

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการแยกฟังไจจากตัวอย่างพืชสมุนไพร

หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน บนอาหาร ME agar ที่มีส่วนผสมของ 0.03 % (w/v) rose bengal และ 0.12 % (w/v) chloramphenicol พบว่ามีการเจริญของฟังไจออกมารอบ ๆ ส่วนของพืชสมุนไพร (ภาพ 4) จากสมุนไพรทั้งหมด 26 ชนิด สามารถแยกฟังไจได้ทั้งหมด 481 ไอโซเลท แบ่งเป็น จากกิ่ง 275 ไอโซเลท จากใบ 206 ไอโซเลท (ตาราง 1 และภาพ 5)



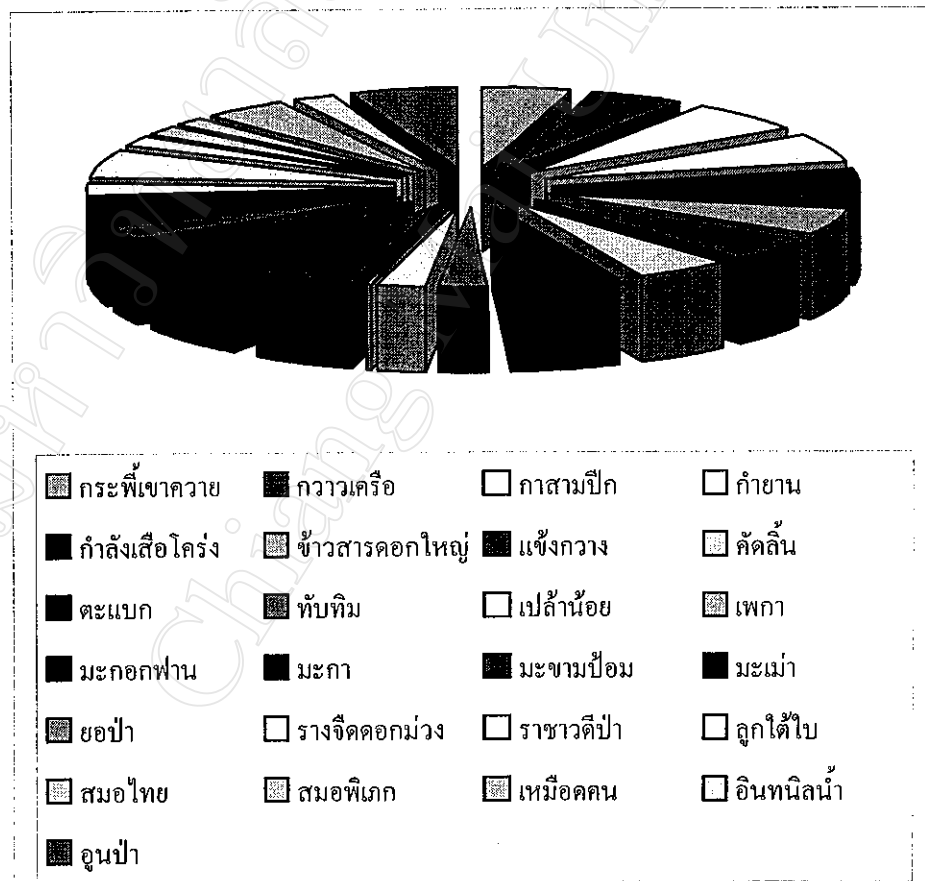
ภาพ 4 โคลนินของฟังไจที่เจริญออกมาจากส่วนของใบของตัวอย่างพืชสมุนไพรบนอาหาร ME agar ที่ผสม rose bengal และ chloramphenicol เป็นเวลา 14 วัน

ตาราง 1 จำนวนฟังไจที่แยกได้จากพืชสมุนไพรแต่ละชนิด บนอาหาร ME agar ที่ผสม rose bengal และ chloramphenicol ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 14 วัน

สมุนไพร	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้		รวม
	กิ่ง	ใบ	
กระเจาะ	9	1	10
กระเพรา	10	11	21
กวาวเครือ	11	13	24
กาสามปีก	16	13	29
กำยาน	14	14	28
กำลังเสือโคร่ง	15	15	30
ข้าวสารดอกใหญ่	13	13	26
แข้งกวาง	12	11	23
คัตลัน	10	13	23
ตะแบก	12	15	27
ทับทิม	6	6	12
เปล้าน้อย	12	0	12
เพกา	2	0	2
มะกอกฟาน	12	14	26
มะกา	18	12	30
มะขามป้อม	11	3	14
มะเฒ่า	8	10	18
ขมิ้น	1	2	3
รางจืดดอกม่วง	11	1	12
ราชวดีป่า	15	12	27
ลูกใต้ใบ	10	0	10
สมอไทย	4	5	9
สมอพิเภก	6	2	8

ตาราง 1 (ต่อ)

สมุนไพร	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้		รวม
	กิ่ง	ใบ	
เหมือดคน	12	9	21
อินทนิลน้ำ	8	2	10
อุ้นป่า	16	10	26
รวม	275	206	481



ภาพ 5 จำนวนฟังไจที่แยกได้จากพืชสมุนไพรแต่ละชนิด บนอาหาร ME agar ที่ผสม rose bengal และ chloramphenicol ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 14 วัน

2. ผลการทดสอบความสามารถในการผลิต แอล-แอสพาราจินส ของฟังไจบนอาหารแข็ง (plate assay)

หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนอาหาร modified Czapek dox's agar ฟังไจในไอโซเลทที่สามารถผลิต แอล-แอสพาราจินส ได้นั้น จะเกิดวงสีชมพู ขึ้นโดยรอบของโคโลนีของฟังไจ พบว่า จากจำนวนฟังไจทั้งหมด 481 ไอโซเลท ที่แยกได้มี สามารถในการผลิต แอล-แอสพาราจินส ได้ทั้งหมด 147 ไอโซเลท (ตาราง 2) ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 30.56 ของจำนวนฟังไจทั้งหมด ซึ่งพบว่า มีฟังไจที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงสีชมพูมากที่สุด 4 ไอโซเลท ได้แก่ LcSITw1-3 มาจากตะแบก (*Lagerstroemia calyculata* Kurz.) BaRfTw2-4 และ BaRfTw2-5 มาจากราชวดีป่า (*Buddleia asiatica* Lour.) และ HtQsTw2-9 มาจากเหมือดคน (*Heliciopsis terminalis* Sleum.) ที่มีวงสีขนาด 4.5, 3.5, 5.1, และ 4.1 ตามลำดับ (ภาพ 6) โดยฟังไจ ทั้ง 4 ไอโซเลท มาจากส่วนของกิ่งของพืชสมุนไพร

ตาราง 2 จำนวนฟังไจที่สามารถผลิต แอล-แอสพาราจินส บนอาหาร modified Czapek dox's agar ที่มี phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยสังเกตจากการสร้างวงสีชมพูรอบ ๆ โคโลนีของฟังไจ

สมุนไพร	จำนวนไอโซเลท	จำนวนไอโซเลทที่ผลิต แอล-แอสพาราจินส ได้	ไอโซเลทที่ให้วง สีชมพูกว้าง (cm)
กระเจาะ	10	9	OwRfLf2-2 (2.6)
กระเพราควาย	21	11	DcSITw1-2 (0.4)
กวาวเครือ	24	2	-
กาสามปึก	29	7	PcRfLf2-5 (1.3)
กำยาน	28	10	SbRfLf2-7 (0.9)
กำลังเสือโคร่ง	30	10	Ba1RfTw2-2 (0.7)
ข้าวสารดอกใหญ่	26	11	RpSITw2-3 (1.5)
แข้งกวาว	23	2	St1RfLf2-5 (0.7)
คัตลีน	23	5	Wt2RfLf2-5 (2.3)
ตะแบก	27	12	LcSITw1-3 (2.0)

