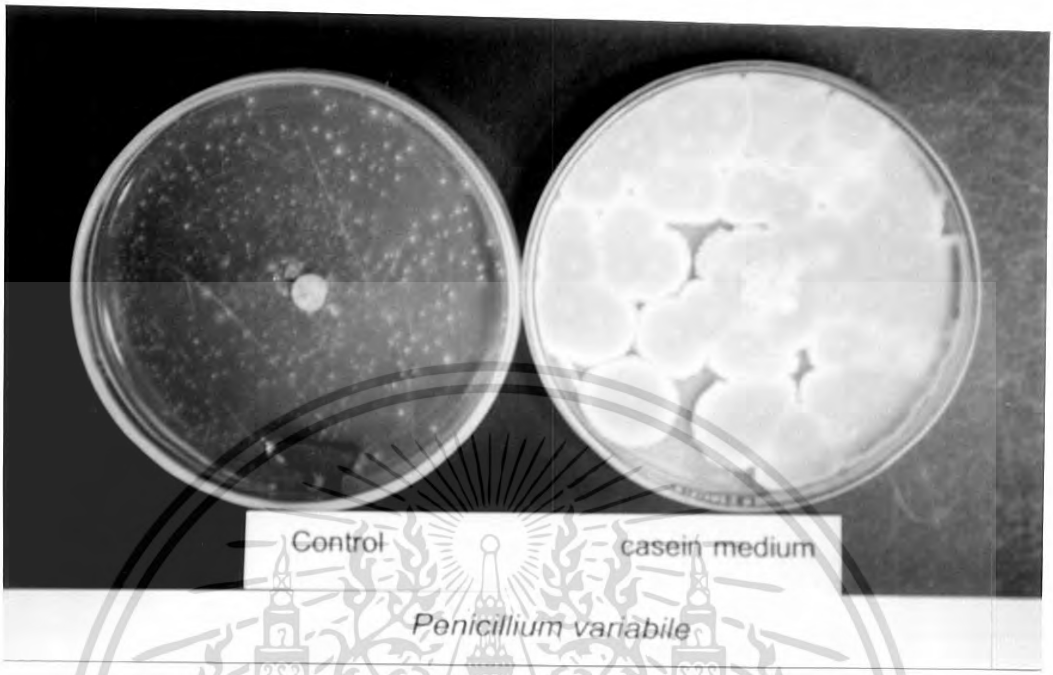


ภาพที่64 การไม่เกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Trichoderma ha*matum (T-12) บน casein hydrolysis medium

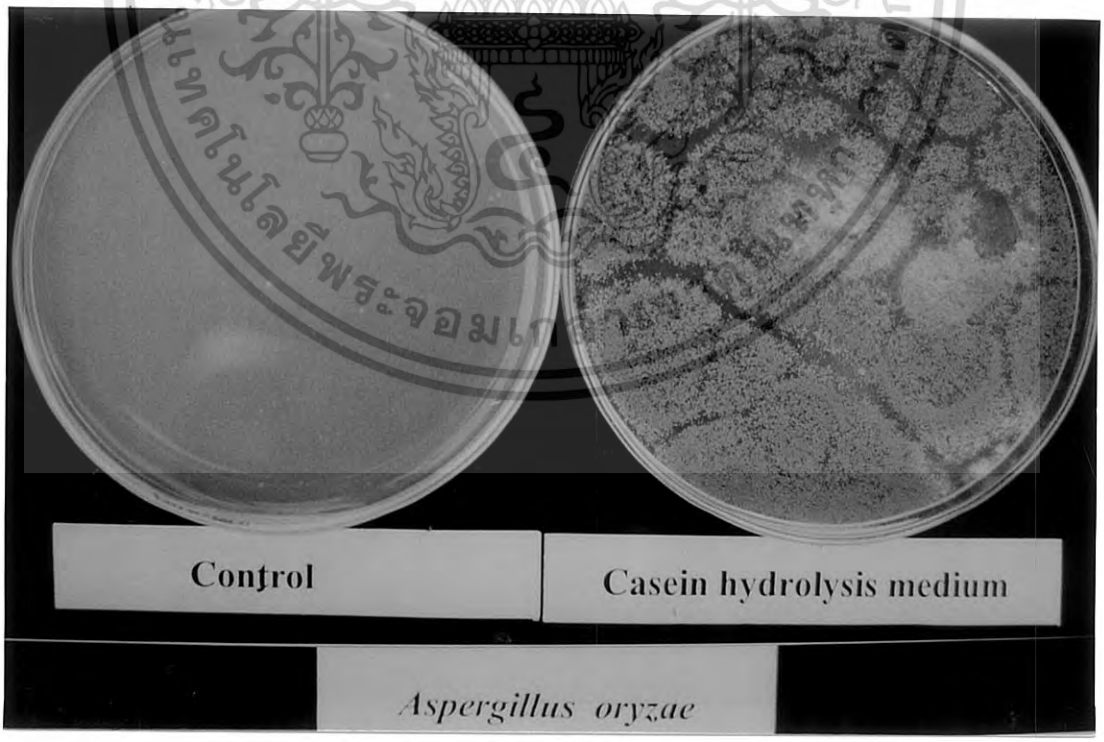


ภาพที่65 การไม่เกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Gliocladium virens* บน casein hydrolysis medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

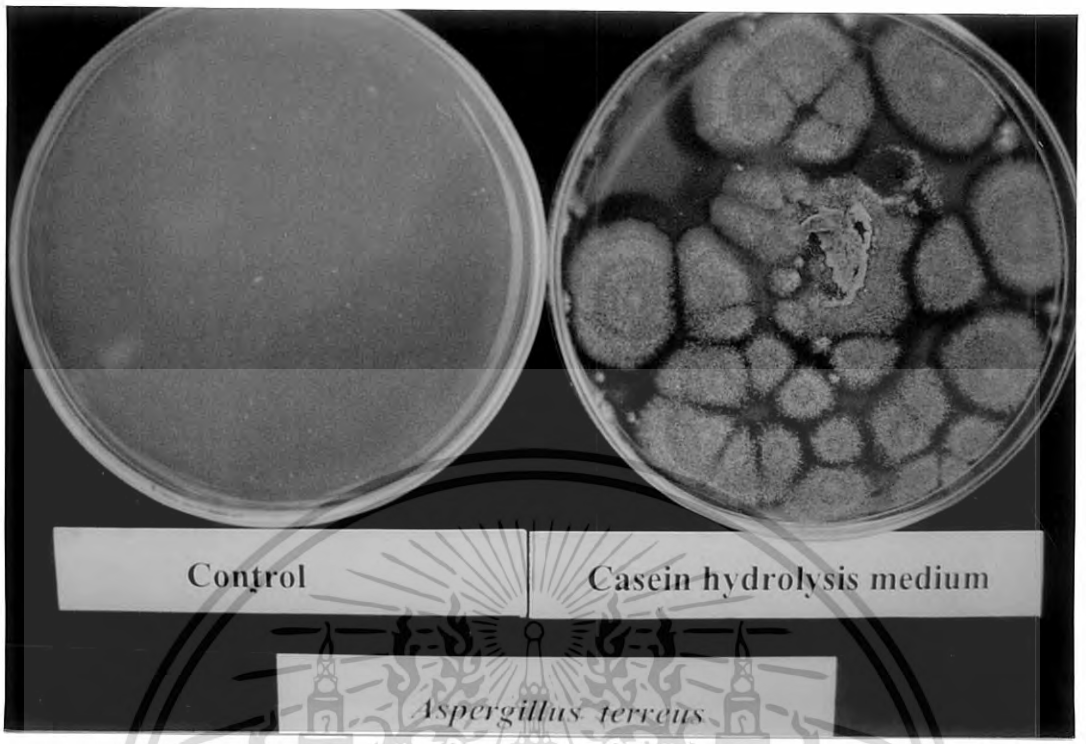


ภาพที่66 การไม่เกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Penicillium variabile* บน casein hydrolysis medium

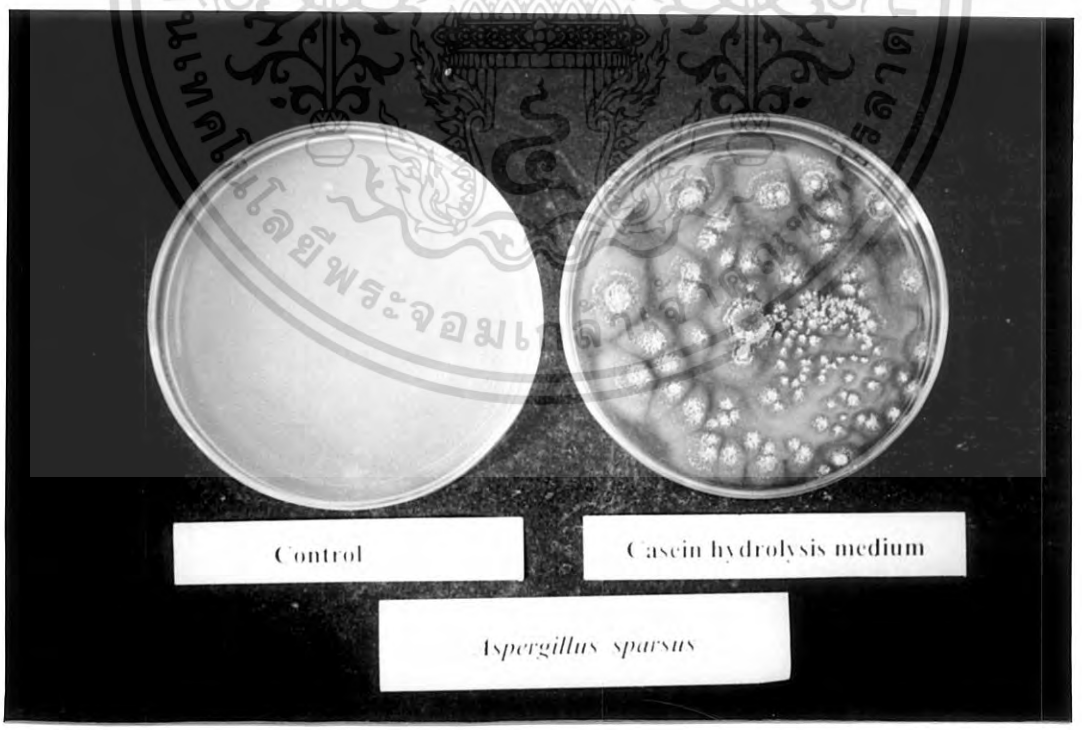


ภาพที่67 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Aspergillus oryzae* บน casein hydrolysis medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

