

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์      การแยกและการคัดเลือกเชื้อราในคั้นพีชตระกูลไผ่พื้นเมืองบางชนิด  
ของประเทศไทยที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์

ชื่อผู้เขียน      นางสาวสุธีรา ทองกันทา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต      สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. สายสมร	ลำยอง	ประธานกรรมการ
อาจารย์ ดร. อูราภรณ์	สอาดสุด	กรรมการ
อาจารย์ พิภพ	ลำยอง	กรรมการ

### บทคัดย่อ

ในการแยก endophytic fungi จากกิ่งไผ่ 13 ชนิด จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อุทยานแห่งชาติ ดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ และบ้านหาดแพน จังหวัดพะเยา โดยนำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple sterilization ได้เชื้อราจำนวน 636 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบและบ่งบอกชนิดแล้วพบว่า Mycelia sterilia มีมากที่สุด จำนวน 97 ไอโซเลท รองลงมาคือ *Fusarium* spp. เชื้อที่พบมากเป็นอันดับสามคือ *Xylaria* spp. และ *Phoma* spp. ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถระบุชื่อหมายเลข 1, 2 และ *Colletotrichum* spp. พบมากเป็นอันดับสี่ *Phomopsis* spp., *Cladosporium* sp., *Artrinium* sp. และเชื้อที่ไม่สามารถระบุชื่อหมายเลข 3 พบในความถี่ต่ำ เชื้อที่พบเพียงเล็กน้อย ได้แก่ *Arthrographis* sp., *Aspergillus* sp., *Cephalosporium* sp., *Chaetasbolisia* sp. *Curvularia* sp., *Drechslera* spp., *Harknessia* sp., *Helicoon* sp., *Nigrospora* sp., *Papularia* spp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Pithomyces* spp., *Syringospora* sp., *Xylariaceae* นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ไม่สามารถระบุชื่อได้ใน class *Hyphomycetes* และ *Coelomycetes* จำนวน 27 และ 3 กลุ่มย่อยตามลำดับ

ในการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์ 4 ชนิด โดยประยุกต์ใช้วิธี gel diffusion assay ของ Downie *et al.* (1994) พบว่าวิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดการผลิต mannanase ได้ดีกว่า cellulase และ xylanase ส่วน inulinase ไม่สามารถตรวจวัดได้เลยเมื่อนำเชื้อรา endophyte จำนวน 226 ไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย locust bean gum 1% (w/v) แล้วตรวจการผลิต mannanase โดยใช้ phyta gel 0.7% (w/v) และ locust bean gum 0.1% (w/v) พบว่าเชื้อราจำนวน 99 ไอโซเลทผลิต mannanase ได้ดีโดยให้วงใสขนาด 15-22 มิลลิเมตร เมื่อคัดเลือกรหัสไปหมักในอาหารเหลว cultivation medium บ่มไว้บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) นาน 4 วัน แล้วตรวจวัดการผลิต mannanase ด้วย DNS reagent พบว่าเชื้อราที่ผลิต mannanase ได้สูงสุดคือ *Fusarium sp.* GncMU384 มีค่า mannanase activity 4.3 U/ml และ specific activity 22.2 U/mg ค่าการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเป็น 15.1 U/ml เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย locust bean gum 3.0% (w/v), peptone 0.9% (w/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2% (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03% (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ mannanase คือ ใช้ sodium acetate buffer 0.1M pH 6.5 บ่มที่ 60°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่า mannanase activity เพิ่มขึ้นเป็น 23.08 U/ml

**Thesis Title** Isolation and Selection of Endophytic Fungi from Some Native Thai Bamboo Capable of Polysaccharide Hydrolyzing Enzyme Production

**Author** Miss Sutheera Thongkantha

**M.S.** Biology

**Examining Committee**

Associate Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Chairman
Lecturer Dr. Auraporn Sardud	Member
Lecturer Pipop Lumyong	Member

**Abstract**

Six hundred and thirty three endophytic fungi have been isolated from thirteen species of bamboo in Chiang Mai University, Doi Suthep-Pui National Park, and Ban Hat Fan in Phayao area using a triple surface sterilization technique. The fungi were group to genera and family; *Mycelia sterilia* (morphospecies) is being the most abundant and the other isolates belong to *Fusarium* spp., *Xylaria* spp., *Phoma* spp., unidentified No. 1-2, *Colletotrichum* spp., *Phomopsis* spp., *Cladosporium* sp., *Artrinium* sp. and unidentified No. 3. A few number isolated were *Arthrographis* sp., *Aspergillus*, *Cephalosporium* sp., *Chaetasbolisia* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* spp., *Harknessia* sp., *Helicoon* sp., *Nigrospora* sp., *Papularia* spp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Pithomyces* spp., *Syringospora* sp., *Xylariaceae*. Moreover, 27 and 3 subgroup of unidentified species in class *Hyphomycetes* and *Coelomycetes* were found.

Modified gel diffusion method to selection endophytic fungi capable of four polysaccharide hydrolyzing enzyme production, mannanase were detected well than cellulase and xylannase, but inulinase was not detected by this assay.

Endophytic fungi isolated from 13 bamboo species in northern Thailand were screened for mannanase activity. A total of 226 strains tested, 99 were found to be mannanase positive, giving a clear zone of 15-22 mm on 0.1% (w/v) locust bean gum mixed with 0.7% (w/v) phyta gel. Five isolates were selected for quantitative assay of mannanase activity by DNS reagent. The isolate GnCMU384 identified as *Fusarium* sp. produced the highest mannanase activity, 4.3 U/ml and specific activity of 22.2 U/mg protein. Mannanase activity up to 15 U/ml ( $P < 0.05$ ) was produced by this strain in shake flask on galactomannan medium containing (%w/v), locust bean gum, 3; peptone, 0.9;  $K_2HPO_4$ , 0.2;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.03; and  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.03, and trace metal solution 0.1 (v/v), pH 7.0 incubate at room temperature (28-30°C) for 84 h. The enzyme worked well at pH 6.5 when incubated with mannan for 30 min at 60°C in 0.1M sodium acetate buffer pH 6.5. In this condition after incubated for 3 h the activity increased to 23 U/ml.