

การผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสจากเชื้อรา *Aspergillus section Nigri*
เพื่อใช้เตรียมน้ำเชื่อมอินเวิร์ตสำหรับเป็นอาหารเสริมเลี้ยงผึ้งพันธุ์
(*Apis mellifera* L.)



อริสรา มณีกลัด

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2568

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสจากเชื้อรา *Aspergillus section Nigri*
เพื่อใช้เตรียมน้ำเชื่อมอินเวิร์ตสำหรับเป็นอาหารเสริมเลี้ยงผึ้งพันธุ์
(*Apis mellifera* L.)



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2568
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

PRODUCTION OF INVERTASE FROM *ASPERGILLUS SECTION NIGRI*
FOR THE PREPARATION OF INVERT SYRUP AS A SUPPLEMENTARY
FEED FOR HONEY BEE (*APIS MELLIFERA* L.)



A Thesis Submitted to University of Phayao
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Master of Science Degree in Biotechnology
May 2025

Copyright 2025 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสจากเชื้อรา *Aspergillus section Nigri*
เพื่อใช้เตรียมน้ำเชื่อมอินเวิร์ตสำหรับเป็นอาหารเสริมเลี้ยงผึ้งพันธุ์
(*Apis mellifera* L.)

ของ อริสรา มณีกลัด

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ดร. บาจรีย์ ฉัตรทอง)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร. ขรรค์ชัย ดันเมฆ)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภััสสร)

..... อาจารย์บัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยพะเยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รวิสรา รื่นไวย)

..... คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิพรพรรณ เนืองเม็ก)

- เรื่อง:** การผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสจากเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* เพื่อใช้เตรียมน้ำเชื่อมอินเวิร์ตสำหรับเป็นอาหารเสริมเลี้ยงผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera* L.)
- ผู้วิจัย:** อริสรา มณีกลัด, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2567
- อาจารย์ที่ปรึกษา:** ดร. ชรรค์ชัย ดันเมฆ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร ภัสสร
- คำสำคัญ:** แอสเพอร์จิลลัส, น้ำเชื่อมอินเวิร์ตเลี้ยงผึ้งพันธุ์

บทคัดย่อ

ผึ้งเป็นแมลงเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย ส่งผลให้มีเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม การให้อาหารที่ไม่เหมาะสมหรือขาดความรู้ความเข้าใจที่ถูกต้อง อาจก่อให้เกิดผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและการดำรงชีวิตของผึ้ง การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก *Aspergillus section Nigri* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสมาย่อยสลายน้ำตาลซูโครสให้อยู่ในรูปแบบที่ใช้งานได้ง่ายที่เรียกว่าน้ำเชื่อมอินเวิร์ต โดยสามารถคัดแยกเชื้อ *Aspergillus section nigri* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสได้ 24 ไอโซเลท จากนั้นทำการศึกษาหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม พบว่าการเลี้ยงเชื้อราเป็นระยะเวลา 3 วัน ที่ค่า pH 7 โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุด ดังนี้ 4.043, 3.235 และ 2.515 ยูนิต/มล. ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่าการใช้ฟัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 4 และการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้สูงสุด 0.315 และ 0.189 ยูนิต/มล. ตามลำดับ นำเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ได้มาทำเป็นน้ำเชื่อมอินเวิร์ตเลี้ยงผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera* L.) ดังนี้ (N) น้ำเชื่อม (P) น้ำเชื่อม ร่วมกับ pollen patty (T1) น้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 5 (T2) น้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 14 (T3) น้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 15 (T4) น้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 19 โดยทุกกลุ่มได้รับ pollen patty ร่วมด้วย ยกเว้นกลุ่ม N ที่ไม่ได้รับ ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื่อมต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์ พบว่าน้ำเชื่อมที่มีส่วนผสมของเอนไซม์มีการบริโภคสูงกว่าน้ำเชื่อมธรรมดา โดยผึ้งที่ได้รับน้ำเชื่อมซึ่งมีส่วนผสมของเอนไซม์อินเวอร์เทสมีขนาดของต่อมอะซินี (Acini) ใหญ่กว่าผึ้งที่ได้รับน้ำเชื่อมธรรมดาอย่างเห็นได้ชัด โดยอาหาร T4 ทำให้ขนาดอะซินีใหญ่สุด (99.99 ไมโครเมตร) สะท้อนให้เห็นว่าเอนไซม์อินเวอร์เทสมีบทบาทในการส่งเสริมการพัฒนาของต่อมไฮโปฟารินเจียล (Hypopharyngeal gland: HPG) นอกจากนี้ผึ้งในกลุ่มที่ได้รับน้ำเชื่อมผสมเอนไซม์อินเวอร์เทสส่วนใหญ่ยังมีมวลกล้ามเนื้อส่วนนอกมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยผึ้งที่ได้รับอาหาร T4 เป็นเวลา 18 วัน มีมวลกล้ามเนื้อส่วนนอกสูงสุด (11.43 มิลลิกรัม) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์อินเวอร์เทสมีส่วนช่วยในการพัฒนากล้ามเนื้อบริเวณอกของผึ้งพันธุ์ อีกทั้งยังพบว่าผึ้งในกลุ่มที่ได้รับน้ำเชื่อมผสมเอนไซม์อินเวอร์เทสมีอายุขัยเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะผึ้งที่ได้รับน้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 5 ซึ่งแม้จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุด แต่กลับมีอายุขัยมากที่สุด (18.00 วัน) ผลการทดลองที่ได้แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์อินเวอร์เทสที่คัดแยกได้จาก *Aspergillus section nigri* มีศักยภาพในการส่งเสริมสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Title: PRODUCTION OF INVERTASE FROM *ASPERGILLUS* SECTION *NIGRI*
FOR THE PREPARATION OF INVERT SYRUP AS A SUPPLEMENTARY
FEED FOR HONEY BEE (*APIS MELLIFERA* L.)

Author: Arisra Maneeklad, Thesis: M.Sc. (Biotechnology), University of Phayao, 2024

Advisor: Dr. Khanchai Dunmek Co–advisor Assistant Professor Dr.Supaporn Passorn

Keywords: *Aspergillus* section *Nigri* invert syrup Honey bee

ABSTRACT

Bees are economically important insects in Thailand, leading to a large number of beekeepers. However, improper feeding practices or a lack of adequate understanding of bee nutrition can negatively affect the health and survival of honey bees. This study aimed to isolate strains of *Aspergillus* section *Nigri* capable of producing invertase enzyme to hydrolyze sucrose into invert syrup, which is more readily utilized by bees. As a result, 24 isolates of *Aspergillus* section *Nigri* with invertase–producing ability were successfully obtained. Subsequently, optimal culture conditions were investigated. It was found that culturing the fungus for 3 days at pH 7, using ammonium chloride (NH₄Cl) as the nitrogen source, resulted in the highest enzyme activities of 4.043, 3.235, and 2.515 units/ml, respectively. Enzyme characterization assays further revealed that using a buffer at pH 4 and incubating the enzyme at 60 °C yielded the highest enzyme activities of 0.315 and 0.189 units/ml, respectively. The obtained invertase enzyme was then used to prepare invert syrup for feeding honey bees, divided into six treatments: (N) syrup only, (P) syrup with pollen patty, (T1) syrup supplemented with invertase from isolate *Asp.* 5, (T2) syrup supplemented with invertase from isolate *Asp.* 14, (T3) syrup supplemented with invertase from isolate *Asp.* 15 and (T4) syrup supplemented with invertase from isolate *Asp.* 19. All groups received pollen patty supplementation, except group N. The invertase enzyme obtained was utilized to produce invert syrup and study the effectiveness of the resulting invert syrup on the health and growth of honey bees (*Apis mellifera* L.). The results showed that the enzyme–supplemented syrup had a higher consumption rate compared to regular syrup. Honey bees fed with invertase–supplemented syrup had significantly larger acini compared to the control group. Notably, honey bees in the T4 group exhibited the largest acini size (99.99 µm), suggesting that the invertase enzyme promotes hypopharyngeal gland development. Furthermore, honey bees in the groups receiving invertase enzyme–supplemented syrup generally exhibited greater thoracic muscle mass compared to the control group. Notably, honey bees fed with the T4 diet for 18 days had the highest thoracic muscle mass (11.43 mg), indicating that the invertase enzyme contributes to the development of thoracic muscles in honey bees. Additionally, honey bees that received enzyme–supplemented syrup had a longer average lifespan than those in the control group. Interestingly, the honey bees fed with syrup containing invertase from isolate *Asp.* 5, despite its lowest enzyme activity, demonstrated the highest average lifespan (18.00 days). The results revealed statistically significant differences ($p < 0.05$). Based on the findings of this study, it can be concluded that invertase enzymes isolated from *Aspergillus* section *Nigri* possess the potential to effectively promote the health and growth of honey bees.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความรู้และความช่วยเหลือจากหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.ชรรค์ชัย ตันเมฆ และ ผู้ทรงคุณวุฒิ รองศาสตราจารย์ ดร.โชค โสรัจกุล ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนการช่วยเหลือในด้านวิชาการและด้านอื่น ๆ อย่างดียิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร.บาจรีย์ นัทรทอง และ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร ภัสสร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รวิสร่า รื่นไวย์ ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อตรวจสอบและให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และ ทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ได้ให้วิชาความรู้และมอบประสบการณ์อันมีค่าให้ ตลอดระยะเวลาการศึกษา ซึ่งเป็นพื้นฐานสำคัญที่ช่วยให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วง

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และ ทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา และ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทุกท่าน รวมถึงผู้มีส่วนร่วมในการสนับสนุนวิทยานิพนธ์นี้ในด้านต่าง ๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการศึกษาและการทำวิจัย

อริสร่า มณีกลัด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่จะได้รับการจากการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ผึ้งพันธุ์ (<i>Apis mellifera</i> L.)	4
สารอาหารที่ผึ้งต้องการ	5
สารพิษในน้ำหวานและอาหารเสริมน้ำตาล	5
สารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัลฟูรัล (5-Hydroxymethylfurfural; HMF)	7
อินเวอร์เทส (Invertase)	8
เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส (<i>Aspergillus</i> spp.).....	9
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	16
วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี	16

ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ	18
ขั้นตอนและวิธีการวิจัย	20
1. การคัดแยกเชื้อราจากผิ้วพันธุ์.....	20
2. การทำสารละลายสปอร์	21
3. การเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส	22
4. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์	22
5. การศึกษาโครงสร้างของเชื้อราด้วยวิธี Slide culture	23
6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส	23
6.1 การศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส ...	23
6.2 การศึกษาความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (pH optimum)	24
6.3 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (Nitrogen optimum).....	24
7. การศึกษาลักษณะคุณสมบัติของเอนไซม์อินเวอร์เทส.....	25
7.1 การศึกษาความเป็นกรด-เบสของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทดสอบเอนไซม์อินเวอร์เทส (pH Buffer)	25
7.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทดสอบเอนไซม์อินเวอร์เทส	25
8. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงผิ้วพันธุ์.....	25
8.1 การเตรียมเอนไซม์อินเวอร์เทส.....	25
8.2 การทำน้ำเชื่อมความเข้มข้น 50 °Brix (แหล่งคาร์โบไฮเดรต)	25
8.3 การเตรียมเกสรผึ้ง (แหล่งโปรตีน)	25
8.4 การผลิตน้ำเชื่อมอินเวิร์ต.....	25
9. การเตรียมตัวอย่างและกล่องทดสอบผึ้ง.....	26
9.1 การเตรียมผึ้งงานสำหรับใช้ในการทดลอง.....	26

9.2 การเตรียมกล่องทดสอบผึ้ง	26
10. การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเสริมต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์	27
10.1 การศึกษาอัตราการกินอาหารเสริมของผึ้งพันธุ์	28
10.1.1 เกสรผึ้งดอกข้าวโพด (แหล่งโปรตีน)	28
10.1.2 น้ำเชื่อม (แหล่งคาร์โบไฮเดรต)	28
10.2 การศึกษาผลของอาหารเสริมต่อการพัฒนาต่อม Hypopharyngeal gland (HPG) ..	28
10.3 การศึกษาผลของอาหารเสริมต่อการพัฒนามวลกล้ามเนื้อส่วนอกของผึ้งพันธุ์ ..	28
10.4 การศึกษาผลของอาหารเสริมต่ออายุขัยของผึ้งพันธุ์	28
11. สถิติที่ใช้ในงานวิจัย	28
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	30
การตัดแยกเชื้อรา <i>Aspergillus section Nigri</i> ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสจากผึ้งพันธุ์	30
1. การตัดแยกเชื้อรา <i>Aspergillus section Nigri</i>	30
2. การตัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส	30
การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเสริมต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์	49
1.1 เกสรข้าวโพด (แหล่งโปรตีน)	49
1.2 น้ำเชื่อม (แหล่งคาร์โบไฮเดรต)	51
บทที่ 5 บทสรุป	56
สรุปผลการทดลอง	56
บรรณานุกรม	61
ภาคผนวก	70
ภาคผนวก ก เอกสารประกอบงานวิจัย	71
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	72
ภาคผนวก ค การเตรียมสารละลายและการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	74

ภาคผนวก จ ผลการทดลอง	78
ประวัติผู้วิจัย.....	89



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม <i>Aspergillus section Nigri</i> บนอาหารสังเคราะห์ PDA ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผัสดังพันธุ์บริเวณ ต.บ้านเหล่า อ.แม่ใจ จ.พะเยา	32
ตาราง 2 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม <i>Aspergillus section Nigri</i> บนอาหารสังเคราะห์ PDA ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผัสดังพันธุ์บริเวณ ต.บ้านถ้ำ อ.ดอกคำใต้ จ.พะเยา.....	33
ตาราง 3 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม <i>Aspergillus section Nigri</i> บนอาหารสังเคราะห์ PDA ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผัสดังพันธุ์บริเวณ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา	34
ตาราง 4 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม <i>Aspergillus section Nigri</i> บนอาหารสังเคราะห์ PDA ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผัสดังพันธุ์บริเวณภาควิชาชีววิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่.....	36
ตาราง 5 เปรียบเทียบลักษณะของเชื้อรากลุ่ม <i>Aspergillus section Nigri</i> ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผัสดังพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์	39
ตาราง 6 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Invertase production medium เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน	42
ตาราง 7 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Invertase production medium ที่ pH แตกต่างกัน.....	43
ตาราง 8 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Invertase production medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน	45
ตาราง 9 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH) ในการทดสอบแตกต่างกัน.....	47
ตาราง 10 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ใช้อุณหภูมิในการทดสอบแตกต่างกัน.....	48
ตาราง 11 อัตราการกินอาหารเกสรข้าวโพด (Pollen patty).....	50
ตาราง 12 อัตราการกินน้ำเชื่อม	51

ตาราง 13 ผลการวิเคราะห์ขนาด acini ของฝั้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารต่างกันเป็นเวลา 7 วัน.....	52
ตาราง 14 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักอกแห้งของฝั้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารต่างกัน.....	54
ตาราง 15 อายุขัยของฝั้งพันธุ์ในกล่องทดลองที่ได้รับอาหารต่างกันเป็นเวลา 21 วัน	55
ตาราง 16 แสดงค่าแอดติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้	78
ตาราง 17 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม Aspergillus section Nigri ไอโซเลท 5 ที่คัดแยกได้จาก ตัวอย่างฝั้งพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์	80
ตาราง 18 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม Aspergillus section Nigri ไอโซเลท 14 ที่คัดแยกได้จาก ตัวอย่างฝั้งพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์	81
ตาราง 19 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม Aspergillus section Nigri ไอโซเลท 15 ที่คัดแยกได้จาก ตัวอย่างฝั้งพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์	82
ตาราง 20 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม Aspergillus section Nigri ไอโซเลท 19 ที่คัดแยกได้จาก ตัวอย่างฝั้งพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์	83



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 ผึ้งพันธุ์ (<i>Apis mellifera</i>)	4
ภาพ 2 การให้น้ำตาลเป็นอาหารเสริมเลี้ยงผึ้งของ จันทนา ฟาร์มผึ้ง.....	6
ภาพ 3 โครงสร้างทางเคมีของ HMF	7
ภาพ 4 การย่อยสลายน้ำตาลซูโครสโดยเอนไซม์อินเวอร์เทส	8
ภาพ 5 <i>Aspergillus section Nigri</i>	11
ภาพ 6 กราฟการเจริญเติบโตของ <i>Aspergillus niger</i>	13
ภาพ 7 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์บริเวณ ตำบลบ้านเหล่า อำเภอแม่ใจ	19
ภาพ 8 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์บริเวณ ตำบลบ้านคำ อำเภอดอกคำใต้	19
ภาพ 9 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์บริเวณ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา	19
ภาพ 10 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์บริเวณ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะ เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่	20
ภาพ 11 วิธีการทำ Serial Dilution	21
ภาพ 12 กล้องทดสอบผึ้งในระดับห้องปฏิบัติการ	27
ภาพ 13 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสของเชื้อรา <i>Aspergillus section Nigri</i> ที่ คัดแยกได้.....	38
ภาพ 14 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp. ไอโซเลท 14	40
ภาพ 15 รูปร่างและขนาด acini ของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารต่างชนิดเป็นเวลา 7 วัน.....	53
ภาพ 16 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Invertase production medium เป็นระยะเวลาต่างกัน	84
ภาพ 17 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Invertase production medium ที่ pH แตกต่างกัน.....	84

ภาพ 18 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Invertase production medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน.....	85
ภาพ 19 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH) ในการทดสอบแตกต่างกัน2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทดสอบเอนไซม์อินเวอร์เทส	85
ภาพ 20 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ใช้อุณหภูมิในการทดสอบ แตกต่างกัน.....	86
ภาพ 21 แสดงอัตราการกินอาหารเกสรดอกข้าวโพดของผึ้งพันธุ์ในระยะเวลา 21 วัน	86
ภาพ 22 แสดงอัตราการกินน้ำเชื่อมของผึ้งพันธุ์ในระยะเวลา 21 วัน.....	87
ภาพ 23 กราฟแสดงขนาด HPGs ของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารต่างกันเป็นเวลา 7 วัน.....	87
ภาพ 24 กราฟเปรียบเทียบน้ำหนักอกแห้งของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารต่างกัน	88
ภาพ 25 อายุขัยของผึ้งพันธุ์ในกลุ่มทดลองที่ได้รับเกสรข้าวโพดและน้ำเชื่อมต่างชนิด เป็นเวลา 21 วัน (Kaplan–Meier)	88



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ฝักรเป็นแมลงเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย “ในปัจจุบันประเทศไทยมีเกษตรกรผู้เลี้ยงฝักรจำนวน 35,405 ราย ผลผลิตน้ำฝักรที่ได้คิดเป็นมูลค่าทางเศรษฐกิจจำนวนมหาศาล มีรายได้หมุนเวียนมากกว่า 2,000 ล้านบาท ไม่รวมผลผลิตชนิดอื่น ๆ และผลิตภัณฑ์แปรรูป ซึ่งผลผลิตส่วนใหญ่ที่มีการส่งออกนั้นเป็นผลผลิตที่ได้จากฝักรพันธุ์ เนื่องจากเกษตรกรไทยนิยมเลี้ยงฝักรชนิดนี้เป็นส่วนใหญ่ เพราะสามารถให้ผลผลิตได้ดี โดยประเทศไทยมีการผลิตและส่งออกน้ำฝักรสูงเป็นอันดับที่ 2 ของอาเซียน และอันดับที่ 36 ของโลก” (ศูนย์ข่าวกรมส่งเสริมการเกษตร, 2565)

ตามธรรมชาติฝักรจะอาศัยในบริเวณพื้นที่ที่มีแหล่งอาหารสมบูรณ์ คือ มีพืชอาหารฝักรที่เหมาะสมและเพียงพอที่ฝักรจะสามารถใช้ในการดำรงชีวิตได้ เกษตรกรจึงมักนำฝักรไปเลี้ยงในบริเวณแหล่งอาหารที่อุดมไปด้วยดอกไม้เพื่อให้ฝักรได้รับสารอาหารเพียงพอที่จะสามารถเจริญเติบโต มีการขยายรัง และให้ผลผลิตที่ดี แต่ด้วยสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละฤดู ทำให้บางครั้งฝักรออกไปหาอาหารได้น้อยลงหรือมีพืชอาหารไม่เพียงพอ ส่งผลให้ผลผลิตน้ำฝักรได้น้อย ฝักรอ่อนแอและเสี่ยงที่จะย้ายรัง ดังนั้นเกษตรกรผู้เลี้ยงฝักรจึงมีความจำเป็นต้องย้ายรังไปในพื้นที่ที่มีแหล่งอาหารเพียงพอหรือจัดหาอาหารทางเลือกแทนพืชอาหารในธรรมชาติ เช่น เกสรเทียม (ทดแทนโปรตีน) น้ำตาลซูโครส (ทดแทนคาร์โบไฮเดรต) เป็นต้น สารละลายซูโครสที่ใช้มีมากมาย เช่น น้ำเชื่อมแป้ง น้ำเชื่อมข้าวโพดที่มีฟรุกโตสสูง (Jachimowicz and El Sherbiny 1975; LeBlanc, et al., 2009; Brodschneider, et al., 2010; Brodschneider and Crailsheim 2010) โดยซูโครสที่นิยมใช้คือน้ำตาลทราย เนื่องจากหาซื้อได้ง่ายและใช้สะดวก น้ำตาลทราย 1 กิโลกรัม สามารถเลี้ยงฝักรพันธุ์ 1 รัง ได้ประมาณ 10 – 14 วัน ขึ้นอยู่กับจำนวนประชากรฝักร (สุทธิศักดิ์ ยารังษี, ผู้ให้สัมภาษณ์, 12 กันยายน 2563) แต่การให้น้ำตาลในรูปแบบเม็ดฝักรกินและดูดซึมได้ยากเนื่องจากมีโมเลกุลที่ใหญ่ และตามข้อกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรในการผลิตน้ำฝักรจะต้องมีน้ำตาลซูโครสไม่เกินร้อยละ 5 ของน้ำหนัก (มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 8003-2556 น้ำฝักร, 13 กุมภาพันธ์ 2557, หน้า 1 – 9) หมายความว่า การที่ให้น้ำตาลซูโครสในปริมาณมากอาจส่งผลให้มีซูโครสตกค้างในน้ำฝักรสูงและทำให้น้ำฝักรไม่ได้มาตรฐานจากเหตุผลที่กล่าวมาเกษตรกรบางรายจึงใช้ความร้อนหรือกรดละลายน้ำตาลเพื่อให้อยู่ในรูป

สารละลายที่กินและดูดซึมง่าย อัตราส่วนของซูโครสต่ำลง แต่การให้ความร้อนหรือกรดส่งผลให้เกิดสารประกอบบนเปื้อน 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัล (5-Hydroxymethylfurfural; HMF) ที่เป็นอันตรายแก่ผิว โดยพบว่าเมื่อให้อาหารที่มีความเข้มข้นของ HMF สูงจะส่งผลต่ออัตราการตายของผึ้ง ทำให้ประชากรผึ้งลดลง และส่งผลต่อปริมาณผลผลิต (Krainer, et al., 2016; Shapla, et al., 2018) อีกทั้งมาตรฐานสินค้าเกษตรกำหนดน้ำผึ้งมี HMF ไม่เกิน 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยผึ้งงาน 1 ตัว ต้องการน้ำตาล 11 มิลลิกรัม/วัน (Huang, 2010) ในต่างประเทศมีการแก้ปัญหาโดยให้น้ำเชื่อมอินเวิร์ตหรือทำฟองดองที่เป็นอาหารแก่ผึ้ง เพื่อให้ผึ้งดูดกินและนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย แต่การทำนั้นบางที่มีการเติมกรด น้ำมะนาว หรือครีมออฟทาร์ทาร์ (Cream Of Tartar) และใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งทำให้เกิด HMF (Harman, February 17 2017, Online)

จากการศึกษารูปแบบการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสให้อยู่ในรูปแบบที่ใช้งานง่ายสามารถนำวิธีทางชีวภาพมาใช้ได้ เช่น **“การใช้เอนไซม์”** ที่ผ่านมามีนักวิจัยได้ทำการศึกษาและคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อภาคอุตสาหกรรมอาหาร ยา และสิ่งแวดล้อม เช่น งานวิจัยของ Garlapatl, et al., (2015) ที่ทำการคัดแยกเชื้อราจากดินได้ *Aspergillus* sp. ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดร่วมกัน หนึ่งในนั้นคือ *Aspergillus niger* (*Aspergillus* section *Nigri*) ที่สามารถผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสได้ดี เอนไซม์อินเวอร์เทสมีคุณสมบัติในการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นโมเลกุลเดี่ยวหรือที่เรียกว่า **“น้ำตาลอินเวิร์ต”** น้ำตาลหรือน้ำเชื่อมอินเวิร์ตถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องดื่ม

จากปัญหาที่กล่าวมา ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาอาหารเสริมเลี้ยงผึ้งพันธุ์ด้วยการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Aspergillus* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสมาเข้าทำปฏิกิริยาแทนการใช้กรดและความร้อนสูง โดยทำการคัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสที่มีประสิทธิภาพ มาย่อยน้ำตาลซูโครสเพื่อผลิตเป็นอาหารเสริมเลี้ยงผึ้งประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ผึ้งสามารถดูดกินได้ง่าย ทั้งยังช่วยส่งเสริมสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยก *Aspergillus* section *Nigri* จากผึ้งพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส
2. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสในอาหารเหลว (Submerge Fermentation) จากเชื้อ *Aspergillus* section *Nigri* ที่คัดแยกได้
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื่อมอินเวิร์ตที่ผลิตได้ต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์

สมมติฐานของการวิจัย

เนื่องจากเชื้อรา *Aspergillus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสสามารถย่อยสลายน้ำตาลเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ ผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่าจะพบเชื้อนี้ในบริเวณที่มีน้ำตาลหรือแหล่งคาร์โบไฮเดรตสูง เช่น รังผึ้ง ผู้วิจัยจึงทำการคัดแยกเชื้อราจากบริเวณรังผึ้งเพื่อหาเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

ประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัย

1. ได้เชื้อรา *Aspergillus section Nigri* ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นเอนไซม์ชีวภาพ เพื่อประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงผึ้งหรือในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม
2. ได้น้ำเชื่อมอินเวิร์ตสำหรับเป็นอาหารเสริมเลี้ยงผึ้งพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมและพัฒนาต่อม Hypopharyngeal gland มวลกล้ามเนื้อส่วนอก และอายุขัยของผึ้งพันธุ์
3. ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยสามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* การผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ได้รวมถึงใช้ในการพัฒนาอาหารเสริมที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงผึ้งพันธุ์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera* L.)

