

การศึกษาคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากไผ่พื้นเมือง ที่สร้างกลุ่มเอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์

Survey Study of Endophytic Fungi from Native Thai Bamboo for Polysaccharide Hydrolyzing Enzymes Production

Key word : endophytic fungi, enzymes, bamboo

นิตยา บุญทิม* และ สายสมร ล้ายอง**

* วทม.(ชีววิทยาศาสตร์ภาวะแวดล้อม) มหาวิทยาลัยมหิดล

นักวิจัยชำนาญการ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** วทด. (จุลชีววิทยาประยุกต์) มหาวิทยาลัยสอกโกโด ประเทศญี่ปุ่น

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Nitaya Boontim* and Saisamorm Lumyong**

* Institute for Science and Technology Research and Development , Chiang Mai University

** Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

Abstract

Various kinds of endophytic fungi such as *Hyphomycetes*, *Coelomycetes*, *Mycelia sterilia*, *Phoma* sp., *Phomopsis*, sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Xylaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp. were found in 8 kinds of native Thai bamboo species in Chiang Mai. A total of 71 isolates of these fungi were examined for polysaccharide hydrolyzing enzymes using gel diffusion assay. The result was showed that 51, 44, 37 and 22 isolates could produce cellulase, mannanase, xylanase and inulinase enzymes respectively. This result can point out that the fungi from native Thai bamboo is interesting source in term of studying polysaccharide hydrolyzing enzymes production.

บทคัดย่อ

ผลการทดลอง พบว่ามีเชื้อราจำนวนหลายชนิด เช่น *Hyphomycetes*, *Coelomycetes*, *Mycelia sterilia*, *Phoma* sp., *Phomopsis*, sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Xylaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp. ในไผ่พื้นเมืองของไทย จำนวน 8 ชนิด ในจังหวัดเชียงใหม่ เมื่อนำเชื้อราทั้งหมด จำนวน 71 ไอโซเลต มาทดสอบ

การสร้าง polysaccharide hydrolyzing enzymes ด้วยวิธี gel diffusion assay พบว่า เชื้อรา จำนวน 51, 44, 37 และ 22 ไอโซเลต สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase, mannanase, xylanase และ inulinase ตามลำดับ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า เชื้อราจากไผ่เป็นเชื้อราที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์

คำนำ

เชื้อราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช เชื้อราในกลุ่มนี้ สามารถผลิตสารที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะและเอนไซม์ซึ่งมีความสำคัญต่อวงการอุตสาหกรรม เนื่องจากเชื้อราสามารถเจริญในพืชซึ่งเป็นแหล่งของโพลีแซคคาไรด์ เช่น เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เช่น ไซเลน จึงมีแนวโน้มที่เชื้อราดังกล่าวจะสามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ ได้ เมื่อโพลีแซคคาไรด์ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ก็จะได้ไตรแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์หรือโมโนแซคคาไรด์ เอนไซม์ที่ย่อยโพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ cellulase, mannanase, inulinase และ xylanase ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์เหล่านี้มาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหารและยา (Vandamme และคณะ, 1983; Kobayashi และคณะ, 1983; Sasaki และคณะ, 1983)

ในการวิจัยครั้งนี้ได้แยกเชื้อราจากไผ่พื้นเมืองจำนวน 8 ชนิดในจังหวัดเชียงใหม่ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase, inulinase, mannanase และ xylanase เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อราจากต้นไผ่

เก็บตัวอย่างของไผ่ในจังหวัดเชียงใหม่ นำมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวดานนอกด้วยวิธี triple surface sterilization ตัดและนำชิ้นส่วนของพืชมาวางบนอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 300 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำเชื้อรามาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 2 ช้ำ เก็บเชื้อราแต่ละไอโซเลตไว้ในอาหารแข็ง PDA