ตาราง 2 (ต่อ)

สมุนไพร	จำนวนไอโซเลท	จำนวนไอโซเลทที่ผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้	ไอโซเลทที่ให้วง สีชมพูกว้าง (cm)
ทับทิม	12	4	PgRfTw1-5 (0.9)
เปล้าน้อย	12	4	CsRfTw2-1 (0.2)
เพกา	2	1	-
มะกอกพราน	26	9	CbSiTw1-4 (1.0)
มะกา	30	2	BoRfTw1-3 (1.5)
มะขามป้อม	14	7	PeSiLf1-1 (0.2)
มะเมาะ	18	4	AvRfLf2-3 (0.7)
ขมิ้น	3	0	-
รางจืดดอกม่วง	12	2	-
ราชวดีป่า	27	7	BaRfTw2-11 (0.8)
ลูกใต้ใบ	10	4	-
สมอไทย	9	4	TcQsTw2-1 (0.6)
สมอพิเภก	8	0	-
เหมือดคน	21	12	HtQsTw 2-9 (1.8)
อินทนิลน้ำ	10	1	-
อุ้นป่า	26	7	ViRfLf2-4 (1.0)
รวม	481	147	

หมายเหตุ หมายเลขไอโซเลทของเชื้อจะกำหนดด้วยรหัส 4 กลุ่ม ๆ ละ 2 ตัวอักษรหรือตัวเลข ดังนี้

กลุ่มแรก แทนชื่อ genus และ species ของพืชสมุนไพร

กลุ่มสอง แทนชื่อสถานที่ของพืชสมุนไพร

กลุ่มสาม แทนส่วนของพืชสมุนไพร

กลุ่มสี่ แทนลำดับไอโซเลทที่แยกได้

เช่น TcQsTw2-1 คือ เชื้อฟงไฉไอโซเลทนี้แยกได้จากพืชสมอไทย (*Terminalia chebula* Retz.) นำมาจากสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ โดยแยกจากส่วนของกิ่ง (twig) ที่ 2 ไอโซเลทที่ 1

3. ผลการทดสอบความสามารถในการผลิต แอล-แอสพาราจินส ของฟังไจในอาหารเหลว (nesslerization)

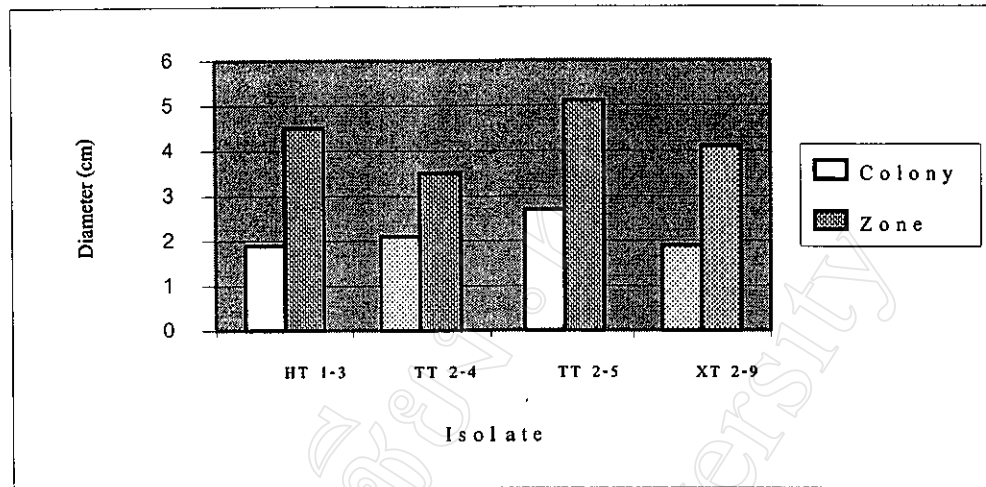
จากการนำฟังไจทั้ง 4 ไอโซเลท ที่ได้ทำการคัดเลือกไว้คือ ฟังไจไอโซเลท LcSITw1-3, BaRfTw2-4, BaRfTw2-5, และ HtQsTw2-9 ไปทำการทดสอบความสามารถในการผลิต แอล-แอสพาราจินส ของฟังไจในอาหารเหลว (nesslerization) พบว่า ในไอโซเลท BaRfTw2-4 มีค่า enzyme activity สูงที่สุด คือ 3.85 ใยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตาราง 3 ภาพ 7) โดยมีค่า พี เอช สุดท้าย แสดงดังภาพ 8

ตาราง 3 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและวงสีชมพู การทำงานของ แอล-แอสพาราจินส ของฟังไจ ไอโซเลท LcSITw1-3, BaRfTw2-4, BaRfTw2-5, และ HtQsTw2-9

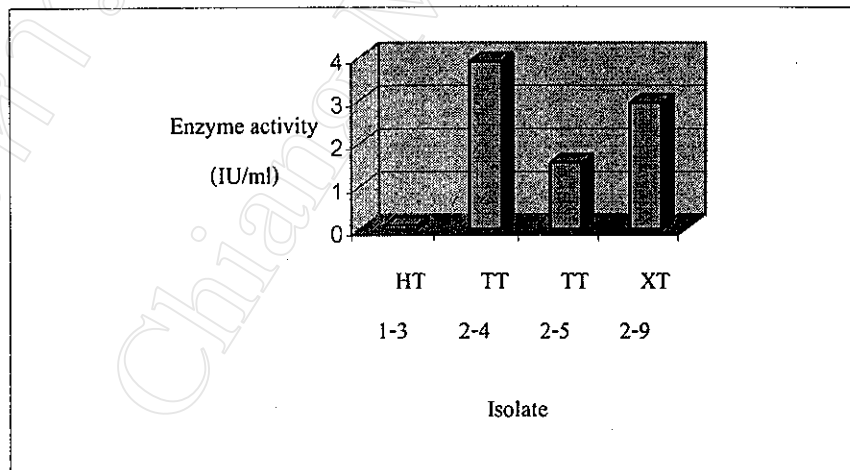
Fungi	Colony diameter (cm)	Zone diameter (cm)	Enzyme activity (IU/ml)	pH of culture filtrate
HT 1-3	1.9	4.5	0.09	8.88
TT 2-4	2.1	3.5	3.90	8.70
TT 2-5	2.7	5.1	1.56	8.71
XT 2-9	1.9	4.1	2.94	8.85

หมายเหตุ - เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและวงสีชมพู เลี้ยงฟังไจไอโซเลท LcSITw1-3, BaRfTw2-4, BaRfTw2-5, และ HtQsTw2-9 บนอาหาร modified Czapek dox's agar ที่มี phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

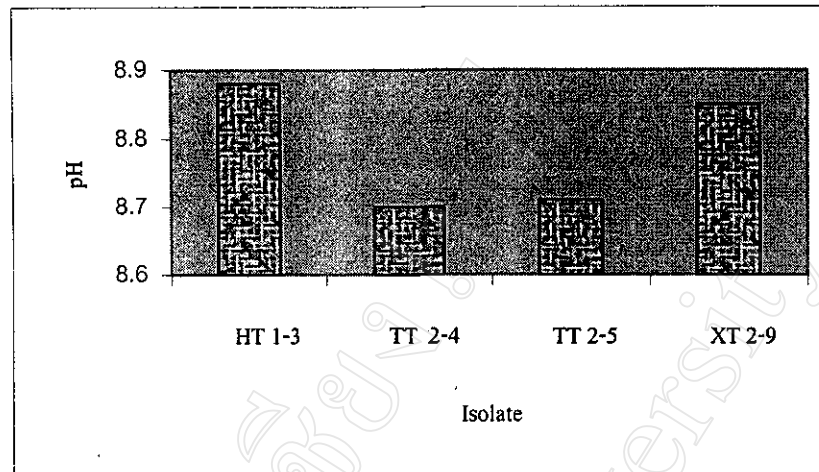
- การทำงานของ แอล-แอสพาราจินส (IU/ml) เลี้ยงฟังไจไอโซเลท LcSITw1-3, BaRfTw2-4, BaRfTw2-5, และ HtQsTw2-9 บนอาหาร modified Czapek dox's broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง



ภาพ 6 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและวงสีชมพูของฟังไจไอโซเลท LcSITw1-3, BaRfTw2-4, BaRfTw2-5, และ HtQsTw2-9



ภาพ 7 การทำงานของ แอล-แอสพาราจินเนส (IU/ml) ของฟังไจไอโซเลท LcSITw1-3, BaRfTw2-4, BaRfTw2-5, และ HtQsTw2-9 ในอาหาร modified Czapek dox's broth เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง



ภาพ 8 ค่า พี เอช สุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อ (modified Czapek dox's broth) หลังจากเลี้ยงเชื้อครบ 96 ชั่วโมง เหย้าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของฟังไจไอโซเลท LcSITw1-3, BaRfTw2-4, BaRfTw2-5, และ HtQsTw2-9

4. ผลการตรวจสอบอนุกรมวิธานของฟังไจที่ผลิต แอล-แอลพาราจินส ได้สูงสุด

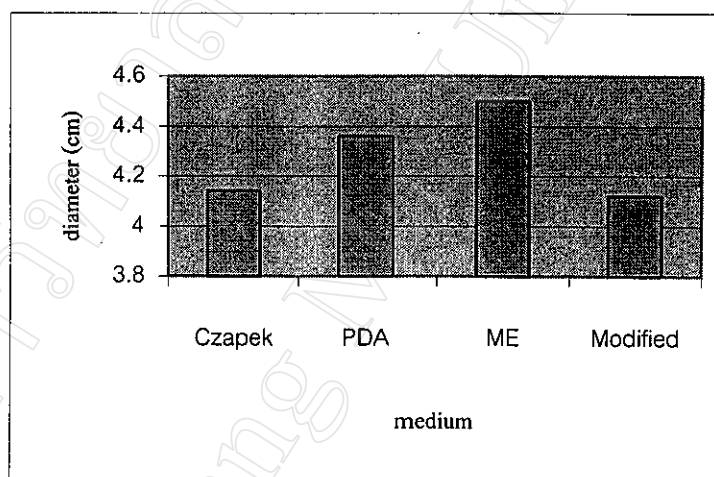
4.1 ลักษณะการเจริญของฟังไจบนอาหารแข็ง

จากการนำฟังไจ BaRfTw2-4 มาทำการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง ทั้ง 4 ชนิด ได้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีดังตาราง 4 และ ภาพ 9 พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ จะมีลักษณะโคโลนีดังต่อไปนี้

- ก. Czapek-dox agar มีลักษณะของเส้นใยสีขาวอัดตัวแน่นและหนา กระจายสม่ำเสมอ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 4.14 เซนติเมตร
- ข. PDA มีลักษณะของเส้นใยสีขาวอัดตัวแน่น เสมอกันกระจายเป็นวงกว้าง ขอบของโคโลนีมีลักษณะเป็นแฉก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 4.36 เซนติเมตร
- ค. ME agar มีลักษณะของเส้นใยสีขาวอัดตัวแน่น เสมอกันกระจายเป็นวงกว้าง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 4.5 เซนติเมตร ดังภาพ 10
- ง. Modified czapek dox's agar มีลักษณะของเส้นใยสีขาวอัดตัวแน่นและหนา กระจายตัวสม่ำเสมอ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 4.12 เซนติเมตร

ตาราง 4 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของฟังไจ BaRfTw2-4 บนอาหารแข็ง 4 ชนิด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชนิดของอาหาร	เส้นผ่านศูนย์กลาง (cm)
Czapek-dox agar	4.14
PDA	4.36
ME agar	4.50
Modified czapek dox's agar	4.12



ภาพ 9 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของฟังไจ BaRfTw2-4 บนอาหารแข็ง 4 ชนิด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Czapek - Czapek-dox agar, ME – ME agar, modified – modified czapek dox's agar)

4.2 การสร้างสปอร์ของฟังไจบนอาหารแข็ง

จากการนำฟังไจ BaRfTw2-4 มาทำการศึกษาการสร้างสปอร์บนอาหารแข็งทั้ง 4 ชนิด พบว่า ไม่พบการสร้างสปอร์ของฟังไจได้ในอาหารใดเลยทั้ง 2 ชุด การทดลอง (ตาราง 5 และ 6)



ภาพ 10 ลักษณะโคโลนีของฟังไจ BaRfTw2-4 บนอาหาร ME agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตาราง 5 การสร้างสปอร์ของฟังไจ BaRfTw2-4 บนอาหารแข็ง 4 ชนิด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน ภายใต้อาการแสงปกติ

ชนิดของอาหาร	การสร้างสปอร์
PDA	-
ME agar	-
Czapek-dox agar	-
Modified czapek dox's agar	-

ตาราง 6 การสร้างสปอร์ของฟังไจ BaRfTw2-4 บนอาหารแข็ง 4 ชนิด เป็นเวลา 30 วันภายใต้รังสี near UV

ชนิดของอาหาร	การสร้างสปอร์
PDA	-
ME agar	-
Czapek-dox agar	-
Modified czapek dox's agar	-

5. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ของฟังไจในอาหารเหลว

5.1 ชนิดของกล้าเชื้อ (seed medium) ที่เหมาะสมในการเตรียมเป็นกล้าเชื้อ

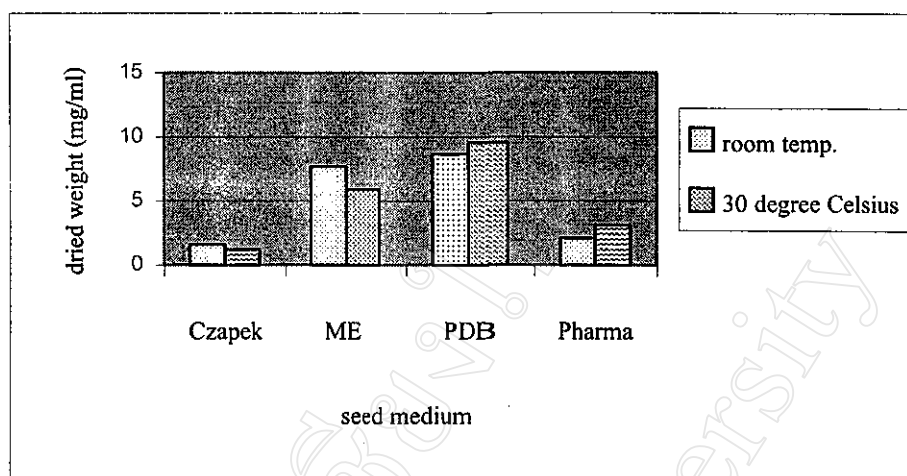
จากการนำฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 มาทำการศึกษาหาชนิดของกล้าเชื้อ (seed medium) ที่เหมาะสมในการเตรียมเป็นกล้าเชื้อทั้ง 4 ชนิด โดยใช้อุณหภูมิห้องและ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ได้ผลใกล้เคียงกัน คือ พบว่าเชื้อมีการกระจายตัวดีในทุกชนิดของกล้าเชื้อ และ PDB เป็นกล้าเชื้อที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งมากที่สุด (ตาราง 7 และ 8 ภาพ 11 และ 12)

