

การทดสอบวัสดุในการเพาะเลี้ยงและกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายของเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* Speg.

Evaluation of cultured media and degrading enzymes of luminescent mushroom, *Neonothopanus nambi* Speg.

วีรวัตร นามานุศาสตร์^{1*} และ วีระศักดิ์ สักดิ์ศิริรัตน์¹

Weravart Namanusart^{1*} and Weerasak Saksirirat¹

บทคัดย่อ: เห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* Speg. เป็นเห็ดที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมสาเหตุโรครากเน่า การศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบการเจริญของเส้นใยเชื้อเห็ดบนวัสดุเพาะจำนวน 4 สูตร พบว่าเห็ดเรืองแสงไอโซเลต PW2 เส้นใยเจริญได้ดีที่สุดในเชื้อเลี้ยงขางพาราผสมแป้งข้าวโพด 10% ขณะที่ไอโซเลต KKKU2 เส้นใยเจริญได้ดีที่สุดในเชื้อเลี้ยงขางพาราผสมแป้งข้าวสาลี 10% การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายที่เห็ดปลดปล่อยออกมาเพื่อย่อยสารอาหาร เพื่อนำไปสู่การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยและดอกของเห็ดเรืองแสง พบว่าเห็ดเรืองแสง ไอโซเลต PW2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase สูงที่สุดคือ เท่ากับ 6.02 $\mu\text{mol-glucose equivalent/mg protein/hr}$ การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ pectinase พบว่าไอโซเลต PW4 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 151.10 $\mu\text{mol-galacturonic acid equivalent/mg protein/hr}$ การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ amylase พบว่าเห็ดเรืองแสงทุกไอโซเลตมีกิจกรรมของเอนไซม์ amylase ก่อนข้างต่ำ ไอโซเลตที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือ PW4 โดยมีค่าเท่ากับ 0.63 $\mu\text{mol-glucose equivalent/mg protein/hr}$ ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ protease ไอโซเลต PW1 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 13.8 $\mu\text{mol-tyrosine equivalent/mg protein/hr}$ การศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงการมีกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายของเห็ดเรืองแสง *N. nambi*

คำสำคัญ: กิจกรรมของเอนไซม์, การเพาะเลี้ยง, สูตรอาหาร, เห็ดเรืองแสง

Abstract: *Neonothopanus nambi* Speg. is a luminescent mushroom that produced bioactive compound that used to biologically control plant disease, especially to control root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* Chitwood). The hyphal growth of *N. nambi* was evaluated by cultivation on four different media of para rubber sawdust. The results showed that sawdust supplemented with 10% corn flour was the most appropriate formula for growth of *N. nambi* isolate PW2, while the sawdust supplemented with 10% wheat flour was the best promoted mycelial growth of fungal isolates KKKU2. Degrading

¹ สาขาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร, ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (AG-BIO/PERDO-CHE) และ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

¹ Plant Pathology Section, Dept. of Plant Science and Agricultural Resources, Center for Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE) and Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: weravart2015@hotmail.com

enzyme activities, cellulose, pectinase, amylase, laccase and protease were also measured using quantitative enzyme assays. Highest cellulolytic activity (6.02 μmol -glucose equivalent/mg protein/hr) from isolate PW2 and highest pectinolytic activity (151.10 μmol -galacturonic acid equivalent/mg protein/hr) were obtained from isolate PW4. On the other hand, highest amylolytic activity (0.63 μmol -glucose equivalent/mg protein/hr.) was achieved from isolate PW4, whereas isolate PW1 expressed highest activity of protease of 13.8 μmol -tyrosine equivalent/mg protein/hr. This study indicates the secretion of degrading enzymes of *N. nambi*