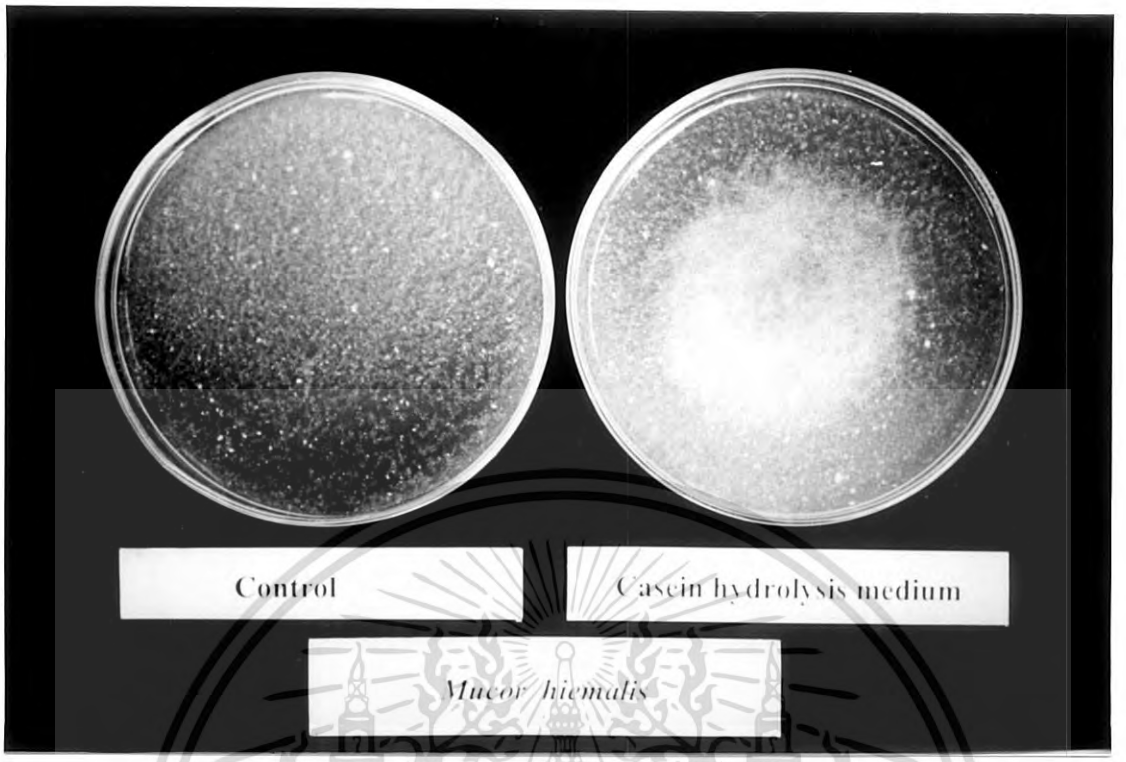


ภาพที่68 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Aspergillus terreus* บน casein hydrolysis medium



ภาพที่69 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Aspergillus sparsus* บน casein hydrolysis medium

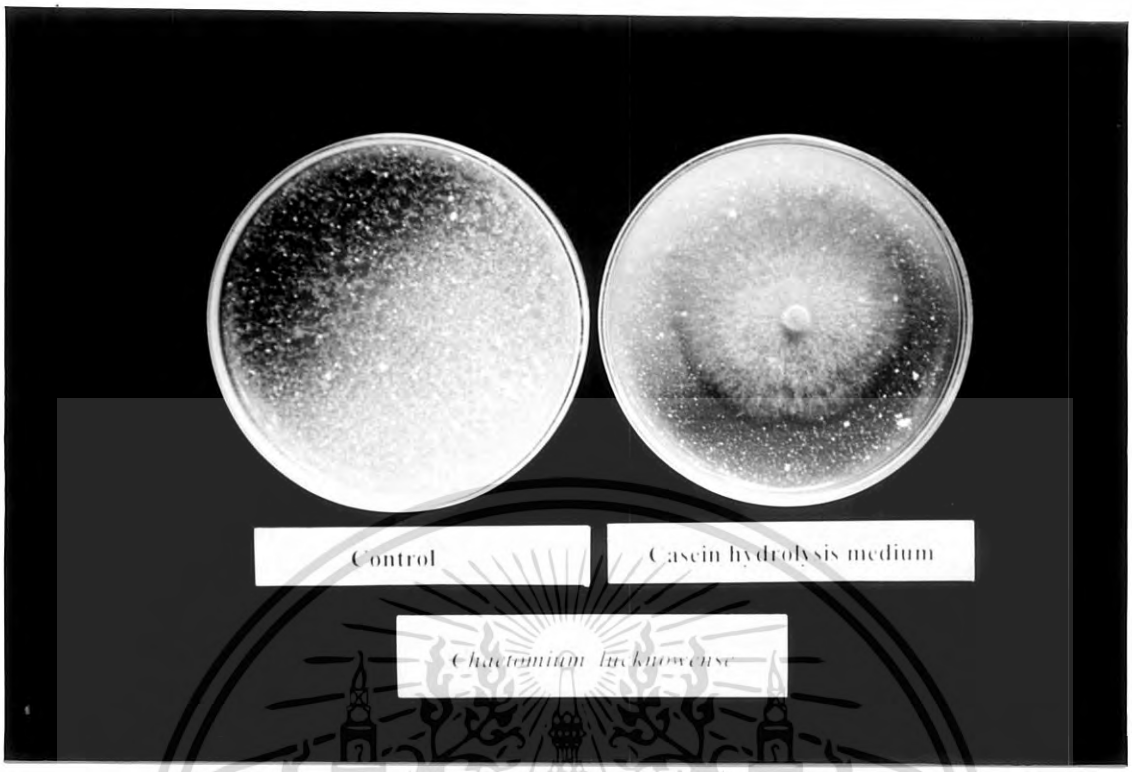
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



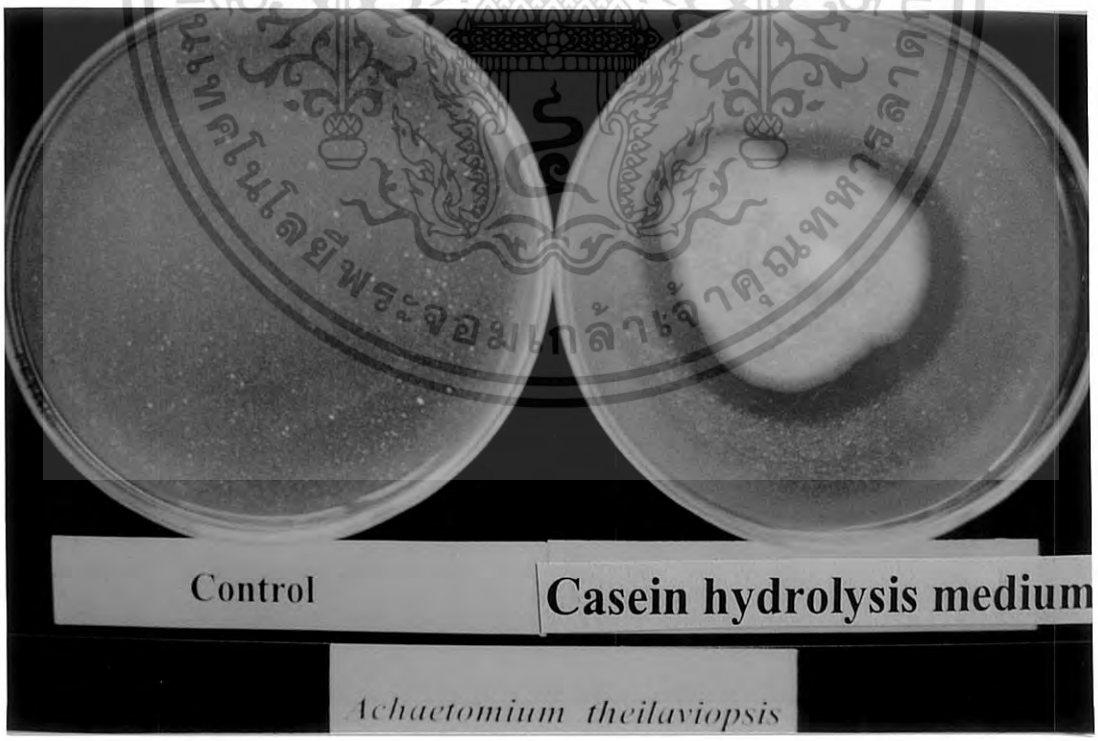
ภาพที่70 การไม่เกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Mucor hiemalis* บน casein hydrolysis medium

ภาพที่71 การไม่เกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Mucor circinelloides* บน casein hydrolysis medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

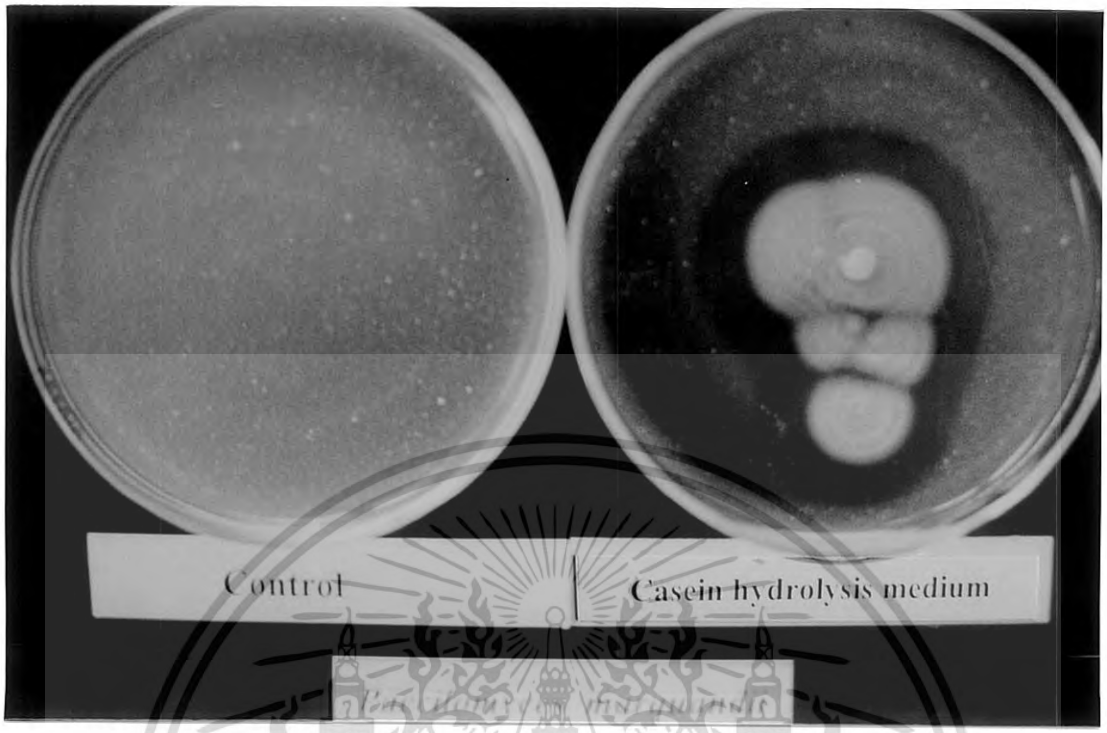


ภาพที่72 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Chaetomium lucknowense* บน casein hydrolysis medium