ผึ้งเป็นแมลงที่มีความสำคัญในระบบนิเวศ เนื่องจากช่วยทำหน้าที่ในการช่วยผสมเกสรให้กับพืช ส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพ นอกจากนี้ผึ้งยังเป็นแมลงเศรษฐกิจที่สำคัญ ผึ้งที่พบในไทยมี 6 ชนิด คือ ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*), ผึ้งโพรง (*Apis cerana*), ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*), ผึ้งมี้ม (*Apis florea*), ผึ้งม้าม (*Apis andreniformis*) และ ผึ้งหิมาลัย (*Apis laboriosa*) (ปศุสัตว์.คอม, ม.ป.ป., สื่อออนไลน์) ผึ้งพันธุ์เป็นผึ้งที่นำเข้ามาจากต่างประเทศเพื่อเลี้ยงในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผึ้ง ประเทศไทยนิยมเลี้ยงผึ้งชนิดนี้เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากเป็นผึ้งที่เลี้ยงง่าย อนุบาลง่าย ไม่ดุ ไม่ทิ้งรัง สามารถให้ผลผลิตน้ำผึ้งและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ในปริมาณมาก (ศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่, ม.ป.ป., สื่อออนไลน์; สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2532)



ภาพ 1 ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*)

ที่มา: https://hmong.in.th/wiki/Italian_bee

สารอาหารที่ผึ้งต้องการ

ผึ้งต้องการสารอาหารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุ เพื่อใช้ในการดำรงชีวิตและเจริญเติบโต ปริมาณสารอาหารที่ผึ้งต้องการในแต่ละวันยังไม่มีรายงานแน่ชัด ในธรรมชาติผึ้งได้รับโปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุ จากเกสรดอกไม้ (Herbert and Shimanuki, 1978) และใช้น้ำหวานจากดอกไม้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต โดยผึ้งงาน 1 ตัว ต้องการน้ำตาล 11 มิลลิกรัม/วัน ความเข้มข้นของไขมันทั้งหมดภายในอาหารเสริมเกสรแนะนำให้อยู่ที่ 5 – 8 เปอร์เซ็นต์ และผึ้งต้องการวิตามินจำพวก กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid), ไบโอติน (Biotin), กรดโฟลิก (Folic acid), ไนอะซินาไมด์ (Niacinamide), ไพริดอกซีน (Pyridoxine), กรดแพนโทเทนิค (Pantothenic acid), ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) และ ไทอามีน (Thiamine) เพื่อใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อน (Huang, 2010)

สารพิษในน้ำหวานและอาหารเสริมน้ำตาล

ผึ้งโตเต็มวัยสามารถใช้ซูโครส (Sucrose), กลูโคส (Glucose), ฟรุกโตส (Fructose), มอลโตส (Maltose), เมเลซิโตส (Melezitose) และทรีฮาโลส (Trehalose) แต่ผึ้งไม่สามารถย่อยไซโลส (Xylose), แลคโตส (Lactose), กาแลคโตส (Galactose), ราฟฟิโนส (Raffinose), แรมินอส (Rhaminose), อาราบิโนส (Arabinose), แมนโนส (Mannose), เมลิบิโอส (Melibiose) หรือสตาชีโอส (Stachyose) น้ำตาลเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นพิษต่อผึ้ง และประมาณ 40% ของน้ำตาลที่พบในถ้วยเหลืองเป็นพิษต่อผึ้ง ดังนั้นควรระมัดระวังเมื่อใช้ถ้วยเหลืองในอาหารเลี้ยงผึ้ง นอกจากนี้ น้ำหวานจากดอกไม้ในธรรมชาติของพืชบางชนิดยังเป็นพิษต่อผึ้งเนื่องจากมีสารประกอบอัลคาลอยด์ในน้ำหวาน เช่น ต้นผีเสื้อ (*Alangium chinense*), ต้นไม้แห่งชีวิต (*Camptotheca acuminata*), ลำโพงม่วง (*Datura stramonium*), ต้นชา (*Camellia sinensis*), ชาน้ำมัน (*Camellia oleifera*), *Aesculus californica*, *Cyrilla racemiflora*, *Rhododendron molle*, *Veratrum nigrum* และ *Macleaya cordata* (พืชในตระกูลป๊อปปี) น้ำหวานจากพืชเหล่านี้มักเป็นพิษต่อผึ้งตัวเต็มวัยและตัวอ่อน และส่วนใหญ่เป็นพิษต่อมนุษย์ด้วย (Huang, 2010)

การเลี้ยงผึ้งในประเทศไทย

“ปัจจุบันประเทศไทยมีเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งจำนวน 35,405 ราย ผลผลิตน้ำผึ้งที่ได้คิดเป็นมูลค่าทางเศรษฐกิจจำนวนมหาศาล มีรายได้หมุนเวียนมากกว่า 2,000 ล้านบาท ไม่รวมผลผลิตชนิดอื่น ๆ และผลิตภัณฑ์แปรรูป ซึ่งผลผลิตส่วนใหญ่ที่มีการส่งออกนั้นเป็นผลผลิตที่ได้จากผึ้งพันธุ์ โดยประเทศไทยมีการผลิตและส่งออกน้ำผึ้งสูงเป็นอันดับที่ 2 ของอาเซียน และอันดับที่ 36 ของโลก” (ศูนย์ข่าวกรมส่งเสริมการเกษตร, 2565) การเลี้ยงผึ้งของเกษตรกรไทยส่วนใหญ่จะเลี้ยงแบบปล่อยตามธรรมชาติ คือเลี้ยงในป่า สวนผลไม้ หรือสวนดอกไม้ ที่มีพืชอาหารอุดมสมบูรณ์

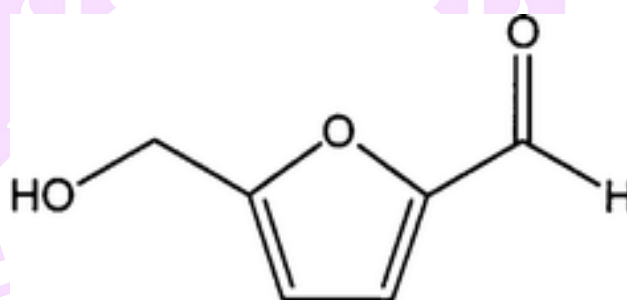
เพื่อให้ผึ้งได้ออกไปหาอาหารเอง เมื่อหมดช่วงการบานของดอกไม้หรือพืชอาหารไม่เพียงพอ เกษตรกรจะขนย้ายรังผึ้งไปในพื้นที่ต่าง ๆ ที่มีพืชอาหารเพียงพอ เนื่องจากดอกไม้แต่ละชนิดมีช่วงเวลาการบานที่แตกต่างกัน เช่น ดอกลิ้นจี่บานเฉพาะเดือนมกราคม ดอกทานตะวันบานช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงกุมภาพันธ์ เป็นต้น ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการขนย้ายทั้งในเรื่องแรงงานและค่าน้ำมัน นอกจากนี้ในช่วงที่ผึ้งออกไปหาอาหารได้น้อยลง เช่น ฤดูฝนและฤดูหนาว เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งจำเป็นต้องให้อาหารเสริมเพื่อรักษาประชากร อาหารเสริมเลี้ยงผึ้งมีทั้งแหล่งโปรตีน (ทดแทนเกสรดอกไม้) หรือคาร์โบไฮเดรต (ทดแทนน้ำหวาน) โดยอาหารเสริมเหล่านี้สามารถหาซื้อได้ทั่วไปและทำเองได้ เช่น การใช้ถั่วเหลืองเป็นแหล่งให้โปรตีนโดยนำผงถั่วเหลือง (สำหรับขงคั่วทั่วไป) ผสมกับน้ำผึ้งในอัตราส่วน 1:1 (ประพันธ์ จีระวัง, 2563, สื่อออนไลน์) หรือการให้สารละลายซูโครส เช่น น้ำเชื่อมแป้ง น้ำเชื่อมข้าวโพดที่มีฟรุกโตสสูง (Jachimowicz and El Sherbiny 1975; LeBlanc, et al., 2009; Brodschneider, et al., 2010; Brodschneider and Crailsheim, 2010) เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดคือน้ำตาลทราย เนื่องจากหาซื้อได้ง่ายและใช้สะดวก การให้น้ำตาลถ้าเป็นเม็ดควรทำให้ละเอียดเป็นผงแบบไอซิ่งซูการ์เพื่อง่ายต่อการดูดกินของผึ้ง แต่เนื่องจากน้ำตาลชนิดนี้หายากและไม่มีอุปกรณ์ที่จะบดน้ำตาลจนละเอียดได้วิธีนี้จึงไม่เป็นที่นิยม เกษตรกรบางฟาร์มจึงเลือกที่จะให้น้ำตาลทรายเป็นเม็ด ๆ โดยไม่ผ่านกระบวนการใด (สุทธิศักดิ์ ยารังษี, ผู้ให้สัมภาษณ์, 12 กันยายน 2563) หรือนำน้ำตาลทรายไปผ่านกระบวนการความร้อนเพื่อทำเป็นน้ำเชื่อมโดยผสมกับน้ำในอัตราส่วนต่าง ๆ ตามต้องการ (สุทธิชัย สุทธิ วราภิรักษ์, ม.ป.ป., สื่อออนไลน์) วิธีนี้ผึ้งจะดูดกินได้ง่ายเนื่องจากโมเลกุลของน้ำตาลมีขนาดเล็กลง แต่จะทำให้เกิดสารประกอบปนเปื้อน 5-ไฮดรอกซีเมทิลฟูรัล (5-Hydroxymethyl furfural; HMF) ที่เป็นอันตรายแก่ผึ้ง



ภาพ 2 การให้น้ำตาลเป็นอาหารเสริมเลี้ยงผึ้งของ จันทนา ฟาร์มผึ้ง

สารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัลฟูรัล (5-Hydroxymethylfurfural; HMF)

สารประกอบอินทรีย์ HMF เกิดจากการย่อยสลายน้ำตาลในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด เมื่อได้รับความร้อนผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโน (Amino acid) และน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ในระหว่างการแปรรูปอาหารหรือการเก็บน้ำผึ้งเป็นเวลานาน สารประกอบพวกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (กลูโคสและฟรุคโตส) กรดและแร่ธาตุหลายชนิด ส่งเสริมให้เกิดสารประกอบนี้ในน้ำผึ้ง โดยปริมาณความเข้มข้นของสาร HMF จะเพิ่มขึ้นตามระดับอุณหภูมิ ระยะเวลาการให้ความร้อน และระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง น้ำผึ้งสดจึงแทบไม่มีหรือมีสาร HMF น้อยมาก ปริมาณสาร HMF จึงถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้การเก็บรักษาหรือการให้ความร้อน โดยสาร HMF ปริมาณ 1900 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แสดงถึงการผสมโซรัปในน้ำผึ้ง (Eurolab Laboratory Services, ม.ป.ป., สืบออนไลน์) คณะกรรมการมาตรฐาน Codex Alimentarius ได้กำหนดให้ในน้ำผึ้งมีสาร HMF ไม่เกิน 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยน้ำผึ้งในเขตร้อนสามารถมีสาร HMF ได้ไม่เกิน 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เพื่อให้แน่ใจว่าผลิตภัณฑ์ไม่ได้ผ่านความร้อนสูงในระหว่างกระบวนการผลิต และปลอดภัยต่อการบริโภค (Shapla, et al., 2018)



ภาพ 3 โครงสร้างทางเคมีของ HMF

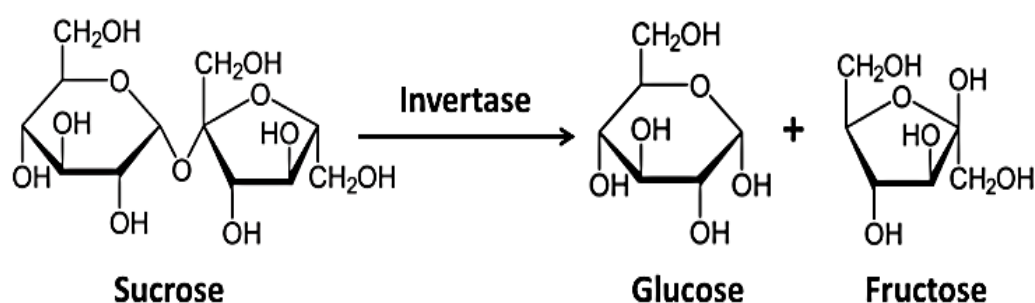
ที่มา: Melo, et al. 2014

HMF สามารถดูดซึมได้ง่ายจากอาหารผ่านระบบทางเดินอาหาร เมื่อถูกเผาผลาญเป็นอนุพันธ์ต่าง ๆ จะถูกขับออกทางปัสสาวะ จากการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าสาร HMF มีผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์ เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อเมือก ผิวหนังและระบบทางเดินหายใจส่วนบน การกลายพันธุ์ ความผิดปกติของโครโมโซม และเป็นสารก่อมะเร็งต่อมนุษย์และสัตว์ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้พบว่า HMF มีผลในเชิงบวกมากมาย เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต่อต้านการแพ้ ต้านการอักเสบ ต้านภาวะขาดออกซิเจน ต่อด้านโรคเม็ดเลือดแดงรูปเคียว

(Sickle-cell disease; SCD) และมีฤทธิ์ต้านภาวะกรดยูริกเกิน แต่ระดับการบริโภค HMF ที่ปลอดภัยยังไม่ได้ได้รับการยืนยันที่แน่นอน เนื่องจากเมแทบอลิซึมของ HMF การเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ และอัตราการกำจัดออกจากร่างกายนั้นขึ้นอยู่กับการทำงานของอวัยวะในแต่ละบุคคล (Shapla, et al., 2018) นอกจากการใช้ความร้อนในการทำสารละลายซูโครสแล้ว สามารถใช้วิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase) ในการย่อยสลายน้ำตาลให้เป็นโมเลกุลเดี่ยว โดยไม่เกิดหรือเกิดสารประกอบ HMF ได้น้อย

อินเวอร์เทส (Invertase)

อินเวอร์เทส (Invertase, Invertin, Maxinvert, Glucosucrase, Sucrose, Saccharase, β -Ffase, β -fructosidase, β -fructosylinvertase, β -h-fructosidase-fructofuranosidase) มีชื่อสามัญคือ เบต้าฟรุคโตฟูราโนไซด์เอส (β -fructofuranosidase) EC.3.2.1.26 ค้นพบครั้งแรกโดย Berthelot ในปี ค.ศ. 1860 (Neumann and Lampen, 1967) อินเวอร์เทสเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะ α -1,4-glycosidic ของสับเซตรท เช่น ซูโครส (Sucrose), แรมโนส (Rhamnose), ราฟฟิโนส (Raffinose) และสตาซีโอส (Stachyose) (Fiedurek, et al., 2000) ที่เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถดูดซึมและนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตได้ง่าย คือ กลูโคส (Glucose) และฟรุคโตส (Fructose) อย่างละเท่า ๆ กัน (Mobini-Dehkordi, et al., 2008) อินเวอร์เทสถูกกระบุว่าเป็นโปรตีนชนิดแรกที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ต่อมาในปี ค.ศ. 1913 อินเวอร์เทสถูกนำมาศึกษาด้านจลนพลศาสตร์จนได้เป็นสมการ Michaelis-Menten (Chen, et al., 1999)



ภาพ 4 การย่อยสลายน้ำตาลซูโครสโดยเอนไซม์อินเวอร์เทส

ที่มา: วิราวรรณ สายชล และนพพล เล็กสวัสดิ์, ม.ป.ป., สืบออนไลน์

เอนไซม์อินเวอร์เทสในธรรมชาติมีหลายรูปแบบแตกต่างกันไป แบ่งตามตำแหน่งที่พบเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (Extracellular Invertase) และ เอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ (Intracellular Invertase) แบ่งตามสภาวะกรด-เบส (pH) ได้เป็น เอนไซม์อินเวอร์เทสในรูปที่เป็นกรด (Acid Invertase) และเอนไซม์อินเวอร์เทสในรูปที่เป็นกลาง (Neutral Invertase) โดยเอนไซม์อินเวอร์เทสจะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมซึ่งแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งที่พบเอนไซม์ เอนไซม์อินเวอร์เทสสามารถพบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ ยีสต์ รา แบคทีเรีย และแมลงบางชนิด เช่น ผึ้งใช้เอนไซม์อินเวอร์สในการเปลี่ยนน้ำหวานจากดอกไม้เป็นน้ำผึ้ง ข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง อ้อย ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ใช้ในการทำขนมปัง และเบียร์ *S. Carlsbergensis* ในรา *Aspergillus niger*, *A. Japonicas*, *A. phoenicis*, *A. Oryzae*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida utilis* และ *Furasium onyosporium* เชื้อราเส้นใยสามารถผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสที่มีศักยภาพในการใช้งานในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ดี (Soares, et al., 2012) เอนไซม์อินเวอร์เทสถูกใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องดื่ม น้ำตาลอินเวิร์ตที่ได้จากการสลายซูโครสมีความหวานมากกว่าซูโครสประมาณ 1.5 เท่า เนื่องจากมีฟรุคโตสในระดับสูง เอนไซม์อินเวอร์เทสจึงเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทั้งในด้านชีววิทยาและอุตสาหกรรม (Gracida-Rodríguez, et al., 2006; Kulshrestha, et al., 2013) การผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสในระดับอุตสาหกรรมมักใช้จุลินทรีย์หลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์สูง โดยเฉพาะยีสต์และรา ซึ่งสามารถสังเคราะห์เอนไซม์นี้ได้ในปริมาณมาก จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ เช่น ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ รา *Aspergillus niger* การเลือกใช้จุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ ความสามารถในการเพาะเลี้ยง และต้นทุนการผลิต การใช้วัสดุเหลือใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับจุลินทรีย์ยังเป็นแนวทางที่ช่วยลดต้นทุนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

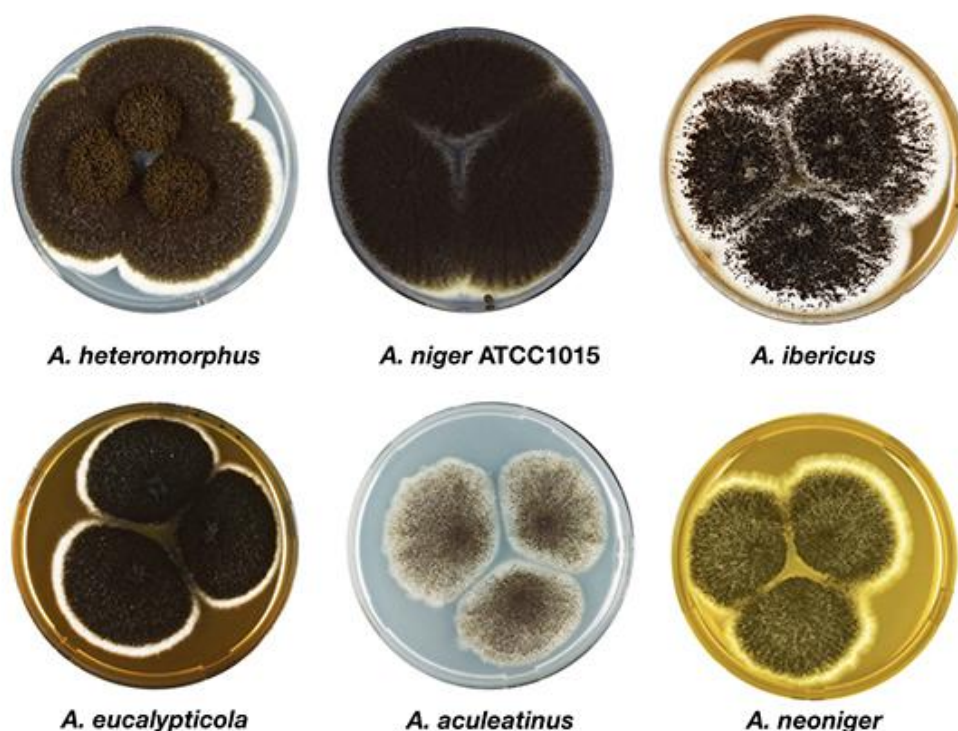
เชื้อราแอสเปอร์จิลลัส (*Aspergillus* spp.)

Aspergillus spp. เป็นกลุ่มเชื้อราเส้นใยขนาดใหญ่ที่สามารถพบได้ทั่วไปเกือบทุกที่บนโลก เจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ในแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นอินทรีย์ผลิตกรดอินทรีย์และเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น กรดซิตริก (Citric acid) เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) ย่อยโมเลกุลของแป้งเป็นน้ำตาล เอนไซม์เพกทิเนส (Pecinase) ย่อยสลายเพกทิน (Pectin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช เอนไซม์โปรตีเอส (Protease) ย่อยโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน เอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase) ย่อยสลายพันธะ α -1,4-glycosidic ของซัลโคสเตรท เช่น ซูโครส (Sucrose) ได้เป็น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จากความสามารถที่กล่าวมา

เชื้อราในสกุล *Aspergillus* จึงมีความสำคัญทางอุตสาหกรรม เภสัชกรรม เกษตรกรรม พยาธิวิทยา และวิทยาศาสตร์ ตัวอย่างเชื้อราในสกุลนี้ที่รู้จักในฐานะผู้ผลิตเอนไซม์และสารเมแทบอไลต์ทางอุตสาหกรรมอาหาร คือ *A. niger*, *A. sojae* และ *A. oryzae* (Astoreca, et al., 2010)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา *Aspergillus* เป็นราในกลุ่ม Ascomycetes สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ เป็นราเส้นใย (Hyphae) แบบไม่มีผนังกัน มีการสร้างสปอร์ (Conidia) เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยก้านชูสปอร์ (Conidiophore) อาจมีหรือไม่มีผนังกันก็ได้ ปลายก้านชูสปอร์มีลักษณะโป่งออกเป็นเวสซิเคิล (Vesicle) และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็นสเตอริกมา (Sterigma) 1-2 ชั้น มีโคนิเดีย (Conidia) รูปทรงกลมติดอยู่เป็นสายมีหลายสี เช่น เหลือง เขียว น้ำตาล และ ดำ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา

Aspergillus section *Nigri* (เดิมคือกลุ่ม *Aspergillus niger*) เป็นกลุ่ม *Aspergillus* ที่มีสีดำสามารถพบได้ทั่วไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณสภาพอากาศอบอุ่นและเขตร้อนชื้น *Aspergillus* section *Nigri* เป็นผู้ผลิตเอนไซม์และสารทุติยภูมิที่มีประสิทธิภาพมาก ส่วนใหญ่ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์ เอนไซม์ในอุตสาหกรรม 49 จาก 260 ชนิด ผลิตจาก *Aspergillus* section *Nigri* (Varga, et al., 2007; Vesth, et al., 2018) สายพันธุ์ที่โดดเด่นในสกุลนี้คือ *Aspergillus niger* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส กรดซิตริก และอื่น ๆ *A. niger* ถือเป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดที่ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพ มีการใช้เพื่อผลิตเอนไซม์มาหลายสิบปี กรดและเอนไซม์หลายชนิดที่ได้จาก *A. niger* ได้รับการพิจารณาว่าสามารถใช้เติมลงไปในการอาหารได้อย่างปลอดภัย (GRAS) โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (González-Salgado, et al., 2005; Schuster, et al., 2002)



ภาพ 5 *Aspergillus section Nigri*

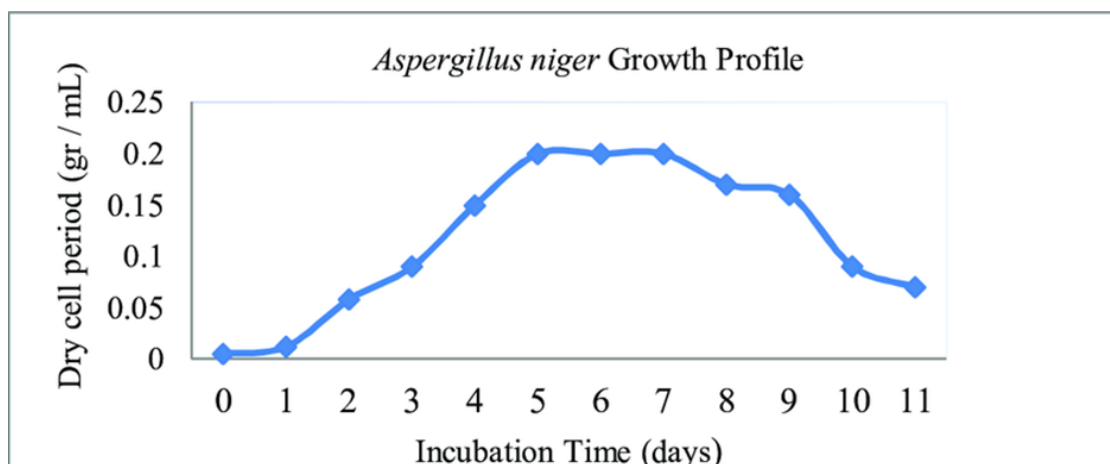
ที่มา: Vesth, et al., 2018

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ayesha Siddiq and Ghanima Amin (2022) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสจากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* โดยใช้เชื้อราจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ *A. niger*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. ochraceus* และ *A. parasiticus* เชื้อราทั้งหมดถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA; Merck KGaA, Germany) ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 4 วัน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ในการจำแนกชนิดเชื้อราทางพันธุกรรม พบว่า *A. ochraceus* (รหัส LC360803), *A. flavus* (รหัส LC368455) และ *A. niger* (รหัส LC368456) ได้รับการระบุสายพันธุ์ไว้วางหน้าแล้ว ส่วนอีก 2 ไอโซเลต ได้รับความอนุเคราะห์จากแผนกสารพิษ สภาวิจัยแห่งชาติ การผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสดำเนินการโดยวิธีการหมักแบบจมน้ำ (Submerged Fermentation) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย ซูโครส 30 กรัม/ลิตร, ยีสต์สกัด 2 กรัม/ลิตร, โซเดียมไนเตรด (NaNO_3) 2 กรัม/ลิตร, แมกนีเซียม