2. การจำแนกชนิดของเชื้อรา

สังเกตลักษณะการเจริญบนอาหาร PDA และ corn malt agar ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจลักษณะของโครงสร้างสปอร์ (spore) เปรียบเทียบลักษณะต่างๆ เพื่อบ่งบอกชนิดของเชื้อราในระดับ genus (Von Arx, 1981; Barnnett และ Hunter, 1987; Sutton, 1980)

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา

นำเชื้อรามาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal medium ซึ่งมี 1% (w/v) ของโพลีแซคคาไรด์ที่แตกต่างกัน จำนวน 4 ชนิด คือ CM-cellulose, inulin, locust bean gum และ xylan นำมาเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวา ในอุณหภูมิห้องโดยใช้ความเร็ว เท่ากับ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

4. การทดสอบการสร้าง polysaccharide hydrolyzing enzymes

การทดสอบการย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ ใช้วิธี gel diffusion assay (Downie และคณะ, 1994) โดยนำเอนไซม์จากเชื้อราในข้อ 3 มาปั่นโดยใช้ความเร็วรอบ เท่ากับ 6000 รอบ เป็นเวลา 20 นาที เพื่อนำส่วนใส (supernatant) ปริมาตร เท่ากับ 10 ไมโครลิตร มาหยอดลงในหลุมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตรของ phyta gel plate 0.7 % (w/v) ซึ่งมี 0.1 % (w/v) ของโพลีแซคคาไรด์สำหรับทดสอบเอนไซม์แต่ละชนิด คือ CM-cellulose, inulin, locust bean gum และ xylan นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C ในที่มืด เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ย้อมด้วยสี congo red 0.1 % (w/v) และล้างด้วย 1 M NaCl จนกว่าจะเห็นวงใสชัดเจน หลังจากนั้นวัดขนาดของวงใส (clear zone) และบันทึกผลการทดลอง

ผลการทดลอง

ผลจากการแยกเชื้อราจากไม้ จำนวน 8 ชนิด สามารถพบเชื้อรา ดังต่อไปนี้ คือ *Aspergillus* sp., *Fusarium* spp., *Phomopsis* spp., *Colletotrichum* spp., *Phoma* spp., *Xylaria* spp., *Pestalotiopsis* spp., เชื้อราใน Class *Hyphomycetes*, Class *Coelomycetes* และ *Mycelia sterilia* จำนวนทั้งหมด 71 ไอโซเลต (รูปที่ 1) ในปี ค.ศ. 1999, Teresita และคณะ รายงานว่า พบเชื้อราพวก *Hyphomycetes*, *Coelomycetes*, *Mycelia sterilia*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis* ในไม้สปีชีส์ *Bambusa tuldoidea* เช่นเดียวกัน เมื่อนำมาทดสอบการสร้าง polysaccharide hydrolyzing enzymes (รูปที่ 2) พบว่า เชื้อราเอนโดไฟต์ สร้างเอนไซม์ cellulase ได้มากที่สุด (ตารางที่ 1) มีจำนวนเท่ากับ 51 ไอโซเลต คิดเป็น 71.8 % ของเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด มีขนาดของวงไฮโดรไลซิส ตั้งแต่ 5 ถึง 21 มิลลิเมตร โดยเชื้อราพวก *Hyphomycetes* ซึ่งแยก