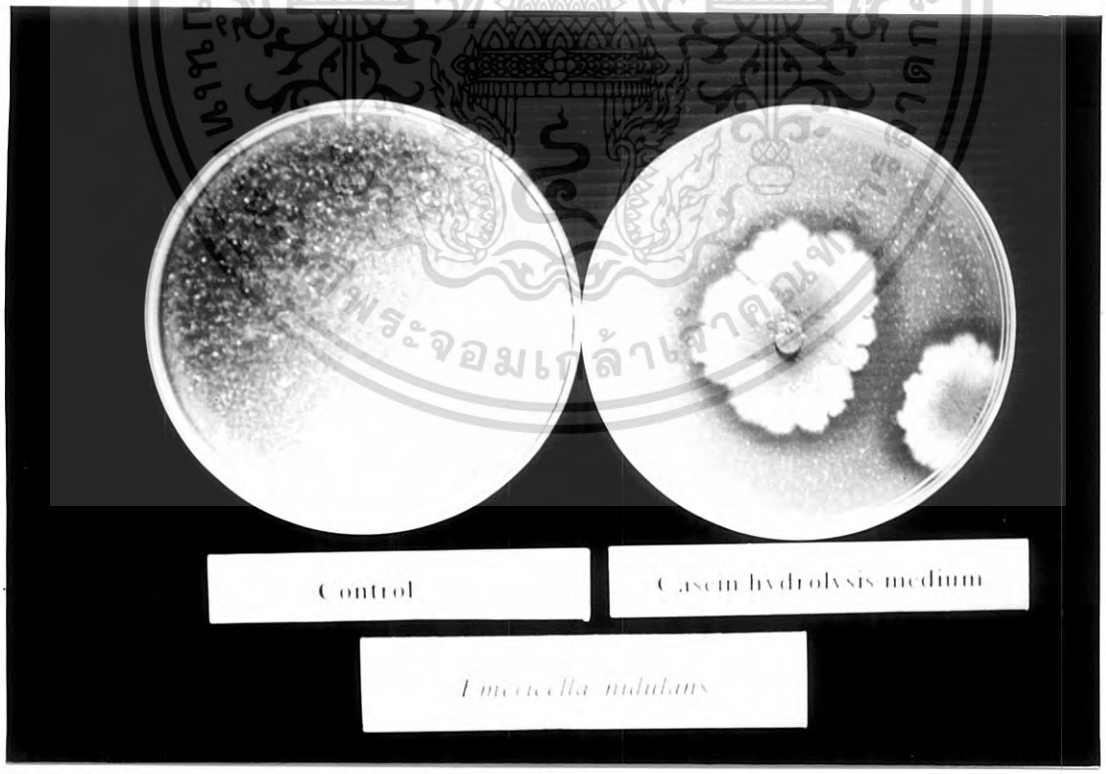


ภาพที่73 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Achaetomium theilaviopsis* บน casein hydrolysis medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

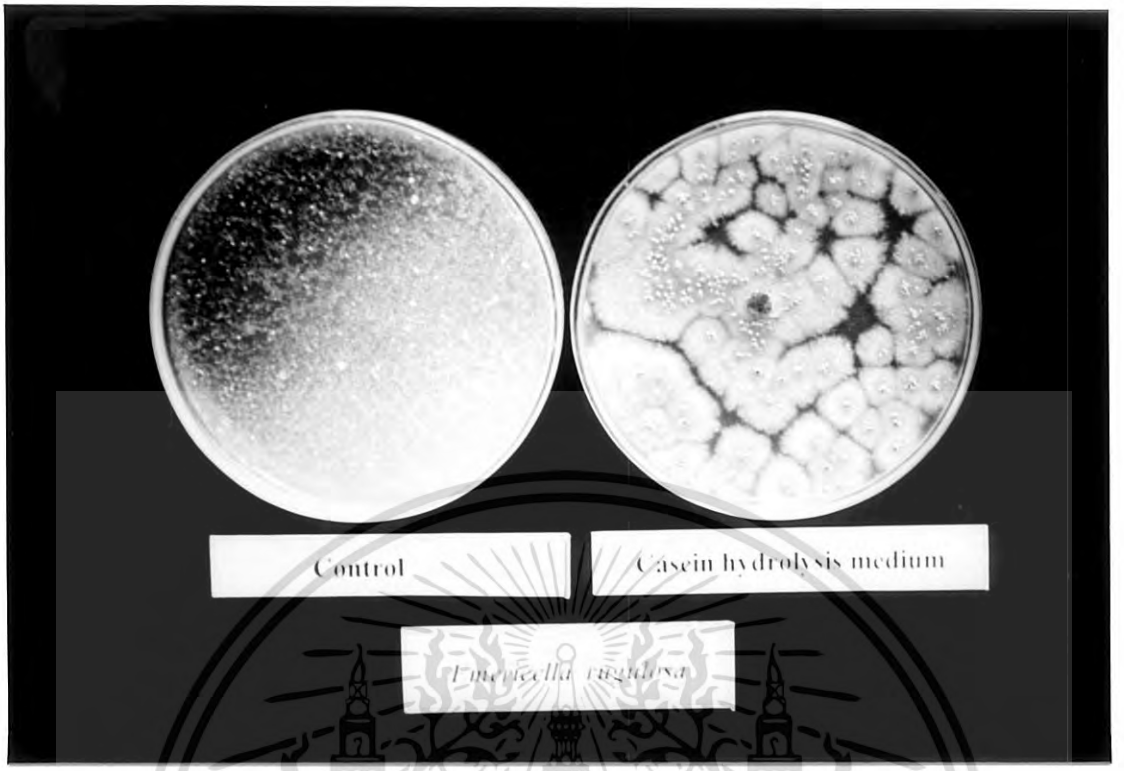


ภาพที่74 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Paecilomyces marquandii* บน casein hydrolysis medium

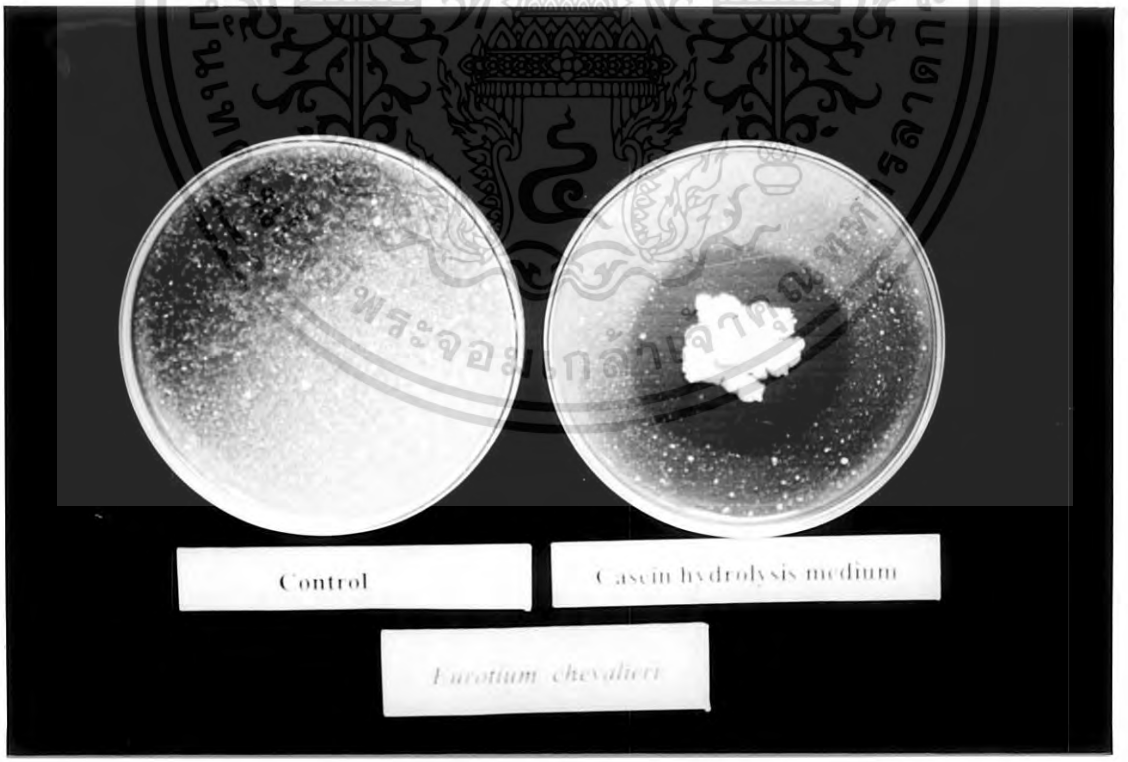


ภาพที่75 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Emericella nidulans* บน casein hydrolysis medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

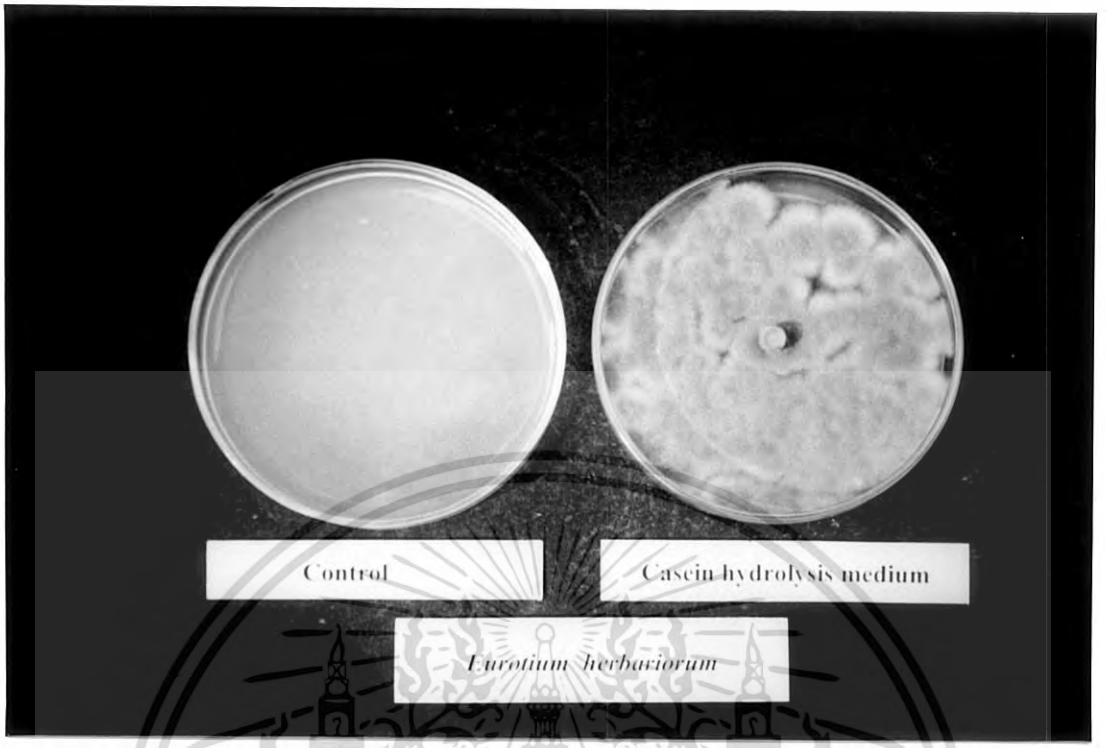


ภาพที่76 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Emericella rugulosa* บน casein hydrolysis medium

