

การแยกเชื้อราชอบด่างที่ผลิตเอนไซม์ไซแลเนส และการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราจาก
พืชผลทางการเกษตรบางชนิด

Isolation of Xylanase-Producing Alkaliphilic Fungi and Development of
Fungal Culture Media from Some Agricultural Crops

สันธยา บุญรุ่ง* รัตนาวดี ดีสวัสดิ์ และ อนิสา สารูปพล

Santhaya Boonrung* Rattanawadee Deesawat and Anisa Sarupphon

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

Biology Program, Faculty of Science, Buriram Rajabhat University

*E-mail: Santhaya.br@bru.ac.th

Received: Jan 05, 2023

Revised: Feb 08, 2023

Accepted: Feb 13, 2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อราชอบด่างที่ผลิตเอนไซม์ไซแลเนสจากดินที่มีเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และเพื่อพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราจากพืชผลทางการเกษตรบางชนิดเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ ในการศึกษาสามารถแยกเชื้อราชอบด่างได้ทั้งหมด 23 ไอโซเลทจากดินที่มีเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จากการนำเชื้อราชอบด่างที่ได้มาตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสบนอาหาร xylan agar, pH 9 ด้วยวิธี Gram's iodine โดยแสดงผลด้วยค่าดัชนีการผลิตเอนไซม์ ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี พบว่ามีเชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท GMCF 16 และ GMSS 14 ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสสูงที่สุด โดยมีค่าดัชนีการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 2.07 ± 0.25 และ 1.94 ± 0.08 ตามลำดับ จากการระบุชนิดของเชื้อราโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลทมีลักษณะสอดคล้องกับเชื้อราในสกุล *Aspergillus* จากนั้นนำเชื้อราดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่เตรียมจากพืชผลทางการเกษตร 4 ชนิด ได้แก่ มันสำปะหลัง มันม่วง ข้าวโพด และถั่วแดง ส่วนในชุดควบคุมเพาะเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) สำเร็จรูป อาหารเลี้ยงเชื้อราทุกชนิดมีการปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 9 พบว่า *Aspergillus* sp. GMSS 14 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้นมันม่วง รองลงมาคือ อาหาร PDA สำเร็จรูป และเจริญได้น้อยที่สุดบนอาหารวุ้นมันสำปะหลัง อาหารวุ้นข้าวโพด และอาหารวุ้นถั่วแดง ส่วน *Aspergillus* sp. GMCF 16 เจริญได้ดีไม่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราสูตรใหม่ ๆ จากพืชผลทางการเกษตรเพื่อใช้ทดแทนอาหาร PDA สำเร็จรูปที่มีราคาค่อนข้างแพงที่ใช้เป็นประจำในห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: อาหารเลี้ยงเชื้อรา พืชผลทางการเกษตร เชื้อราชอบด่าง ไซแลเนส

Abstract

The objective of the present study was to isolate xylanase-producing alkaliphilic fungi from soil containing decayed agricultural waste and to develop fungal culture media from some agricultural crops for culturing the isolated fungi. In this study, a total of 23 alkaliphilic fungal isolates were isolated from soil containing decayed agricultural waste. The alkaliphilic fungal isolates were tested for their xylanase production ability using Gram's iodine assay on xylan agar, pH 9 which was expressed as the enzymatic index calculated from the ratio of clear zone diameter to colony diameter. It was found that the fungal isolates GMCF 16 and GMSS 14 exhibited the highest xylanase activity with the enzymatic indexes of 2.07 ± 0.25 and 1.94 ± 0.08 , respectively. Based on morphological characteristics, the two fungal isolates were identified belonging to the genus *Aspergillus*. The

fungal isolates were subsequently cultivated on culture media prepared from 4 agricultural crops including cassava, purple sweet potato, corn and red kidney bean while in the control, they were cultivated on commercial potato dextrose agar (PDA). The initial pH of all fungal culture media was adjusted to 9. It was found that *Aspergillus* sp. GMSS 14 showed the highest growth on purple sweet potato agar, followed by commercial PDA, and the least growth on cassava agar, corn agar and red kidney bean agar whereas *Aspergillus* sp. GMCF 16 was able to grow well on all culture media. This research demonstrated the feasibility of developing new fungal culture media from agricultural crops to replace the relatively expensive commercial PDA commonly used in laboratories.