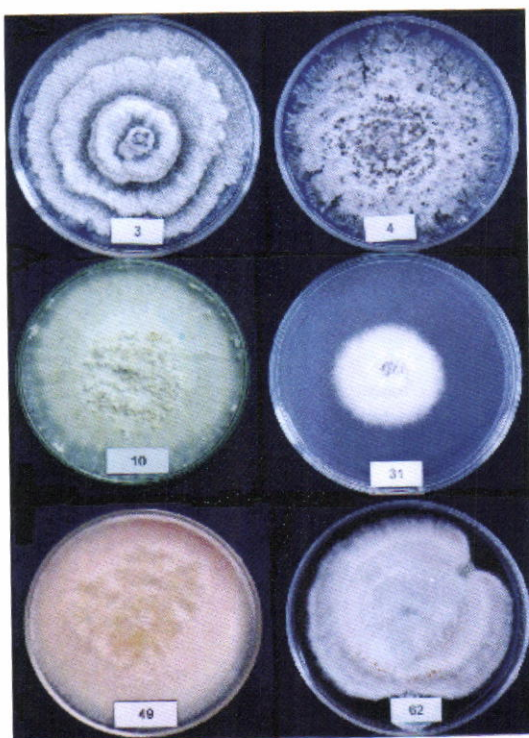
จากไม้ลำสร้างวงไฮโดรไลซิสที่มีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ที่สุด เท่ากับ 21 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่ของวงไฮโดรไลซิสมีขนาดตั้งแต่ 6-15 มิลลิเมตร เชื้อราที่สร้างเอนไซม์ mannase มีจำนวน 44 ไอโซเลต (61.1 %) มีขนาดตั้งแต่ 6 ถึง 35 มิลลิเมตร โดยพบว่าส่วนใหญ่ของวงไฮโดรไลซิสมีขนาดตั้งแต่ 6-15 มิลลิเมตร ทำนองเดียวกันนี้พบว่า เชื้อราในกลุ่มของ *Hyphomycetes* ซึ่งแยกจากไม้บงหนามสร้างวงไฮโดรไลซิสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ 35 มิลลิเมตร เชื้อราที่สร้างเอนไซม์ xylanase ได้ มีจำนวนเท่ากับ 37 ไอโซเลต (54.9%) มีขนาดของวงไฮโดรไลซิส ตั้งแต่ 5 ถึง 25 มิลลิเมตร เชื้อราส่วนใหญ่สร้างวงไฮโดรไลซิสขนาดใหญ่ ตั้งแต่ 5-10 มิลลิเมตร พบว่าเชื้อราพวก *Coelomycetes* ที่แยกจากไม้รวกสร้างวงไฮโดรไลซิสใหญ่ที่สุดเท่ากับ 25 มิลลิเมตร เชื้อราสร้างเอนไซม์ inulinase ได้น้อยที่สุด เท่ากับ 22 ไอโซเลต ซึ่งคิดเป็น 31 % ส่วนใหญ่สร้างวงไฮโดรไลซิสตั้งแต่ 6-10 มิลลิเมตร พบว่า เชื้อราพวก *Hyphomycetes* จากไม้รวกสร้างวงไฮโดรไลซิสใหญ่ที่สุด เท่ากับ 18 มิลลิเมตร

ตารางที่ 1. ความสามารถของเชื้อราในการสร้าง polysaccharide hydrolyzing enzymes

ชนิดของเชื้อรา	ชนิดของไม้	ชนิดของโพลีแซคคาไรด์ ขนาดของวงไฮโดรไลซิส (มิลลิเมตร)			
		CM-cellulose	inulin	locust bean gum	xylan
<i>Hyphomycetes</i>	ไม้หกเครือ	0	5	11	0
<i>Xylaria</i> sp.	ไม้บงหนาม	15	0	0	0
<i>Hyphomycetes</i>	ไม้บงหนาม	15	0	0	11
<i>Xylaria</i> sp.	ไม้บงหนาม	16	0	0	0
<i>Coelomycetes</i>	ไม้รวก	10	0	10	0
<i>Hyphomycetes</i>	ไม้บงหนาม	5	0	0	0
<i>Mycelia sterilia</i>	ไม้บงหนาม	0	0	0	0
<i>Mycelia sterilia</i>	ไม้บงหนาม	11	0	6	0
<i>Hyphomycetes</i>	ไม้ชางคอย	10	0	11	8
<i>Hyphomycetes</i>	ไม้รวก	15	0	0	7