ซัลเฟต (MgSO_4) 0.05 กรัม/ลิตร และโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.5 กรัม/ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อถูกปรับค่า pH เป็น 6.0 ก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร ลงในขวด Erlenmeyer ขนาด 250 มิลลิลิตร ก่อนเติมเชื้อราในอัตรา 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30°C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสโดยผสมสารละลายเอนไซม์ 0.2 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลายซูโครส 1% ในบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต 0.2 โมลาร์ (pH 5) ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครส หลังจากนั้นเติมกรดดีนิโทรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อยุติปฏิกิริยา โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตร-โฟโตมิเตอร์ โดย 1 ยูนิต ของเอนไซม์อินเวอร์เทส (1 unit of invertase activity) ถูกกำหนดให้เป็นปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *Aspergillus niger* ให้ผลผลิตเอนไซม์ อินเวอร์เทสสูงที่สุดที่ 6.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ขณะที่ *Aspergillus parasiticus* ให้ผลผลิตต่ำที่สุดที่ 0.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สำหรับผลผลิตของ *A. terreus*, *A. flavus* และ *A. ochraceus* เท่ากับ 4.5, 6.6 และ 4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ในปี 2018 Rejeki, et al., ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของ *Aspergillus niger* โดยใส่สารละลาย *Aspergillus niger* ความเข้มข้น 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร ในอาหาร Potato Dextrosa Broth (PDB) 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 11 วัน วัดการเจริญเติบโตของ *Aspergillus niger* โดยเก็บมวลไมซีเลียม (Mycelium) ทุก 24 ชั่วโมง มาล้างด้วยน้ำกลั่น และอบแห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ 80°C องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้น้ำหนักคงที่ ทำแบบนี้จนครบ 11 วัน นำข้อมูลระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับเวลาบ่มมาสร้างกราฟการเติบโต (ภาพ 6) จากการทดลองพบว่าในช่วงแรก (0 – 1 วัน) *Aspergillus niger* มีการปรับตัวของเซลล์เพื่อสลายสารตั้งต้น หลัง 1 – 3 วัน เซลล์จะเริ่มทำงานและแบ่งตัวมากขึ้น ในวันที่ 3–5 ระยะนี้เซลล์สามารถแบ่งตัวได้สูงสุด กิจกรรมของเซลล์จึงมีมากเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ระยะนี้ถือเป็นระยะที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของเชื้อรา และในช่วงเริ่มต้นของระยะนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด ช่วงวันที่ 5 – 7 ระยะนี้จำนวนเซลล์ที่เติบโตค่อนข้างเท่ากับจำนวนเซลล์เซลล์ที่ตายแล้ว หลังวันที่ 8 เป็นช่วงการตายของ *Aspergillus niger* ระยะนี้สารอาหารเริ่มลดน้อยลงและการเกิดของสารอื่น ๆ ที่เป็นพิษและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของ *Aspergillus niger* เริ่มลดลง



ภาพ 6 กราฟการเจริญเติบโตของ *Aspergillus niger*

ที่มา: Rejeki, et al., 2018

Oyedeji, et al., (2017) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* IBK1 ในอาหารเหลวโดยใช้เปลือกกล้วยป่นเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ได้ผลผลิตสูงสุด 21.46 ± 0.60 U/mL แต่เมื่อเกิน 120 ชั่วโมง การผลิตอินเวอร์เทสลดลง การลดลงนี้อาจเกิดจากการหมดของกลูโคสที่เป็นเมแทบอลิต์หลักที่ได้จากการสลายตัวของซัสเตรท ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต หรือความเข้มข้นของของเสียที่ได้จากการเผาผลาญที่หลั่งออกมาในอาหารหมักที่เพิ่มขึ้น (Mamma, et al., 2008) โดยมวลโมซีเลียมของเชื้อราเพิ่มขึ้นในสัดส่วนโดยตรงกับการผลิตเอนไซม์จนถึงจุดสูงสุดที่ระยะการบ่ม 168 ชั่วโมง ผลลัพธ์นี้คล้ายกับผลของ Mahesh, et al., (2012) และ Aliaa and Atalia (2015) ที่รายงานว่า 120 ชั่วโมง เป็นระยะการเพาะเลี้ยงที่ผลิตอินเวอร์เทสได้สูงสุดโดย *A. spp* M1 ที่แยกได้จากรังผึ้งและ *A. terreus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมทางทะเล ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม Guimaraes, et al., (2007) และ Uma, et al., (2010) พบว่า *A. ochraceus* และ *A. flavus* ผลิตอินเวอร์เทสได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง อินเวอร์เทสสังเคราะห์ได้ดีในช่วง pH 4.0–6.0 ผลิตได้สูงสุดที่ pH 5.0 ใกล้เคียงกับ *A. flavus* (Uma, et al., 2010) ผลิตได้สูงที่อุณหภูมิ 35 °C (24.20 ± 0.38 U/mL) คล้ายกับการผลิตอินเวอร์เทสใน *Penicillium expansum* Link (Kashif, et al., 2015) ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้การผลิตจะลดลงอย่างต่อเนื่อง เอนไซม์มีความเสถียรสูงถึง 60 °C ซึ่งบ่งชี้ถึงศักยภาพในการทนร้อนในระดับหนึ่ง และสามารถสังเคราะห์อินเวอร์เทสได้สูงเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (22.64 ± 0.34 U/mL) ในงานวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่าการผลิตอินเวอร์เทสโดยใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้นในการหมักแบบอาหารเหลว

(Submerge Fermentation; SmF) มีค่าตั้งแต่ 2.4–34 U/mL เมื่อผลิตโดย *A. niger* (Nadeem, et al., 2009) ชูโครสถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการสังเคราะห์อินเวอร์เทสโดยเชื้อราชนิดต่าง ๆ (Uma, et al., 2010; Mahesh, et al., 2012; Shankar, et al., 2013) การผลิตอินเวอร์เทสเด่นชัดที่สุดเมื่อใช้กรดอะมิโน (Amino acid) กรดกลูตามิก (Glutamic acid) และเปปโตเน (peptone) เป็นแหล่งไนโตรเจน Shafiq และคณะ (2003) พบว่าเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตอินเวอร์เทสโดยเชื้อรา ส่วนการใช้กรดกลูตามิกน่าจะมาจากความง่ายในการหาผลาญกรดอะมิโน เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการหาผลาญกรดอะมิโนในเซลล์ที่มีชีวิต (Kelly and Stanley, 2001) ในงานวิจัยของ Oyediji, et al., (2017) *A. niger* IBK1 มีแนวโน้มที่ดีในการผลิตสารอินเวอร์เทสในระดับสูง คุณสมบัติของอินเวอร์เทสที่ได้ชี้ให้เห็นว่ามีศักยภาพทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ดีสำหรับการใช้ในอุตสาหกรรม เช่น การผลิตน้ำตาลอินเวอร์เทสสูงสำหรับอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอื่น ๆ เอนไซม์นี้ทนต่อความร้อนและมีความคงตัวถึง pH ที่เป็นกรด ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์สำหรับการผลิต High Invert Fructose Syrup ในอุตสาหกรรม

Danmek, et al., (2022) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการพบเชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ LP5 ที่สามารถผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส ซึ่งแยกได้จากละอองเกสรลำไย และการประยุกต์ใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมลำไยเพื่อเลี้ยงผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera* L.) เนื่องจากในภาคเหนือของประเทศไทย ดอกลำไยเป็นแหล่งน้ำหวานหลักสำหรับการผลิตน้ำผึ้ง การศึกษานี้ได้วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่พบในละอองเกสรลำไย พบว่าเชื้อราสกุล *Aspergillus* เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส และถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตน้ำเชื่อมลำไย วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือการประเมินผลของน้ำเชื่อมลำไยที่เติมเอนไซม์อินเวอร์เทสต่อจำนวนประชากรของผึ้งงานที่ได้รับการให้อาหารด้วยน้ำเชื่อมนี้เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

ผลการศึกษาพบเชื้อราหลายชนิดในตัวอย่างละอองเกสรลำไย โดยพบเชื้อราสกุล *Aspergillus* เป็นกลุ่มหลักที่มีอยู่ในปริมาณมาก แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ กลุ่ม *Nigri*, *Flavi* และ *Terrei* นอกจากนี้ยังพบเชื้อราอื่น ๆ ได้แก่ *Trichoderma* spp., *Rhizopus* spp., *Neurospora* spp., *Chaetomium* spp., *Fusarium* spp. และ *Penicillium* spp. อย่างไรก็ตาม มีเพียงเชื้อราในสกุล *Aspergillus* เท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสได้ โดยพบว่าเชื้อรา *Aspergillus* ในกลุ่ม *Nigri* คือ *A. niger* LP5 มีค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 60 °C เมื่อนำเอนไซม์อินเวอร์เทสจาก *A. niger* LP5 ไปใช้ในกระบวนการผลิตน้ำเชื่อมลำไย พบว่าตัวอย่างน้ำเชื่อมลำไยที่เติมอินเวอร์เทส (ตัวอย่าง C) มีปริมาณกลูโคส (3.45%)

และฟรุทโตส (2.08%) สูงที่สุด ในขณะที่ตัวอย่างน้ำเชื่อมลำไยสด (A) และน้ำเชื่อมที่ผ่านการต้ม (B) มีปริมาณน้ำตาลทั้งสองชนิดต่ำกว่า โดยตรวจพบปริมาณซูโครสใน (A) ที่ 4.25% ในขณะที่ (B) และ (C) อยู่ที่ 4.02% และ 3.08% ตามลำดับ จากการพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมในการเลี้ยงและรักษาจำนวนประชากรผึ้ง พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างน้ำเชื่อมลำไยสองชนิดที่เลือกใช้ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื่อมน้ำตาลทั่วไปที่ใช้เลี้ยงผึ้งงาน สรุปเชื้อราที่พบมากที่สุดจากผลของเกสรลำไยคือเชื้อราในสกุล *Aspergillus* และการค้นพบสายพันธุ์ *A. niger* LP5 ที่สามารถผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสได้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตน้ำตาลอินเวอร์เทสได้ ประชากรผึ้งงานที่ได้รับอาหารจากน้ำเชื่อมลำไยทั้งชนิดต้มและชนิดที่เติมเอนไซม์อินเวอร์เทสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื่อมจากผลลำไยสามารถนำมาใช้เป็นอาหารทดแทนในช่วงที่อาหารธรรมชาติมีจำกัดได้อย่างเหมาะสม



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 กระบอกฉีดยา (Syringe)
- 1.2 กระบอกตวง (Cylinder)
- 1.3 กล่องพลาสติก (Plastic box) ขนาด 600 มิลลิลิตร
- 1.4 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
- 1.5 กล้องจุลทรรศน์ Leica M205 FCA-FA, Germany
- 1.6 กล้องจุลทรรศน์ Nikon ECLIPSE Si
- 1.7 ขวดแก้วดูแรน (Duran Bottle)
- 1.8 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
- 1.9 เข็มเย็บเชื้อและห่วงเย็บเชื้อ (Needle and Inoculating Loop)
- 1.10 คิวเวตต์ (Cuvette)
- 1.11 คีมคีบ (Forceps)
- 1.12 เครื่องเขย่า (Shaker)
- 1.13 เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)
- 1.14 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer)
- 1.15 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 1.16 เครื่องวัดพีเอช (pH Meter)
- 1.17 เครื่องให้ความร้อน (Hot Plate)
- 1.18 จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)
- 1.19 ช้อนตักสาร (Spatula)
- 1.20 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
- 1.21 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow)
- 1.22 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 1.23 ตู้เย็น (Refrigerator)

- 1.24 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
- 1.25 เตาแก๊ส (Gas Stove)
- 1.26 ถุงร้อน (Plastic Bag)
- 1.27 ที่วางหลอดทดลอง (Test Tube Rack)
- 1.28 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader Glass)
- 1.29 แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
- 1.30 ปีกเกอร์ (Glass Beaker)
- 1.31 ปิเปตแบบอัตโนมัติ (Auto Pipette)
- 1.32 สำลี (Cotton)
- 1.33 หม้อต้ม (Cauldron)
- 1.34 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
- 1.35 หลอดทดลอง (Test Tube)
- 1.36 หลอดทดลองฝาเกลียว (Test Tube with Screw Cap)
- 1.37 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)

2. สารเคมี

- 2.1 น้ำกลั่น
- 2.2 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide)
- 2.3 Agar
- 2.4 Alcohol 70%, 95%
- 2.5 Ammonium Sulfate
- 2.6 Bromothymol Blue
- 2.7 Calcium
- 2.8 Calcium Chloride
- 2.9 Citric acid
- 2.10 5,5 Dinitrosalicylic acid
- 2.11 Ethyl Alcohol 95%
- 2.12 Ferrous Sulphate
- 2.13 Glucose
- 2.14 Magnesium Sulfate
- 2.15 Manganese Sulfate

- 2.16 Peptone
- 2.17 Phenol
- 2.18 Potassium Dihydrogen
- 2.19 Potassium Dihydrogenphosphate
- 2.20 Sodium Citrate
- 2.21 Sodium Chloride
- 2.22 Sodium Hydroxide
- 2.23 Sodium meta-bisulfite
- 2.24 Sucrose
- 2.25 Sodium potassium tartrate
- 2.26 Tetraman
- 2.27 Tween 80
- 2.28 Yeast extract
- 2.29 Zinc Chloride
- 2.30 Zinc (II) Sulfate

ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ

ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera* L.) โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์จากบริเวณพื้นที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด 4 แห่ง ดังต่อไปนี้

1. บริเวณ ตำบลบ้านเหล่า อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา
2. บริเวณ ตำบลบ้านถ้ำ อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา
3. บริเวณ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา
4. บริเวณ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้เข้าอบรมและผ่านการทดสอบความรู้หลักสูตร “ผู้ขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์” เลขที่ใบอนุญาตใช้สัตว์ U1-10479-2565



ภาพ 7 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์บริเวณ ตำบลบ้านเหล่า อำเภอแม่ใจ
จังหวัดพะเยา พิกัด $19^{\circ}24'34.7''\text{N}$ $99^{\circ}49'40.9''\text{E}$



ภาพ 8 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์บริเวณ ตำบลบ้านถ้ำ อำเภอดอกคำใต้
จังหวัดพะเยา พิกัด $19^{\circ}04'22.9''\text{N}$ $100^{\circ}03'34.0''\text{E}$



ภาพ 9 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์บริเวณ คณะเกษตรศาสตร์และ
ทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา
พิกัด $19^{\circ}01'52.7''\text{N}$ $99^{\circ}53'54.8''\text{E}$



ภาพ 10 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์บริเวณ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่
พิกัด 18°47'35.0"N 98°57'40.0"E

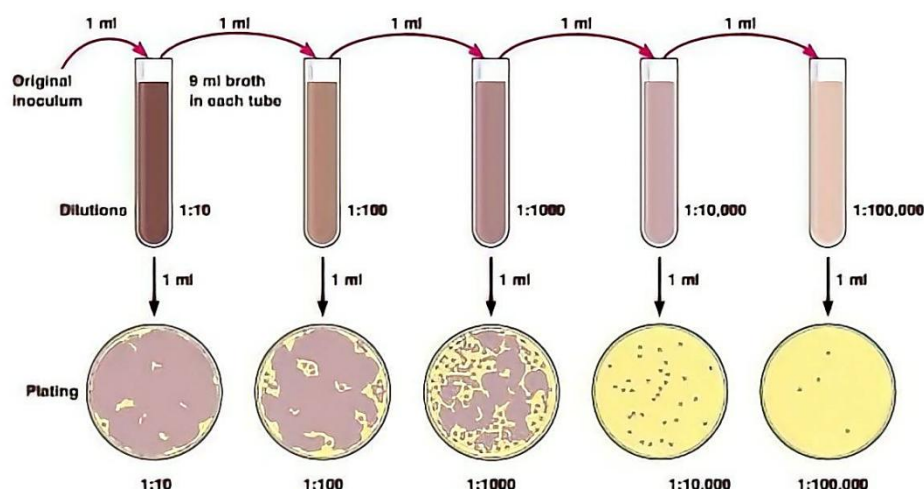
ขั้นตอนและวิธีการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อราจากผึ้งพันธุ์

ผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์ที่มีชีวิตจากบริเวณพื้นที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด 4 แห่ง ทำการการุณยฆาต (Euthanasia) โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ให้ผ่านการสูดดม จากนั้นนำไปคัดแยกเชื้อที่ อยู่บริเวณผิวของผึ้งพันธุ์ ด้วยวิธี Spread plate technique เพื่อเปรียบเทียบเชื้อราที่ได้จากพื้นที่ต่าง ๆ

Dilution plate method (Johnson and Curl 1972)

นำตัวอย่างผึ้งพันธุ์แต่ละแห่งที่เก็บมาชั่งน้ำหนัก ตัวอย่างละ 10 ตัว (ประมาณ 1 กรัม) ทำการเจือจางตัวอย่างผึ้งพันธุ์ (Serial Dilution) แล้วใช้ออโต้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างผึ้ง-พันธุ์ที่มีความเจือจาง 10⁻³, 10⁻⁴ และ 10⁻⁵ ตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร นำไปเกลี่ย (Spread plate) ลงบนอาหารแข็ง *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA) (Frandsberg, et al., 2003) สำหรับการคัดแยกเชื้อราสกุลแอสเพอร์จิลลัส จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้รับการเกลี่ยเชื้อแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลเชื้อที่เจริญบนอาหารแล้วทำการคัดแยกเชื้อราแอสเพอร์จิลลัสที่มีสีดำให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวและถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงสูตรจาก Semisynthetic Medium (SS medium) (Danmek, et al., 2014) ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อคัดแยกเชื้อราแอสเพอร์จิลลัสที่ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส และเก็บรักษาเชื้อราเพื่อการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพ 11 วิธีการทำ Serial Dilution

ที่มา: Benli and Gönül, 2021

2. การทำสารละลายสปอร์

นำเชื้อราที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มเพลท แล้วนำสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl 0.85%) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร/ขวด เทใส่เพลทเชื้อราเล็กน้อยและทำการขูดสปอร์ จากนั้นใช้ออโตปีเปตตูดสารละลายสปอร์เก็บเข้าไปในขวดเดิม โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 ขวด ต่อเชื้อรา 1 ตัวอย่าง

จากนั้นทำการนับจำนวนสปอร์โดยการเขย่าขวดเก็บสารละลายสปอร์เพื่อให้สปอร์ของเชื้อราแขวนลอยในน้ำ นำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อราโดยดูดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 1 (ที่มี NaCl 0.85% ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เพื่อเจือจาง 10 เท่า) จากนั้นดูดสารแขวนลอยสปอร์จากหลอดที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 2 (ที่มี NaCl 0.85% ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เพื่อเจือจาง 100 เท่า) จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์ที่เจือจาง 100 เท่า มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ Hemacytometer นับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า ทั้ง 2 พับ เลือกนับบริเวณตรงกลางของแต่ละฝักซึ่งมี 25 ช่องเล็ก โดยเลือกนับ 5 ช่อง คือ ตรงกลาง และมุม 4 มุม ซึ่งในแต่ละช่องเล็กจะมีช่องย่อย 16 ช่อง จากนั้นนำค่าที่ได้จากการนับทั้ง 2 พับ มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อราจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของเชื้อรา} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์} \times (\text{ค่าคงที่ } 2.5 \times 10^5)}{\times \text{ระดับการเจือจางที่ใช้นับ}}$$

เสร็จแล้วปรับความเข้มข้นของเชื้อราที่นับได้ให้เป็น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้สูตรดังนี้

$$C1V1 = C2V2$$

โดย

$C1$ = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่มี

$V1$ = ปริมาตรสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่มี

$C2$ = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ต้องการ

$V2$ = ปริมาตรสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่นำไปใช้จริง

ปรับความเข้มข้นโดยใช้ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (หน่วยความเข้มข้น CFU/ml)

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

นำสารละลายสปอร์ของเชื้อราที่คัดแยกได้ 1.0 มิลลิลิตร (10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Invertase production medium (IP medium) ที่มีส่วนประกอบของแหล่งอาหารที่สำคัญ คือ Sucrose (1.0% w/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.3% w/v), KH_2PO_4 (0.2% w/v), MgSO_4 (0.05% w/v), CaCl_2 (0.01% w/v), FeSO_4 (0.005% w/v), MnSO_4 (0.005% w/v), ZnSO_4 (0.005% w/v) และ Tween 80 (0.2% v/v) pH 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเอนไซม์ไว้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

การวิเคราะห์กิจกรรมอินเวอร์เทสวัดได้โดยการประมาณการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค Dinitrosalicylic acid method (Miller, 1959) โดยดูดซับสเตรท (Sucrose 1% ในสารละลาย Sodium citrate buffer) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเอนไซม์อินเวอร์เทส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ

- ชุดที่ 1 ไม่มีการบ่ม
- ชุดที่ 2 มีการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- ชุดควบคุม (Blank) คือหลอดที่ไม่ได้ใส่สารสกัดเอนไซม์หยาบ

จากนั้นเติม DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในการทดลองทั้ง 2 ชุด แล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (Vertex mixer) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการ

ดูกลืนแสงที่บันทึกได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐานเพื่อนำไปคำนวณหาค่า Unit of enzyme

5. การศึกษาโครงสร้างของเชื้อราด้วยวิธี Slide culture

นำสไลด์พร้อมกระจกปิดสไลด์ใส่ลงในจานเพาะเชื้อแก้วแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ฆ่าเชื้อแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อ รอจนอาหารแข็ง จากนั้นใช้มีดตัดอาหารเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนของอาหารที่ตัดวางลงบนสไลด์ในจานเพาะเชื้อที่นำไปฆ่าเชื้อก่อนหน้านี้ ทำการเผาเข็มเชื้อเชื้อจนร้อนแดงแล้วทิ้งให้เย็น จากนั้นเช็ดสปอร์เชื้อราที่ต้องการศึกษาและไปที่ด้านข้างของอาหารทั้ง 4 ด้าน ปิดชิ้นอาหารที่ลงเชื้อแล้วด้วยกระจกปิดสไลด์ และใส่ก้อนสำลีชุบน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปในจานเพาะเชื้อเพื่อให้ความชื้น นำจานเพาะเชื้อใส่ถุงแล้วมัดหลวม ๆ พอให้อากาศเข้าออกได้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสังเกตเห็นเส้นใยของเชื้อราที่เจริญแผ่เส้นใยบนสไลด์และกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์ที่มีเส้นใยของเชื้อรามาเชื้อเอาอาหารออก หยดสีย้อมเส้นใยเชื้อรา Lactophenol Cotton Blue ลงบนสไลด์หรือกระจกปิดสไลด์ที่มีเส้นใยเชื้อราเกาะอยู่ นำกระจกปิดสไลด์แผ่นใหม่ค่อย ๆ ปิดทับลงไประวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เสร็จแล้วใช้กระดาษซับสีส่วนเกินออก

จากนั้นนำสไลด์ตัวอย่างเชื้อราที่ได้ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Nikon ECLIPSE Si โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งในลักษณะต่าง ๆ เช่น สี ขนาด รูปร่าง สปอร์ เป็นต้น (Klich, 2002; Danmek, et al., 2014)

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสจะช่วยให้สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพได้ในปริมาณมาก โดยนำเชื้อราที่คัดแยกได้ที่มีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสสูงสุด มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Invertase production medium (IP medium) โดยทำการเปลี่ยนปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

6.1 การศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

นำสารละลายสปอร์ของเชื้อราที่มีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสสูงสุด 1.0 มิลลิลิตร (10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Invertase production medium (IP medium) pH 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที

ในการศึกษานี้จะศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสโดยเปลี่ยนวันเพาะเลี้ยงเป็น 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ 15 วัน จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 4 เพื่อหาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

6.2 การศึกษาความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (pH optimum)

นำสารละลายสปอร์ของเชื้อราที่มีค่าแอดติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสสูงสุด 1.0 มิลลิลิตร (10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Invertase production medium (IP medium) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งในการศึกษานี้จะศึกษาความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสโดยเปลี่ยน pH ในอาหารเป็น pH 3, 6, 7, 8, 9, 10 และ 12 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 4 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

6.3 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (Nitrogen optimum)

นำสารละลายสปอร์ของเชื้อราที่มีค่าแอดติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสสูงสุด 1.0 มิลลิลิตร (10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Invertase production medium (IP medium) pH 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งในการศึกษานี้จะศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสโดยเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนในอาหารจาก $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.3% w/v) เป็น NH_4Cl , NaNO_3 , yeast extract, peptone, Skim milk, Urea, กากยีสต์, เป็ลือกั่วเหลือง, ถั่วเน่า และแกลบ (เป็ลือกั่วขาวสาร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 4 เพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