ตาราง 7 น้ำหนักแห้งของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ในการเตรียมเป็นกล้าเชื้อ ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

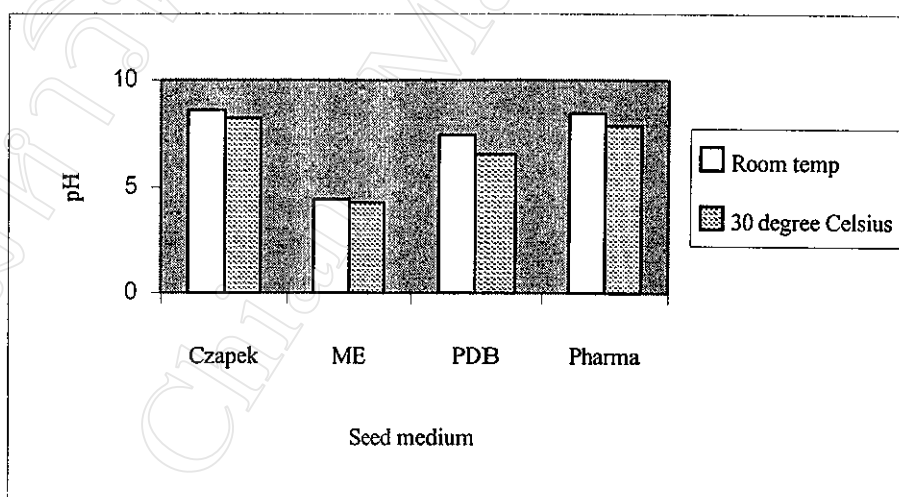
Seed medium	pH of culture filtrate	Dried weight (mg/ml)
Czapek-dox broth	8.62	1.57
ME broth	4.43	7.66
PDB	7.44	8.66
Pharmamedia	8.46	2.08

ตาราง 8 น้ำหนักแห้งของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 บนอาหารแข็ง 4 ชนิด ในการเตรียมเป็นกล้าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Seed medium	pH of culture filtrate	Dried weight (mg/ml)
Czapek-dox broth	8.24	1.20
ME broth	4.29	5.86
PDB	6.53	9.56
Pharmamedia	7.89	3.08



ภาพ 11 น้ำหนักแห้งของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ในการเตรียมเป็นกล้าเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องและที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Czapek - Czapek-dox broth, ME - ME broth, Pharma - Pharmamedia)



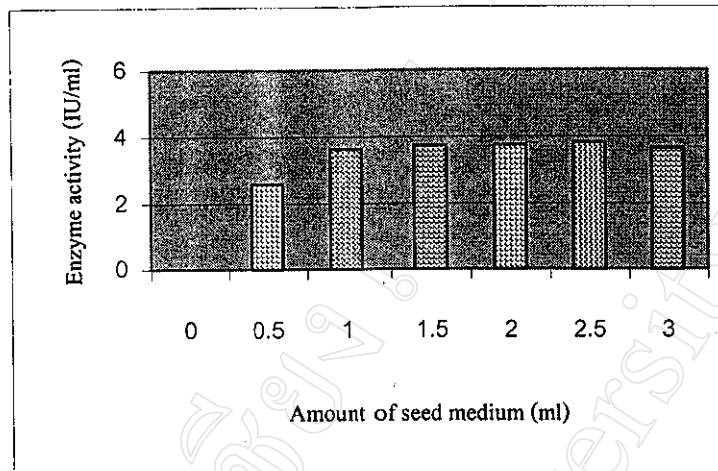
ภาพ 12 ค่า พี เอช สุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด หลังจากเลี้ยงเชื้อครบ 48 ชั่วโมง ของฟังไจ *Ms. Xylaria* sp. *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 (Czapek - Czapek-dox broth, ME - ME broth, Pharma - Pharmamedia)

5.2 ปริมาณของกล้าเชื้อ (seed medium) ที่เหมาะสมในการผลิต แอล-แอสพาราจินัส

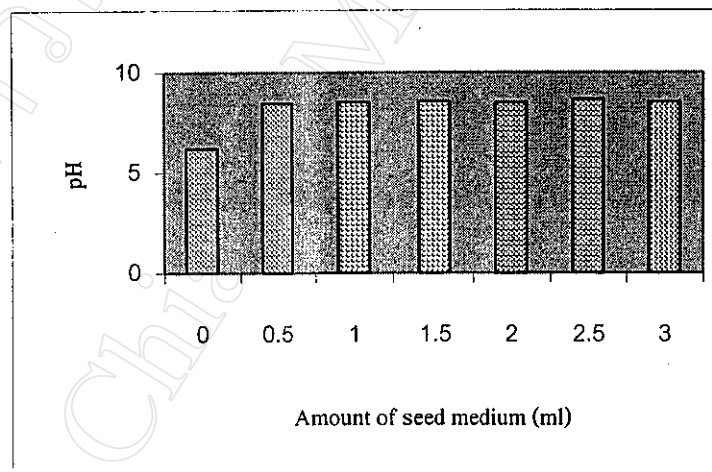
จากการนำฟังใจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 มาทำการศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมในอาหาร PDB ที่ใช้เป็น seed medium โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณกล้าเชื้อที่ 2.5 มิลลิลิตร หรือ 8.33 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเป็นปริมาณที่เชื้อมีการผลิต แอล-แอสพาราจินัส ที่สูงที่สุด (ตาราง 9 ภาพ 13) โดยมีค่า พี เอช สุดท้ายแสดงดังภาพ 14

ตาราง 9 การทำงานของ แอล-แอสพาราจินัส (IU/ml) ของฟังใจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้กล้าเชื้อในปริมาณต่าง ๆ

Amount of seed medium (ml)	pH of culture filtrate	Enzyme activity (IU/ml)
0.0	6.20	0.00
0.5	8.44	2.60
1.0	8.53	3.63
1.5	8.56	3.73
2.0	8.50	3.75
2.5	8.66	3.83
3.0	8.51	3.66



ภาพ 13 การทำงานของ แอล-แอสพาราจิเนส (IU/ml) ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้กล้าเชื้อในปริมาณต่าง ๆ



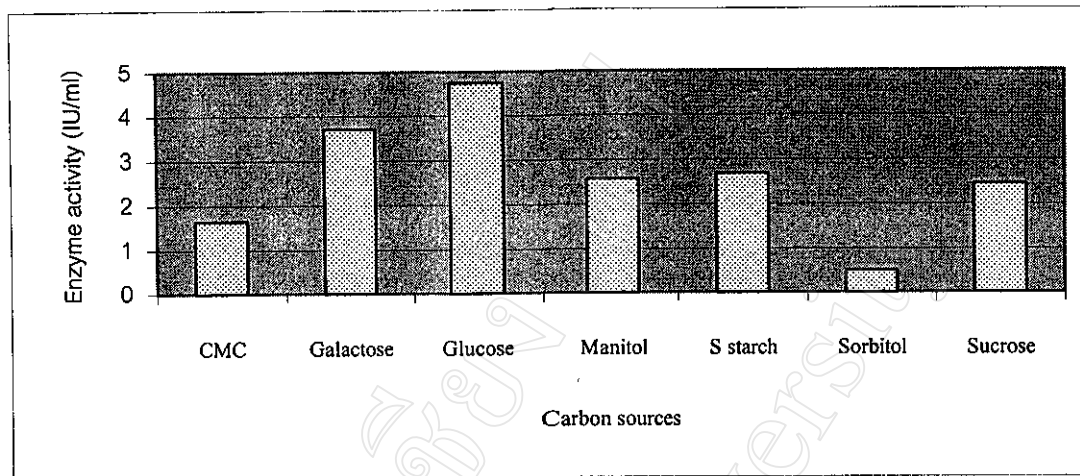
ภาพ 14 ค่า พี เอช สุดท้ายของอาหาร modified Czapek dox's broth หลังจากการเลี้ยงเชื้อครบ 96 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 โดยใช้กล้าเชื้อปริมาณต่าง ๆ ใน PDB (seed medium)