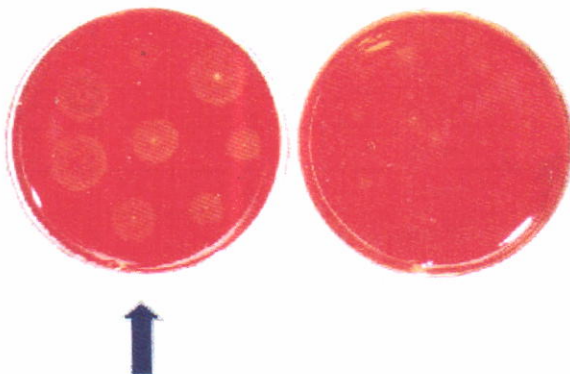
ชนิดของเชื้อรา	ชนิดของไม้	ชนิดของโพลีแซคคาไรด์ ขนาดของวงใส (มิลลิเมตร)			
		CM- cellulose	inulin	locust bean gum	xylan
<i>Aspergillus niger</i>	ไผ่รวก	10	0	12	10
<i>Mycelia sterilia</i>	ไผ่บงหนาม	8	0	0	5
<i>Coelomycetes</i>	ไผ่รวก	8	0	0	0
<i>Coelomycetes</i>	ไผ่รวก	16	0	17	13
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่รวก	18	0	0	7
<i>Fusarium sp.</i>	ไม้หกเครือ	15	0	18	0
<i>Mycelia sterilia</i>	ไผ่บงหนาม	8	0	10	0
<i>Phomopsis sp.</i>	ไผ่บงหนาม	6	0	0	10
<i>Colletotrichum sp.</i>	ไผ่ประดับ	13	0	18	8
<i>Mycelia sterilia</i>	ไผ่บงหนาม	9	0	0	6
<i>Xylaria sp.</i>	ไผ่บงหนาม	0	0	0	0
<i>Colletotrichum sp.</i>	ไผ่บงหนาม	0	0	0	0
<i>Phoma sp.</i>	ไผ่บงหนาม	10	5	0	7
<i>Xylaria sp.</i>	ไผ่รวก	14	10	15	11
<i>Fusarium sp.</i>	ไผ่ประดับ	16	0	10	8
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่บงหนาม	20	0	6	5
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่ดำ	21	0	10	11
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่บงหนาม	0	0	0	10
<i>Coelomycetes</i>	ไผ่ชางดอย	5	0	16	0
<i>Phomopsis sp.</i>	ไผ่รวก	16	9	16	16
<i>Coelomycetes</i>	ไผ่ประดับ	13	0	0	0
<i>Phoma sp.</i>	ไผ่บงหนาม	14	0	0	0
<i>Phoma sp.</i>	ไผ่บงหนาม	14	0	0	0
<i>Xylaria sp.</i>	ไผ่รวก	15	0	10	0
<i>Xylaria sp.</i>	ไผ่บงหนาม	0	0	0	0
<i>Mycelia sterilia</i>	ไผ่บงหนาม	10	0	12	5
<i>Coelomycetes</i>	ไผ่รวก	11	0	14	21
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	ไผ่รวก	12	0	12	13
<i>Coelomycetes</i>	ไผ่บงหนาม	17	0	13	0
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่บงหนาม	0	4	10	0
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่บงหนาม	5	0	35	0