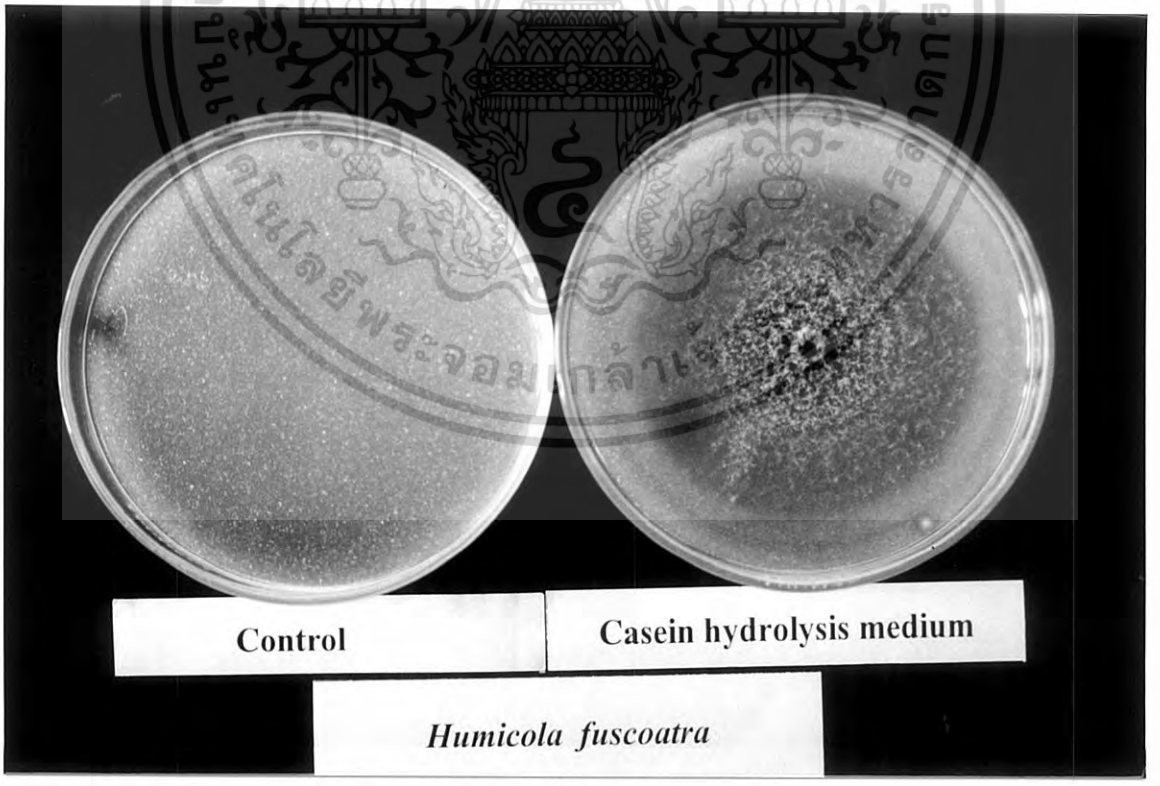


ภาพที่77 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Eurotium chevalieri* บน casein hydrolysis medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่78 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Eurotium herbariorum* บน casein hydrolysis medium



ภาพที่79 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Humicola fuscoatra* บน casein hydrolysis medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่80 การเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อ *Arthrobotrys oligospora* บน casein hydrolysis medium

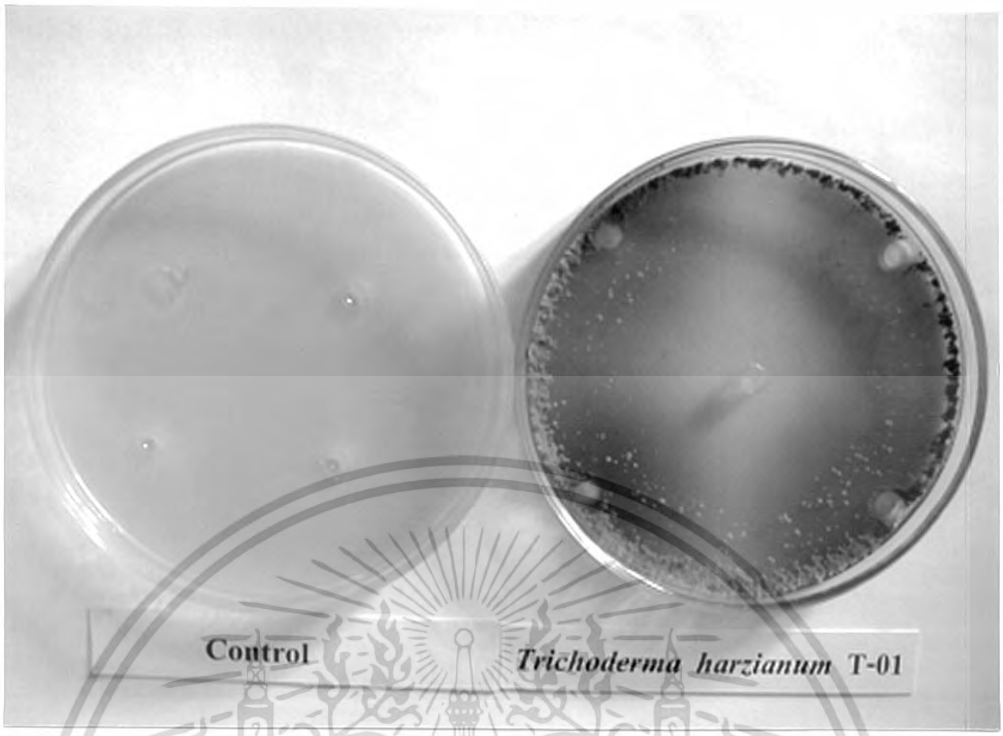
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ligninase

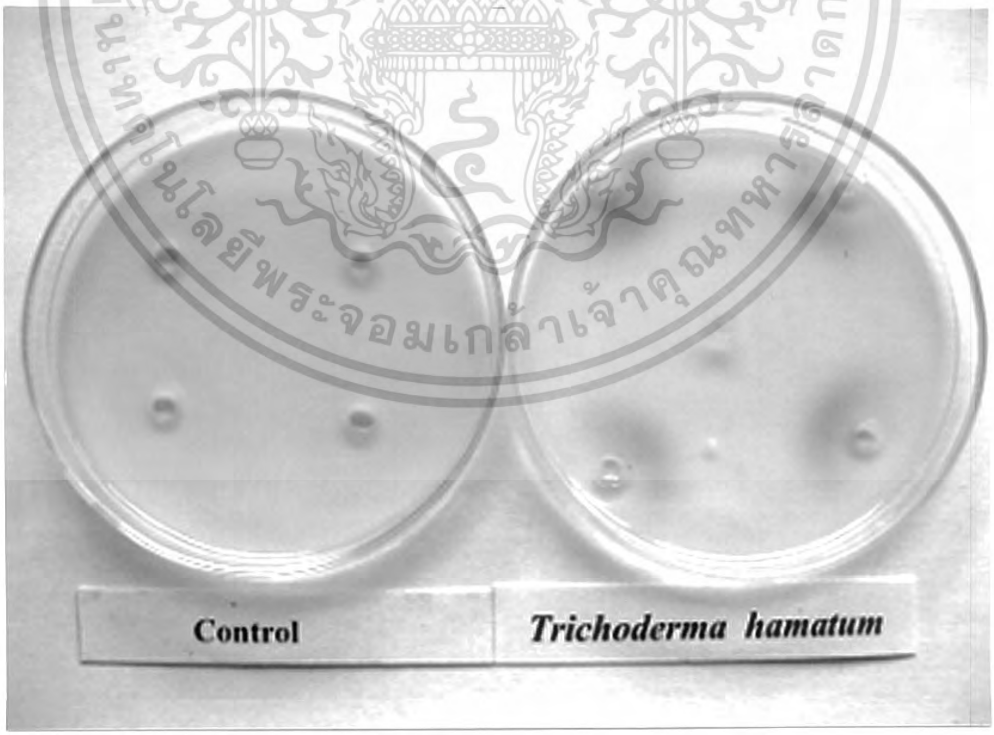
จากการเลี้ยงเชื้อราทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์บนอาหาร CMA และทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ligninase ด้วยสารละลายทดสอบปฏิกิริยาจากกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ที่เชื้อราสร้างขึ้น พบว่ามีเชื้อรา 16 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ligninase ได้ โดยพบว่าเกิดปฏิกิริยาจากกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase เกิดเป็นสีเหลืองทอง – น้ำตาลเข้ม ให้ผลเป็น + positive ได้แก่เชื้อ *Trichoderma harzianum, T. harzianum (T-01), T. hamatum, T. hamatum (T-12), Gliocladium virens, A. sparsus, Mucor hiemalis, Mucor circinelloides, Cheatomium lucknowense, Achaetomium theilaviopsis, Paecilomyces marquandii, Emericella nidulans, Emericela rugulosa, Eurotium herbariorum, Humicola fuscoatra* และ *Arthrobotrys oligospora* ดังตารางที่ 1 และเชื้อรา 4 สายพันธุ์ ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ ligninase ได้ โดยพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาจากกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase กับสารทดสอบ ให้ผลเป็น - negative ได้แก่เชื้อ *Penicillium variabile, Aspergillus oryzae, A. terreus*, และ *Eurotium chevalieri* ดังตารางที่ 1 และภาพที่81-100

ภาพที่81 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Trichoderma harzianum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

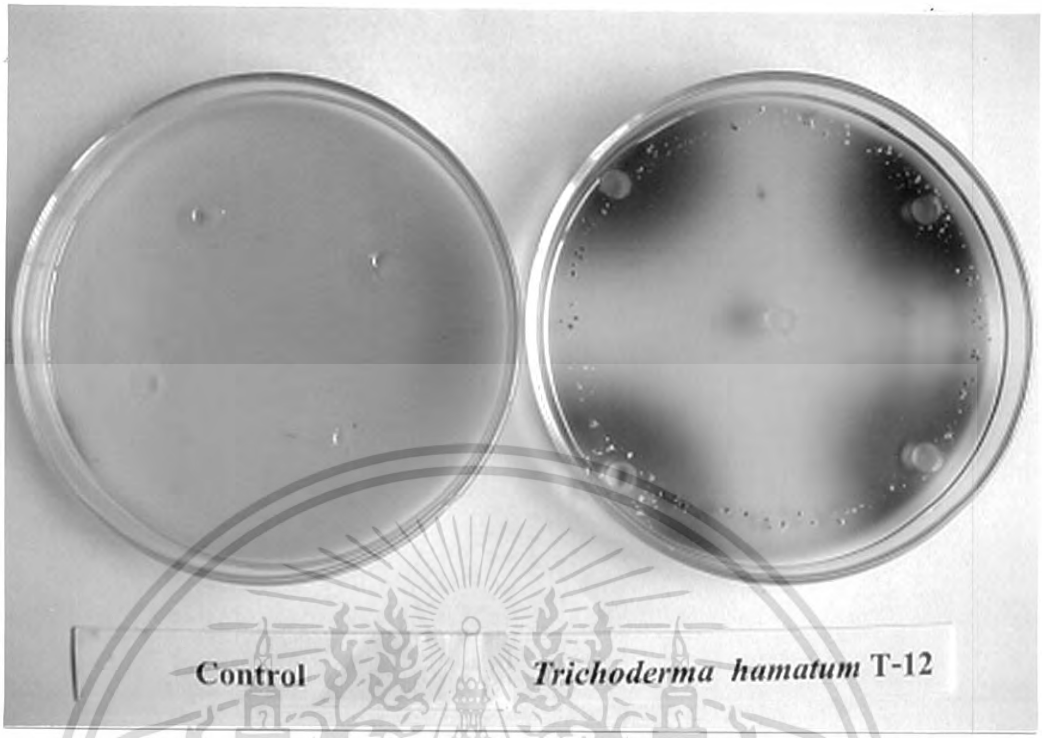


ภาพที่82 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Trichoderma harzianum* (T-01) เมื่อเปรียบเทียบกับ control