Keywords: Fungal culture media, Agricultural crops, Alkaliphilic fungi, Xylanase

1. บทนำ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจัดเป็นวัสดุประเภท ลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) มีองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ เซลลูโลส (Cellulose) ร้อยละ 30-45 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ร้อยละ 25-45 และลิกนิน (Lignin) ร้อยละ 15-30 [1], [2] โดยเฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบโพลีแซ็กคาไรด์ ที่มีจำนวนมากเป็นอันดับสองในผนังเซลล์พืชรองจากเซลลูโลส มีองค์ประกอบหลักเป็นไซแลน (Xylan) ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของ น้ำตาลไซโลส (Xylose) ที่ต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic bond) และมีโครงสร้างกิ่งของน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เช่น อะราบินอส (Arabinose) กาแลคโตส (Galactose) และกรดกลูคูโรนิก (Glucuronic acid) [2]-[5] ในการย่อยสลายไซแลนที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์พืชนั้นต้องการ เอนไซม์กลุ่มไซแลเนส (Xylanase) ได้แก่ 1) เอนโดไซแลเนส (Endo-1,4- β -xylanase, EC 3.1.2.8) ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิกระหว่างหน่วยย่อยน้ำตาลไซโลสแบบสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Xylooligosaccharides) และ 2) เบต้าไซโลซิเดส (β -xylosidase, EC 3.2.1.37) ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะในไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ ทำให้ได้หน่วยย่อยเป็นน้ำตาลไซโลส [2], [6] ในสภาพธรรมชาติพบว่ามีจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลเนสย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา ซึ่งเชื้อราจัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่น เนื่องจากสร้างเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูงแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์จึงทำให้ง่ายต่อการแยกและเก็บเกี่ยวเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป [4], [5], [7]-[9] ดังนั้นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ เช่น ฟางข้าว ใบอ้อย ชังข้าวโพด แกลบ ลำต้นมันสำปะหลัง เป็นต้น จึงสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุหมักเพื่อใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้ผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้ ในปัจจุบันเอนไซม์ไซแลเนสชอบต่างได้รับความสนใจนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อ

กระดาษเพิ่มมากขึ้น โดยนำมาใช้ในขั้นตอนก่อนการฟอกเยื่อ (Pre-bleaching) โดยเฉพาะเยื่อกระดาษkraft (Kraft pulp) ที่ได้จากขั้นตอนการผลิตเยื่อที่ผ่านการต้มด้วยด่าง โดยทั่วไปกระดาษkraftที่มีสีน้ำตาลเนื่องจากมีลิกนินเป็นองค์ประกอบและมีค่า pH ของเยื่อหลังการต้มประมาณ 9-10 ดังนั้นการใช้เอนไซม์ไซแลเนสที่ทำงานได้ดีภายใต้สภาวะที่เป็นด่างสูงในการกำจัดลิกนินออกจากเยื่อกระดาษก่อนการฟอกเยื่อ จึงทำให้ไม่ต้องปรับค่า pH ของเยื่อลงเพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้ โดยเอนไซม์ไซแลเนสจะย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส จึงทำให้ลิกนินที่จับอยู่กับเฮมิเซลลูโลสหลุดออกจากเยื่อกระดาษไปด้วย ส่งผลให้เยื่อกระดาษมีความขาวขึ้น การใช้เอนไซม์ไซแลเนสจึงช่วยลดปริมาณคลอรีนที่ใช้ในขั้นตอนการฟอกเยื่อกระดาษ ทำให้ช่วยลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ [10], [11]

ในการคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซแลเนสจากธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นิยมเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป โดยเฉพาะอาหารวุ้นมันฝรั่งสำเร็จรูป (Commercial potato dextrose agar หรือ commercial PDA) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีองค์ประกอบซับซ้อน (Complex media) มีส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่ น้ำสกัดจากมันฝรั่ง น้ำตาลเดกซ์โทรส และวุ้น โดยเชื้อราส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายแป้งในมันฝรั่งให้เป็นน้ำตาลที่ละลายน้ำได้เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ นอกจากนั้นมันฝรั่งยังเป็นแหล่งของไนโตรเจน วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อราอีกด้วย [12], [13] การใช้อาหาร PDA สำเร็จรูปในการเพาะเลี้ยงเชื้อราถึงแม้จะมีข้อดี คือ สามารถเตรียมใช้งานได้ง่าย และรวดเร็ว โดยการละลายผงอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่น แต่มีข้อเสียคือ ราคาแพงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงทำให้ในปัจจุบันมีความสนใจในการนำพืชผลทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีปริมาณมาก และราคาถูก เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด มันเทศ ฟักทอง