ชนิดของเชื้อรา	ชนิดของไม้	ชนิดของโพลีแซคคาไรด์ ขนาดของวงใส (มิลลิเมตร)			
		CM- cellulose	inulin	locust bean gum	xylan
<i>Phomopsis</i> sp.	ไผ่รวก	15	12	29	15
<i>Coelomycetes</i>	ไผ่รวก	12	5	20	25
<i>Xylaria</i> sp.	ไผ่รวก	12	4	15	15
<i>Coelomycetes</i>	ไผ่บงหนาม	0	0	25	23
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่รวก	12	18	22	12
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่ซาง	7	0	24	20
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่ประดับ	15	16	11	0
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่รวก	8	9	0	10
<i>Hyphomycetes</i>	ไม้หกเครือ	10	0	17	0
<i>Coelomycetes</i>	ไม้หกเครือ	0	6	0	0
<i>Coelomycetes</i>	ไผ่รวก	16	10	10	13
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่รวก	0	0	17	20
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่ประดับ	12	0	27	23
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่บงหนาม	0	0	0	0
<i>Xylaria</i> sp.	ไผ่บงหนาม	0	5	6	7
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่บงหนาม	8	10	0	5
<i>Fusarium</i> sp.	ไผ่ซางดอย	8	0	15	15
<i>Fusarium</i> sp.	ไผ่ประดับ	0	5	0	0
<i>Fusarium</i> sp.	ไผ่ประดับ	9	16	6	0
<i>Mycelia sterilia</i>	ไม้หกเครือ	9	0	15	20
<i>Xylaria</i> sp.	ไผ่รวก	11	0	0	0
<i>Mycelia sterilia</i>	ไผ่รวก	8	0	6	5
<i>Coelomycetes</i>	ไผ่รวก	0	0	10	0
<i>Coelomycetes</i>	ไผ่รวก	0	0	0	0
<i>Mycelia sterilia</i>	ไผ่รวก	0	0	17	0
<i>Hyphomycetes</i>	ไม้หกเครือ	10	6	16	0
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่ประดับ	0	4	0	0
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่ซาง	0	5	8	8
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่ประดับ	0	7	15	0
<i>Hyphomycetes</i>	ไผ่เหลือง	0	8	11	8



รูปที่ 1. เชื้อราที่แยกจากไผ่พื้นเมือง

- | | | |
|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 3 : <i>Phomopsis</i> sp. ; | 4 : <i>Phoma</i> sp. ; | 10 : <i>Xylaria</i> sp. |
| 31 : <i>Hyphomycetes</i> ; | 49 : <i>Fusarium</i> sp. ; | 62 : <i>Mycelia sterilia</i> |



รูปที่ 2. การย่อยสลาย locust bean gum บน phyta gel

วิจารณ์ผล

จะเห็นได้ว่าเชื้อราจากไฟฟืนเมืองนั้นสามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ cellulase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่มีมากในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว รำข้าว แกลบ ขี้เลื่อย โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของกลูโคส ซึ่งสามารถนำมาใช้ผลิตสารอินทรีย์ต่างๆ เช่น เอทานอล หรือ ผลิตภัณฑ์บางอย่าง เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสใช้เป็น ส่วนประกอบของผงซักฟอก มีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อราสามารถสลายเซลลูโลสในธรรมชาติได้ดี (Sasaki และคณะ, 1985) มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์ cellulase จากเชื้อราในกลุ่มต่างๆ เช่น *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Sporotrichum pulverulentum* และ *Telaromyces emersonii* โดยพบว่า *Trichoderma viridae* สามารถผลิตเอนไซม์ cellulase ได้สูงและมีประสิทธิภาพ ส่วนเอนไซม์ xylanase นั้นสามารถย่อยสลายไซแลน ที่เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ของ hemicellulose ให้เป็นน้ำตาลไซโลส ซึ่งสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตแอลกอฮอล์ สารปฏิชีวนะ และอาหารสัตว์ นอกจากนี้มีการนำเอนไซม์ xylanase ไปใช้ในการฟอกเยื่อกระดาษ เอนไซม์ชนิดนี้สามารถสร้างโดยจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ พบว่า เชื้อราที่ผลิต xylanase ได้แก่ *Trichoderma* sp., *Shizophyllum commune* แต่อย่างไรก็ตามเชื้อราที่ใช้ศึกษาส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อราพวก *Trichoderma* sp. เอนไซม์ mananase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย แมนแนน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเมล็ดปาล์ม เอนไซม์ชนิดนี้สามารถนำมาใช้ทดแทนเอนไซม์ cellulase ในการเปลี่ยน โพลีแซคคาไรด์ ให้เป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 12 หรือ 24 ตัว สิ่งที่น่าสนใจมาก คือ น้ำตาลชนิดนี้สามารถใช้ในการเร่งการเจริญของ *Bifidobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สำคัญในลำไส้ของคนและสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น นำไปใช้ช่วยลดความหนืดในการทำกาแฟสำเร็จรูป (Marga และคณะ, 1996) ป้องกันการขุ่นของไวน์องุ่น (Firantas และคณะ, 1982)