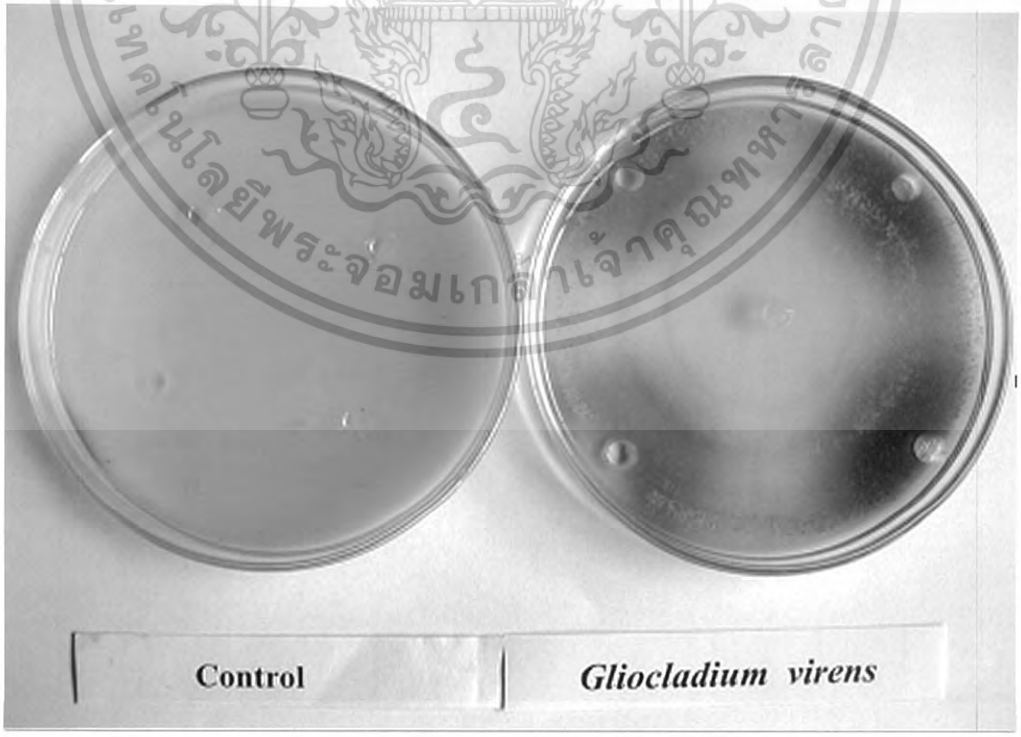


ภาพที่83 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Trichoderma hamatum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

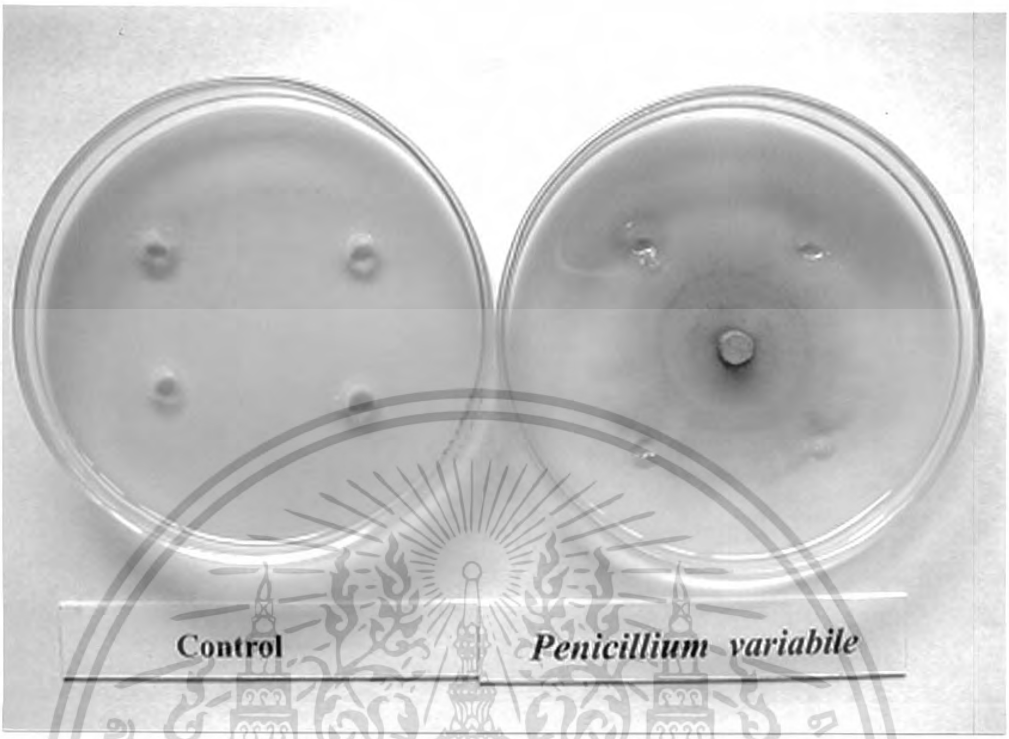


ภาพที่84 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Trichoderma hamatum* (T-12) เมื่อเปรียบเทียบกับ control



ภาพที่85 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Gliocladium virens* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

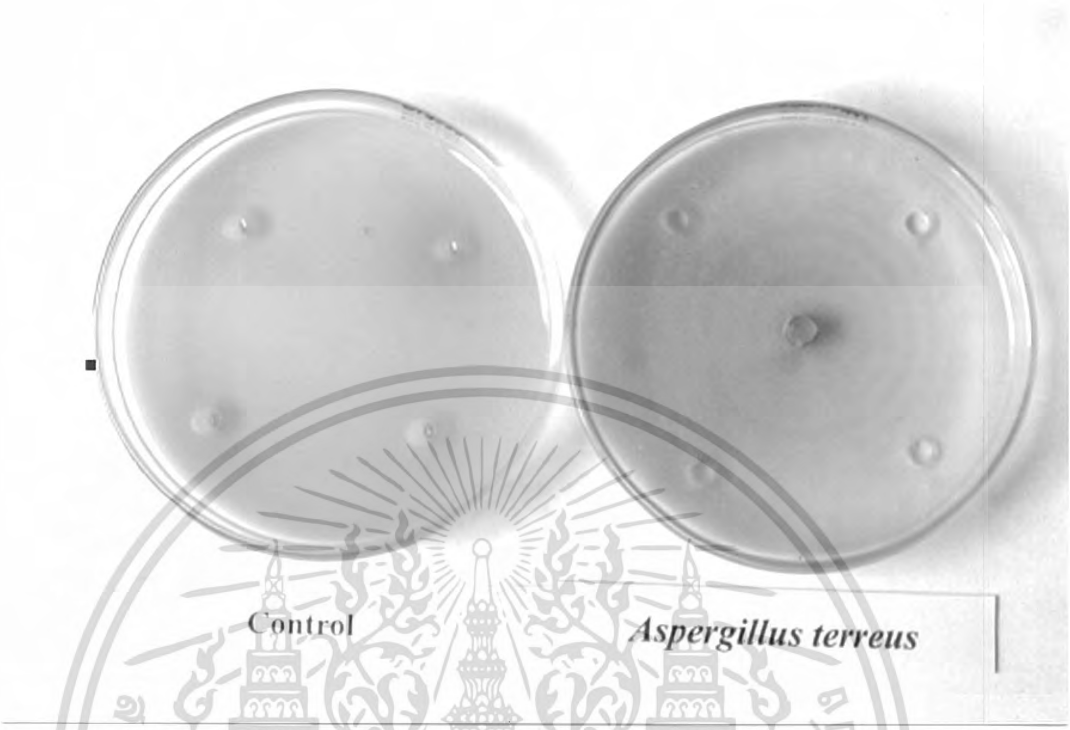
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



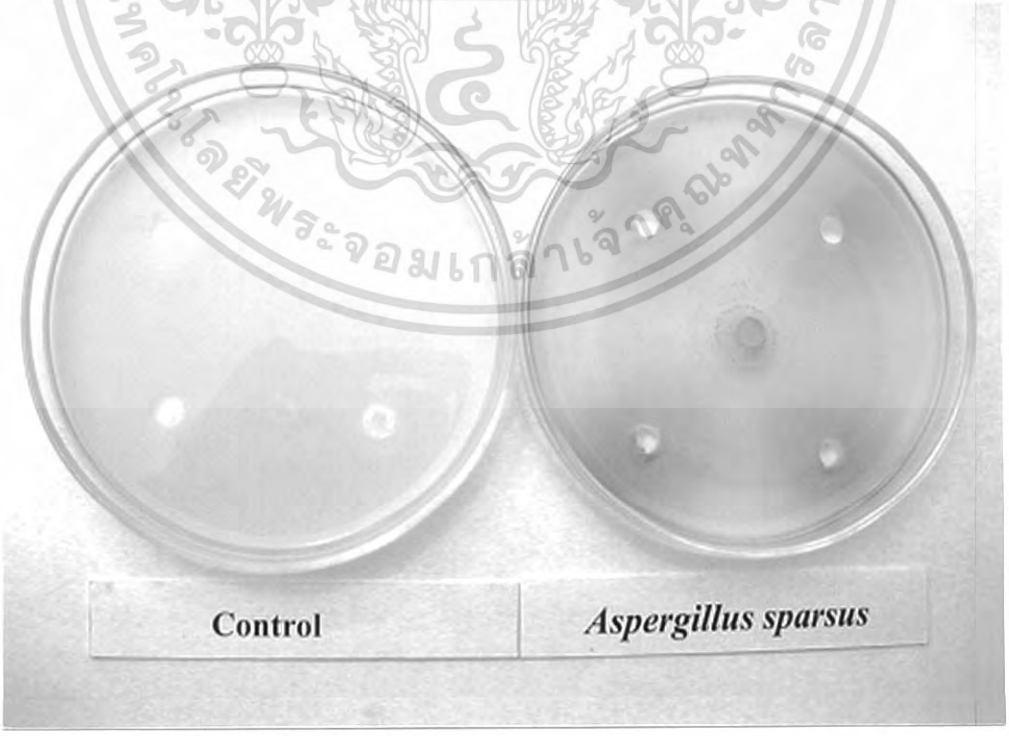
ภาพที่86 การไม่สร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Penicillium variabile* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ภาพที่87 การไม่สร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

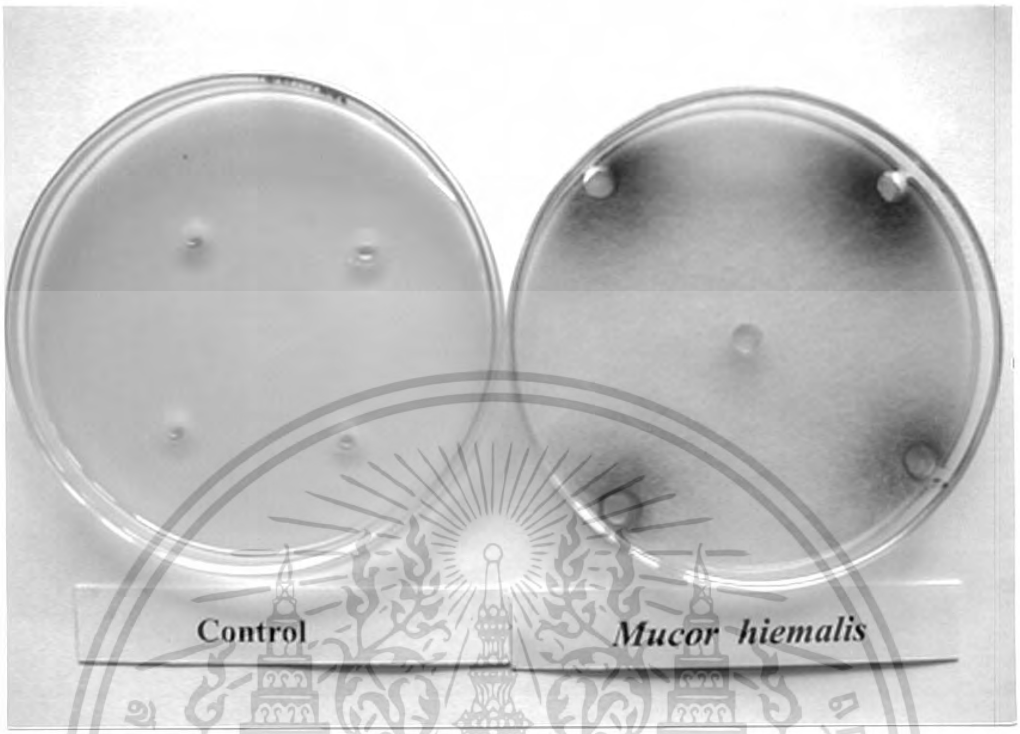


ภาพที่88 การไม่สร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Aspergillus terreus* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