เป็นต้น มาพัฒนาเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราเพื่อใช้ทดแทนอาหาร PDA สำเร็จรูป ทำให้ช่วยลดต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อ [12], [14]-[16] อย่างไรก็ตาม เชื้อราชอบต่างที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสแต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน [17] ดังนั้นจึงทำให้ต้องมีการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากพืชผลทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ ขึ้นมาเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราชอบต่างที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสแต่ละชนิด โดยเฉพาะใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสชอบต่างหรือทนต่างสำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ต่อไป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อราชอบต่างที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสจากดินที่มีเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราจากพืชผลทางการเกษตรบางชนิด เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้แทนอาหาร PDA สำเร็จรูป ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราชอบต่างที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ต่อไป

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การแยกเชื้อราบริสุทธ์

ทำการเก็บตัวอย่างดินที่มีเศษฟางจากแปลงนาข้าว และดินที่มีเศษใบอ้อยจากแปลงปลูกอ้อยในพื้นที่จังหวัดบุรีรัมย์ มาเจือจางตามลำดับส่วน (Serial dilution) และนำไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อ (Spread plate method) บนอาหาร PDA สำเร็จรูป (Commercial PDA) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India), pH 9 ที่เติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (Tetracycline) เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน และทำการแยกเชื้อราให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บรักษาเชื้อราไว้ในหลอดอาหารวุ้นเยือก PDA สำเร็จรูป เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2. การคัดเลือกเชื้อราชอบต่างที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลส

เพาะเลี้ยงเชื้อราบนจานอาหาร PDA สำเร็จรูป, pH 9 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเชื้อราบริเวณขอบโคโลนี แล้วใช้เข็มเย้าย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราไปวางตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหาร Xylan agar

(0.2% Beechwood xylan, 0.2% NaNO_3 , 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% MgSO_4 , 0.05% KCl, 0.02% Peptone, 1.7% Agar), pH 9 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน และตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสด้วยวิธี Gram's iodine [18] โดยเทสารละลายไอโอดีนให้ท่วมผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อและโคโลนีของเชื้อรา ทั้งวันนาน 3-5 นาที แล้วตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสของเชื้อราโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีเชื้อรา (Clear zone diameter) และเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (Colony diameter) โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier caliper) ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณหาค่าอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี หรือค่าดัชนีการผลิตเอนไซม์ (Enzymatic index, EI) ดังสมการที่ 1 [19]-[21] และคัดเลือกเชื้อราที่มีค่าดัชนีการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสสูงสุดเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

$$\text{EI} = \text{clear zone diameter/colony diameter} \quad (1)$$

2.3. การระบุชนิดของเชื้อราชอบต่างที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสในเบื้องต้น

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราชอบต่างที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสได้ในระดับสูง โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA สำเร็จรูป เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อรา เช่น รูปร่าง สี ผิวหน้า ขอบโคโลนี เป็นต้น และศึกษาลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Eclipse E100, Tokyo, Japan) โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงบนสไลด์ (Slide culture technique) จากนั้นนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับคู่มือการจัดจำแนกเชื้อราหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เพื่อระบุกลุ่มของเชื้อราในเบื้องต้น

2.4. การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราชอบต่างที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสจากพืชผลทางการเกษตร

พืชผลทางการเกษตรที่นำมาใช้เตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราเพื่อทดแทนอาหาร PDA สำเร็จรูป ได้แก่ มันสำปะหลัง มันม่วง ข้าวโพด และถั่วแดง โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีส่วนประกอบดังนี้ (กรัมต่อลิตร) น้ำสกัดที่ได้จากการต้มพืชผลทางการเกษตร 200 กรัม กลูโคส 20 กรัม และวุ้น 15 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 9 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อราขอบต่างที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงบนจานอาหาร PDA สำเร็จรูป, pH 9 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเชื้อราบริเวณขอบโคโลนี แล้วใช้เข็มเย็บย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราไปวางตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหารวุ้นทดสอบทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ อาหารวุ้นมันสำปะหลัง (Cassava agar) อาหารวุ้นมันม่วง (Purple sweet potato agar) อาหารวุ้นข้าวโพด (Corn agar) อาหารวุ้นถั่วแดง (Red kidney bean agar) และอาหาร PDA สำเร็จรูป (Commercial PDA) และนำเชื้อราไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารวุ้นทดสอบแต่ละชนิด โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

2.5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่ม (Completely Randomized Design, CRD) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS) version 23 เปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่โดยใช้วิธีการ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. ผลการวิจัย

3.1. การแยกและคัดเลือกเชื้อราขอบต่างที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