5.3 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต แอล-แอสพาราจินัส

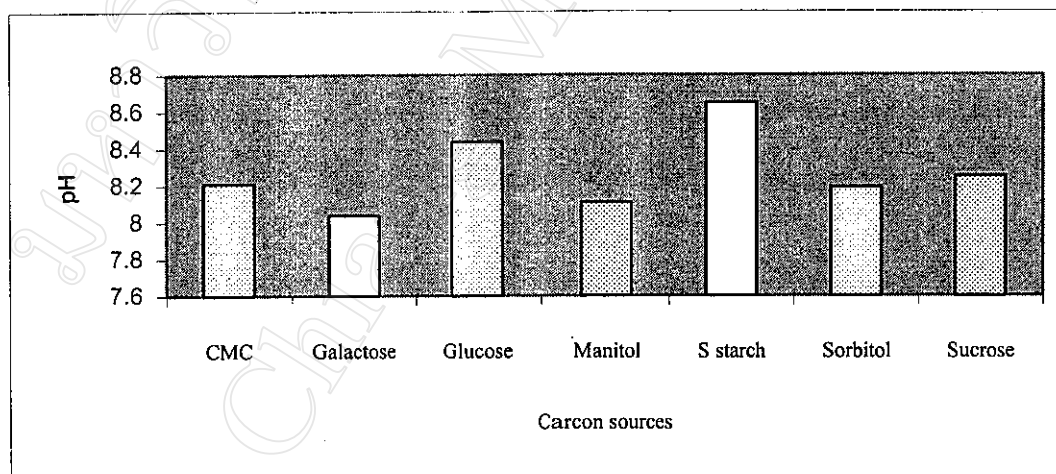
จากการนำฟังใจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 มาเลี้ยงใน based medium ที่ประกอบด้วย L-asparagine 1% (w/v), KH_2PO_4 0.152% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.052% (w/v), KCl 0.052% (w/v), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace (v/v) พี เอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 5 ชนิด พบว่า เมื่อใช้ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน จะมีค่า enzyme activity สูงที่สุด คือ 4.75 ใยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตาราง 10 ภาพ 15) ส่วน galactose, manitol, sucrose, และ sorbitol ผลิตเอนไซม์ได้รองลงมาคือ 3.71, 2.57, 2.46, และ 0.5 ใยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับโดยมีค่า พี เอช สุดท้ายแสดงดังภาพ 16

ตาราง 10 การทำงานของ แอล-แอสพาราจินัส (IU/ml) ของฟังใจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ 7 ชนิด

Carbon sources	pH of culture filtrate	Enzyme activity (IU/ml)
CMC	8.21	1.65
Galactose	8.04	3.71
Glucose	8.44	4.75
Manitol	8.11	2.57
Soluble starch	8.65	2.69
Sorbitol	8.19	0.50
Sucrose	8.25	2.46



ภาพ 15 การทำงานของ แอล-แอลพาราจินเนส (IU/ml) ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ 7 ชนิด (S starch = soluble starch)



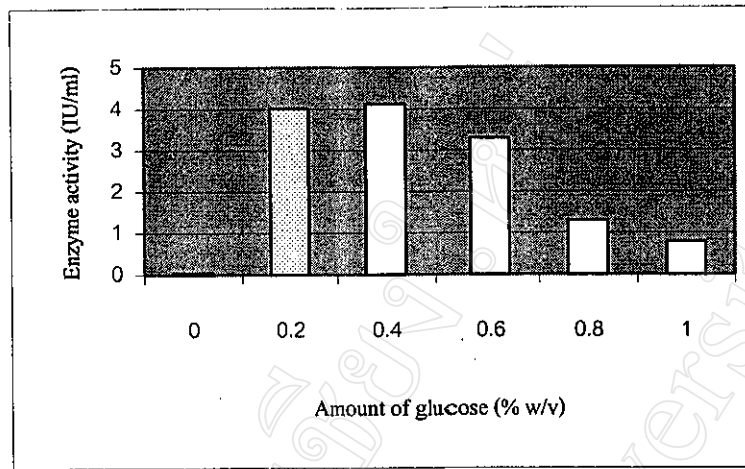
ภาพ 16 ค่า พี เอช สุดท้ายของอาหาร modified Czapek dox' broth หลังจากเลี้ยงเชื้อครบ 96 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ 7 ชนิด (S starch = soluble starch)

5.4 ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (กลูโคส) ที่เหมาะสมในการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส

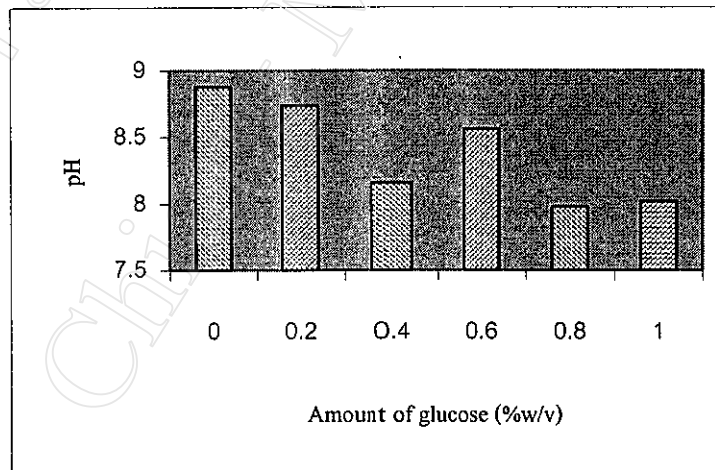
จากการนำฟังใจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 มาเลี้ยงใน based medium ที่ประกอบด้วย L-asparagine 1% (w/v), KH_2PO_4 0.152% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.052% (w/v), KCl 0.052% (w/v), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace (v/v) พี เอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่มีแหล่งคาร์บอนคือกลูโคสในปริมาณต่าง ๆ พบว่า เมื่อใช้กลูโคสปริมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จะมีค่า enzyme activity สูงที่สุด คือ 4.12 ิออนิตต่อมิลลิตร (ตาราง 11 และ ภาพ 17) โดยมีค่า พี เอช สุดท้ายแสดงดังภาพ 18

ตาราง 11 การทำงานของ แอล-แอสพาราจิเนส (IU/ml) ของฟังใจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณต่าง ๆ

Amount of glucose (% w/v)	pH of culture filtrate	Enzyme activity (IU/ml)
0.0	8.88	0.04
0.2	8.74	4.02
0.4	8.16	4.12
0.6	8.56	3.30
0.8	7.98	1.30
1.0	8.02	0.78



ภาพ 17 การทำงานของ แอล-แอสพาราจิเนส (IU/ml) ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณต่าง ๆ