7. การศึกษาลักษณะคุณสมบัติของเอนไซม์อินเวอร์เทส

7.1 การศึกษาความเป็นกรด-เบสของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทดสอบเอนไซม์อินเวอร์เทส (pH Buffer)

นำเอนไซม์อินเวอร์เทสที่มีค่าแอกติวิตีสูงสุดมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 4 โดยใช้บัฟเฟอร์ pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 เพื่อหาความเป็นกรด-เบสของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส

7.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทดสอบเอนไซม์อินเวอร์เทส

นำเอนไซม์อินเวอร์เทสที่มีค่าแอกติวิตีสูงสุดมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 4 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส

8. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์

8.1 การเตรียมเอนไซม์อินเวอร์เทส

คัดเลือกเชื้อราที่มีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสสูงสุด 4 อันดับแรกมาเพาะเลี้ยง ในอาหารเหลว Semisynthetic Medium (SS medium) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน เพื่อผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส จากนั้นทำการเก็บเอนไซม์หยาบไว้ในขวดเก็บสารเคมี (Duran Bottle) พร้อมพันพาราฟิล์ม เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทำน้ำเชื่อมอินเวิร์ตสำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์

8.2 การทำน้ำเชื่อมความเข้มข้น 50 °Brix (แหล่งคาร์โบไฮเดรต)

นำน้ำตาลทรายมาผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 (กรัม) คนให้เข้ากันจนละลาย เป็นเนื้อเดียวจะได้เป็นน้ำเชื่อมความเข้มข้น 50 °Brix

8.3 การเตรียมเกสรผึ้ง (แหล่งโปรตีน)

ใช้เกสรผึ้ง (ดอกข้าวโพด) ผสมกับน้ำเชื่อมความเข้มข้น 50 °Brix ในอัตราส่วน 2 : 1 (กรัม) ผสมให้เข้ากันจนได้เป็น Pollen patty เก็บในภาชนะมีฝาปิดและเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.4 การผลิตน้ำเชื่อมอินเวิร์ต

ทำน้ำเชื่อมอินเวิร์ตสำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์ สูตรที่ใส่เอนไซม์ให้เต็มเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ผลิตได้ 5% โดยทำการชั่งน้ำหนัก (กรัม) ผสมกับน้ำเชื่อม 50 °Brix คนให้เข้ากัน

แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
ทำการเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยแบ่งการทดลองดังนี้

ชุดควบคุม : กลุ่มควบคุมลบ-บวก (Negative-Positive control) น้ำเชื่อม 50 °Brix

สูตรที่ 1 : น้ำเชื่อม 50 °Brix + เอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 5

สูตรที่ 2 : น้ำเชื่อม 50 °Brix + เอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 14

สูตรที่ 3 : น้ำเชื่อม 50 °Brix + เอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 15

สูตรที่ 4 : น้ำเชื่อม 50 °Brix + เอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 19

9. การเตรียมตัวอย่างและกล่องทดสอบผึ้ง

9.1 การเตรียมผึ้งงานสำหรับการใช้ในการทดลอง

เตรียมตัวอย่างผึ้งงานเกิดใหม่ โดยใช้ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) จากแปลง
ปฏิบัติการภาคกีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตรวจสอบผึ้ง
จากรังที่มีความสมบูรณ์ คือ มีการวางไข่ของนางพญาสม่ำเสมอ (หนอนตัวอ่อนผึ้ง) ดักแด้ และ
อาหาร (เกสรและน้ำผึ้ง) ที่สมดุลเหมาะสมที่สำคัญคือภายในรังต้องไม่มีไรผึ้ง รังผึ้งที่มีความ
สมบูรณ์มีปริมาณดักแด้เยอะจะถูกคัดเลือก โดยเลือกคอนผึ้งที่มีเซลล์ตัวอ่อนที่ปิดฝารวงและ
อยู่ในระยะที่ใกล้จะเจริญออกมาเป็นตัวเต็มวัย ทำการเขย่าหรือใช้แปรงสำหรับปัดผึ้งปัดผึ้งงาน
ตัวเต็มวัยออก แล้วนำคอนผึ้งมาใส่กล่องเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 33 ± 1 องศาเซลเซียส
ความชื้นสัมพัทธ์ $60\% \pm 10\%$ ในที่มีดเป็นเวลา 1 คืน จนกระทั่งดักแด่กลายเป็นผึ้งตัวเต็มวัย
จึงนำมาทำการทดสอบต่อไป (Hsu, et al., 2021)

9.2 การเตรียมกล่องทดสอบผึ้ง

กล่องพลาสติกใสทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร สูง 8
เซนติเมตร (ปริมาตร 600 มิลลิลิตร) ทำการเจาะรูบนฝาเพื่อให้อากาศสามารถผ่านเข้าออกได้
และเป็นช่องสำหรับใส่หลอดอาหาร มีการแขวนแผ่นฐานรังผึ้ง (Foundation sheet) ขนาด 5 x 5
เซนติเมตร ไว้ด้านบนเพื่อเป็นที่ยึดเกาะของผึ้ง เจาะด้านข้างกล่อง กว้าง 5 เซนติเมตร
สูง 2 เซนติเมตร เพื่อเป็นประตูเปิด - ปิดสำหรับเปลี่ยนอาหาร 1 ช่อง โดยในกล่องทดลอง
ประกอบด้วย หลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด โดยหลอดที่ 1 ใส่ น้ำเชื่อม หลอด
ที่ 2 ใส่ น้ำสะอาด และฝาอาหาร 1 ฝา (Omar, et al., 2017)



ภาพ 12 กล่องทดสอบผึ้งในระดับห้องปฏิบัติการ

10. การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเสริมต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์

นำผึ้งพันธุ์ที่เกิดใหม่มาทดสอบโดยเลี้ยงในกล่องทดสอบกล่องละ 30 ตัว กลุ่มละ 6 ซ้ำ ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ แบบไม่มีแสงโดยให้อาหารเสริมเพื่อทดสอบและเปรียบเทียบจำนวน 6 กลุ่ม ดังนี้

ชุดควบคุม : กลุ่มควบคุมแบบลบ (Negative control) น้ำเชื่อม

: กลุ่มควบคุมแบบบวก (Positive control) น้ำเชื่อม + Pollen patty

สูตรที่ 1 : น้ำเชื่อมผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 5 + Pollen patty

สูตรที่ 2 : น้ำเชื่อมผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 19 + Pollen patty

สูตรที่ 3 : น้ำเชื่อมผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 20 + Pollen patty

สูตรที่ 4 : น้ำเชื่อมผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 24 + Pollen patty

ในทุกกล่องทดสอบมีการควบคุมการให้อาหารโปรตีน (Pollen patty) 2 กรัม/ครั้ง น้ำเชื่อมและน้ำเปล่า 5 มิลลิลิตร/ครั้ง ยกเว้นกลุ่มควบคุมแบบลบ (Negative control) ที่จะไม่มีการให้อาหารโปรตีน ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน โดย

ซ้ำที่ 1 – 3 เก็บผลอัตราการกินและอายุขัยของผึ้งพันธุ์

ซ้ำที่ 4 – 5 เก็บผลมวลกล้ามเนื้อส่วนนอกของผึ้งพันธุ์

ซ้ำที่ 6 เก็บผลการพัฒนาของต่อม Hypopharyngeal gland (HPG)

10.1 การศึกษาอัตราการกินอาหารเสริมของผึ้งพันธุ์

ศึกษาอัตราการกินอาหารเสริมของผึ้งพันธุ์ทั้ง 6 ทริตเมนต์ โดยเก็บผลการกินทั้งหมด 21 วัน ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน ซึ่งนำหนักร่อนก่อนกินและหลังกินทุกครั้ง

10.1.1 เกสรผึ้งดอกข้าวโพด (แหล่งโปรตีน)

ทำการชั่งน้ำหนัก Pollen patty ก่อนกินและหลังกิน จากนั้นนำน้ำหนักอาหารก่อนกินลบด้วยน้ำหนักอาหารหลังกิน เพื่อหาอัตราการกิน Pollen patty (Jang, et al., 2022)

10.1.2 น้ำเชื่อม (แหล่งคาร์โบไฮเดรต)

ทำการชั่งน้ำหนักน้ำเชื่อมก่อนกินและหลังกิน จากนั้นนำน้ำหนักน้ำเชื่อมก่อนกิน ลบด้วยน้ำหนักน้ำเชื่อมหลังกิน เพื่อหาอัตราการกินน้ำเชื่อมของผึ้ง

10.2 การศึกษาผลของอาหารเสริมต่อการพัฒนาต่อม Hypopharyngeal gland (HPG)

คัดเลือกผึ้งงานอายุ 7 วัน จากแต่ละกลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 3 ตัว ทำการตัดและผ่าส่วนหัวเพื่อศึกษา HPG โดยใช้คีมคีบสแตนเลส (Forceps) ผ่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (ดัดแปลงจากวิธีของ Corby-Harris & Snyder, 2018) วางบนแผ่นสไลด์และหยดสารละลายไซเตียมคลอไรด์ 0.85 โมลาร์ ก่อนทำการถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไมโครสโคป (Leica M205 FCA-FA, Germany) และวัดขนาดของ Acini ตัวอย่างละ 20 คู่

10.3 การศึกษาผลของอาหารเสริมต่อการพัฒนามวลกล้ามเนื้อส่วนอกของผึ้งพันธุ์

คัดเลือกผึ้งงานอายุ 5 และ 18 วัน จากแต่ละกลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 15 ตัว ทำการน็อกผึ้งด้วยความเย็น - 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 15 นาที เสร็จแล้วทำการแยกส่วนอก (อก ขา ปีก) ออกจากส่วนหัวและท้อง อบแห้งด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (มิลลิกรัม)

10.4 การศึกษาผลของอาหารเสริมต่ออายุขัยของผึ้งพันธุ์

ทำการนับจำนวนการตายของผึ้งพันธุ์ ทั้ง 6 ทริตเมนต์ ที่ได้รับอาหารแตกต่างกันทุกวันเป็นเวลาทั้งหมด 21 วัน เนื่องจากเมื่อผึ้งงานมีอายุ 22 วัน จะออกจากรังเพื่อหาอาหาร (Schmuck, 2004) โดยในแต่ละวันผึ้งพันธุ์ที่ตายจะถูกคัดออกและจดบันทึกผล ทำการวิเคราะห์การอยู่รอดแบบ Kaplan-Meier (Hsu, et al., 2021)

11. สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

งานวิจัยนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ผลิตภายใต้สภาวะต่าง ๆ และผลของอาหารแต่ละชนิดต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์ โดยนำค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบคือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ความเป็นกรด-เบส และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต

เอนไซม์อินเวอร์เทส รวมถึงค่าความเป็นกรด-เบสของบัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดสอบเอนไซม์ มาใช้วิเคราะห์ สำหรับการประเมินผลต่อผึ้งพันธุ์ใช้ข้อมูลจากอัตราการกินอาหาร ขนาดของ Hypopharyngeal gland น้ำหนักกล้ามเนื้อส่วนอก และอายุขัยของผึ้ง มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p - \text{value} = 0.05$) ด้วยโปรแกรมทางสถิติ Statistics Package for the Social Sciences (SPSS ver.21) โดยในการทดลองแต่ละครั้งมีการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง (Replicates)



บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

การคัดแยกเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสจากผัสดอง

เนื่องจากผัสดองเป็นแหล่งที่ต้องไปหาอาหารตามท้องไร่ท้องนา ในธรรมชาติ ทำให้บริเวณผิวของผัสดองมีจุลินทรีย์ทั้งเชื้อราและแบคทีเรียต่าง ๆ มากมาย การคัดแยกเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสจึงต้องอาศัยอาหารที่มีความจำเพาะ คือ อาหารแข็ง *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA) (Frandsberg, et al., 2003) สำหรับคัดแยกเชื้อราสกุลแอสเพอร์จิลลัส และอาหารที่ดัดแปลงสูตรจาก Semisynthetic Medium (SS medium) (Danmek, et al., 2014) เพื่อใช้คัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสเบื้องต้น จากการสุ่มเก็บตัวอย่างผัสดองจากบริเวณพื้นที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด 4 แห่ง และนำมาคัดแยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ได้ผลดังนี้

1. การคัดแยกเชื้อรา *Aspergillus section Nigri*

คัดแยกเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* จากผัสดองบนอาหารแข็ง *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA) (Frandsberg, et al., 2003) โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่ที่เจริญเติบโตได้ คือ เชื้อรา *Aspergillus* โดยมีทั้ง *Aspergillus* สปอร์ขาว เหลือง เขียวเข้ม น้ำตาล และดำ ทำการคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus* ที่มีสปอร์สีดำ (section *Nigri*) ได้ 45 ไอโซเลท จากนั้นนำไปทดสอบหาการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสในขั้นต่อไป

2. การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

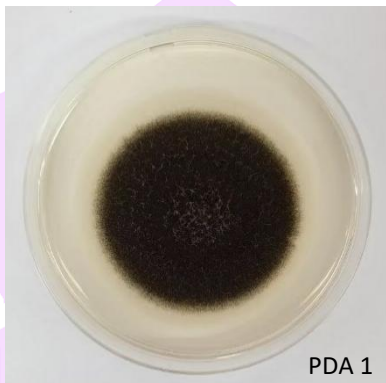
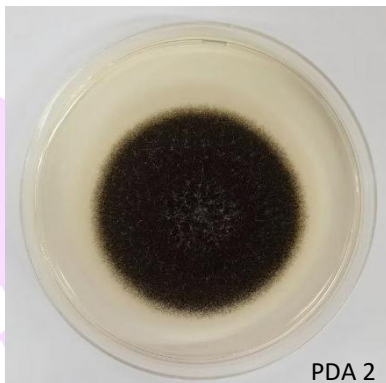
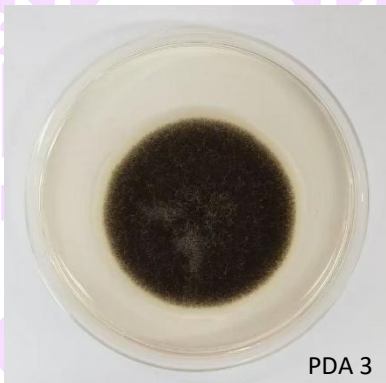
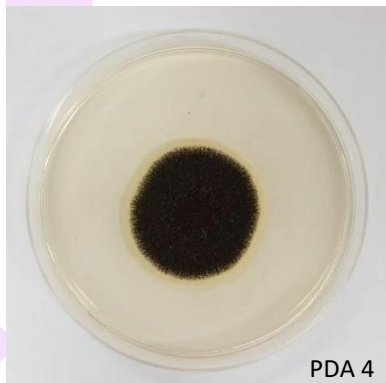
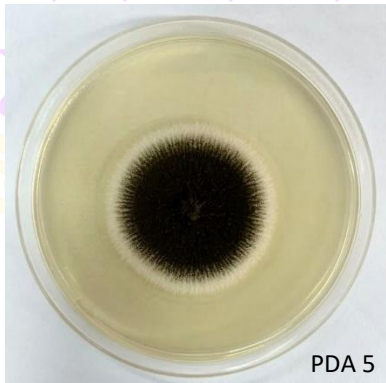
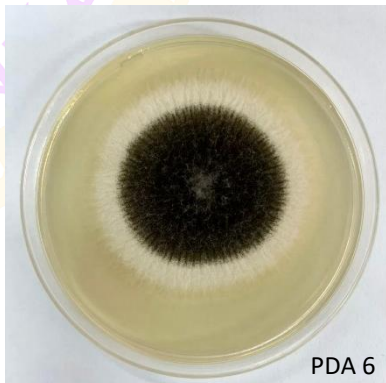
คัดแยกเชื้อรา *Aspergillus* ที่ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสโดยนำเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* ที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงสูตรจาก Semisynthetic Medium (SS medium) (Danmek, et al., 2014) ที่มีชูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการใส่ Bromothymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ (Indicator) โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของอาหารดังนี้ เนื่องจากเอนไซม์อินเวอร์เทสมีความสามารถในการย่อยน้ำตาลชูโครสให้กลายเป็นกลูโคส และฟรุคโตส (Fiedurek et al., 2000; Mobini-Dehkordi, et al., 2008) เมื่อเราใส่ชูโครสเป็น

แหล่งคาร์บอน และ Bromothymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ (Indicator) ในอาหาร Bromothymol blue ที่ pH เป็นกลางจะมีสีเขียว, ที่ pH เป็นกรดจะมีสีเหลือง และที่ pH เป็นด่างจะมีสีน้ำเงิน หากเชื้อราเจริญเติบโตบนอาหารได้ แสดงว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสมาย่อยน้ำตาลซูโครสในอาหารเพื่อดูดซึมสารเข้าสู่เซลล์แล้วนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตสารเมแทบอไลต์ต่าง ๆ ซึ่งสารที่ถูกหลั่งออกมาอาจมีสภาพเป็นกรด จึงทำให้อาหาร SS medium เปลี่ยนสีจากเขียวเป็นเหลือง หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่ามีเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* ที่ทำให้อาหารเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นเหลือง 24 ไอโซเลท โดย

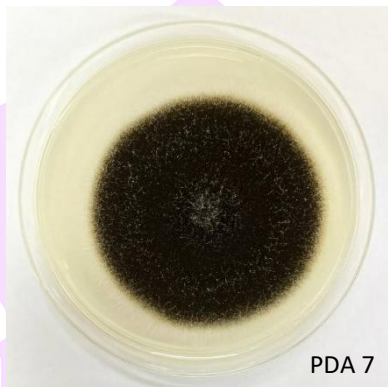
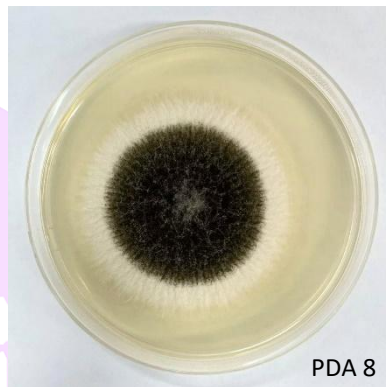
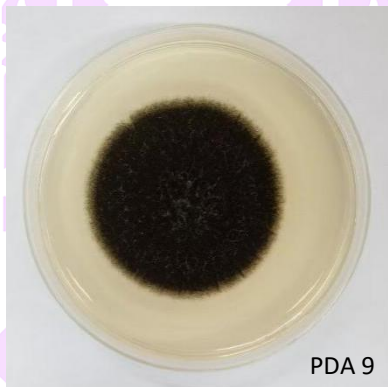
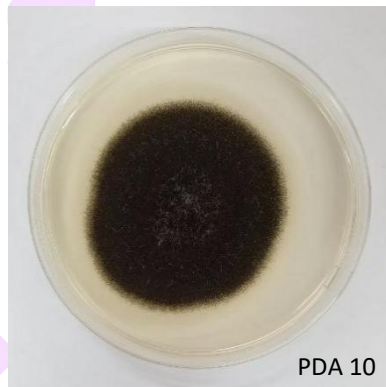
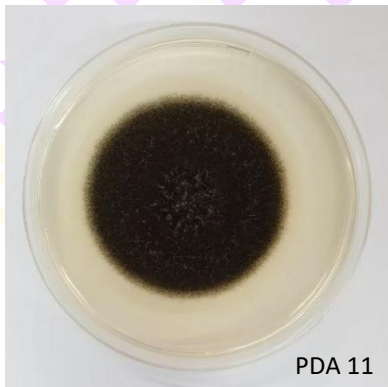
1. บริเวณ ตำบลบ้านเหล่า อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา สามารถแยกได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท
2. บริเวณ ตำบลบ้านถ้ำ อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา สามารถแยกได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลท
3. บริเวณ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา สามารถแยกได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลท
4. บริเวณ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลท

จากนั้นนำเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 24 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ PDA เพื่อเก็บรักษาและเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนที่จะนำไปศึกษาคุณสมบัติด้านต่าง ๆ (ตาราง 1-4)

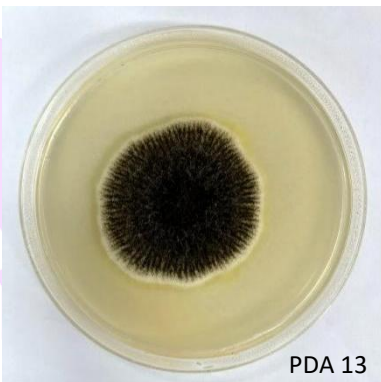
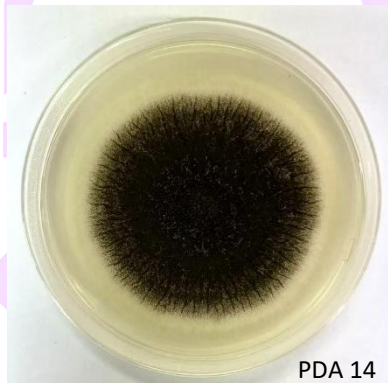
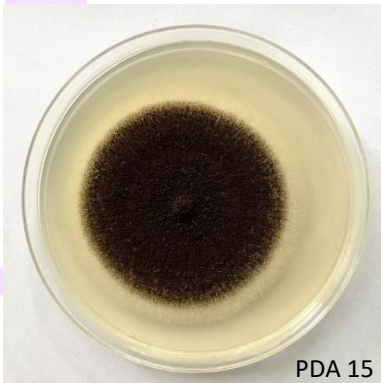
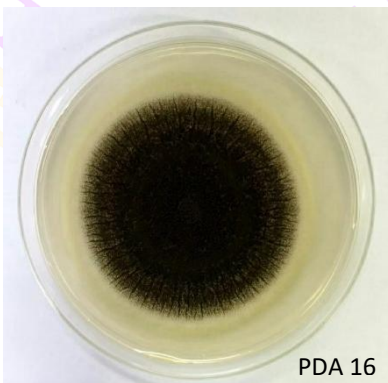
ตาราง 1 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus section Nigri* บนอาหารสังเคราะห์ PDA ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผิงพันธุ์บริเวณ ต.บ้านเหล่า อ.แม่ใจ จ.พะเยา

พิกัดเก็บตัวอย่าง ผิงพันธุ์	ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม <i>Aspergillus section Nigri</i> ที่คัดแยกได้ (ไอโซเลท)	
19°24'34.7"N 99°49'40.9"E	 PDA 1	 PDA 2
	 PDA 3	 PDA 4
	 PDA 5	 PDA 6

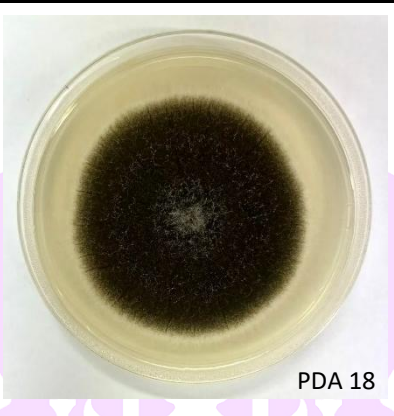
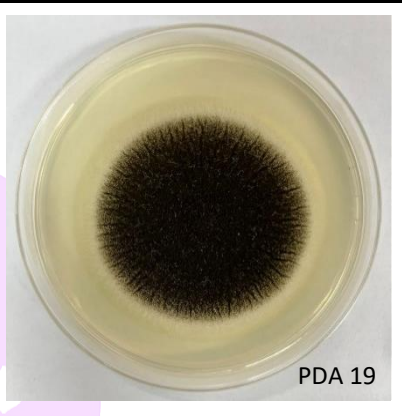
ตาราง 2 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus section Nigri* บนอาหารสังเคราะห์ PDA ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผัสดิบบริเวณ ต.บ้านถ้ำ อ.ดอกคำใต้ จ.พะเยา

พิกัดเก็บตัวอย่าง ผัสดิบ	ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม <i>Aspergillus section Nigri</i> ที่คัดแยกได้ (ไอโซเลท)	
19°04'22.9"N 100°03'34.0"E	 PDA 7	 PDA 8
	 PDA 9	 PDA 10
	 PDA 11	

ตาราง 3 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus section Nigri* บนอาหารสังเคราะห์ PDA ที่ คัดแยกได้จากตัวอย่างผิ้วพันธุ์บริเวณ คณะเกษตรศาสตร์และ ทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา

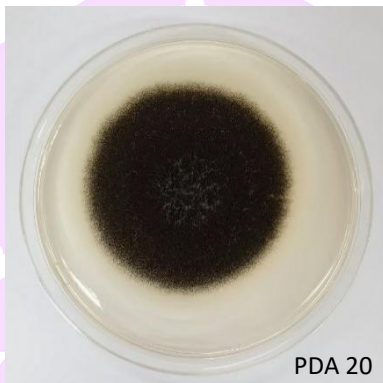
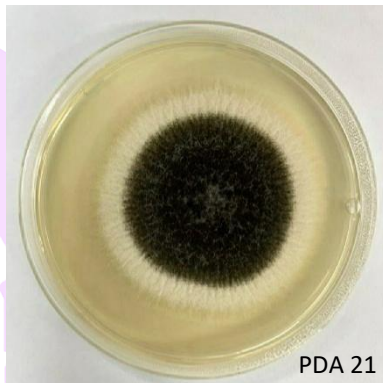
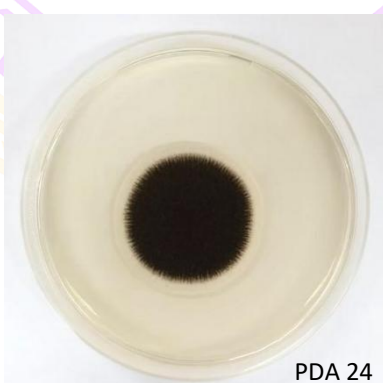
พิกัดเก็บตัวอย่าง ผิ้วพันธุ์	ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม <i>Aspergillus section Nigri</i> ที่คัดแยกได้ (ไอโซเลท)	
19°01'52.7"N 99°53'54.8"E	 PDA 12	 PDA 13
	 PDA 14	 PDA 15
	 PDA 16	 PDA 17