งานวิจัยนี้สามารถแยกเชื้อราขอบต่างจากตัวอย่างดินที่มีเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้จำนวน 23 ไอโซเลท (Isolate) และเมื่อนำเชื้อราที่แยกได้มาตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสบนอาหาร Xylan agar พบเชื้อราจำนวน 12 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส (Table 1) โดยเชื้อราไอโซเลท GMCF 16 ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงสุด ซึ่งมีค่าดัชนีการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 2.07 รองลงมาได้แก่ เชื้อรา 5 ไอโซเลท คือ GMSS 2, GMSS 11, GMSS 14, GMSR 20 และ GMSR 23 มีค่าดัชนีการผลิตเอนไซม์อยู่ระหว่าง 1.50-2.00 ส่วนเชื้อราอีก 6 ไอโซเลท ได้แก่ GMSS 6, GMSS 7, GMCF 15, GMCF 18, GMSR 21 และ GMSR 22 มีค่าดัชนีการผลิตเอนไซม์อยู่ระหว่าง 1.00-1.49 ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อราขอบต่างที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงสุดจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ GMCF 16 และ GMSS 14 (Figure 1) เพื่อนำไประบุชนิดและศึกษาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากพืชผลทางการเกษตรในการทดลองต่อไป

Table 1 Enzymatic index of the fungal isolates on xylan agar stained with Gram's iodine

Number	Isolates	Enzymatic index
1	GMSS 2	1.59±0.06 ^{cd}
2	GMSS 6	1.10±0.02 ^f
3	GMSS 7	1.35±0.06 ^{de}
4	GMSS 11	1.59±0.23 ^{cd}
5	GMSS 14	1.94±0.08 ^{ab}
6	GMCF 15	1.07±0.01 ^f
7	GMCF 16	2.07±0.25 ^a
8	GMCF 18	1.40±0.03 ^{de}
9	GMSR 20	1.80±0.01 ^{bc}
10	GMSR 21	1.18±0.03 ^{efde}
11	GMSR 22	1.42±0.03 ^{de}
12	GMSR 23	1.56±0.10 ^{cd}

Data are means ± standard deviations (SD).

Means within a column followed by different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$.

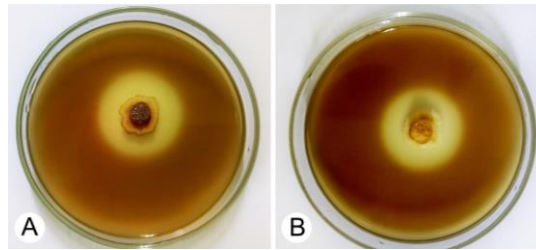


Figure 1 Clear zones around the fungal colonies on xylan agar plates

(A) Isolate GMSS 14; (B) Isolate GMCF 16

3.2. การระบุชนิดของเชื้อราขอบต่างที่ผลิตเอนไซม์ ไซลเนสในเบื้องต้น

เมื่อนำเชื้อราขอบต่างที่ผลิตเอนไซม์ไซลเนสได้สูงสุดจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ GMSS 14 และ GMCF 16 มาศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เชื้อราไอโซเลท GMSS 14 ที่เจริญบนอาหาร PDA สำเร็จรูป มีโคโลนีสีขาว ผิวหน้าโคโลนีขรุขระและนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และเส้นใยฟูเล็กน้อย (Figure 2A) ส่วนเชื้อราไอโซเลท GMCF 16 มีโคโลนีสีเหลือง ขอบโคโลนีสีขาว ผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะเป็นร่องตรงออกจากจุดศูนย์กลางโคโลนี และนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (Figure 3A) ส่วนลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า เชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท มี

ลักษณะที่คล้ายคลึงกัน (Figure 2B และ Figure 3B) คือ เส้นใยมีผนังกัน มีโคนดิโอฟอร์ (Conidiophore) ที่ยาวชูตั้งตรง ไม่มีผนังกัน และโป่งพองที่ปลายเกิดเป็นเวสซิเคิล (Vesicle) ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลม พบไฟลิด (Phialides) สร้างออกจากเวสซิเคิล มีการสร้างสปอร์แบบโคนิเดีย (Conidia) ที่มีรูปร่างกลมต่อกันเป็นสายโซ่ออกจากไฟลิด และหัวโคนิเดีย (Conidia head) เป็นแบบแท่ง (Columnar) ซึ่งลักษณะของเชื้อราดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับเชื้อราในสกุล *Aspergillus* [22], [23] ดังนั้นเชื้อราไอโซเลท GMSS 14 และ GMCF 16 จึงระบุชนิดเป็น *Aspergillus* sp. GMSS 14 และ *Aspergillus* sp. GMCF 16 ตามลำดับ