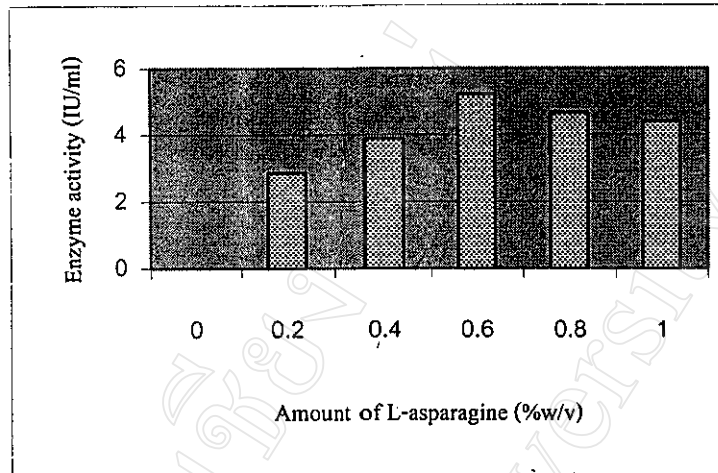
ภาพ 18 ค่า พี เอช สุดท้ายของอาหาร modified Czapek dox's broth หลังจากเลี้ยงเชื้อครบ 96 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณต่าง ๆ

5.5 ปริมาณของไนโตรเจน (แอล-แอสพาราจีน) ที่เหมาะสมในการผลิต แอล-แอสพาราจีน

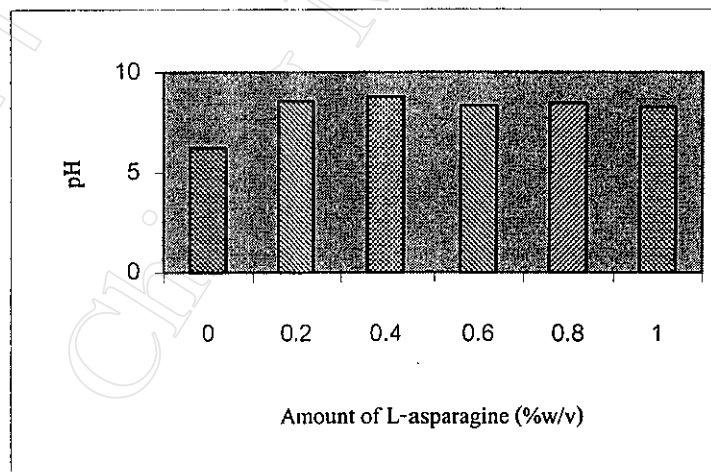
จากการนำฟังใจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 มาเลี้ยงใน based medium ที่ประกอบด้วย Glucose 0.4% (w/v), KH_2PO_4 0.152% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.052% (w/v), KCl 0.052% (w/v), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace (v/v) พี เอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่มี แอล-แอสพาราจีน ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่แตกต่างกันนั้น พบว่า ที่ปริมาณ 0.6 เปอร์เซ็นต์ นั้น จะให้ปริมาณในการผลิต แอล-แอสพาราจีนได้ดีที่สุด คือ 5.23 ใยชนิดต่อมิลลิตร (ตาราง 12 ภาพ 19) โดยมีค่า พี เอช สุดท้ายแสดงดังภาพ 20

ตาราง 12 การทำงานของ แอล-แอสพาราจีน (IU/ml) ของฟังใจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4 % (w/v)) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้ แอล-แอสพาราจีน เป็นแหล่งของไนโตรเจนในปริมาณต่าง ๆ

Amount of L-asparagine (% w/v)	pH of culture filtrate	Enzyme activity (IU/ml)
0.0	6.22	0.00
0.2	8.56	2.87
0.4	8.76	3.89
0.6	8.32	5.23
0.8	8.45	4.66
1.0	8.26	4.42



ภาพ 19 การทำงานของ แอล-แอสพาราจินเนส (IU/ml) ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4 %(w/v)) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้ แอล-แอสพาราจิน เป็นแหล่งของไนโตรเจนในปริมาณต่าง ๆ



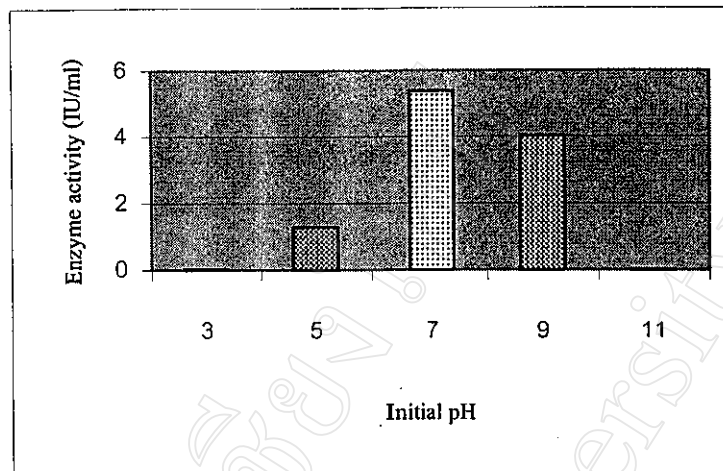
ภาพ 20 ค่า พี เอช สุดท้ายของอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4 %(w/v)) หลังจากเลี้ยงเชื้อครบ 96 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 โดยใช้ แอล-แอสพาราจิน เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณต่าง ๆ

5.6 ค่าพีเอช เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส

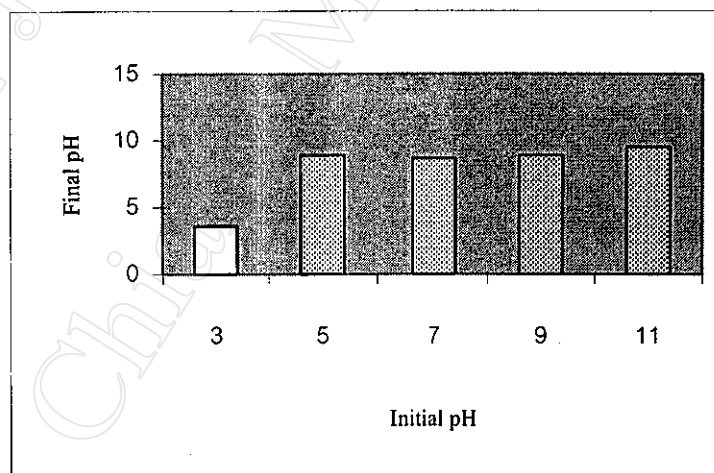
จากการนำฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 มาเลี้ยงใน based medium เพื่อผลิต แอล-แอสพาราจิเนสที่ประกอบด้วย L-asparaginase 0.6% (w/v), Glucose 0.4% (w/v), KH_2PO_4 0.152% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.052% (w/v), KCl 0.052% (w/v), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่มีค่า พี เอช เริ่มต้นแตกต่างกัน พบว่าแทบจะไม่มีการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส หรือ มีการผลิตน้อยมาก ที่ พี เอช 3 และ 11 แต่จะผลิตเมื่อค่า พี เอช อยู่ในช่วง 5-9 โดยที่ พี เอช 7 จะสามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนสได้สูงสุดคือ 5.39 ใยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตาราง 13 ภาพ 21) โดยมีค่า พี เอช สุดท้ายแสดงดังภาพ 22

ตาราง 13 การทำงานของ แอล-แอสพาราจิเนส (IU/ml) ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4%(w/v) แอล-แอสพาราจิน 0.6% (w/v)) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้ค่า พี เอช เริ่มต้นต่าง ๆ

Initiate pH	pH of culture filtrate	Enzyme activity (IU/ml)
3	3.56	0.03
5	8.89	1.27
7	8.65	5.39
9	8.89	4.02
11	9.55	0.01



ภาพ 21 การทำงานของ แอล-แอสพาราจินเนส (IU/ml) ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4%(w/v) แอล-แอสพาราจิน 0.6% (w/v)) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้ค่า พี เอช เริ่มต้นต่าง ๆ