ตาราง 3 (ต่อ)

พิกัดเก็บตัวอย่าง ผิ้วพันธุ์	ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> ที่คัดแยกได้ (ไอโซเลต)
19°01'52.7"N 99°53'54.8"E	 PDA 18  PDA 19



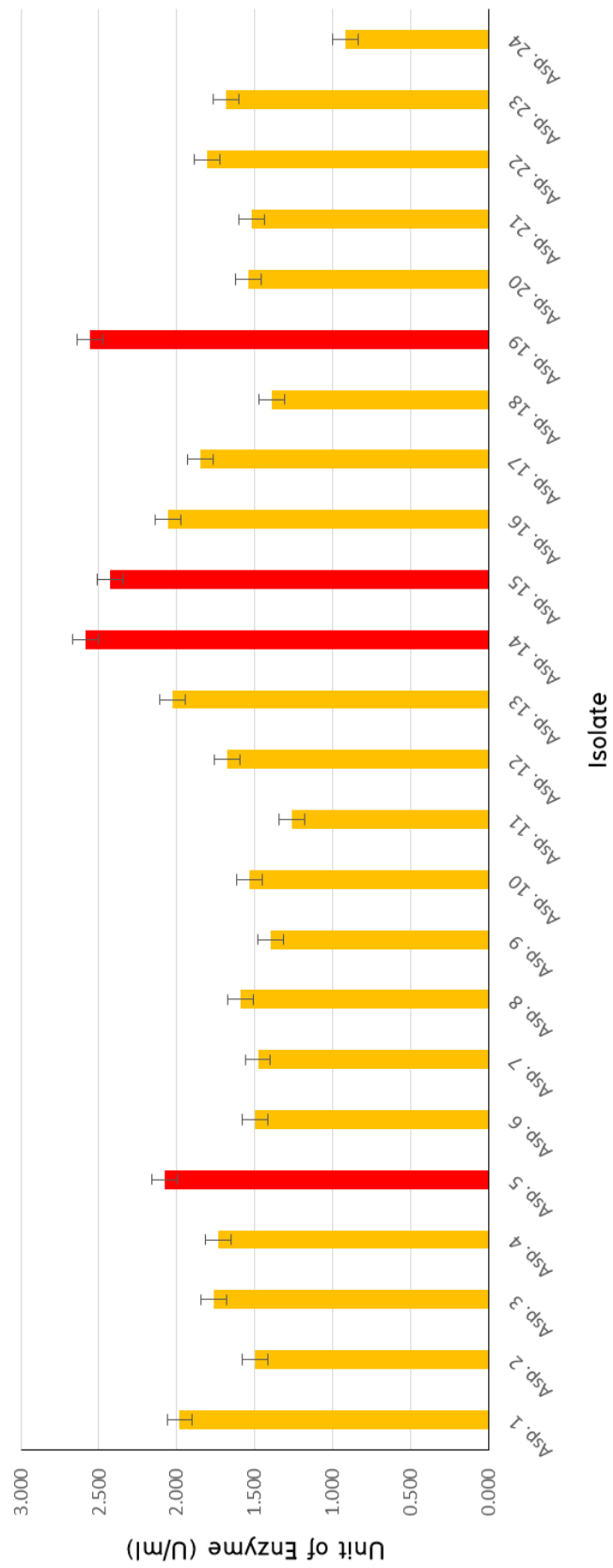
ตาราง 4 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus section Nigri* บนอาหารสังเคราะห์ PDA ที่ตัดแยกได้จากตัวอย่างผึ่งพันธุ์บริเวณภาควิชาภูมิวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่

พิกัดเก็บตัวอย่าง ผึ่งพันธุ์	ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม <i>Aspergillus section Nigri</i> ที่คัดแยกได้ (ไอโซเลท)	
18°47'35.0"N 98°57'40.0"E	 PDA 20	 PDA 21
	 PDA 22	 PDA 23
	 PDA 24	

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสจาก *Aspergillus section Nigri* ที่คัดแยกได้

เมื่อทำการคัดแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์แล้วจึงนำเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* ที่คัดแยกได้ทั้ง 24 ไอโซเลท มาทดสอบหาค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทส โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์เหลว Invertase production medium (IP medium) ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อทดสอบการย่อยสลายซึบสเตรทของเชื้อราแต่ละไอโซเลท โดยการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method พบว่าเชื้อราที่คัดแยกได้ทั้งหมดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส เนื่องจาก *Aspergillus section Nigri* เป็นผู้ผลิตเอนไซม์และสารทุติยภูมิที่มีประสิทธิภาพ สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดหนึ่งในนั้นคือเอนไซม์อินเวอร์เทส ทำให้ *Aspergillus section Nigri* ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการผลิตกรดอินทรีย์และเอ็นไซม์ เชื้อราสกุลนี้จึงมีความสำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพ การแพทย์ เกษตรกรรม และอุตสาหกรรมต่าง ๆ (Varga, et al., 2007; Vesth, et al., 2018) *Aspergillus section Nigri* ถือเป็นหนึ่งในสายพันธุ์ที่สำคัญที่สุดของเชื้อราสกุล *Aspergillus* (Ashtiani, et al., 2017)

ในการทดลองนี้พบว่า เชื้อราที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงที่สุด 4 อันดับแรก คือ เชื้อราจากไอโซเลท 5 (2.077 ยูนิต/มล.), 14 (2.583 ยูนิต/มล.), 15 (2.425 ยูนิต/มล.) และ 19 (2.559 ยูนิต/มล.) (ภาคผนวก จ) เมื่อเรียงลำดับค่าแอกติวิตีจากมากไปน้อยจะได้ดังนี้ Asp. 14, Asp. 19, Asp. 15 และ Asp. 5 ตามลำดับ (ภาพ 13) ทำการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อราที่มีค่าแอกติวิตีสูงที่สุด 4 อันดับแรก บนอาหารสังเคราะห์ PDA AFPA SS medium และ SS medium ที่เพิ่ม Bromothymol Blue เมื่อสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารที่เติมอินดิเคเตอร์จะพบว่า ยิ่งเชื้อรามีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสสูงระดั้มากการเปลี่ยนสีของอาหารจะกว้างกว่าเชื้อราที่มีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากการประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีกว่า (ตาราง 5)



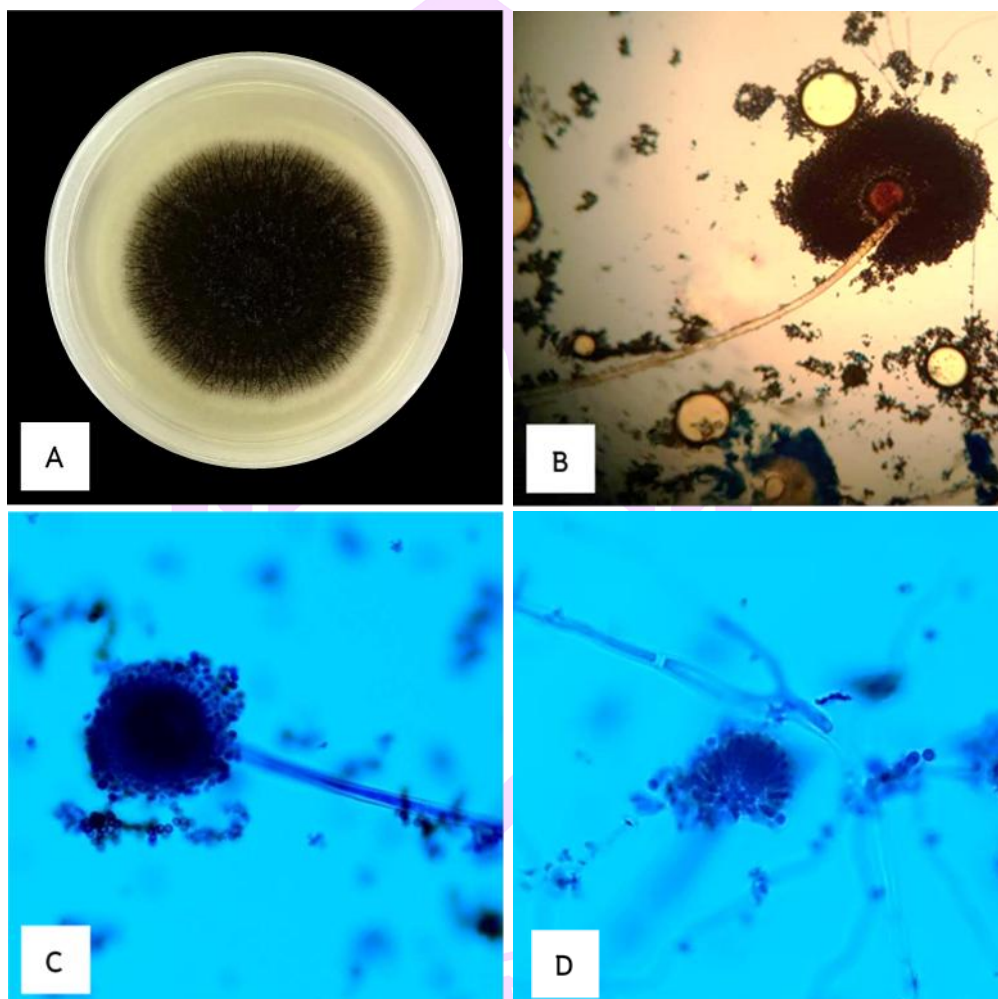
ภาพ 13 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสของเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* ที่คัดแยกได้

ตาราง 5 เปรียบเทียบลักษณะของเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผิ้วพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์

Isolate	PDA	AFPA	SS medium	SS medium + Bromothymol Blue
<i>Aspergillus</i> spp. 5				
<i>Aspergillus</i> spp. 14				
<i>Aspergillus</i> spp. 15				
<i>Aspergillus</i> spp. 19				

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Aspergillus* section *Nigri* ที่คัดแยกได้

นำเชื้อรา *Aspergillus* section *Nigri* ไอโซเลท 14 ที่มีค่าแอดติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสสูงที่สุดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราตามวิธีการของ Klich (2002); Danmek, et al., (2011); Danmek, et al., (2014) โดยศึกษาลักษณะต่างๆ เช่น สี ขนาด และรูปร่าง เป็นต้น



ภาพ 14 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ไอโซเลท 14

หมายเหตุ: A ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA

B ลักษณะของเวสิเคิล (Vesicle)

C ลักษณะของก้านชูสปอร์ (Conidiophores)

D ลักษณะของเส้นใย

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลท 14 ซึ่งมีค่าแอดติวิตีสูงสุด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 4 วัน โคโลนีมีรูปร่างกลม เส้นใยมีสีขาว มีสปอร์สีดำอัดตัวกันแน่นเหมือนแผ่นกำมะหยี่ ขอบโคโลนีมีเส้นใยสีขาวครีมแผ่ออก มีร่องเป็นเส้น (อาหารแตก) รอบวงเป็นรัศมี โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.1 เซนติเมตร ด้านหลังโคโลนีมีสีครีมอมเหลือง ลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์ เวสิเคิล (Vesicle) มีรูปร่างกลม โคนิดี (Conidia) มีสีน้ำตาลเข้มเรียงต่อกันเป็นสายโซ่ (Chains) ก้านชูสปอร์ (Conidiophore) มีลักษณะยาว ใส ไม่มีสี เส้นใย (Hyphae) มีผนังกัน (Septate-Hypha) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเด่นของเชื้อรา *Aspergillus* section *Nigri* อย่างไรก็ตามการศึกษานุกรมวิชาของ *Aspergillus* section *Nigri* มีความซับซ้อนเนื่องจากความแตกต่างระหว่างสปีชีส์มีความละเอียดอ่อนและเชื้อราที่มีวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้การจำแนกหรือการระบุสายพันธุ์โดยพิจารณาจากลักษณะทางฟีโนไทป์เพียงอย่างเดียวอาจทำได้ยากหรือไม่สามารถระบุได้ (Ferranti, et al., 2018; Silva, et al., 2011)



การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

1. การศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus section Nigri* ไอโซเลท 14 ที่มีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดในอาหาร Invertase production medium เป็นระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 3 วัน สามารถให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุด คือ 4.043 ยูนิต/มิลลิลิตร หลังจากนั้นการผลิตอินเวอร์เทสจะค่อย ๆ ลดลง การลดลงดังกล่าวอาจเป็นผลจากการที่กลูโคสซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์หลักที่ได้จากการย่อยสลายสารตั้งต้นและมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตถูกใช้หมดไป หรืออาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของของเสียที่ได้จากการเผาผลาญที่เพิ่มขึ้นและสะสมในอาหารเหลว (Mamma, et al., 2008)

ตาราง 6 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Invertase production medium เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	Unit of Enzyme (U/ml)
1	0.131 ^c ±0.050
3	4.043 ^a ±0.228
5	3.508 ^{ab} ±0.427
7	2.642 ^{ab} ±0.605
9	2.882 ^{ab} ±0.263
11	2.017 ^b ±0.777
13	2.756 ^{ab} ±0.522
15	2.854 ^{ab} ±0.418

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ a, b, c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. การศึกษาความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (pH optimum)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus section Nigri* ไอโซเลท 14 ที่มีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดในอาหาร Invertase production medium ภายใต้สภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่แตกต่างกัน พบว่าเชื้อรามีการสังเคราะห์เอนไซม์อินเวอร์เทสสูงในช่วง pH 7-8 โดยที่ pH 7 ให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุด คือ 3.235 หน่วย/มิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่า pH อื่น ($p < 0.05$) หลังจากนั้นเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นเข้าสู่สภาวะที่เป็นด่าง พบว่าค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างต่อเนื่อง จนเหลือเพียง 0.002 หน่วย/มิลลิลิตร ที่ pH 12 ผลลัพธ์ที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chelliappan and Madhanasundareswari (2013) ซึ่งพบว่า pH 7 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสด้วยกระบวนการหมักแบบของแข็ง (Solid-State Fermentation; SSF) ของเชื้อ *Aspergillus* sp. ที่แยกจากตัวอย่างดิน

ตาราง 7 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Invertase production medium ที่ pH แตกต่างกัน

ค่าความเป็นกรด – เบส ในอาหาร (pH)	Unit of Enzyme (U/ml)
3	1.298 ^d ±0.031
6	1.488 ^c ±0.014
7	3.235 ^a ±0.040
8	2.849 ^b ±0.028
9	1.443 ^c ±0.108
10	0.031 ^e ±0.002
12	0.002 ^e ±0.009

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ a, b, c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (Nitrogen optimum)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus section Nigri* ไอโซเลท 14 ที่มีค่าแอดติวิตีของเอนไซม์สูงสุดในอาหาร Invertase production medium ที่มีการปรับเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจน พบว่าอาหารที่ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถให้ค่าแอดติวิตีของเอนไซม์ได้สูงสุด คือ 2.515 ยูนิต/มิลลิลิตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ($p < 0.05$) สาเหตุอาจเป็นเพราะ NH_4Cl เป็นเกลืออนินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ดี เมื่อแตกตัวแล้วให้แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงในการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ เมื่อจุลินทรีย์ได้รับไนโตรเจนจาก NH_4^+ อย่างเพียงพอจึงทำให้สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งรวมถึงการสร้างเอนไซม์ได้ในปริมาณที่เหมาะสมด้วย (Zhang, et al., 2016) ผลลัพธ์ที่ได้สอดคล้องกับการทดลองใน *Aspergillus carbonarius* ที่พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมอินเวอร์เทสได้สูงสุด (Nascimento, et al., 2019) และเมื่อสังเกตผลการทดลองที่ได้พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ (NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , Urea) ส่วนใหญ่ มีแนวโน้มให้ค่าแอดติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ (Yeast extract, Peptone, Skim milk, กากยีสต์, เปปตอญ์, ถั่วเน่า และเกล็ดปลา) เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์มีคุณสมบัติในการละลายน้ำและแตกตัวได้ดี จึงทำให้จุลินทรีย์สามารถดูดซึมและนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังมีองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน ช่วยลดผลกระทบจากสารประกอบอื่นที่อาจยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการสังเคราะห์เอนไซม์ได้

ตาราง 8 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Invertase production medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน

แหล่งไนโตรเจน	Unit of Enzyme (U/ml)
NH ₄ Cl	2.515 ^a ±0.045
Urea	0.106 ^g ±0.029
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.995 ^b ±0.025
NaNO ₃	1.522 ^c ±0.105
Yest extract	1.551 ^c ±0.085
Peptone	0.756 ^e ±0.048
Skim milk	1.304 ^d ±0.026
แกลบ	0.121 ^g ±0.084
เปลือกถั่วเหลือง	0.242 ^f ±0.037
ถั่วเน่า	0.742 ^e ±0.049
กากยีสต์	0.379 ^f ±0.025

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ a, b, c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05)

การศึกษาลักษณะคุณสมบัติของเอนไซม์อินเวอร์เทส

1. การศึกษาความเป็นกรด-เบสของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทดสอบเอนไซม์อินเวอร์เทส (pH Buffer)

นำเอนไซม์อินเวอร์เทสของ *Aspergillus section Nigri* ไอโซเลท 14 ที่มีค่าแอดติวิตีของเอนไซม์สูงสุดไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่แตกต่างกัน พบว่าเอนไซม์อินเวอร์เทสแสดงค่าแอดติวิตีสูงเมื่อถูกทดสอบด้วยบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด โดยบัฟเฟอร์ pH 4 ให้ค่าแอดติวิตีสูงสุด คือ 0.315 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยค่าที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่า pH อื่น ($p < 0.05$) เมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น พบว่าค่าแอดติวิตีของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด ผลลัพธ์ที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Oyediji, et al., (2017) ที่ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสทนความร้อนจากเชื้อรา *Aspergillus niger* IBK1 แล้วพบว่าเอนไซม์อินเวอร์เทสบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพสูงสุดในสภาวะที่เป็นกรด โดย *Aspergillus niger* IBK1 ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ที่ขึ้นอยู่ค่า pH นั้นถูกกำหนดโดยลักษณะของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (Active Site) ซึ่งจะเกิดการรับและปล่อยโปรตอน (protonation and deprotonation) ตามค่า pH ของสภาพแวดล้อม (Sabu, et al., 2005)

ตาราง 9 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในการทดสอบแตกต่างกัน

Buffer (pH)	Unit of Enzyme (U/ml)
3	0.274 ^b ±0.014
4	0.315 ^a ±0.012
5	0.259 ^b ±0.023
6	0.242 ^b ±0.007
7	0.011 ^c ±0.007
8	0.004 ^c ±0.007
9	0.001 ^c ±0.000
10	0.005 ^c ±0.007
11	0.003 ^c ±0.007
12	0.002 ^c ±0.000

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ a, b, c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทดสอบเอนไซม์อินเวอร์เทส

นำเอนไซม์อินเวอร์เทสของ *Aspergillus section Nigri* ไอโซเลท 14 ที่มีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่าเอนไซม์ที่บ่มด้วยอุณหภูมิในช่วง 50 – 60 องศาเซลเซียส สามารถให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ได้สูงสุดคือ 0.171 และ 0.189 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยค่าที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่าอุณหภูมิอื่น ($p < 0.05$) ผลลัพธ์ที่ได้คล้ายกับงานวิจัยของ Oyediji, et al., (2017) ที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของอินเวอร์เทส คือ 60 องศาเซลเซียส และคล้ายกับงานวิจัยของ Almeida, et al., (2018) ที่ได้ศึกษาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์อินเวอร์เทสและ ทรานส์ฟรุคโตซิลเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และนำเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ ผลการศึกษาพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส คือ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงที่สุด"

ตาราง 10 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ใช้อุณหภูมิในการทดสอบแตกต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	Unit of Enzyme (U/ml)
30	0.006 ^b ±0.001
40	0.060 ^b ±0.005
50	0.171 ^a ±0.034
60	0.189 ^a ±0.017
70	0.048 ^b ±0.004
80	0.016 ^b ±0.007

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ a, b, c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเสริมต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์

ศึกษาผลของอาหารต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารแตกต่างกัน ดังนี้ 1. ให้น้ำเชื่อมอย่างเดียว (Negative control; N) 2. ให้น้ำเชื่อม และ Pollen patty (Positive control; P) 3. Pollen patty + น้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 5 (T1) 4. Pollen patty + น้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 14 (T2) 5. Pollen patty + น้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 15 (T3) และ 6. Pollen patty + น้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 19 (T4)

1. การศึกษาอัตราการกินอาหารเสริมของผึ้งพันธุ์

1.1 เกสรข้าวโพด (แหล่งโปรตีน)

ผลการทดสอบอัตราการกินอาหารเกสรเทียมที่ทำจากเกสรข้าวโพด (Pollen patty) เพื่อเป็นแหล่งโปรตีน พบว่าอัตราการกิน pollen patty ของผึ้งพันธุ์ในช่วง 6 วันแรก มีค่าสูงและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยในทรีตเมนต์ที่ 1 (T1) ซึ่งมีอัตราการกินสูงสุดที่ 0.49 และ 0.64 กรัม ในวันที่ 3 และ 6 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากช่วง 6 วันแรก อัตราการกินของผึ้งในแต่ละทรีตเมนต์มีแนวโน้มลดลงและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจนถึงวันที่ 21 ของการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าในช่วง 6 วันแรก ผึ้งที่ได้รับน้ำเชื่อมผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส (ยกเว้นทรีตเมนต์ 3; T3) มีแนวโน้มการกิน pollen patty มากกว่าผึ้งในกลุ่มควบคุม ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าน้ำเชื่อมที่มีส่วนผสมของเอนไซม์อาจมีผลต่อพฤติกรรมการกินอาหารโปรตีนของผึ้งพันธุ์

ตาราง 11 อัตราการกินอาหารเกสรข้าวโพด (Pollen patty)

อายุของ ผึ้งพันธุ์ (วัน)	Treatment					
	Negative	Positive	Asp. 5	Asp. 14	Asp. 15	Asp. 19
	control (N)	control (P)	(T1)	(T2)	(T3)	(T4)
3	–	0.42 ^{ab} ±0.12	0.49 ^a ±0.03	0.47 ^{ab} ±0.03	0.29 ^b ±0.01	0.44 ^{ab} ±0.01
6	–	0.43 ^c ±0.05	0.64 ^a ±0.02	0.48 ^{bc} ±0.02	0.31 ^d ±0.04	0.55 ^{ab} ±0.04
9	–	0.42±0.04	0.43±0.06	0.42±0.03	0.37±0.04	0.36±0.05
12	–	0.25±0.04	0.30±0.00	0.29±0.03	0.23±0.02	0.25±0.02
15	–	0.20±0.02	0.17±0.01	0.17±0.01	0.16±0.02	0.17±0.04
18	–	0.16±0.02	0.19±0.01	0.20±0.04	0.22±0.03	0.20±0.01
21	–	0.16±0.02	0.15±0.03	0.15±0.01	0.18±0.02	0.17±0.02

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงในตารางมีหน่วยเป็นกรัม, หลังวันที่ 6 อัตราการกิน pollen patty ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

1.2 น้ำเชื่อม (แหล่งคาร์โบไฮเดรต)

ผลการทดสอบอัตราการกินน้ำเชื่อมของผึ้งพันธุ์ พบว่าใน 3 วันแรก อัตราการกินน้ำเชื่อมยังอยู่ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับวันอื่น ๆ เนื่องจากผึ้งเกิดใหม่ต้องการโปรตีนมากกว่าคาร์โบไฮเดรตเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและพัฒนาส่วนต่างๆ ทำให้อัตราการกินน้ำเชื่อมน้อยในช่วงแรก อย่างไรก็ตาม เมื่อเวลาผ่านไปผึ้งต้องการพลังงานในการดำเนินชีวิตและทำกิจกรรมต่าง ๆ ทำให้อัตราการกินน้ำเชื่อมเพิ่มสูงขึ้น (Helm, et al., 2017) หลังจาก 3 วันแรก อัตราการกินเริ่มค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและลดลงในตอนท้าย โดยวันที่ 9 มีอัตราการกินสูงสุดในทรีตเมนต์ 4 (T4) คือ 3.71 กรัม โดยน้ำเชื่อมที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ส่วนใหญ่มีอัตราการกินสูงกว่าน้ำเชื่อมในกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นผลมาจากเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายโมเลกุลน้ำตาลให้มีขนาดเล็กลง ทำให้ผึ้งสามารถกินและดูดซึมได้ง่ายขึ้น และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลในตารางจะพบว่า ทรีตเมนต์ 4 (T4) มีอัตราการกินน้ำเชื่อมสูงสุดอย่างต่อเนื่อง ขณะที่ทรีตเมนต์ 1 (T1) กลับมีอัตราการกินต่ำสุดในกลุ่มของน้ำเชื่อมที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ ในช่วงวันที่ 19-21 อัตราการกินน้ำเชื่อมของผึ้งในทุกทรีตเมนต์ลดลง และไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเป็นผลจากจำนวนประชากรผึ้งที่ลดลงในช่วงท้ายของการทดลอง