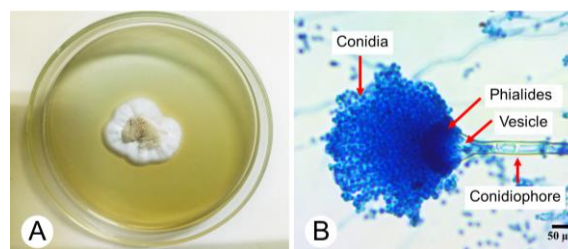


Figure 2 Morphological characteristics of *Aspergillus* sp. GMSS 14

(A) Colony morphology after incubation for 5 days at 37°C on commercial PDA;

(B) Conidia head and conidiophore (400x)

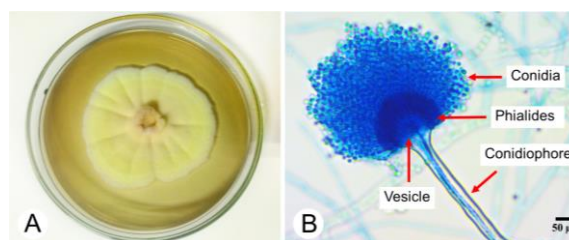


Figure 3 Morphological characteristics of *Aspergillus* sp. GMCF 16

(A) Colony morphology after incubation for 5 days at 37°C on commercial PDA;

(B) Conidia head and conidiophore (400x)

3.3. การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราขอบที่ผลิตเอนไซม์เซลลูลาเนสจากพืชผลทางการเกษตร

จากการนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. GMSS 14 และ *Aspergillus* sp. GMCF 16 ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูลาเนสได้สูงสุดมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA สำเร็จรูป และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากพืชผลทางการเกษตรอีก 4 ชนิด (อาหารวุ้นมันสำปะหลัง อาหารวุ้นมันม่วง อาหารวุ้นข้าวโพด และอาหารวุ้นถั่วแดง) พบว่า เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญบนอาหารวุ้นทดสอบได้ทุกชนิด โดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. GMSS 14 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีระหว่าง 2.40-4.26 เซนติเมตร

(Table 2, Figure 4) ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* sp. GMCF 16 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีระหว่าง 3.90-4.75 เซนติเมตร (Table 2, Figure 5) การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. GMSS 14 บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเชื้อราเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้นมันม่วง รองลงมาคือ อาหาร PDA สำเร็จรูป และเจริญได้น้อยที่สุดบนอาหารวุ้นมันสำปะหลัง อาหารวุ้นข้าวโพด และอาหารวุ้นถั่วแดง ส่วนการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. GMCF 16 บนอาหารวุ้นชนิดต่าง ๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

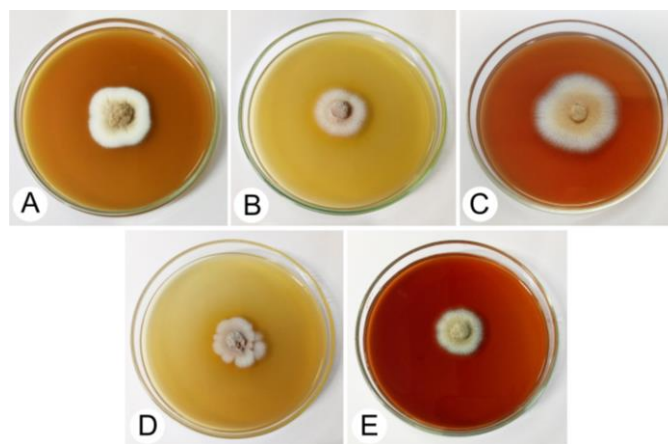


Figure 4 Mycelial growth of *Aspergillus* sp. GMSS 14 on different culture media

(A) Commercial PDA; (B) Cassava agar; (C) Purple sweet potato agar; (D) Corn agar; (E) Red kidney bean agar

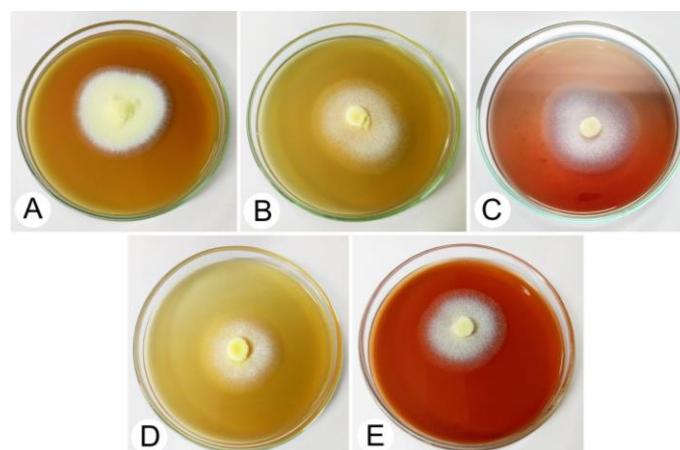


Figure 5 Mycelial growth of *Aspergillus* sp. GMCF 16 on different culture media

(A) Commercial PDA; (B) Cassava agar; (C) Purple sweet potato agar; (D) Corn agar; (E) Red kidney bean agar