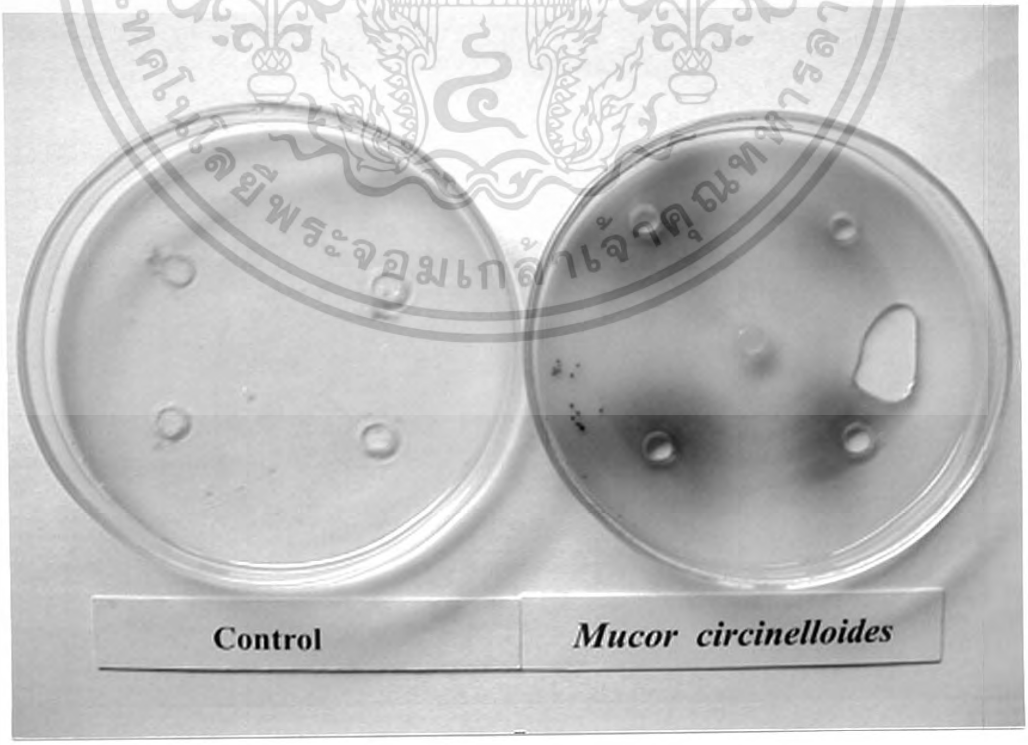


ภาพที่89 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Aspergillus sparsus* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

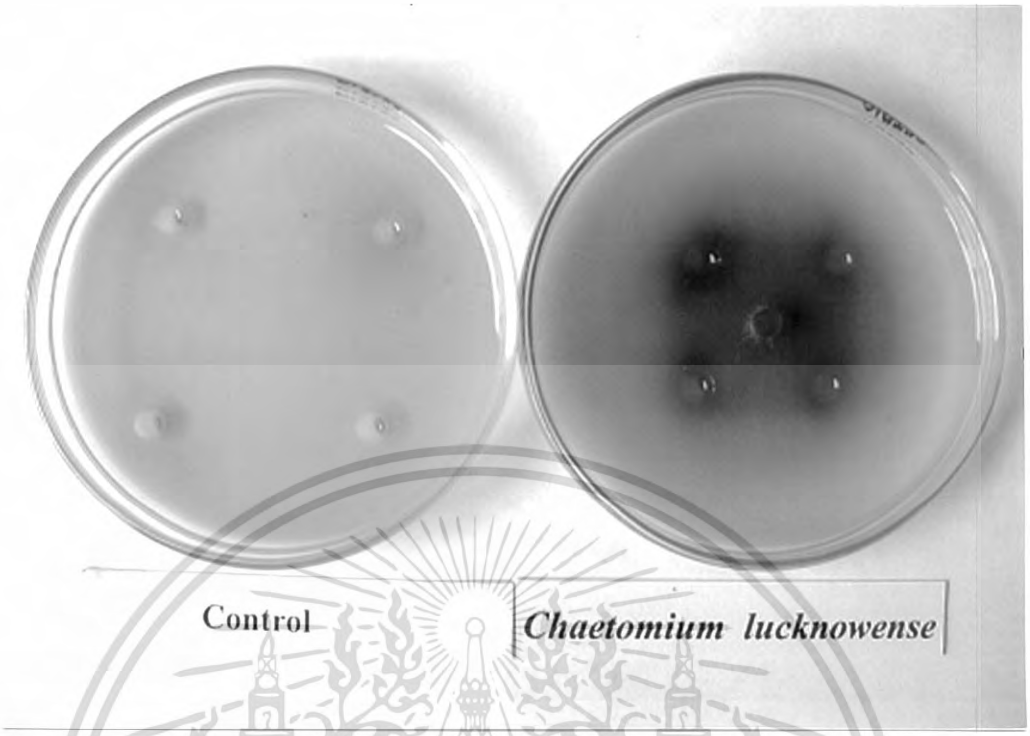


ภาพที่90 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Mucor hiemalis* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

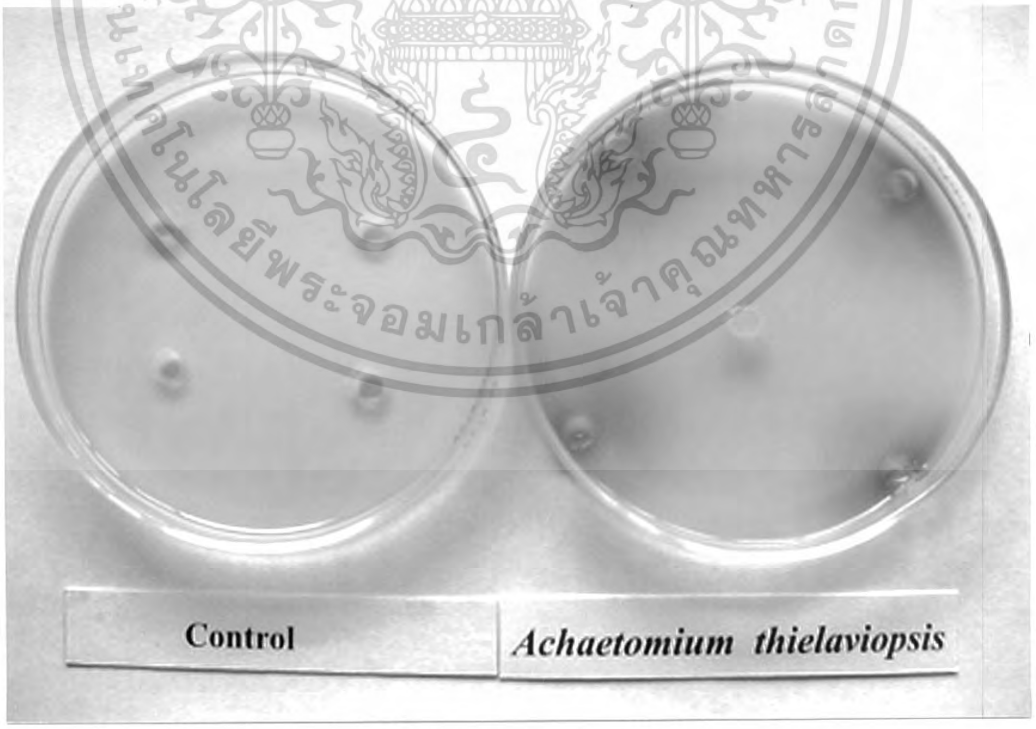


ภาพที่91 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Mucor circinelloides* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

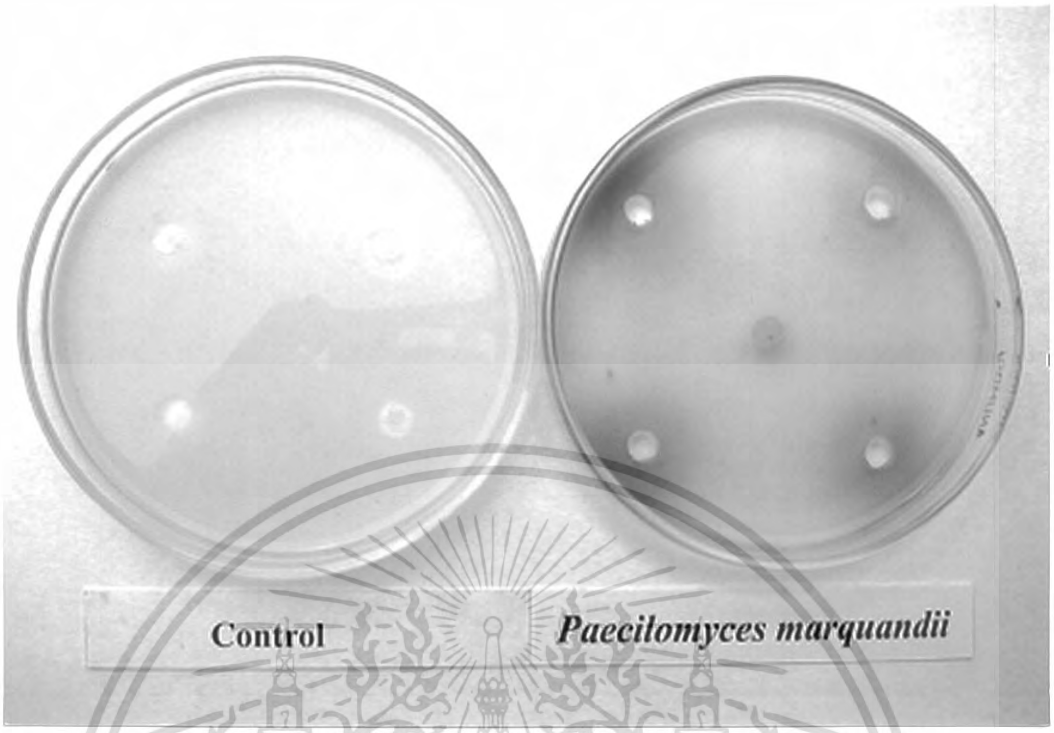


ภาพที่92 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Chaetomium lucknowense* เมื่อเปรียบเทียบกับ control



ภาพที่93 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Achaetomium thielaviopsis* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