ตาราง 12 อัตราการกินน้ำเชื่อม

อายุของ ผึ้งพันธุ์ (วัน)	Treatment					
	Negative control (N)	Positive control (P)	Asp. 5 (T1)	Asp. 14 (T2)	Asp. 15 (T3)	Asp. 19 (T4)
3	1.89 ^b ±0.08	1.82 ^b ±0.01	1.66 ^b ±0.05	1.71 ^b ±0.07	1.97 ^b ±0.07	2.44 ^a ±0.26
6	3.28 ^a ±0.08	2.32 ^b ±0.26	2.18 ^b ±0.06	2.45 ^b ±0.05	3.15 ^a ±0.20	2.98 ^a ±0.18
9	2.91 ^{bc} ±0.13	2.69 ^c ±0.20	2.48 ^c ±0.21	3.00 ^{bc} ±0.07	3.47 ^{ab} ±0.08	3.71 ^a ±0.28
12	1.98 ^c ±0.15	2.57 ^b ±0.20	2.64 ^b ±0.06	2.69 ^{ab} ±0.03	2.96 ^{ab} ±0.11	3.11 ^a ±0.18
15	2.18 ^c ±0.12	2.49 ^{bc} ±0.10	2.78 ^{ab} ±0.05	2.96 ^a ±0.14	2.99 ^a ±0.04	2.70 ^a ±0.15
18	2.20 ^c ±0.20	2.44 ^{bc} ±0.17	2.88 ^{ab} ±0.15	2.98 ^a ±0.11	3.20 ^a ±0.14	3.18 ^a ±0.20
21	1.94 ^a ±0.10	1.74 ^a ±0.25	2.02 ^a ±0.01	1.61 ^a ±0.10	2.17 ^a ±0.16	1.83 ^a ±0.25

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงในตารางมีหน่วยเป็นกรัม

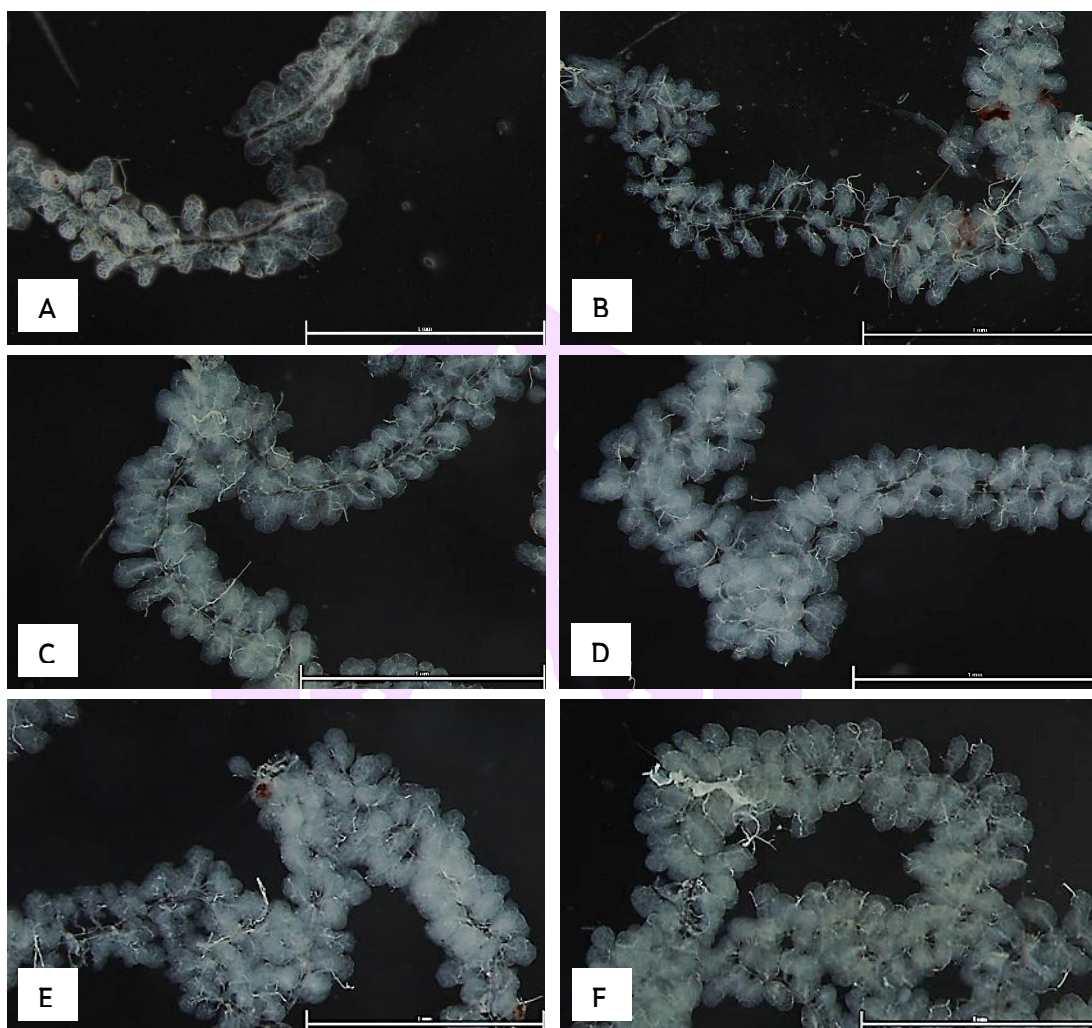
2. การศึกษาผลของอาหารเสริมต่อการพัฒนาต่อม Hypopharyngeal gland (HPG)

ผลการศึกษาการพัฒนาของต่อม HPG ของผึ้งพันธุ์ที่มีอายุ 7 วัน โดยวัดขนาดของ acini พบว่าผึ้งทรีตเมนต์ 4 (T4) มีขนาดของ acini เล็กใหญ่ที่สุด คือ 99.99 ไมโครเมตร รองลงมาคือ ผึ้งทรีตเมนต์ 3 (T3), 2 (T2), 1 (T1), กลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มควบคุมลบ โดยมีขนาดของ acini เล็กใหญ่เท่ากับ 92.06, 91.02, 80.32, 75.90 และ 71.59 ไมโครเมตร ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าผึ้งที่ได้รับน้ำเชื่อมที่มีส่วนผสมของเอนไซม์มีขนาด acini ใหญ่กว่าผึ้งที่ได้รับน้ำเชื่อมธรรมดาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งบ่งชี้ว่า น้ำเชื่อมอินเวิร์ตที่ผลิตจากเอนไซม์อินเวอร์เทสมีผลต่อการพัฒนาต่อม HPG ผลการศึกษาดังกล่าวมีความคล้ายกับงานวิจัยของ Hasan, et al., (2022) ที่พบว่าการเสริมโปรไบโอติก และ กรดอินทรีย์ในน้ำเชื่อมเลี้ยงผึ้งจะส่งผลให้ต่อม HPG มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับผึ้งที่ได้รับน้ำเชื่อมธรรมดา เนื่องจากผึ้งงานใช้ต่อม HPG ในการผลิตนมผึ้ง (Royal Jelly) ซึ่งเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงดูตัวอ่อนและผึ้งนางพญา ดังนั้นการได้รับสารอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาต่อม HPG จะทำให้ acini มีขนาดใหญ่และสามารถผลิตนมผึ้งได้มากขึ้น ส่งผลให้เกิดการสร้างประชากรผึ้งเพิ่มขึ้น (ซรรค์ชัย ดันเมฆ และคณะ 2567; Jang, et al., 2022)

ตาราง 13 ผลการวิเคราะห์ขนาด acini ของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารต่างกันเป็นเวลา 7 วัน

Treatment					
Negative	Positive	(T1)	(T2)	(T3)	(T4)
control (N)	control (P)	Asp. 5	Asp. 14	Asp. 15	Asp. 19
71.59 ^e ±0.71	75.90 ^d ±0.60	80.32 ^c ±1.52	91.02 ^b ±1.04	92.06 ^b ±1.84	99.99 ^a ±1.50

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงในตารางมีหน่วยเป็นไมโครเมตร



ภาพ 15 รูปร่างและขนาด acini ของตับอ่อนที่ได้รับอาหารต่างชนิดเป็นเวลา 7 วัน

หมายเหตุ: ภาพรูปร่างและขนาด acini ที่กำลังขยาย 5 เท่า

A ลักษณะรูปร่างและขนาด acini ของตับ Negative control

B ลักษณะรูปร่างและขนาด acini ของตับ Positive control

C ลักษณะรูปร่างและขนาด acini ของตับ ที่ได้รับอาหาร T1

D ลักษณะรูปร่างและขนาด acini ของตับ ที่ได้รับอาหาร T2

E ลักษณะรูปร่างและขนาด acini ของตับ ที่ได้รับอาหาร T3

F ลักษณะรูปร่างและขนาด acini ของตับ ที่ได้รับอาหาร T4

3. การศึกษาผลของอาหารเสริมต่อการพัฒนามวลกล้ามเนื้อส่วนอกของผึ้งพันธุ์

ผลการทดสอบการพัฒนามวลกล้ามเนื้อส่วนอกของผึ้งที่ได้รับสารอาหารแตกต่างกันเป็นเวลา 5 และ 18 วัน โดยการชั่งน้ำหนักหลังจากที่อบแห้งด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าในผึ้งอายุ 5 วัน ผึ้งทรีตเมนต์ 1 (T1) มีมวลกล้ามเนื้อส่วนอกสูงสุด คือ 10.67 มิลลิกรัม รองลงมาคือ ผึ้งทรีตเมนต์ 3 (T3), 2 (T2), กลุ่มควบคุมบวก (P), 4 (T4), และ กลุ่มควบคุมลบ (N) มีน้ำหนักอกเท่ากับ 10.61, 10.31, 10.15, 10.07 และ 9.57 มิลลิกรัม ตามลำดับ ผลที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนักอาจเป็นเพราะกล้ามเนื้อยังพัฒนาได้ไม่เต็มที่ ในขณะที่ผึ้งอายุ 18 วัน กลับพบว่า ผึ้งที่มีมวลกล้ามเนื้อส่วนอกสูงสุดคือ ผึ้งทรีตเมนต์ 4 (T4) มีน้ำหนักอกเท่ากับ 11.43 มิลลิกรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม รองลงมาคือทรีตเมนต์ 2 (T2), 1 (T1), 3 (T3), กลุ่มควบคุมบวก (P) และ กลุ่มควบคุมลบ (N) มีน้ำหนักอกเท่ากับ 11.41, 11.29, 10.99, 10.83 และ 10.51 มิลลิกรัม ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าผึ้งที่ได้น้ำเชื่อมเพียงอย่างเดียวโดยปราศจากแหล่งของโปรตีน จะมีมวลกล้ามเนื้อส่วนอกน้อยกว่าผึ้งที่ได้รับอาหารโปรตีนควบคู่ โดยผึ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเอนไซม์อินเวอร์เทสส่วนใหญ่มักจะมีมวลกล้ามเนื้อส่วนอกมากกว่าผึ้งในกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองที่ได้อาจสันนิษฐานได้ว่าเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* มีส่วนช่วยในการพัฒนามวลกล้ามเนื้อส่วนอกของผึ้งพันธุ์ แม้ว่าจากการศึกษาหาข้อมูลยังไม่พบหลักฐานที่ระบุอย่างชัดเจนว่าน้ำเชื่อมมีผลโดยตรงต่อการเจริญของมวลกล้ามเนื้อในผึ้งพันธุ์ แต่การให้น้ำเชื่อมเป็นอาหารเสริมสามารถส่งผลทางอ้อมต่อสุขภาพและการพัฒนาทางสรีรวิทยาของผึ้งได้ การเลือกใช้น้ำเชื่อมที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญในการส่งเสริมสุขภาพและประสิทธิภาพในการทำงานของผึ้งพันธุ์

ตาราง 14 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักอกแห้งของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารต่างกัน

อายุของ ผึ้งพันธุ์ (วัน)	Treatment					
	Negative control (N)	Positive control (P)	(T1) Asp. 5	(T2) Asp. 14	(T3) Asp. 15	(T4) Asp. 19
5	9.57 ^c ± 0.08	10.15 ^{ab} ± 0.19	10.67 ^a ± 0.26	10.31 ^{ab} ± 0.16	10.61 ^{ab} ± 0.21	10.07 ^{bc} ± 0.16
18	10.51 ^c ± 0.17	10.83 ^{bc} ± 0.18	11.29 ^{ab} ± 0.18	11.41 ^a ± 0.12	10.99 ^{abc} ± 0.17	11.43 ^a ± 0.14

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงในตารางมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม

4. การศึกษาผลของอาหารเสริมต่ออายุขัยของผึ้งพันธุ์

การศึกษาผลของอาหารเสริมต่ออายุขัยของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารเสริมทั้ง 6 ทรีตเมนต์เป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่าผึ้งทรีตเมนต์ 1 (T1) มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด คือ 18.00 ± 1.12 วัน รองลงมาเป็นผึ้งทรีตเมนต์ 3 (T3), 2 (T2), กลุ่มควบคุมลบ (N), 4 (T4) และกลุ่มควบคุมบวก (P) มีอายุขัย 17.26 ± 1.04 , 17.24 ± 1.10 , 17.21 ± 1.18 , 16.75 ± 1.03 และ 16.38 ± 1.29 วัน ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาความแตกต่างของค่าแอดติวิตีของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์อินเวอร์เทสที่มีค่าแอดติวิตีสูงมีแนวโน้มที่จะส่งผลให้อายุขัยของผึ้งสั้นกว่าเอนไซม์อินเวอร์เทสที่มีค่าแอดติวิตีต่ำ ซึ่งอาจเป็นผลข้างเคียงของเชื้อ *Aspergillus Section Nigri* ที่สามารถผลิตโอคราโทกซิน เอ (Ochratoxin A; OTA) ที่เป็นพิษต่อคนและสัตว์ได้ (Astoreca, et al., 2010) ข้อสังเกตนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Niu et al. (2011) ที่ศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของ OTA ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus* ที่พบได้ในรังผึ้ง โดยระบุว่าผึ้งงานสามารถทนต่อสาร OTA ได้ที่ความเข้มข้นหลายระดับ โดยทนต่อ OTA ได้ในความเข้มข้นต่ำ (1 ไมโครกรัม/กรัม) แต่ถ้าความเข้มข้นสูงกว่า 5 ไมโครกรัม/กรัม จะทำให้ผึ้งตายมากกว่าร้อยละ 50 ภายใน 3 วัน ภายใต้สภาวะการทดลอง

ตาราง 15 อายุขัยของผึ้งพันธุ์ในกล่องทดลองที่ได้รับอาหารต่างกันเป็นเวลา 21 วัน

Treatment					
Negative	Positive	(T1)	(T2)	(T3)	(T4)
control (N)	control (P)	Asp. 5	Asp. 14	Asp. 15	Asp. 19
17.21 ± 1.18	16.38 ± 1.29	18.00 ± 1.12	17.24 ± 1.10	17.26 ± 1.04	16.75 ± 1.03

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงในตารางเป็นอายุขัยของผึ้งที่วิเคราะห์การอยู่รอดแบบ Kaplan–Meier

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการทดลอง

เนื่องจากเชื้อรา *Aspergillus* เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้อย่างแพร่หลายในธรรมชาติ โดยเฉพาะในบริเวณที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรตหรือปริมาณน้ำตาลสูง ซึ่งเหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์อินเวอร์เทสเพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำตาลมาเป็นพลังงานในการเจริญเติบโต ในงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* จากสิ่งปนื้อ ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสได้จำนวน 24 ไอโซเลต ดังนี้

1. บริเวณตำบลบ้านเหล่า อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา คัดแยกได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลต
2. บริเวณตำบลบ้านถ้ำ อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา คัดแยกได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต
3. บริเวณคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา คัดแยกได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต
4. บริเวณภาควิชาชีววิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ คัดแยกได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต

โดยเชื้อราที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงที่สุด 4 อันดับแรกคือ เชื้อราจากไอโซเลต Asp. 14 (2.583 ยูนิต/มล.), Asp. 19 (2.559 ยูนิต/มล.) Asp. 15 (2.425 ยูนิต/มล.) และ Asp. 5 (2.077 ยูนิต/มล.) ตามลำดับ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* ไอโซเลต Asp. 14 ที่มีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดในอาหาร Invertase production medium เพื่อผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

1. การศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส โดยเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ 15 วัน สามารถให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ ดังนี้ 0.131, 4.043, 3.508, 2.642, 2.882, 2.017, 2.756 และ 2.854 ยูนิต/มล. ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าเชื้อที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 วัน สามารถให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

2. การศึกษาความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (pH optimum) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่ pH 3, 6, 7, 8, 9, 10 และ 12 วัน สามารถให้ค่าแอดคิตีวิตี้ของเอนไซม์ ดังนี้ 1.298, 1.488, 3.235, 2.849, 1.443, 0.031 และ 0.002 ยูนิต/มล. ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ pH 7 สามารถให้ค่าแอดคิตีวิตี้ของเอนไซม์สูงสุด โดยในช่วง pH 7-8 โดยที่ pH 7 ให้ค่าแอดคิตีวิตี้ของเอนไซม์สูงสุด

3. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (Nitrogen optimum) โดยมีแหล่งไนโตรเจนในอาหารเป็น NH_4Cl , Urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , Yeast extract, Peptone, Skim milk, แกลบ, เปลือกถั่วเหลือง, ถั่วเน่า และกากยีสต์ สามารถให้ค่าแอดคิตีวิตี้ของเอนไซม์ ดังนี้ 2.515, 0.106, 1.995, 1.522, 1.551, 0.756, 1.304, 0.121, 0.242, 0.742 และ 0.379 ยูนิต/มล. ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าเชื้อที่มี NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถให้ค่าแอดคิตีวิตี้ของเอนไซม์สูงสุด

การศึกษาลักษณะคุณสมบัติของเอนไซม์อินเวอร์เทส

1. การศึกษาความเป็นกรด-เบสของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทดสอบเอนไซม์อินเวอร์เทส (pH Buffer) โดยใช้บัฟเฟอร์ pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ในการวิเคราะห์ กิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส สามารถให้ค่าแอดคิตีวิตี้ ดังนี้ 0.274, 0.315, 0.259, 0.242, 0.011, 0.004, 0.001, 0.005, 0.003 และ 0.002 ยูนิต/มล. ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า การใช้บัฟเฟอร์ pH 4 เหมาะสมต่อการทดสอบเอนไซม์มากที่สุด

2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทดสอบเอนไซม์อินเวอร์เทส โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส สามารถให้ค่าแอดคิตีวิตี้ ดังนี้ 0.006, 0.060, 0.171, 0.189, 0.048 และ 0.016 ยูนิต/มล. ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า การบ่มเอนไซม์ด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้สูงสุด

การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเสริมต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์

ศึกษาสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารแตกต่างกัน ดังนี้

1. ให้น้ำเชื่อมอย่างเดียว (Negative control; N)
2. Pollen patty + น้ำเชื่อม (Positive control; P)
3. Pollen patty + น้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 5 (T1)
4. Pollen patty + น้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 14 (T2)

5. Pollen patty + น้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 15 (T3)

6. Pollen patty + น้ำเชื่อมที่ผสมเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 19 (T4)

1. การศึกษาอัตราการกินอาหารเสริมของผึ้งพันธุ์ โดยการชั่งน้ำหนักอาหาร (หน่วยเป็นกรัม) เพื่อเก็บผลพร้อมเปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน

1.1 อัตราการกินเกสรผึ้งดอกข้าวโพด (แหล่งโปรตีน) พบว่า ผึ้งที่ได้รับน้ำเชื่อมผสมเอนไซม์อินเวอร์เทสส่วนใหญ่มีอัตราการกิน pollen patty สูงกว่าผึ้งในกลุ่มควบคุม โดยทรีตเมนต์ที่ 1 (T1) มีอัตราการกินสูงสุด คือ 0.49 และ 0.64 กรัม ในวันที่ 3 และ 6 ตามลำดับ

1.2 อัตราการกินน้ำเชื่อม (แหล่งคาร์โบไฮเดรต) พบว่า น้ำเชื่อมที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ส่วนใหญ่มีอัตราการกินสูงกว่าน้ำเชื่อมในกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะในทรีตเมนต์ 4 (T4) ที่มีอัตราการกินสูงสุดอย่างต่อเนื่อง

2. การศึกษาผลของอาหารเสริมต่อการพัฒนาต่อม Hypopharyngeal gland (HPG) โดยวัดขนาด acini ของผึ้งพันธุ์อายุ 7 วัน ในแต่ละทรีตเมนต์ ได้แก่ กลุ่มควบคุมลบ, กลุ่มควบคุมบวก, 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3), และ 4 (T4) มีขนาดของ acini ดังนี้ 71.59, 75.90 80.32, 91.02, 92.06 และ 99.99 ไมโครเมตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า ผึ้งที่ได้รับน้ำเชื่อมที่มีส่วนผสมของเอนไซม์มีขนาด acini ใหญ่กว่าผึ้งที่ได้รับน้ำเชื่อมธรรมดา โดยผึ้งทรีตเมนต์ 4 มีขนาดของ acini เฉลี่ยใหญ่ที่สุด

3. การศึกษาผลของอาหารเสริมต่อการพัฒนามวลกล้ามเนื้อส่วนอกของผึ้งพันธุ์ที่มีอายุ 5 และ 18 วัน โดยการชั่งน้ำหนักหลังจากที่อบแห้งด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าผึ้งอายุ 5 วัน ที่มีมวลกล้ามเนื้อทรวงอกสูงสุดคือผึ้งที่ได้รับทรีตเมนต์ 1 มีน้ำหนักอกเฉลี่ยเท่ากับ 10.67 มิลลิกรัม รองลงมาคือ ผึ้งที่ได้รับทรีตเมนต์ 3, 2, กลุ่มควบคุมบวก, 4 และ กลุ่มควบคุมลบ มีน้ำหนักอกเฉลี่ยเท่ากับ 10.61, 10.31, 10.15, 10.07 และ 9.57 มิลลิกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ผึ้งอายุ 18 วัน พบว่าผึ้งที่มีมวลกล้ามเนื้อทรวงอกสูงสุดคือผึ้งที่ได้รับทรีตเมนต์ 4 (T4) น้ำหนักอกเฉลี่ยเท่ากับ 11.43 มิลลิกรัม รองลงมาคือผึ้งที่ได้รับทรีตเมนต์ 2 (T2), 1 (T1), 3 (T3), กลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มควบคุมลบ มีน้ำหนักอกเฉลี่ยเท่ากับ 11.41, 11.29, 10.99, 10.83 และ 10.51 มิลลิกรัม ตามลำดับ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าผึ้งที่ได้น้ำเชื่อมเพียงอย่างเดียวโดยปราศจากแหล่งของโปรตีน จะมีมวลกล้ามเนื้อส่วนอกน้อยกว่าผึ้งที่ได้รับอาหารโปรตีนควบคู่ โดยผึ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเอนไซม์อินเวอร์เทสส่วนใหญ่จะมีมวลกล้ามเนื้อส่วนอกมากกว่าผึ้งในกลุ่มควบคุม

4. การศึกษาผลของอาหารเสริมต่ออายุขัยของผึ้งพันธุ์ โดยเก็บผลทั้งหมด 21 วัน พบว่าผึ้งทรีตเมนต์ 1 (T1) มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด คือ 18.00 ± 1.12 วัน รองลงมาเป็นผึ้งทรีตเมนต์ 3 (T3), 2 (T2), กลุ่มควบคุมลบ (N), 4 (T4) และ กลุ่มควบคุมบวก (P) มีอายุขัย 17.26 ± 1.04 , 17.24 ± 1.10 , 17.21 ± 1.18 , 16.75 ± 1.03 และ 16.38 ± 1.29 วัน ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาความแตกต่างของค่าแอดติวิตีของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์อินเวอร์เทสที่มีค่าแอดติวิตีสูงมีแนวโน้มที่จะส่งผลให้อายุขัยของผึ้งสั้นกว่าเอนไซม์อินเวอร์เทสที่มีค่าแอดติวิตีต่ำ

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า เชื้อรา *Aspergillus section Nigri* ที่คัดแยกจากผึ้งพันธุ์มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 7 โดยมี NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน และเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 วัน สามารถให้ค่าแอดติวิตีของเอนไซม์ได้สูงสุด (3.235, 2.515 และ 4.043 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ) นอกจากนี้ เอนไซม์อินเวอร์เทสยังแสดงค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อถูกทดสอบด้วยบัฟเฟอร์ pH 4 และการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (0.315 และ 0.189 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ) เมื่อนำเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ได้มาใช้ผลิตน้ำเชื่อมอินเวิร์ตเพื่อเลี้ยงผึ้งพันธุ์และประเมินผลต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้ง พบว่า ทรีตเมนต์ 4 (T4) สามารถช่วยส่งเสริมการพัฒนาของ Hypopharyngeal gland และมวลกล้ามเนื้อส่วนอกได้สูงที่สุด (99.99 ไมโครเมตร และ 11.43 มิลลิกรัม ตามลำดับ) ในขณะที่ ทรีตเมนต์ 1 (T1) ซึ่งมีส่วนผสมของเอนไซม์อินเวอร์เทส Asp. 5 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุด แต่กลับมีอายุขัยมากที่สุด (18.00 วัน) สรุปได้ว่าน้ำเชื่อมที่มีส่วนผสมของเอนไซม์อินเวอร์เทสมีส่วนช่วยส่งเสริมการพัฒนาของต่อม Hypopharyngeal gland มวลกล้ามเนื้อส่วนอก และอายุขัยของผึ้งพันธุ์ อย่างไรก็ตาม การใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสที่มีค่ากิจกรรมสูงอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการยืดอายุขัยของผึ้งพันธุ์ ดังนั้นควรเลือกใช้เอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อสุขภาพของผึ้งพันธุ์โดยไม่ก่อให้เกิดผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์

ข้อเสนอแนะ

1. เชื้อรา *Aspergillus section Nigri* ที่คัดแยกได้จากบริเวณผิวของผัสดำ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เตสได้ดี และสามารถนำไปใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมอินเวิร์ตได้ อย่างไรก็ตาม ควรควบคุมปริมาณการใช้ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบที่อาจเป็นอันตราย
2. เพื่อให้ได้เอนไซม์อินเวอร์เตสที่มีค่ากิจกรรมสูง ควรมีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความคงตัวของเอนไซม์
3. จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์อินเวอร์เตสที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus section Nigri* ที่แยกได้จากผัสดำ มีคุณสมบัติทนทานต่อความร้อนได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งศักยภาพดังกล่าวสามารถนำไปต่อยอดและประยุกต์ใช้ในภาคอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพได้



บรรณานุกรม

- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2566). องค์ความรู้ เพิ่มประสิทธิภาพการผลิต สู้การเป็น smart officer. ผึ้งและแมลงเศรษฐกิจ (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด
- ขจรชัย ตันเมฆ, โชค โสรัจกุล, ศุภคม คล้ายโดนด, ชัยณรงค์ วงศ์สรศรี, พิเชษฐ์ ประภาวิไลย กนกวรรณ ไกลถิ่น และบาจรีย์ ฉัตรทอง. (2567). ผลของการเสริมอาหารเกสรเทียมต่อการผลิตผึ้งพันธุ์และโภชนาการของตัวอ่อนผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera* L.). **วารสารแก่นเกษตร**. 52(4): 724–736.
- ประพันธ์ จีระวัง. (2563). สูตรอาหารเลี้ยงผึ้งในช่วงฤดูที่ไม่มีเกสรดอกไม้ตามธรรมชาติ. รักบ้านเกิด. สืบค้นเมื่อ 10 ตุลาคม 2563, จาก <https://today.line.me/th/v2/article/rLWyaY>
- ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และสุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์ (ผู้บรรยาย). (28–29 กันยายน 2560). **การศึกษาสูตรอาหารจากถั่วเหลืองสกัดในการเจริญของเส้นใยเห็ดขอนขาวและเห็ดกระด้าง**. ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 9 (หน้า 2–9). นครปฐม: มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.
- ปศุสัตว์.คอม. (ม.ป.ป.). ผึ้ง และการเลี้ยงผึ้ง. ปศุสัตว์.คอม. สืบค้นเมื่อ 19 ตุลาคม 2565, จาก <https://pasusat.com/%E0%B8%9C%E0%B8%B6%E0%B9%89%E0%B8%87/>
- มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 8003–2556 น้ำผึ้ง. (13 กุมภาพันธ์ 2557). ราชกิจจานุเบกษา. 131(31 ง). หน้า 1–9.
- วิราวรรณ สายชล และนพพล เล็กสวัสดิ์. (ม.ป.ป.). เอนไซม์อินเวอร์เทส. สืบค้นเมื่อ 11 กันยายน 2564, จาก <https://www.agro.cmu.ac.th/absc/data/57/57-028.pdf>
- ศูนย์ข่าวกรมส่งเสริมการเกษตร. (21 พฤษภาคม 2565). กรมส่งเสริมการเกษตร ชู “น้ำผึ้ง” หนึ่งผลิตภัณฑ์บำรุงสุขภาพมวลมนุษยชาติ เดินหน้าเสริมรู้ผู้เลี้ยงผึ้ง–เชื่อมโยงเครือข่ายผลิตและตลาด พร้อมต่อยอดธุรกิจชุมชน. ศูนย์ข่าวกรมส่งเสริมการเกษตร. สืบค้นเมื่อ 19 กรกฎาคม 2565, จาก <https://doae.doe.go.th/archives/12947>
- ศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่. (ม.ป.ป.). ผึ้งพันธุ์. ศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่. สืบค้นเมื่อ 19 ตุลาคม 2565, จาก <http://www.aopdb04.doe.go.th/%E0%B8%9C%E0%B8%B6%E>

0%b9%89%e0%b8%87%e0%b8%9e%e0%b8%b1%e0%b8%99%e0%b8%98%e0%b8%b8%e0%b9%8c/

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. (2532). ชีววิทยาของผึ้ง (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: ต้นอ้อ.