Table 2 Mycelial growth of *Aspergillus* sp. GMSS 14 and *Aspergillus* sp. GMCF 16 on different culture media at 37°C for 5 days

Culture media	Mycelium colony diameter (cm)	
	<i>Aspergillus</i> sp. GMSS 14	<i>Aspergillus</i> sp. GMCF 16
Commercial PDA	3.37±0.28 ^b	4.75±0.07 ^{ns}
Cassava agar	2.80±0.00 ^c	4.42±0.35 ^{ns}
Purple sweet potato agar	4.26±0.09 ^a	4.32±0.63 ^{ns}
Corn agar	2.40±0.24 ^c	3.90±0.10 ^{ns}
Red kidney bean agar	2.76±0.05 ^c	4.53±0.28 ^{ns}

Data are means ± standard deviations (SD).

Means within a column followed by different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$.

NS = not significant

4. อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถแยกเชื้อราชอบต่างที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสได้ในระดับสูงจำนวน 2 ไอโซเลท คือ GMSS 14 และ GMCF 16 และเมื่อนำเชื้อรามาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA สำเร็จรูป และศึกษาเส้นใยและการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท มีลักษณะสอดคล้องกับเชื้อราในสกุล *Aspergillus* [22], [23] ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Aspergillus* เป็นกลุ่มเชื้อราที่มีความหลากหลาย พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งในดิน เศษซากพืชซากสัตว์ และผลผลิตทางการเกษตร เป็นเชื้อราในกลุ่มหลักที่ทำหน้าที่ย่อยสลายในระบบนิเวศ โดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยอินทรีย์วัตถุในธรรมชาติให้เป็นสารที่มีขนาดเล็กและดูดซึมไปใช้ในการเจริญ [24], [25] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wongpisal et al. [26] ที่คัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสจากซากใบปาล์มน้ำมัน และพบเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสได้สูง 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp., *P. funiculosum*, *P. janthinellum* และ *Trichoderma harzianum* ขณะที่ Oyediji et al. [27] ที่ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสจากตัวอย่างดิน พบว่าเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด คือ *Aspergillus flavus* และ *Trichoderma viride* และจากการศึกษาของ Namnuch et al. [28] พบว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* KUB2 ที่แยกได้จากดินสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไฮโดรเลสได้สูงสุด นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่น ๆ ที่สามารถแยกเชื้อรา *Aspergillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสได้จากดินในธรรมชาติ [29], [30]

เมื่อนำ *Aspergillus* sp. GMSS 14 และ *Aspergillus* sp. GMCF 16 มาศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากพืชผลทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับอาหาร PDA สำเร็จรูป พบว่า เชื้อรา *Aspergillus* sp. GMSS 14 เจริญบนอาหารวุ้นมันม่วงได้ดีกว่าอาหาร PDA สำเร็จรูป ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* sp. GMCF 16 เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดโดยไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) การเจริญของเส้นใยเชื้อรานั้นขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาของ Hoa and Wang [15] และ Fang et al. [31] พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลและกรดอะมิโนที่อยู่ในพืชแต่ละชนิดที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อขนาดของโคโลนีและความหนาแน่นของเส้นใยเชื้อรา ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากพืชผลทางการเกษตรทั้ง 4 ชนิด สามารถใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราได้ โดยเฉพาะอาหารวุ้นมันม่วงที่มีผลส่งเสริมการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้เนื่องจากมันม่วงมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่สูง (86.28%) และมีกรดอะมิโนจำนวนมาก [32], [33] ซึ่งสารอาหารดังกล่าวเป็นสารสำคัญที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ จึงทำให้เชื้อราเจริญได้ดีในอาหารวุ้นดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้มันม่วงเป็นวัตถุดิบในการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราสามารถช่วยลดต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เนื่องจากมันม่วงมีราคาถูกกว่าอาหาร PDA สำเร็จรูป ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Samerpitak et al. [16] ที่นำวัตถุดิบทางการเกษตรมาพัฒนาเป็นสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราในห้องปฏิบัติการ ซึ่งพบว่าเชื้อรา *Aspergillus niger* O, *A. niger* N, *A. fumigatus* O และ