ในทางการค่านั้นเอนไซม์ชนิดนี้สามารถเตรียมจากเชื้อราพวก *Aspergillus niger* ส่วนเอนไซม์ inulinase นั้นสามารถย่อยสลาย inulin ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตในราก และหัวของพืชที่เป็นวัชพืชรากในการผลิต fructose syrup นอกจากนี้ยังใช้ในการผลิตเอทานอลเช่นเดียวกัน (Ohta และคณะ, 1993; Nakamura และ Nakatsu, 1988) นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้อีกชนิดหนึ่ง คือ inulo oligosaccharides นั้นเป็น soluble dietary fiber ที่สามารถเพิ่มจำนวน *Bifidobacteria* ในลำไส้มนุษย์

จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อราจากไฟฟืนนั้น สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase, mannanase และ xylanase ได้ดี ส่วนการสร้างเอนไซม์ inulinase นั้นสร้างได้ไม่ดีนัก ข้อดีข้อหนึ่งคือเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราเอนโดไฟต์นั้นมีความจำเพาะค่อนข้างสูง (Sieber และคณะ, 1991) เนื่องจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์จะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ มีเพียงจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูง ดังนั้นเชื้อราในพืช เช่น ฝั่ นั้นนับเป็นแหล่งของเชื้อราแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหายูนิทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูงและมีประสิทธิภาพที่ดีเพื่อสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Barnett, H.L. and B.B. Hunter. 1987. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*: 4th edition. Macmillan Publishing Company. New York. 218 p.
2. Downie, B., Henk, W., Holhorst, M. and J.D. Bewley. 1994. A new assay for quantifying endo-beta-D-mannanase activity using congo red dye. *Phytochemistry*. 36(4):829-835.
3. Firantas, S.G., Venozhinskene, I.Y. and A.B. Paulylonis. 1982. Determination of B-mannanase activity by viscometry and spectrophotometric method. *Microbiology*. 18 (4):461-466.

4. Kobayashi, Y., Echizen, R., Mada, M. and M. Mutai. 1983. Effect of hydrolyzate of Konjac mannan and soybean oligosaccharides on intestinal flora in man and rats., p 69-90. In Mitsuoka, T.(ed), Intestinal flora and dietary factors. Japan Scientific.
5. Marga, F., Ghakis, C., Dopont, C., Morosdi, R. and D. Kluepfel. 1996. Improve production of mannanase by *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbio.* 6 : (12): 4656-4658.
6. Nakamura, T. and S. Nakatsu. 1988. Action and production of inulinase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 35: 121-130.
7. Ohta, K., Hamada, S. and T. Nakamura. 1993. Production of high concentration of ethanol from inulin by simultancous saccharidification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:729-733.
8. Sasaki, H., Kamagata, Y., Takao, S., Matangkasombut, P. and A. Bhumiratana. 1983. Selection and classification of active cellulose decomposing fungi. Microbial Utilization of Renewable Resources. JSPS-NRCT. Seminar on Agro-Industry including Microbial Technology. 2:65-76.
9. Sieber, T.N., Sieber, F., Petrini, O., Ekramaddoullah, A.K.M. and C.E. Dorworth. 1991. Characterization of Canadian and European *Melanconium* from some *Alnus* species by morphological, culture and biochemical studies. *Can. J. Bot.* 69:2170-2176.
10. Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes; Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata*. Commonwealth Mycological Institute. England. 696 p.
11. Teresita, E.U., Tricita, H.Q. and K.D. Hyde. 1999. Endophytic fungi in leaves of *Bambusa tuldoidea*. *Fung. Sci.* 14(1-2): 11-18.
12. Vandamme, E.J. and D.G. Derycke. 1983. Microbial inulinase: fermentation process Properties and application. *Adv. Appl. Microbiol.* 29:139-176.
13. Von Arx, J.A. 1981. *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. J. Cramer. 424 p.