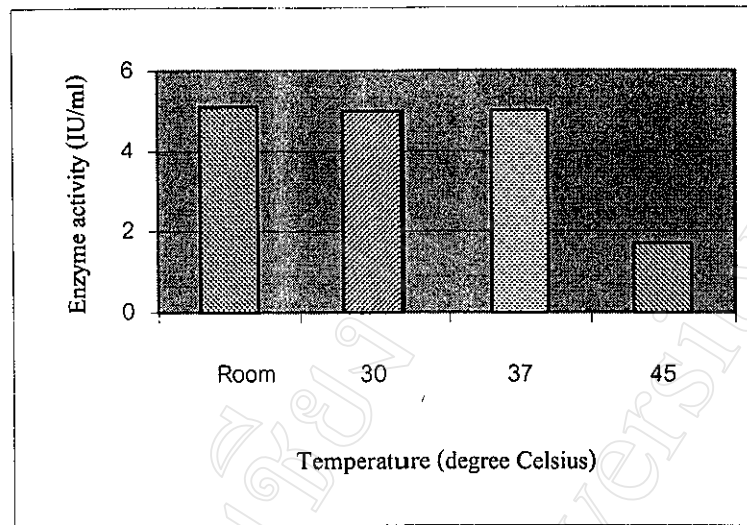
ภาพ 22 ค่า พี เอช สุดท้ายของอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4%(w/v) แอล-แอสพาราจิน 0.6% (w/v)) หลังจากเลี้ยงเชื้อครบ 96 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 โดยใช้ค่า พี เอช เริ่มต้นต่าง ๆ

5.7 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส

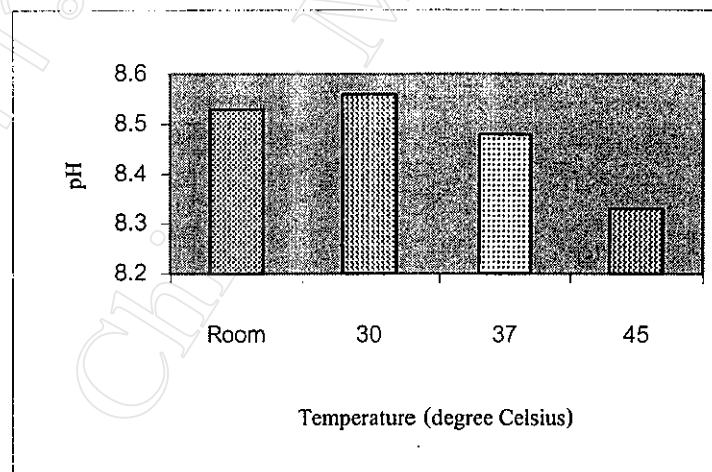
จากการนำฟังใจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 มาเลี้ยงใน based medium เพื่อผลิต แอล-แอสพาราจิเนสที่ประกอบด้วย L-asparaginase 0.6% (w/v), Glucose 0.4% (w/v), KH_2PO_4 0.152% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.052% (w/v), KCl 0.052% (w/v), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace (v/v) พี เอช 7 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่ใช้อุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่า จะมีการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส น้อยมาก ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่จะผลิตได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน ที่อุณหภูมิ ห้อง ถึง 30 องศาเซลเซียสโดยที่ อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 26-32 องศาเซลเซียส) จะสามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนสได้สูงสุดคือ 5.11 ใยูนิตต่อมิลลิตร (ตาราง 14 ภาพ 23) โดยมีค่า พี เอช สุดท้ายแสดงดังภาพ 24

ตาราง 14 การทำงานของ แอล-แอสพาราจิเนส (IU/ml) ของฟังใจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4%(w/v) แอล-แอสพาราจิเนส 0.6% (w/v)) เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Temperature (°C)	pH of culture filtrate	Enzyme activity (IU/ml)
Room	8.53	5.11
30	8.56	5.00
37	8.48	5.01
45	8.33	1.70



ภาพ 23 การทำงานของ แอล-แอสพาราจิเนส (IU/ml) ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4%(w/v) แอล-แอสพาราจิน 0.6% (w/v)) เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ



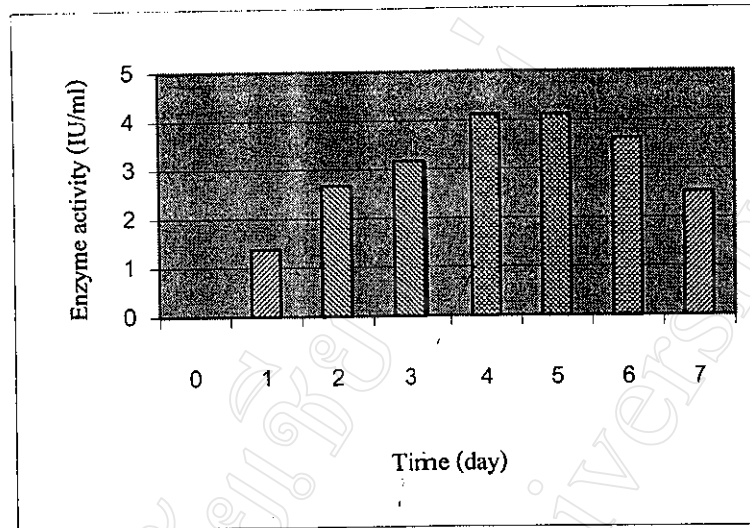
ภาพ 24 ค่า พี เอช สุดท้ายของอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4%(w/v) แอล-แอสพาราจิน 0.6% (w/v)) หลังจากเลี้ยงเชื้อครบ 96 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ของ ฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

5.8 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส

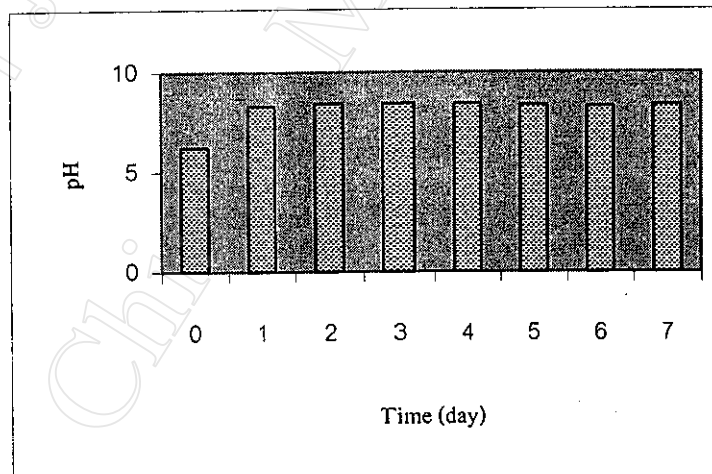
จากการนำฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 มาเลี้ยงใน based medium เพื่อผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ที่ประกอบด้วย L-asparaginase 0.6% (w/v), Glucose 0.4% (w/v), KH_2PO_4 0.152% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.052% (w/v), KCl 0.052% (w/v), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace (v/v) พี เอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่า จะมีการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส เพิ่มขึ้นตามลำดับระยะเวลาที่มากขึ้นจนถึงวันที่ 4-5 คือ 4.11 ใยูนิตต่อมิลลิลิตร และเริ่มผลิตได้ลดลงในวันต่อ ๆ มา (ตาราง 15 ภาพ 25) โดยมีค่า พี เอช สุดท้ายแสดงดังภาพ 26

ตาราง 15 การทำงานของ แอล-แอสพาราจิเนส (IU/ml) ของฟังไจ TT 2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4%(w/v) แอล-แอสพาราจิน 0.6% (w/v)) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยใช้ระยะเวลาต่าง ๆ