Penicillium sp. เจริญบนอาหารวุ้นฟักทองได้ดีกว่าอาหารวุ้นมันฝรั่ง และจากการศึกษาของ Wongjirathiti and Yottakot [12] ที่นำเอาพืชผลในท้องถิ่นมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราทดแทนอาหาร PDA สำเร็จรูป โดยพบว่า เชื้อรา *Aspergillus flavus* TISTR 3366 เจริญบนอาหารวุ้นมันเทศ (Sweet potato dextrose agar) และอาหารวุ้นเผือก (Taro dextrose agar) ได้ดีกว่าอาหาร PDA สำเร็จรูป นอกจากนี้ Thurnkul [34] ยังพบว่า ผลของพืชบางชนิด ได้แก่ มะรุมและมะเดื่อสามารถนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3090, *Pyricularia grisea* PG002-12 และ *Rhizopus oligosporus* แทนอาหาร PDA สำเร็จรูปได้

5. บทสรุป

งานวิจัยนี้สามารถแยกเชื้อราชนิดต่าง (pH 9) ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูลาเนสได้จำนวน 12 ไอโซเลท โดยเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูลาเนสได้สูงสุด ได้แก่ *Aspergillus* sp. GMSS 14 และ *Aspergillus* sp. GMCF 16 ซึ่งมีค่าดัชนีการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 1.94 ± 0.08 และ 2.07 ± 0.25 ตามลำดับ และเมื่อนำเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์มาศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากมันสำปะหลัง มันม่วง ข้าวโพด และถั่วแดง เปรียบเทียบกับอาหารวุ้นมันฝรั่งสำเร็จรูป พบว่า *Aspergillus* sp. GMSS 14 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้นมันม่วง ส่วน *Aspergillus* sp. GMCF 16 เจริญได้ดีบนอาหารวุ้นทดสอบทุกชนิด ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำพืชผลทางการเกษตรที่มีในท้องถิ่นมาพัฒนาเป็นสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา โดยเฉพาะการใช้มันม่วงร่วมกับวุ้นข้าวมะพร้าวในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราชนิดต่างที่ผลิตเอนไซม์เซลลูลาเนสที่คัดแยกได้ และใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราสูตรใหม่ ๆ เพื่อใช้ทดแทนอาหาร PDA สำเร็จรูปที่ใช้เป็นประจำในห้องปฏิบัติการและมีราคาถูกกว่าแพง นอกจากนี้ยังสามารถนำเชื้อราชนิดต่างที่คัดแยกได้ไปใช้เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เซลลูลาเนสชนิดต่างเพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการตรวจสอบสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูลาเนส รวมทั้งการทำเอนไซม์เซลลูลาเนสให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ก่อนนำไปประยุกต์ใช้ในการฟอกเยื่อกระดาษในขั้นตอนต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย

7. References

- [1] Badhan, A.K. and et al. 2007. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**. 98(3): 504-510.
- [2] Lee, S.H., Lim, V. and Lee, C.K. 2018. Newly isolate highly potential xylanase producer strain from various environmental sources. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 16: 669-676.
- [3] Bakir, U., Yavascaoglu, S. and Ersayin, A.G. 2001. An endo-1, 4-xylanase from *Rhizopus oryzae* production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**. 29: 328-334.
- [4] Pal, A. and Khanum, F. 2011. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: Individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. **Process Biochemistry**. 46: 879-887.
- [5] Dhaver, P. and et al. 2022. Isolation, screening, preliminary optimisation and characterisation of thermostable xylanase production under submerged fermentation by fungi in Durban, South Africa. **Mycology**. 13(4): 271-292.
- [6] Kumar, K.S. and et al. 2009. Production of β -xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 107(5): 494-498.