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. (2532). ผึ้ง. ในสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ (เล่มที่ 15). กรุงเทพฯ:โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์.

สุทธิชัย สุทธิวรารักษ์, สุจินต์ สุขวิวัฒน์, นิพนธ์ เดชะ, อุดม จิรเศรษฐกุล และอรสา เสนีวงศ์ ณ อยุธยา. (ม.ป.ป.). ผึ้งและการเลี้ยงผึ้ง. สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร. สืบค้นเมื่อ 19 ตุลาคม 2565, จาก <http://www.agriman.doe.go.th/beegroup/>

อาทิตย์ กัญธุ์ศำพล, พรพิมล ม่วงไทย และปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ. (2554). การศึกษา การเกิดสารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิรอลดีไฮด์ จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดในน้ำผึ้ง STUDY OF 5-HYDROXYMETHYL-2-FURALDEHYDE FROM MAILLARD REACTION IN HONEY. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี), 3(5), 47-58.

Aliaa, R.E, Atalia, S.M.M. (2015). Production and optimization of invertase from pomegranate peel by marine fungal strain *Aspergillus terreus*. **Global Advanced Res. J. Microbiol.** 4(11), 130-139.

Almeida, M. N. d., Guimarães, V. M., Falkoski, D. L., Camargo, B. R. d., Sant'Ana, G. C. F., Maitan-Alfenas, G. P., ... and Rezende, S. T. d. (2018). Purification and characterization of an invertase and a transfructosylase from *aspergillus terreus*. **Journal of Food Biochemistry**, 42(5), e12551. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12551>

Ashtiani, N. M., Kachuei, R., Yalfani, R., Harchegani, A. B., and Nosratabadi, M. (2017). Identification of *Aspergillus* sections *Flavi*, *Nigri*, and *Fumigati* and their differentiation using specific primers. **Le infezioni in medicina**, 25(2), 127-132. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28603231>

Astoreca, A. L., Magnoli, C. E. and Dalcero A. M. (2010). Ecophysiology of *Aspergillus* Section *Nigri* Species Potential Ochratoxin A Producers. **Toxins**, 2(11), 2593-2605. <https://doi.org/10.3390/toxins2112593>

Brodschneider, R. and Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, 41(3), 278-294. doi:10.1051/apido/2010012

- Brodschneider, R., Moosbeckhofer, R. and Crailsheim, K. (2010). Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. **Journal of Apicultural Research**, 49(1), 23–30. doi:10.3896/ibra.1.49.1.04
- Corby–Harris, V., and Snyder, L. A. (2018). Measuring Hypopharyngeal Gland Acinus Size in Honey Bee (*Apis mellifera*) Workers. **Journal of visualized experiments**. (139): 58261. <https://doi.org/10.3791/58261>
- Chen, Y. H., Aull, J. L. and Bell, L. N. (1999), Invertase storage stability and sucrose hydrolysis in solids As affected by water activity and glass transition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 504–509. doi:10.1021/jf9807216
- Danmek, K., Intawicha, P., Thana, S., Sorachakula, C., Meijer, M. and Samson, R. A. (2014). Characterization of cellulase producing from *Aspergillus melleus* by solid state fermentation using maize crop residues. **African journal of Microbiology Research**, 8(24), 2397–2404. doi:10.5897/ajmr2014.6738
- Danmek K, Ruenwai R, Sorachakula C, Jung C, Chuttong B. (2022). Occurrence of an invertase producing strain of *Aspergillus niger* LP5 isolated from longan pollen and its application in longan syrup production to feed honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Ecology and Environment**, 46(13). <https://doi.org/10.5141/jee.22.002>
- Eurolab Laboratory Services. (ม.ป.ป.). การวิเคราะห์ HMF Hydroxymethylfurfural HMF. Eurolab Laboratory Services. สืบค้นเมื่อ 11 กุมภาพันธ์ 2565, จาก <https://www.eurolab.com.tr/th/sektorel-test-ve-analizler/gida-testleri/hmf-hidroksmetilfurfural-analizi>
- Ferranti, L. de S., Fungaro, M. H. P., Massi, F. P., Silva, J. J. da, Penha, R. E. S., Frisvad, J. C., ... and Iamanaka, B. T. (2018). Diversity of *Aspergillus* section *Nigri* on the surface of *Vitis labrusca* and its hybrid grapes. **International Journal of Food Microbiology**, 268, 53–60. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.027
- Fiedurek, J., Pielecki, J. and Skowronek, M. (2000). Direct methods for selecting mutants with increased production of invertase from mutagenised cultures of *Aspergillus fumigatus*. **Journal Basic of Microbiology**, 40, 111–118. [doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4028\(200005\)40:2%3C111::AID-JOBM111%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4028(200005)40:2%3C111::AID-JOBM111%3E3.0.CO;2-B)

- Frandsberg, E., Pitt, J. and Olsena, M. (2003). Quality control of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* agar and comparison with dichloran 18% glycerol agar: a collaborative study. **International Journal of Food Microbiology**, 89, 99–102.
doi:10.1016/s0168-1605(03)00293-9
- Garlapati, V. K., Maheswarl, N. and Gupta, A. (2015). Isolation and Screening of Fungal Isolates for Multienzyme Production Through Submerged and Solid State Fermentations. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, 5(8),
doi.org/10.4172/2155-9821.1000249
- González-Salgado, A., Patiño, B., Vázquez, C. and González-Jaén, M. T. (2005). Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. **FEMS Microbiology Letters**, 245(2), 353–361.
doi:10.1016/j.femsle.2005.03.023
- Gracida-Rodríguez, J., Favela-Torres, E., Prado-Barragán, A., Huerta-Ochoa, S. and Saucedo-Castañeda, G. (2006). Invertases. **Enzyme Technology**, 449–463.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-35141-4_23
- Guimaraes, L.H.S, Terenzih, F., Polizeli, M.L.T., Jorge, J.A. 2007. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agro-industrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, 42(1), 52–57.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.07.021>
- Harman, A. (February 17, 2017). SUGAR FOR BEES. Bee Culture Bee The Magazine of American Beekeeping. Retrieved November 29, 2022, from
<https://www.beeculture.com/sugarforbees/#:~:text=Beekeepers%20make%20invert%20sugar%2C%20called,juice%20or%20cream%20of%20tartar.>
- Hasan, A., Qazi, J. I., Tabssum, F., and Hussain, A. (2022). Feeding probiotics and organic acids to honeybees enhances acinal surface area of their hypopharyngeal glands. **Research in veterinary science**. 149, 47–50.
- Helm, B. R., Slater, G. P., Rajamohan, A., Yocum, G. D., Greenlee, K. J., and Bowsher, J. H. (2017). The geometric framework for nutrition reveals interactions between protein

- and carbohydrate during larval growth in honey bees. **Biology open**, 6(6), 872–880. <https://doi.org/10.1242/bio.022582>
- Herbert, E. W. and Shimanuki, H. (1978). Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. **Apidologie**, 9(1), 33–40.
doi:10.1051/apido:19780103
- Hsu, C.-K., Wang, D.-Y., & Wu, M.-C. (2021). A Potential Fungal Probiotic *Aureobasidium melanogenum* CK-CsC for the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. **Journal of Fungi**, 7(7): 508. <https://doi.org/10.3390/jof7070508>
- Huang, Z. (2010). Honey bee nutrition. **American Bee Journal**, 150(8), 773–776.
- Jachimowicz, T. and El Sherbing G. (1975). Zur Problematik der Verwendung von Invertzucker für die Bienenfütterung. **Apidologie**, 6(2), 121–143.
doi:10.1051/apido:19750203
- Jang, H., Ghosh, S., Sun, S., Cheon, K. J., Mohamadzade Namin, S., & Jung, C. (2022). Chlorella-supplemented diet improves the health of honey bee (*Apis mellifera*). **Frontiers in Ecology and Evolution**. 10:922741.
<https://doi.org/10.3389/fevo.2022.922741>
- Johnson, L. F., & Curl, E. A. (1972). Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens. (pp. 247). United States: Minneapolis: Burgess Publishing Company
<https://doi.org/10.2136/sssaj1972.03615995003600040002x>
- Kashif, A., Valeem, E.E., Qamar, U.H. 2015. Biosynthesis, purification and characterization of commercial enzyme by *Penicillium expansum* LINK. **Pak J Bot**, 47(4), 1521–1526.
- Kelly, A., and Stanley, C. A. (2001). Disorders of glutamate metabolism. **Mental retardation and developmental disabilities research reviews**, 7(4), 287–295.
<https://doi.org/10.1002/mrdd.1040>
- Klich, M. A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands: CBS
- Krainer, S., Brodschneider, R., Vollmann, J., Crailsheim, K. and Riessberger-Gallé, U. (2016). Effect of hydroxymethylfurfural (HMF) on mortality of artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). **Ecotoxicology**, 25(2), 320–328.
doi:10.1007/s10646-015-1590-x

- Kulshrestha, S., Tyagi, P., Sindhi, V. and Yadavilli, K. S. (2013). Invertase and its applications – A brief review. **Journal of Pharmacy Research**, 7(9), 792–797.
doi:10.1016/j.jopr.2013.07.014
- LeBlanc, B. W., Eggleston, G., Sammataro, D., Cornett, C., Dufault, R., Deeby, T. and Cyr, St. E. (2009). Formation of Hydroxymethylfurfural in Domestic High-Fructose Corn Syrup and Its Toxicity to the Honey Bee (*Apis mellifera*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(16), 7369–7376. doi:10.1021/jf9014526
- Mahesh, P., Bhamre, R., Patil, U. 2012. Invertase production from *Aspergillus* spp M1 isolated from honeycomb. Int. **J Appl. Biores.** 4, 1–5.
- Mamma, D., Kourtoglou, E., and Christakopoulos, P. (2008). Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, 99(7), 2373–2383. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.018
- Miller, G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Journal of Analytical Chemistry**, 31, 426–428.
<http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mobini-Dehkordi, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Ghaedi, K., Tavassoli, M. and Akada, R. (2008). Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 105(4), 403–408.
doi:10.1263/jbb.105.403
- Nascimento, G. C. do, Batista, R. D., Santos, C. C. A. do A., Silva, E. M. da, de Paula, F. C., Mendes, D. B., ... and Almeida, A. F. de. (2019). β -Fructofuranosidase and β -D-Fructosyltransferase from New *Aspergillus carbonarius* PC-4 Strain Isolated from Canned Peach Syrup: Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Enzyme Production. **The Scientific World Journal**, 2019, 1–13. doi:10.1155/2019/6956202
- Nadeem, H., Rashid, M. H., Riaz, M., Asma, B., Javed, M. R., & Perveen, R. (2009). Invertase from hyper producer strain of *Aspergillus niger*: Physiochemical properties, thermodynamics and active site residues heat of ionization. **Protein and Peptide Letters**, 16(9), 1098–1105. <https://doi.org/10.2174/092986609789055322>

- Neumann, N. P. and Lampen, J. O. (1967). Purification and Properties of Yeast Invertase. **Biochemistry**, 6(2), 468–475. doi:10.1021/bi00854a015
- Niu, G., Johnson, R. M., & Berenbaum, M. R. (2011). Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. **Apidologie**, 42(1), 79–87.
- Omar, E., Abd-Ella, A. A., Khodairy, M. M., Moosbeckhofer, R., Crailsheim, K., & Brodschneider, R. (2017). Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, 48, 425–436.
- Oyediji, O., Bakare, M. K., Adewale, I. O., Olutiola, P. O., and Omoboye, O. O. (2017). Optimized production and characterization of thermostable invertase from *Aspergillus niger* IBK1, using pineapple peel as alternate substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 9, 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.01.001>
- Rejeki, D. S., Aminin, A. L. N., Suzery, M. (2018). Preliminary Study of Hyptis pectinate (L.) Poit Extract Biotransformation by *Aspergillus niger*. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, 349. doi:10.1088/1757-899X/349/1/012004
- Sabu, A., Shegal Kiran, G., & Pandey, A. (2005). Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620. **Food Technology and Biotechnology**, 43(2), 133–138.
- Schmuck R. (2004). Effects of a chronic dietary exposure of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to imidacloprid. **Archives of environmental contamination and toxicology**, 47(4), 471–478. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-3057-6>
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. and Dijck, P. W. M. V. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, 59(4–5), 426–435. doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6

- Shankar, T., Thangamathi, P., Rama, R., Sivakumar, T. 2013. Optimization of invertase production using *Saccharomyces cerevisiae* MK under varying cultural conditions. **International Journal of Biochemistry and Biophysics**, 1(3), 47–56.
<http://dx.doi.org/10.13189/ijbb.2013.010301>
- Shapla, U. M., Solayman, M., Alam, N., Khalil, M. I. and Gan, S. H. (2018). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. **Chemistry Central Journal**, 12(1), 35. doi:10.1186/s13065-018-0408-3
- Siddiqi A. and Amin G. (2022). Invertase enzyme. **International Journal of Advanced Biochemistry Research**, 6(2), 120–126.
<https://doi.org/10.33545/26174693.2022.v6.i2b.148>
- Silva, D. M., Batista, L. R., Rezende, E. F., Fungaro, M. H., Sartori, D., and Alves, E. (2011). Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 42(2), 761–773.
<https://doi.org/10.1590/S1517-838220110002000044>
- Soares, I., Tavora, Z., Barcelos, R. P. and Baroni, S. (2012). Microorganism–Produced Enzymes in the Food Industry. **Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry**, 89. doi:10.5772/31256
- Uma, C., Gomathi, D., Muthulakshmi, C., Gopalakrishnan, V.K. 2010. Production, purification and characterization of invertase by *Aspergillus flavus* using fruit peel waste as substrate. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 4(1), 31–36.
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60282-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60282-2)
- Varga, J., Kocsube, S., Toth, B., Frisvad, J. C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M. and Samson, R. A. (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biserial black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57(8), 1925–1932. doi:10.1099/ijs.0.65021-0
- Vesth, T. C., Nybo, J. L., Theobald, S., Frisvad, J. C., Larsen, T. O., Nielsen, K. F., et al. (2018). Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing

of *Aspergillus* section *Nigri*. **Nature Genetics**, 50, 1688–1695.

<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0246-1>

Zhang, Y., Jiao, R., Lu, Y., and Yao, L. (2016). Improvement of chaetominine production by tryptophan feeding and medium optimization in submerged fermentation of *Aspergillus fumigatus* CY018. **Bioresources and Bioprocessing**, 3(1).

doi:10.1186/s40643-016-0117-5 .





ภาคผนวก ก เอกสารประกอบงานวิจัย

1. ใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์



ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ประสงค์สม และสุกฤตา, 2560)

- มันฝรั่ง 20 %
- กลูโคส 2 %
- Agar 2 %
- pH 5.5 – 6.00

ล้างมันฝรั่งให้สะอาดแล้วหั่นให้มีขนาดเท่า ๆ กัน นำไปต้มในน้ำกลั่นจนมันฝรั่งสุก กรองเอามันฝรั่งทิ้ง นำน้ำมันฝรั่งที่ได้ไปทำอาหารเลี้ยงเชื้อโดยผสมกับกลูโคส ปรับปริมาตรและค่า pH ให้อยู่ระหว่าง 5.5 – 6.00 เติมน้ำจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหาร *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA) (Frandsberg, et al., 2003)

- Yeast extract 2 %
- Peptone 1 %
- Ferric ammonium citrate 0.05 %
- Dichloran 0.0002 %
- Agar 2 %
- pH 5.5–6.0

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรและค่า pH ให้อยู่ระหว่าง 5.5 – 6.00 เติมน้ำจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหาร Semisynthetic Medium (SS medium) (Danmek, et al., 2014)

- Yeast extract 0.1 %
- Peptone 0.2 %
- Potassium dihydrogen 0.2 %
- Magnesium sulfate 0.05 %
- Manganese sulfate 0.05 %
- Zinc chloride 0.05 %
- Ferrous sulphate 0.05 %
- Calcium 0.01 %
- Sucrose 2.0 %

- Agar 2.0 %
- Bromothymol Blue
- pH 5.5 – 6.00

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรและค่า pH ให้อยู่ระหว่าง 5.5 – 6.00 เติมผงวุ้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใส่ Bromothymol Blue จำนวนเล็กน้อยแล้วเขย่าให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว

4. สูตรอาหาร Invertase Production medium (IP medium) (ดัดแปลงสูตรจาก

SS medium ของ Danmek, et al., 2014)

- Sucrose 1.0 %
- Ammonium sulfate 0.3 %
- Tween 80 0.2 %
- Potassium dihydrogenphosphate 0.2 %
- Magnesium sulfate 0.05 %
- Calcium chloride 0.01 %
- Ferrous sulfate 0.005 %
- Manganese sulfate 0.005 %
- Zinc sulfate 0.005 %
- pH 7

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรและค่า pH ให้อยู่ระหว่าง 5.5 – 6.00 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค การเตรียมสารละลายและการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. การเตรียมสารที่ใช้ทดสอบหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic method (DNS method) (Miller, 1959)

การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid reagent (DNS) (Miller, 1959)

- 3,5 Dinitrosalicylic acid	10.6	กรัม
- Sodium hydroxide	19.8	กรัม
- Sodium potassium tartrate	306.0	กรัม
- Sodium meta-bisulfite	8.3	กรัม
- Phenol	7.6	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	1,416.0	มิลลิลิตร

ละลายสารแต่ละตัว คือ 3,5 Dinitrosalicylic acid, Sodium hydroxide, Sodium potassium tartrate และ Sodium meta-bisulfite ลงในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร แบบแยกปีกเกอร์ (สาร 1 ตัว/ปีกเกอร์) คนจนละลาย แล้วนำสารละลายแต่ละชนิดมาเทรวมกัน จากนั้นละลาย Phenol ด้วย Hot plate ในตู้ดูดควัน (Laminar Air Flow) แล้วดูดสารละลาย Phenol ปริมาตร 7.6 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมที่เตรียมไว้และคนให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นอีก 416.0 มิลลิลิตร เสร็จแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมสารละลาย Sodium citrate bufler

- Sodium citrate	2.117 %
- Citric acid	0.588 %
- น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร
- pH	5.5 – 6.0

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.5 – 6.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายซูโครสซับสเตรท (Sucrose Substrate)

ละลาย Sucrose 1% ในสารละลาย Sodium citrate bufler แล้วปรับปริมาตรจนครบมิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลาย Normal saline (NaCl 0.85 %)

- Sodium chloride	0.85 %
- Tween 80	0.2 %

ละลาย Sodium chloride ในน้ำกลั่น คนจนละลาย แล้วเติม Tween 80 และปรับ
ปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ง

การคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์และกราฟมาตรฐาน

1. การทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

1. เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ละลายใน Sodium citrate bufler ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่า pH ในช่วง 5.5 – 6.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร โดยมีน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.00 0.10 0.20 0.30 0.40 0.50 0.60 0.70 0.80 0.90 และ 1.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. ใช้ข้อโต้ปิเปตดูดสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

3. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอดแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที

4. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลอด เขย่าสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (Vertex mixer) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุม (Control) ให้ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่บันทึกได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า Unit of enzyme

โดย 1 หน่วย (Unit) ของเอนไซม์อินเวอร์เทส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์อินเวอร์เทสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นซูโครสให้กลายเป็นน้ำตาลอินเวิร์ต (กลูโคสและฟรุกโทส) จำนวน 1 ไมโครโมล (μmol) ต่อ 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณค่า Unit of Enzyme ตามวิธีของ The International Union of Biochemistry (IUB)

1. การคำนวณกิจกรรมของอินเวอร์เทส (Total Invertase)

1 หน่วยของเอนไซม์ (U) = ปริมาณเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เร่งปฏิกิริยา
การเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นซูโครส
1 ไมโครโมล (μmol) ไปเป็นน้ำตาลรีดิคซ์ใน
1 นาที

= ปริมาณของน้ำตาลซูโครส 1 μmol ที่เกิดขึ้น
ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

= น้ำตาลกลูโคส 0.180 mg ที่เกิดขึ้นภายใน 1
นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

น้ำตาลกลูโคส 0.180 mg = 1 μmol

น้ำตาลกลูโคส A mg = $(1 \times A) / 0.180 \mu\text{mol}$

= $A \times 5.556 \mu\text{mol}$

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส $A \times 5.556 \mu\text{mol}$ เกิดขึ้นภายใน 60 นาที

ดังนั้น 60 นาที มีน้ำตาลกลูโคส = $A \times 5.556 \mu\text{mol}$

1 นาที มีน้ำตาลกลูโคส = $[1 \times (A \times 5.556)] / 60 \mu\text{mol/นาที}$

= $A \times 0.093 \mu\text{mol/นาที}$

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส $A \times 0.185 \mu\text{mol/นาที}$ เกิดจากการใช้เอนไซม์ 0.5 ml

ดังนั้น ใช้เอนไซม์ 0.5 ml มีน้ำตาลกลูโคส = $A \times 0.093 \mu\text{mol} / \text{นาที}$

ใช้เอนไซม์ 1.0 ml มีน้ำตาลกลูโคส = $[1 \times (A \times 0.093)] / 0.5 \mu\text{mol/นาที/ml}$