Time (days)	pH of culture filtrate	Enzyme activity (IU/ml)
0	6.22	0.00
1	8.29	1.37
2	8.41	2.67
3	8.43	3.18
4	8.42	4.11
5	8.34	4.11
6	8.28	3.62
7	8.34	2.52



ภาพ 25 การทำงานของ แอล-แอสพาราจิเนส (IU/ml) ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ในอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4%(w/v) แอล-แอสพาราจิน 0.6% (w/v)) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยใช้ระยะเวลาต่าง ๆ



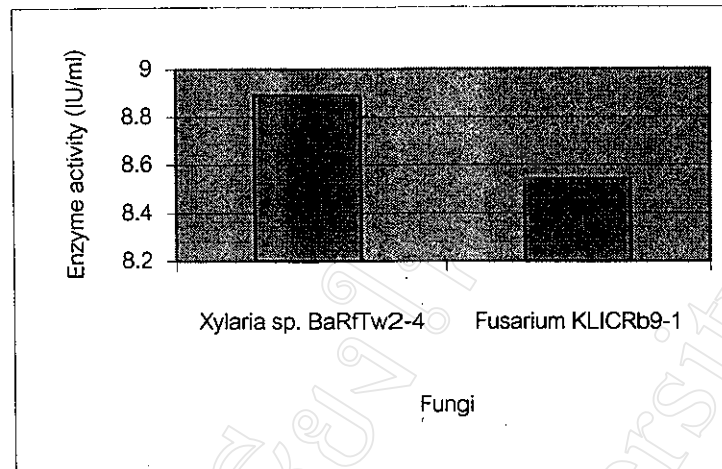
ภาพ 26 ค่า พี เอช สุดท้ายของอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4%(w/v) แอล-แอสพาราจิน 0.6% (w/v)) หลังจากเลี้ยงเชื้อครบ 96 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 หลังจากเลี้ยงเชื้อครบในเวลาต่าง ๆ

6. ผลการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบค่า enzyme activity (IU/ml) และ specific activity (IU/mg) ของ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 และ *Fusarium* KLICRb9-1

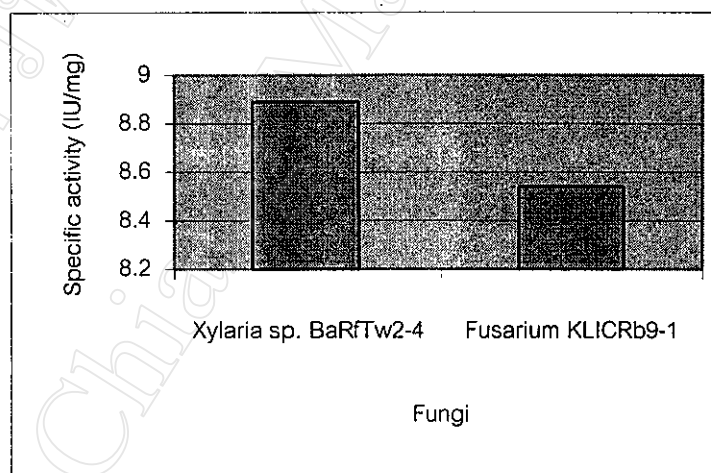
หลังจากเลี้ยง *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 และ *Fusarium* KLICRb9-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต แอล-แอสพาราจิเนสที่ประกอบด้วย L-asparaginase 0.6% (w/v), Glucose 0.4% (w/v), KH_2PO_4 0.152% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.052% (w/v), KCl 0.052% (w/v), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trace (v/v) พี เอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่า *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 จะมีการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้มากกว่า *Fusarium* KLICRb9-1 โดย *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 จะสามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้ 4.21 ไอยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ *Fusarium* KLICRb9-1 จะผลิต แอล-แอสพาราจิเนสได้ 3.02 ไอยูนิตต่อมิลลิลิตร และ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 ยังมีค่า specific activity มากกว่า *Fusarium* KLICRb9-1 กล่าวคือ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 มีค่า specific activity เท่ากับ 5.33 ไอยูนิตต่อมิลลิกรัม ในขณะที่ *Fusarium* KLICRb9-1 มีค่า specific activity เท่ากับ 4.51 ไอยูนิตต่อมิลลิกรัม (ตาราง 16 ภาพ 27, 28) โดยมีค่า พี เอช สุดท้ายแสดงดังภาพ 29

ตาราง 16 เปรียบเทียบค่าการทำงานของ แอล-แอสพาราจิเนส (enzyme activity และ specific activity) ของ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 และ *Fusarium* KLICRb9-1 ในอาหาร modified Czapek dox's broth ที่ประกอบด้วย กลูโคส 0.4 % (w/v) แอล-แอสพาราจิเนส 0.6 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

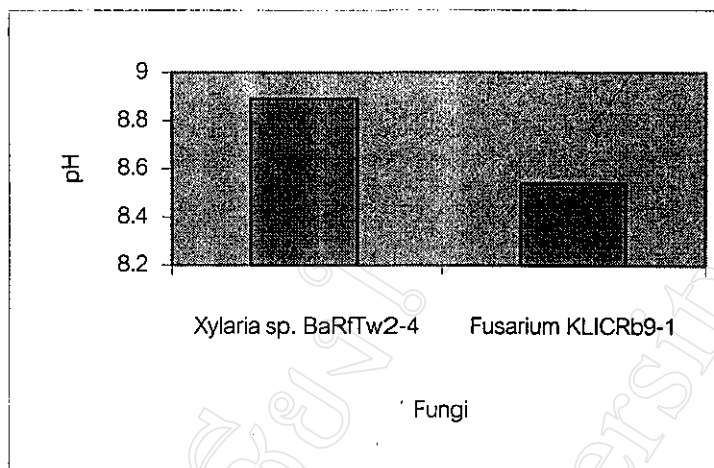
Fungi	pH of culture filtrate	Enzyme activity	Specific activity
		(IU/ml)	(IU/mg)
<i>Xylaria</i> sp. BaRfTw2-4	8.89	4.21	5.33
<i>Fusarium</i> KLICRb9-1	8.54	3.02	4.51



ภาพ 27 ค่า enzyme activity (IU/ml) ของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 และ *Fusarium* KLICRb 9-1 ในอาหาร modified Czapek dox's broth ที่ประกอบด้วยกลูโคส 0.4 %(w/v) แอล-แอสพาราจีน 0.6 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง



ภาพ 28 ค่า specific activity (IU/mg) ของ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 และ *Fusarium* KLICRb9-1 ในอาหาร modified Czapek dox's broth ที่ประกอบด้วยกลูโคส 0.4 %(w/v) แอล-แอสพาราจีน 0.6 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง



ภาพ 29 ค่า พี เอช สุดท้ายของอาหาร modified Czapek dox's broth (กลูโคส 0.4 %(w/v) แอล-แอล พาราจีน 0.6 %(w/v)) เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของ ฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 และ *Fusarium* KLICRb9-1

ตาราง 17 สรุปค่าปริมาณต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการผลิต แอล-แอลพาราจีนของฟังไจ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4

สภาวะการศึกษา	ค่าที่เหมาะสม
ปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสม	2.5 มล (8.33 %(v/v))
แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม	กลูโคส
ปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม	0.4 %
ปริมาณ แอล-แอลพาราจีน ที่เหมาะสม	0.6 %
ค่า พี.เอช. ที่เหมาะสม	7.0
อุณหภูมิที่เหมาะสม	ห้อง (ประมาณ 26-30 °C)
ระยะที่เหมาะสม	96 ชม.