- [7] Agnihotri, S. and et al. 2010. Production and biochemical characterization of a novel cellulase-poor alkali-thermo-tolerant xylanase from *Coprinellus disseminatus* SW-1 NTCC1165. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 26: 1349-1359.
- [8] Khanahmadi, M. and et al. 2018. Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid-state fermentation in flask and tray bioreactor. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 13: 272-282.
- [9] Cunha, L. and et al. 2018. Optimization of xylanase Production from *Aspergillus foetidus* in soybean residue. **Enzyme Research**. 2: 1-7.
- [10] Tolan, J.S. 1996. Pulp and paper. In: Godfrey, T. and West, S. (eds.) **Industrial Enzymology**. London: Macmillan Press.
- [11] Nagar, S. and et al. 2013. Biobleaching application of cellulase poor and alkali stable xylanase from *Bacillus pumilus* SV-85S. **3 Biotech**. 3: 277-285.
- [12] Wongjirathiti, A. and Yottakot, S. 2017. Utilisation of local crops as alternative media for fungal growth. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**. 40(2): 295-304.
- [13] Bunrung, S. and Maliwan, C. 2021. The preservation of potato infusion for the substitute of potato dextrose agar (PDA) culture medium using in laboratory. **Council of University Administrative Staff of Thailand Journal**. 11(1): 29-35. (in Thai)
- [14] Rachael, O.T. and Adebolu, T.T. 2014. Effect of formulated culture media on growth of some fungal species. **International Journal of Botany and Research**. 4(5): 29-34.
- [15] Hoa, H.T. and Wang, C.L. 2015. The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). **Mycobiology**. 43(1): 14-23.
- [16] Samerpitak, K. and et al. 2007. Development of fungal media for using in laboratory learning. **Srinagarind Medical Journal**. 22(4): 394-400. (in Thai)
- [17] Ajdari, Z. and et al. 2011. Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several strains of *Monascus purpureus* on solid state cultivation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2011(1): 487329.
- [18] Kasana, R.C. and et al. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**. 57: 503-507.
- [19] Choudhary, M. and et al. 2016. Crop residue degradation by fungi isolated from conservation agriculture fields under rice-wheat system of North-West India. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**. 5: 349-360.
- [20] Bundidamorn, D. and et al. 2021. Screening of fungi isolated from damaged plant materials for the production of lignocellulolytic enzymes with decolorizing ability. **Asia-Pacific Journal of Science and Technology**. 26(3): 1-10.
- [21] Mardetko, N. and et al. 2021. Screening of lignocellulolytic enzyme activities in fungal species and sequential solid-state and submerged cultivation for the production of enzyme cocktails. **Polymers**. 13(21): 3736.
- [22] Samson, R.A. and et al. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**. 78: 141-173.
- [23] Nyongesa, B.W., Okoth, S. and Ayugi, V. 2015. Identification key for *Aspergillus* species isolated from maize and soil of Nandi County, Kenya. **Advances in Microbiology**. 5: 205-229.
- [24] Abrao, F.O. and et al. 2017. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. **PLoS One**. 12(8): e0183628.

- [25] Atallah, O.O. and et al. 2022. Polyphasic characterization of four *Aspergillus* species as potential biocontrol agents for white mold disease of bean. **Journal of Fungi**. 8: 626.
- [26] Wongpisal, P. and et al. 2016. Screening of fungi producing cellulase and xylanase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf litter. **Khon Kaen Agriculture Journal**. 44(1): 948-952. (in Thai)
- [27] Oyedeji, O. and et al. 2018. Isolation and screening of xylanolytic fungi from soil of botanical garden: xylanase production from *Aspergillus flavus* and *Trichoderma viride*. **Journal of Microbiology Research**. 8(1): 9-18.
- [28] Namnuch, N., Thammasittirong, A. and Thammasittirong, S.N. 2021. Lignocellulose hydrolytic enzymes production by *Aspergillus flavus* KUB2 using submerged fermentation of sugarcane bagasse waste. **Mycology**. 12(2): 119-127.
- [29] Shabeena, A.K.S., Ravi, M. and Jayaraj, Y.M. 2017. Isolation and identification of xylanase producing fungal isolate. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**. 4(3): 102-106.
- [30] Al-Qahtani, A.N., Perveen, K. and Alwahibi, M.S. 2022. Xylanase-producing fungi diversity in the soil of Jeddah, Saudi Arabia. **Asian Journal of Advanced Research and Reports**. 16(1): 57-67.
- [31] Fang, Y.W. and et al. 2020. Relationship between the honeydew of mealy bugs and the growth of *Phlebotomus portentosus*. **PLoS One**. 15(6): e0233710.
- [32] Afiati, F., Priadi, G. and Setiyoningrum, F. 2018. The improvement of functional food in yogurt enriched with purple sweet potato (*Ipomea batatas* var. *Ayamurasaki*). **Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture**. 43(2): 159-168.
- [33] Kurnianingsih, N. and et al. 2020. A comparative study on nutritional value of purple sweet potatoes from West Java and Central Java, Indonesia. **Journal of Physics: Conference Series**. 1665(1): 012011.
- [34] Thurnkul, N. 2019. Using of some fruits as substitute of potato in potato dextrose agar media. **PSRU Journal of Science and Technology**. 4(3): 27-36. (in Thai)