= $A \times 0.186 \mu\text{mol นาที/ml}$

= $A \times 0.186 \text{ U/ml}$

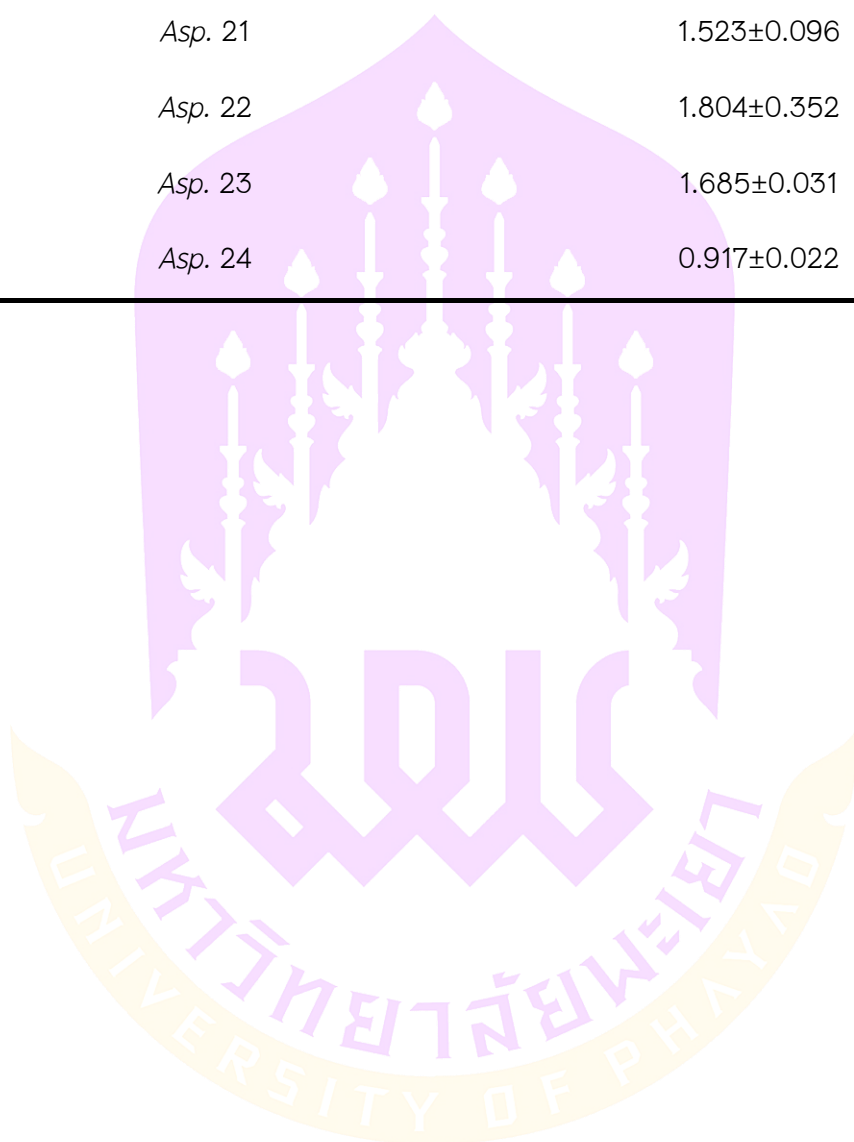
ภาคผนวก จ ผลการทดลอง

ตาราง 16 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้

Isolate	Unit of Enzyme (U/ml)
Asp. 1	1.982±0.450
Asp. 2	1.499±0.127
Asp. 3	1.762±0.225
Asp. 4	1.737±0.035
Asp. 5	2.077±0.005
Asp. 6	1.501±0.030
Asp. 7	1.481±0.060
Asp. 8	1.593±0.015
Asp. 9	1.401±0.005
Asp. 10	1.538±0.005
Asp. 11	1.263±0.075
Asp. 12	1.680±0.179
Asp. 13	2.028±0.133
Asp. 14	2.583±0.023
Asp. 15	2.425±0.137
Asp. 16	2.059±0.044
Asp. 17	1.849±0.126
Asp. 18	1.394±0.550
Asp. 19	2.559±0.185

ตาราง 16 (ต่อ)

Isolate	Unit of Enzyme (U/ml)
<i>Asp. 20</i>	1.539±0.047
<i>Asp. 21</i>	1.523±0.096
<i>Asp. 22</i>	1.804±0.352
<i>Asp. 23</i>	1.685±0.031
<i>Asp. 24</i>	0.917±0.022



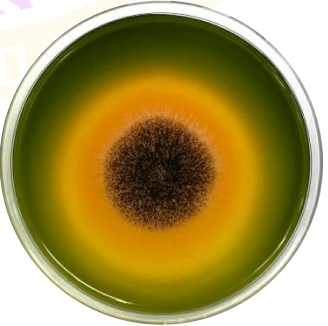
ตาราง 17 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri* ไอโซเลท 5 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผึ่งพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์

Isolate	<i>Aspergillus</i> spp. 5
PDA	
AFPA	
SS medium	
SS medium + Bromothymol Blue	

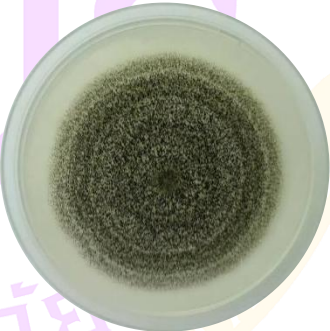
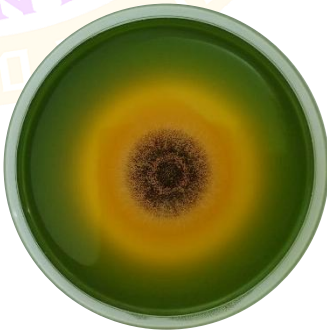
ตาราง 18 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri* ไอโซเลท 14 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผิ้วพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์

Isolate	<i>Aspergillus</i> spp. 14
PDA	
AFPA	
SS medium	
SS medium + Bromothymol Blue	

ตาราง 19 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri* ไอโซเลท 15 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผึ่งพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์

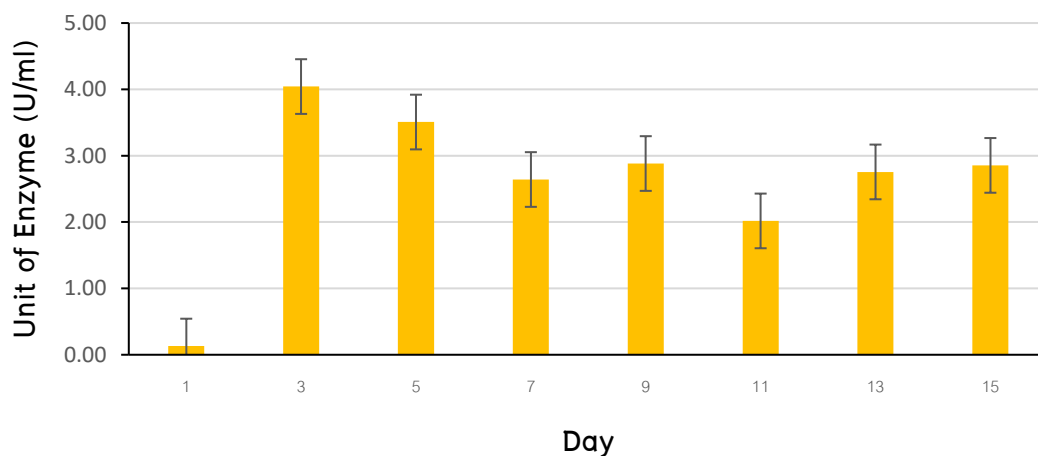
Isolate	<i>Aspergillus</i> spp. 15
PDA	
AFPA	
SS medium	
SS medium + Bromothymol Blue	

ตาราง 20 ลักษณะของเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri* ไอโซเลท 19 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผิ้วพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์

Isolate	<i>Aspergillus</i> spp. 19
PDA	
AFPA	
SS medium	
SS medium + Bromothymol Blue	

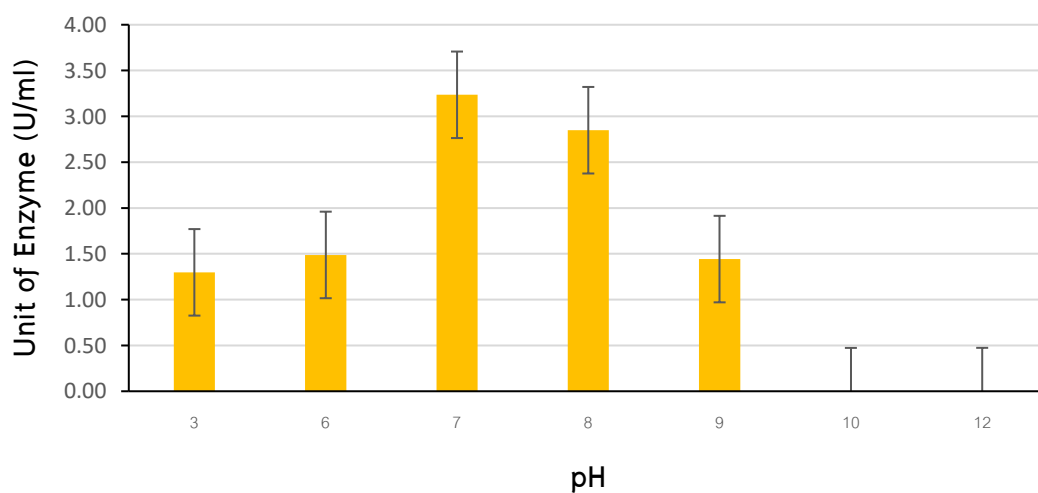
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

1. การศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส



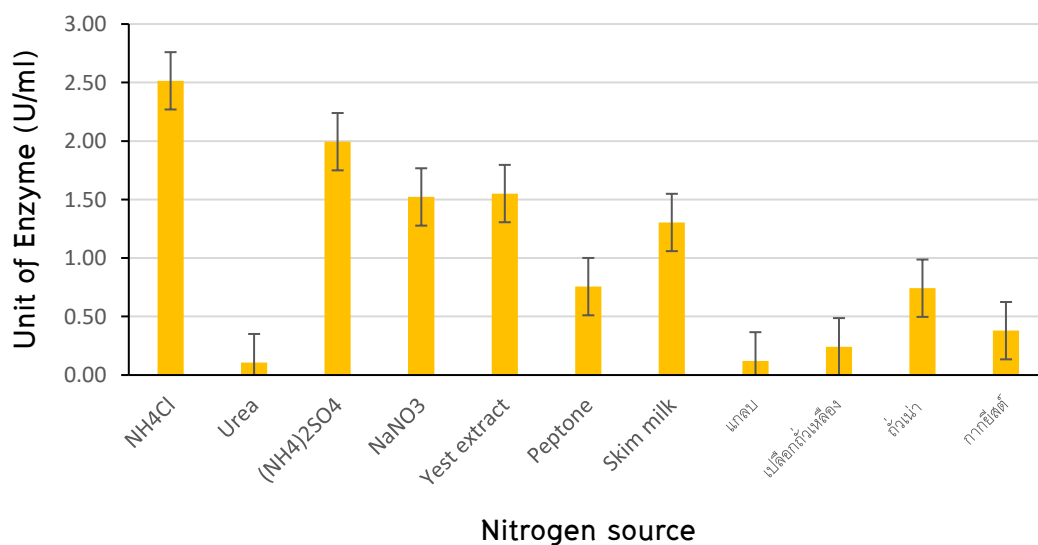
ภาพ 16 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Invertase production medium เป็นระยะเวลาต่างกัน

2. การศึกษาความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส



ภาพ 17 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Invertase production medium ที่ pH แตกต่างกัน

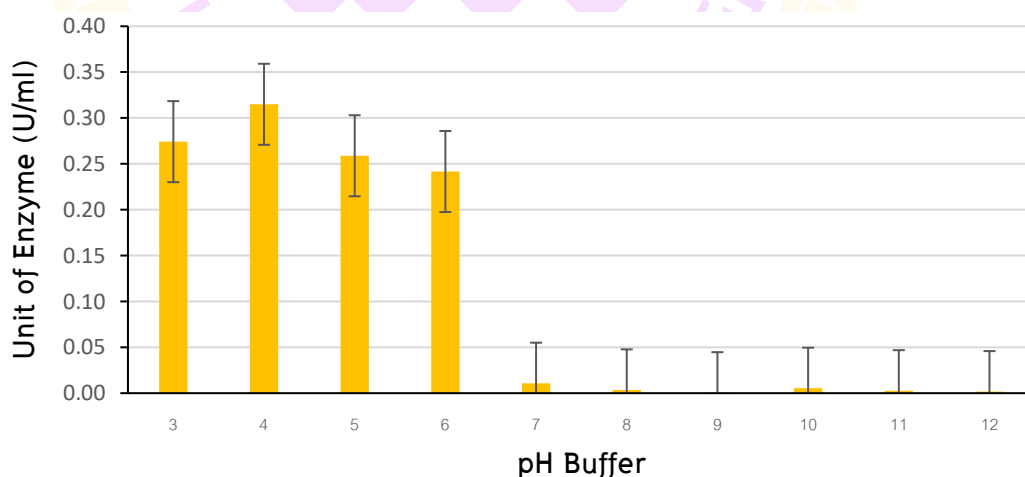
3. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส



ภาพ 18 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Invertase production medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน

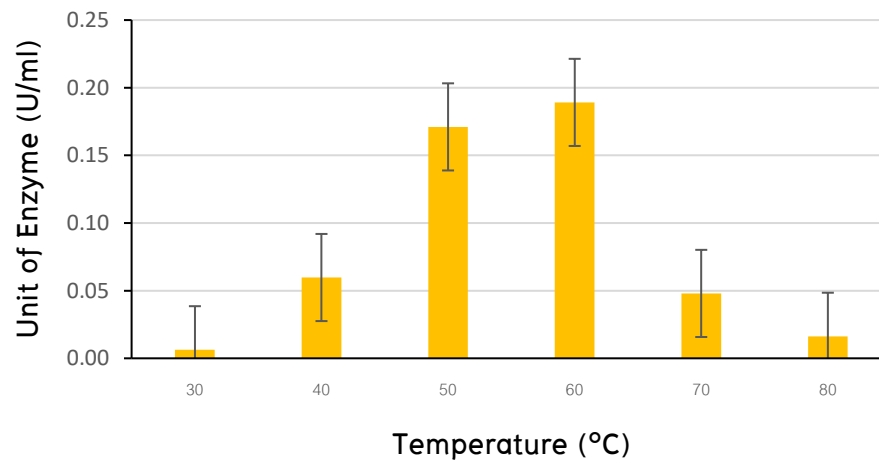
การศึกษาลักษณะคุณสมบัติของเอนไซม์อินเวอร์เทส

1. การศึกษาความเป็นกรด-เบสของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทดสอบเอนไซม์อินเวอร์เทส (pH Buffer)



ภาพ 19 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH) ในการทดสอบแตกต่างกัน

2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทดสอบเอนไซม์อินเวอร์เทส



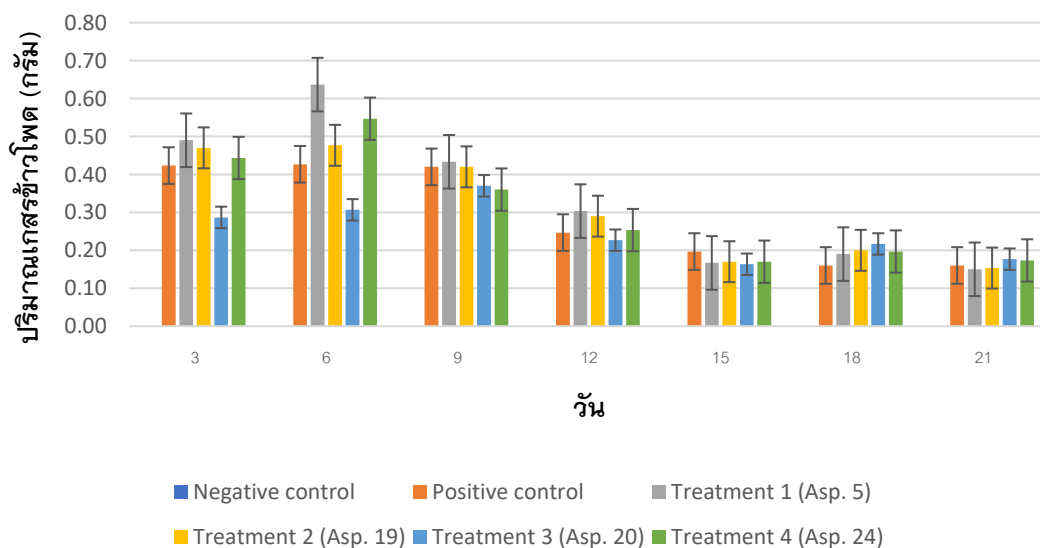
ภาพ 20 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ใช้อุณหภูมิในการทดสอบ แตกต่างกัน

การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเสริมต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของผึ้งพันธุ์

1. การศึกษาอัตราการกินอาหารเสริมของผึ้งพันธุ์

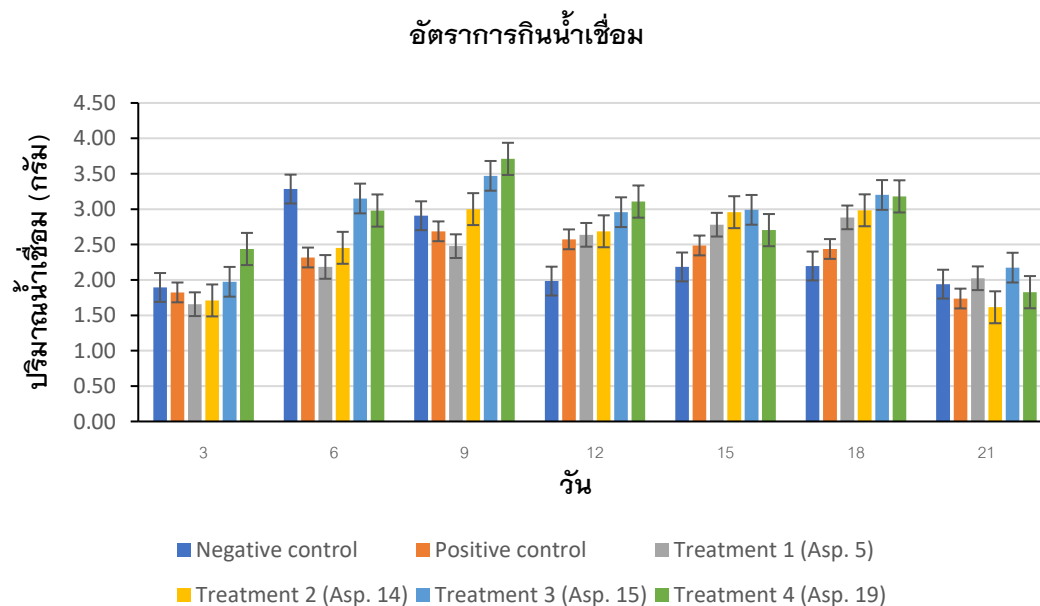
1.1 เกสรผึ้งดอกข้าวโพด (แหล่งโปรตีน)

อัตราการกินเกสรข้าวโพด



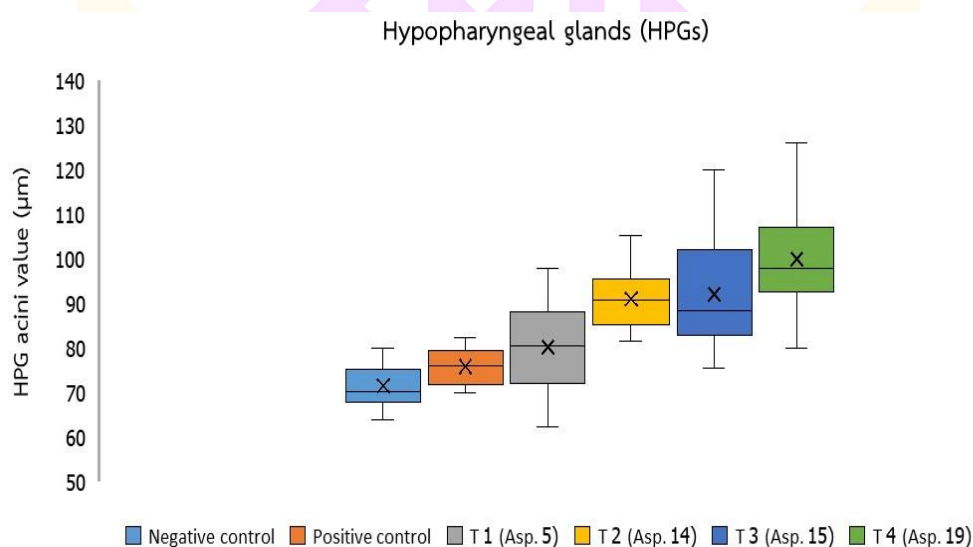
ภาพ 21 แสดงอัตราการกินอาหารเกสรดอกข้าวโพดของผึ้งพันธุ์ในระยะเวลา 21 วัน

1.2 น้ำเชื่อม (แหล่งคาร์โบไฮเดรต)



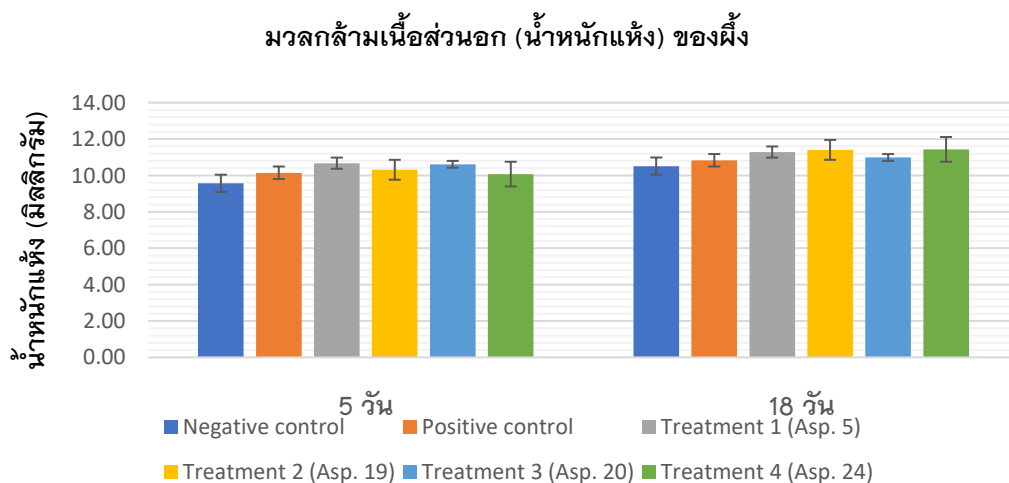
ภาพ 22 แสดงอัตราการกินน้ำเชื่อมของผึ้งพันธุ์ในระยะเวลา 21 วัน

2. การศึกษาผลของอาหารเสริมต่อการพัฒนาต่อม Hypopharyngeal gland (HPG)



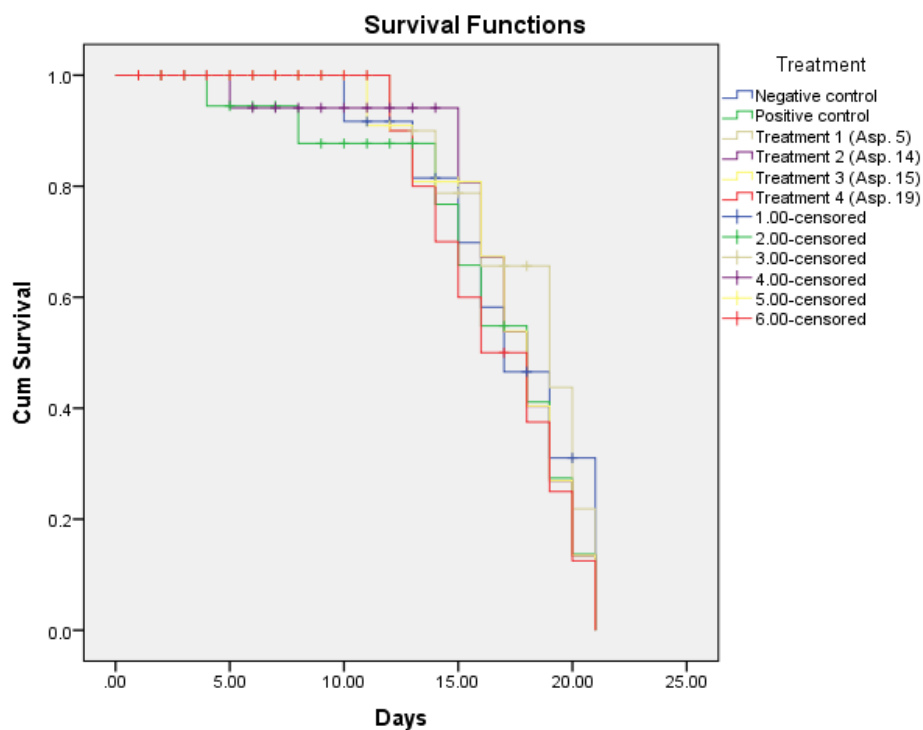
ภาพ 23 กราฟแสดงขนาด HPGs ของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารต่างกันเป็นเวลา 7 วัน

3. การศึกษาผลของอาหารเสริมต่อการพัฒนามวลกล้ามเนื้อส่วนนอกของผึ้งพันธุ์



ภาพ 24 กราฟเปรียบเทียบน้ำหนักอกแห้งของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารต่างกัน

4. การศึกษาผลของอาหารเสริมต่ออายุขัยของผึ้งพันธุ์



ภาพ 25 อายุขัยของผึ้งพันธุ์ในกล่องทดลองที่ได้รับเกสรข้าวโพดและน้ำเชื่อมต่างชนิด เป็นเวลา 21 วัน (Kaplan–Meier)

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	น.ส. อริสรา มณีกลัด
วัน เดือน ปี เกิด	11 กันยายน 2540
สถานที่เกิด	กรุงเทพ ฯ
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2562 วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ที่อยู่ปัจจุบัน	78/7 ซอยหนองบัว ถนนเกษราภิบาลดินทร์ ตำบลท่าอิฐ อำเภอเมือง อุตรดิตถ์ จังหวัดอุตรดิตถ์ 53000
ผลงานตีพิมพ์	อริสรา มณีกลัด ศุภคม คล้ายไอนด พิเชษฐ์ ประภาวิสัย ธันย์ชนก เอื้อ อาจิน บาจริย์ ฉัตรทอง และขรรค์ชัย ตันเมฆ. (7 มีนาคม 2568). การ ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสจากเชื้อรา <i>Aspergillus section Nigri</i> เพื่อใช้ เตรียมน้ำเชื่อมอินเวิร์ตสำหรับเป็นอาหารเสริมเลี้ยงผึ้งพันธุ์. การ ประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 4 (หน้า 737-749), มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.