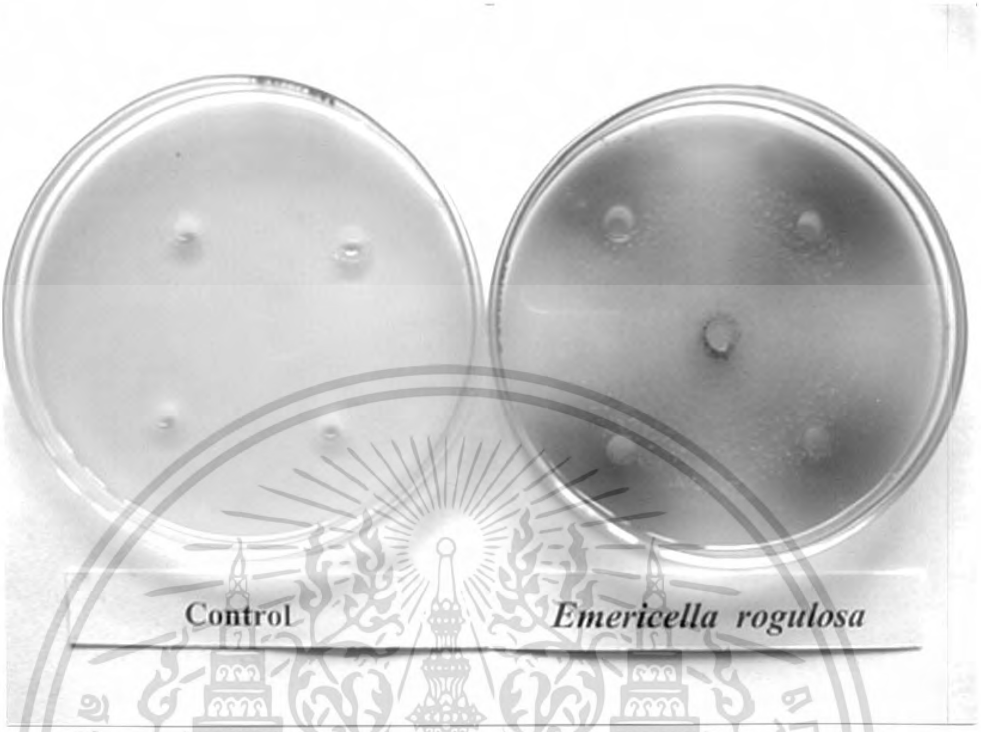
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่94 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Paecilomyces marquandii* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ภาพที่95 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Emericella nidulans* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

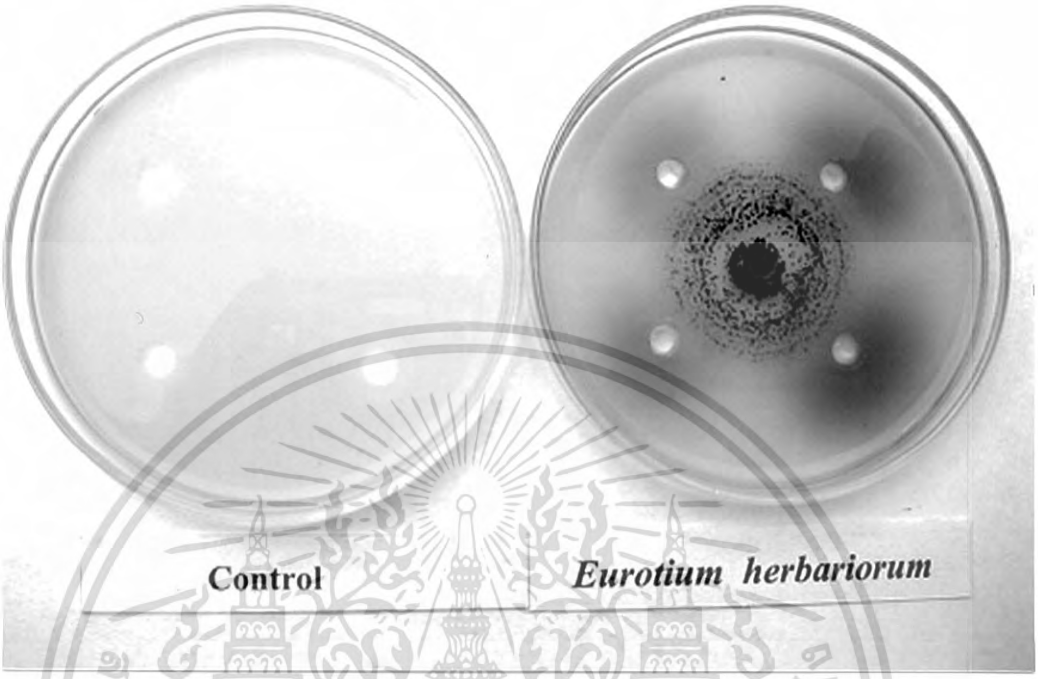
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



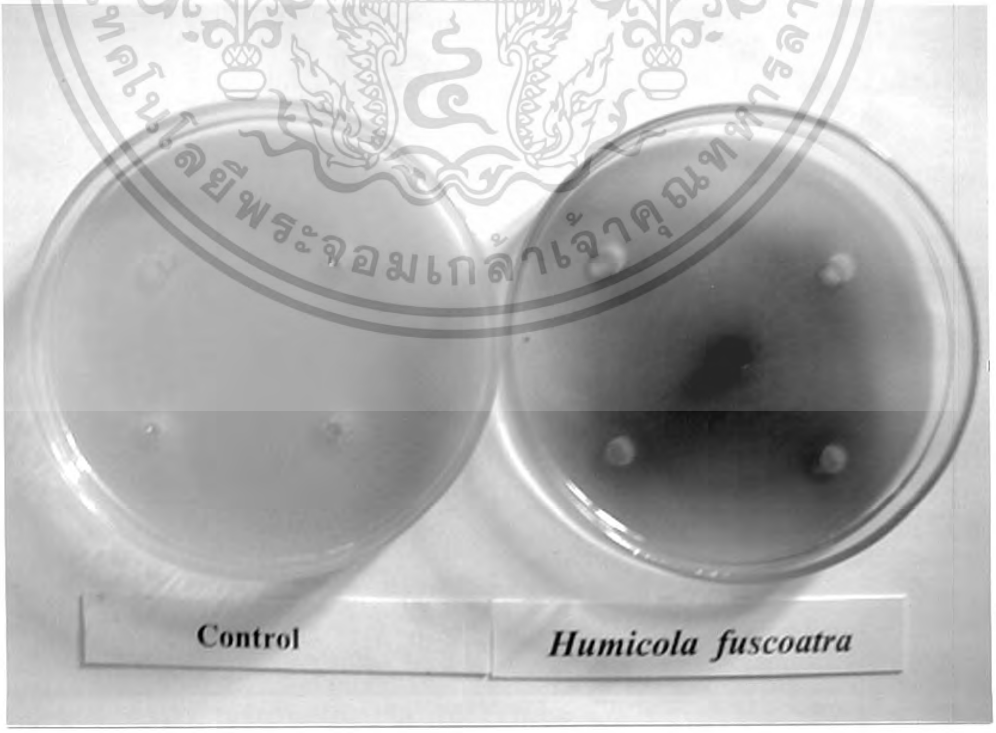
ภาพที่96 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Emericella rugulosa* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ภาพที่97 การไม่สร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Eurotium chevalieri* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่98 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Eurotium herbariorum* เมื่อเปรียบเทียบกับ control



ภาพที่99 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Humicola fuscoatra* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่100 การสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อ *Arthrobotrys oligospora* เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

วิธีการทดสอบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อราบนอาหารแข็งนั้นเป็นวิธีการตรวจสอบการสร้างแล้วมีการปลดปล่อยออกมาจากเส้นใยของเชื้อรา และเกิดกิจกรรมของเอนไซม์บนอาหารที่ใช้ทดสอบ ดังเช่นวิธีการทดสอบการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ดังนั้นการที่ได้ผลการทดสอบไม่ได้ผลเป็น +positive ก็ย่อมหมายถึงไม่มีการสร้างเอนไซม์ขึ้นมา หรือเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ได้แต่ไม่ปลดปล่อยออกมานอกเส้นใยทำให้ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวบนอาหารทดสอบได้ ดังนั้นการไม่สามารถตรวจพบปฏิกิริยาอาจจะไม่เป็นการยืนยันที่แน่ชัดได้ว่าเชื้อราชนิดนั้นไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดนั้นๆ ได้แน่นอนนัก

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อราทั้ง 20 สายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด โดยจากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ amylase พบว่า 80%ของเชื้อราที่ทดสอบทั้งหมดสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ amylase บนอาหาร starch agar ได้ กล่าวคือ เชื้อราสามารถใช้ soluble starch ที่เป็นส่วนประกอบที่เป็นแหล่งพลังงานให้กับเชื้อรา ถ้าเชื้อราสามารถสร้างและปลดปล่อยเอนไซม์ amylase ออกมาย่อยสลาย soluble starch ได้ ดังนั้นเมื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ก็จะพบ clear zone รอบๆ โคโลนีของเชื้อ แต่เพื่อเป็นการช่วยให้การสังเกตทำได้ง่ายยิ่งขึ้นจึงอาศัยปฏิกิริยาระหว่างสารละลายไอโอดีนกับแป้ง มาใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยถ้าใช้สารละลายไอโอดีนทดสอบปฏิกิริยากับแป้งแล้วนั้นพบว่าเกิดปฏิกิริยามีการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารทดสอบบริเวณรอบๆ โคโลนีของเชื้อราทดสอบเป็นสีน้ำเงิน-ม่วง แสดงว่าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amylase เนื่องจากแป้งยังไม่ถูกใช้ไปโดยเชื้อรา

จากการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase เมื่อเลี้ยงเชื้อราทดสอบบนอาหาร cellulose medium ที่อาศัยการเกิด dye diffusion ของ cellulose azure ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารประกอบที่เป็นการเชื่อมกันระหว่าง azure blue dye กับ cellulosic substrate และจะถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อ cellulosic substrate ถูกย่อยสลายไป ซึ่งอาหารที่ใช้ในการทดสอบจะมีลักษณะเป็น bi-layer คือ ส่วนล่างของอาหารเป็นส่วนที่ไม่มีสี ส่วนอาหารในส่วนบนนั้นจะมี cellulose azure อยู่ด้วย ดังนั้นถ้าเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase จะสามารถตรวจสอบได้โดยการสังเกตการแพร่ของสีจากอาหารส่วนบนลงมายังส่วนที่ไม่มีสีในส่วนล่าง และจากผลการทดลองพบว่า 85% ของเชื้อราทดสอบสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าเชื้อ *Trichoderma harzianum*, *T. harzianum* (T-01), *T. hamatum*, *T. hamatum* (T-12) สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kubicek และคณะ (1993) ซึ่งรายงานว่าเชื้อ *Trichoderma* sp. มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cellulase และทำการทดลองเกี่ยวกับขบวนการปลดปล่อยเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตลอดจนหากลไกในการย่อยสลาย cellulose ของเชื้อดังกล่าวด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Murase และคณะ (2003) ที่รายงานการศึกษาการแยกโปรตีนจากดินตัวอย่างจากเรือนทดลองโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ซึ่งพบว่าโปรตีนที่พบในดินเป็นชนิดเดียวกันกับเอนไซม์ cellulase ที่เชื้อรา *Humicola* สร้างขึ้นมา แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Humicola* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cellulase ใช้ในการย่อยสลาย cellulose แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Humicola fuscoatra* บนอาหารที่ใช้ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ได้

สำหรับการทดลองตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ protease นั้นพบว่า 70% ของเชื้อราทดสอบมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ protease ได้ โดยจากผลการทดลองพบว่า *Aspergillus oryzae, A. terreus, a. spasrus* สามารถสร้างเอนไซม์ protease ได้ โดยสามารถตรวจสอบได้โดยการสังเกต clear zone รอบๆ โคโลนีของเชื้อราทดสอบบนอาหาร casein hydrolysis medium ซึ่งมีส่วนประกอบของ skim milk ซึ่งนอกจากจะเป็น substrate ในการทดสอบแล้วยังทำให้อาหารทดสอบมีสีขุ่น ช่วยให้สังเกตบริเวณที่ skim milk ถูกย่อยไปโดยเชื้อราทดสอบได้ง่ายยิ่งขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Wang และคณะ (2005) ที่ทำการทดลองตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *A. fumigatus* ที่แยกได้จากดินและพบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ protease ที่มีน้ำหนักโมเลกุลของ extracellular protease เท่ากับ 124 kDa

ในขบวนการย่อยสลายลิกนินจะเป็นการทำงานของ oxidative enzymes ชนิดต่างๆ เช่น polyphenol oxidase, tyrosinase, peroxidase, laccase ในการทดลองความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ligninase ของเชื้อราครั้งนี้เป็นการทดสอบการสร้าง peroxidase enzyme ซึ่งวิธีการในการทดลองได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Egger (1986) ซึ่งเป็นการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อราทดสอบบนอาหาร Corn Meal Agar แล้วทำการตรวจสอบการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาจากเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยอาศัยการทำปฏิกิริยากันระหว่าง peroxidase enzyme ที่เชื้อปลดปล่อยออกมากับ 1% w/v pyrogallic acid และ 0.4% hydrogenperoxide ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยากันทำให้เกิดสีเหลืองทองจนถึงสีน้ำตาลเข้ม จากผลการทดลองพบว่าเชื้อราทดสอบสามารถตรวจพบกิจกรรมของ peroxidase enzyme ของเอนไซม์ ligninase ได้ถึง 80% ของเชื้อราทดสอบ 20 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose, protease และ ligninase ของเชื้อราที่มีประโยชน์ทั้ง 20 สายพันธุ์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1 สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

เชื้อ *Trichoderma harzianum*	สามารถสร้างเอนไซม์ cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับปานกลาง) protease และ ligninase แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase
T. harzianum (T-01)	สามารถสร้างเอนไซม์ cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับปานกลาง) protease และ ligninase แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase
T. hamatum	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ) และ ligninase แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ protease
T. hamatum (T-12)	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ) และ ligninase แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ protease
Gliocladium virens	สามารถสร้างเอนไซม์ cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ) และ ligninase แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase และ protease
Penicillium variabile	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase และ cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ) แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ protease และ ligninase
Aspergillus oryzae	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับปานกลาง) และ protease แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ ligninase
A. terreus	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ) และ protease แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ ligninase
A.sparsus	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ), protease และ ligninaseได้ทั้ง 4 ชนิด
Mucor hiemalis	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ) และ ligninase แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ protease

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mucor circinelloides	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ) และ ligninase แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ protease
Chaetomium lucknowense	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ), protease และ ligninase ได้ทั้ง 4 ชนิด
Achaetomium theilaviopsis	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ), protease และ ligninase ได้ทั้ง 4 ชนิด
Paecilomyces marquandii	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับสูง), protease และ ligninase ได้ทั้ง 4 ชนิด
Emericella nidulans	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ), protease และ ligninase ได้ทั้ง 4 ชนิด
Emericella rugulosa	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, protease และ ligninase แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase
Eurotium chevalieri	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase และ protease แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase และ ligninase
Eurotium herbariorum	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับปานกลาง), protease และ ligninase ได้ทั้ง 4 ชนิด
Humicola fuscoatra	สามารถสร้างเอนไซม์ protease และ ligninase แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase และ cellulase
Arthrobotrys oligospora	สามารถสร้างเอนไซม์ amylase, cellulose (มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ), protease และ ligninase ได้ทั้ง 4 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Abdel-Raheem, A. and Shearer, C. A. 2002. Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. Fungal Diversity 11: 1-19.

Cabaleiro, D. R., Rodriguez-Couto, S., Sanroman, A. and Longo, M. A. 2002. Comparison between the protease production ability of ligninolytic fungi cultivated in solid state media. Process Biochemistry 37(9): 1017-1023.

Castanres, A., Hay, A. J., Gordon, A. H., Maarae, S. I. and Wood, T. M. 1995. D-xylan-degrading enzyme system from the fungus *Phanerochate chrysosporium*. Journal of Biotechnology 93(3): 183-194.

Egger, K. N. 1986. Substrate hydrolysis patterns of post-fire ascomycetes (Pezizales). Mycologia 78: 771-780.

Fogarty, W. M. and Kelly, C. J. 1979. Developments in microbial extracellulr enzymes. In: Alan Wiseman. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. Fllis Horwood Ltd, Publishers, England, Vol3: pp289.

Germano, S., Pandey, A., Osaku, C. A., Rocha, S. N. and Soccol, C. R. 2003. Characterization and stability of proteases from *Penucillium* sp. produced by solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology 32(2): 246-251.

Kubicek, C. P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R. L. and Kubicek-pranz, E. M. 1993. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. Enzyme and Microbial Technology 15(2): 90-99.

Kvesitadze, E.,Adeishvili, E., Gomarteli, M., Kvachadze. L. and Kvesitadze, G. 1999. Celluase end xylanase activity of fungi in a collection isolated from the Southern Caucasus. International Biodeterioration & Biodegredation 43(4): 189-196.

Machuca, A. and Ferraz, A. 2001. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis*decay in solid medium. Enzyme and Microbial Technology 29(6-7): 386-391.

Marlida, Y., Saari, N., Hassan, Z. and Radu, S. 2000. Raw starch-degrading enzyme from newly isolated strains of endophytic fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16(6): 576-578.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mishra, C. and Leatham, G. F. 1990. Recovery and fractionation of the extracellular degradative enzymes from *Lentinula edodes* cultures cultivated on a solid lignocellulosic substrate. Journal of Fermentation and Bioengineering 69(1): 8-15.

Murase, A., Yoneda, M., Ueno, R. and Yonebayshi, K. 2003. Isolation of extracellular protein from greenhouse soil. Soil Biology and Biochemistry 35(5): 733-736.

Novotny, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E. and Sasek, V. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. Soil Biology and Biochemistry 36(10): 1545-1551.

Orth, A. B., Royse, D. J., Tien, M. and Ming, T. 1993. Uniquity of lignin degrading peroxidases among various wood degrading fungi. Applied and Environmental Microbiology 59(12): 4017-4023.

Paterson, R. R. M. and Bridge, P. D. 1994. Biochemical Techniques for Filamentous Fungi. Cab International, Wallingford.

Pekkarinen, A., Mannonen, L., Jones, B. L. and Niku-paavola, M. L. 2000. Production of Protease by *Fusarium* species Grown on Barley Grains and in Media Containing Cereal Proteins. Journal of Cereal Science 31(3): 253-261.

Puchart, V., Katapodis, P., Biely, P., Kremnicky, L., Christakopoulos, P., Vrsanska, M., Kekos, D., Marcris, B. J. and Bhat, M. K. 1999. Production of xylanases, mannases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Enzyme and Microbial Technology 24(-): 355-361.

Singh, A. and Sharma, S. 2002. Composting of a crop residue through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting.

Tuor, U., Winterhaalter, K. and Fiechter, A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. Journal of Biotechnology 41(1): 1-17.

Wang, S., Chen, Y., Wang, C. Yen, Y. and Chern, M. 2005. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. Enzyme and Microbial Technology 36(5-6): 660-665.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Whitehead, E. A. and Smith, S. N. 1989. Fungal extracellular enzyme activity associated with the breakdown of plant cell biomass. Enzyme and Microbial Technology 11(11): 736-743.

Wyk, J. P. H. 1999. Increaseed bioconversion of pretreated wastepaper to sugar by successive treatment with cellulose from *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei*.Australasian Biotechnology. 9(4): 206-210.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. PDA (Potato Dextrose Agar)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. Starch agar

Czapek solution A	50.0	มิลลิลิตร
Czapek solution C	50.0	มิลลิลิตร
Zinc solution	1.0	มิลลิลิตร
Copper solution	1.0	มิลลิลิตร
Starch solution	50.0	มิลลิลิตร
Agar	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	850.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่ความดัน 5 psi เป็นเวลา 30 นาที

3. Czapek solution A

$NaNO_3$	4.0	กรัม
KCl	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4. Czapek solution C

K_2HPO_4	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Zinc solution

$ZnSO_4.7H_2O$	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

6. Copper solution

$CuSO_4.5H_2O$	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	กรัม

7. Starch solution

Soluble starch	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

8. Cellulose media

$NH_4H_2PO_4$	0.1	กรัม
KCl	20.0	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	20.0	มิลลิกรัม
Agar	1.2	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH 4.5 เทอาหารที่เตรียมได้ลงในขวดแก้วขนาดเล็ก ขวดละประมาณ 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่ความดัน 10 psi เป็นเวลา 10 นาที

สำหรับอาหารชั้นที่เติมสี cellulose azure ชั้นบน เตรียมโดยละลาย cellulose azure 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 33 มิลลิลิตร และเตรียมส่วนของ basal agar ด้วยส่วนประกอบเช่นเดียวกับส่วนของอาหารชั้นล่างดังที่กล่าวมาแล้ว แต่ให้ลดปริมาตรของน้ำกลั่นเหลือ 67 มิลลิลิตร นำส่วนประกอบทั้งสองส่วนไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่ความดัน 10 psi เป็นเวลา 10 นาที โดยแยกส่วนประกอบทั้งสองส่วนออกจากกัน หลังจากนั้นนำทั้งสองส่วนมาผสมเข้าด้วยกันขณะร้อน แล้วจึงนำอาหารส่วนนี้ไปเททับบนอาหารส่วนล่างที่เตรียมไว้ในขวดแก้วขนาดเล็กก่อนหน้านี้ ขวดละประมาณ 0.1 มิลลิลิตร เพราะฉะนั้นอาหารที่ใช้ทดสอบจะมีสองส่วนด้วยกัน คือส่วนที่ไม่มีสีอยู่ด้านล่างและส่วนที่มีสีน้ำเงินอยู่ด้านบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. Casein hydrolysis medium

KH_2PO_4	1.0	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.1	กรัม
15% Skim milk	25.0	มิลลิลิตร
Glucose	10.0	กรัม
Agar	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร	

ปรับ pH 5.4 หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่ความดัน 5 psi เป็นเวลา 30 นาที โดย 15% Skim milk เตรียมโดย ละลายผง skim milk 3.75 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยละลายให้เป็นเนื้อครีมก่อนเติมลงในอาหาร

10. PYG (Peptone Yeast extract Glucose Agar)

Peptone	1.25 กรัม
Yeast extract	1.25 กรัม
Glucose	3.00 กรัม
Agar	18.00 กรัม
น้ำกลั่น	1.00 ลิตร

11. CMA (Corn Meal Agar)

Corn Meal Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้