Key words: enzymatic activity, fungi cultivation, growth medium, luminous fungi

บทนำ

Neonothopanus nambi Speg. เป็นเห็ดเรืองแสงที่มีการรายงานในประเทศไทยเป็นครั้งแรกในเขตโลกภูตกา พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี อำเภอยางตลาด จังหวัดขอนแก่น โดย Saksiriat et al. (2003) โดยเห็ดเรืองแสงชนิดนี้เจริญบนรากไม้หรือกิ่งไม้ที่ตายแล้วของไม้ตระกูลเต็งรัง ลักษณะดอกคล้ายเห็ดนางรมแต่จัดเป็นเห็ดพิษ ที่มีกลิ่น คับและดอกมีสีขาว ในที่มีเห็ดชนิดนี้จะเปล่งแสงสีเขียวอมเหลือง ต่อมาได้มีการค้นพบเห็ดที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันกับเห็ดที่พบในเขตโลกภูตกาในเขตมหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งได้มีการศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rRNA gene กับฐานข้อมูล GenBank (สรีระพร, 2550) ปัจจุบันมีการตื่นตัวในการศึกษาประโยชน์ของเห็ดเรืองแสง เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีมาก ในต่างประเทศเช่น Sterner et al. (1997) พบสาร secondary metabolite ที่ได้จาก culture filtrate โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดเรืองแสงในอาหาร yeast malt glucose (YMG) พบว่าเห็ดเรืองแสง *Omphalotus olearius* จะปลดปล่อยสาร omphalotin ซึ่งออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมไส้เดือนรากปม *Meloidogyne incognita* ได้ สำหรับในประเทศไทย สุวิดา (2545) ได้ศึกษาศักยภาพของเส้นใยเห็ดเรืองแสงเบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคพืช

พบว่า เส้นใยของเห็ดเรืองแสงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Pythium* sp., *Rhizotonia solani* และ *Phytophthora palmivora* ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเห็ดเรืองแสง เป็นเห็ดที่น่าสนใจเป็นอย่างมากในการที่จะใช้ประโยชน์จากความเป็นพิษของเห็ดดังกล่าวมาใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยเฉพาะใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคพืชที่มีพืชอาศัยกว้างมากชนิดหนึ่ง ดังนั้นเพื่อให้ได้มาซึ่งเชื้อวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในการทดสอบและการใช้ประโยชน์จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีอยู่ในเห็ดเรืองแสง *N. nambi* จำเป็นอย่างยิ่งที่จะมีการทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย เพื่อการนำไปใช้ผลิตมวลชีวภาพ และศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

วิธีการศึกษา

เชื้อเห็ดเรืองแสงที่ใช้ในการศึกษามี 6 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต PW1, PW2, PW3 และ PW4 แยกได้จากดอกเห็ดจากเขตอุทยานโลกภูตกา อ. ยางตลาด จ. ขอนแก่น และไอโซเลต KKKU1 และ KKKU2 แยกได้จากพื้นที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำเชื้อมาเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30°C เมื่อเชื้อเจริญได้ 4 วัน จึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดส่วนของเส้นใยพร้อมทั้งอาหารเป็นชิ้นวงกลม ย้ายเชื้อที่ได้

ปลูกต่อในเมล็ดข้าวฟ่างหนึ่งฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 20-30 วัน แล้วจึงนำเชื้อที่ปลูกได้มาเพาะเลี้ยงบนซีลีเยอไมยางพาราที่ผสมอาหารเสริมชนิดต่าง ๆ การศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเบื้องต้นได้ทำในเชื้อเห็ด 2 ไอโซเลต คือ KKU2 และ PW2 วัสดุที่ใช้ในการเพาะมี 4 สูตร ซึ่งมีซีลีเยอไมยางพาราเป็นส่วนประกอบหลัก ส่วนประกอบวัสดุที่ใช้เพาะในอัตราส่วนโดยน้ำหนักดังนี้

สูตรที่ 1 ซีลีเยอไมยางพารา 90% + รำละเอียด 10% (Rice Bran) โดยน้ำหนัก เป็นกรรมวิธีควบคุม

สูตรที่ 2 ซีลีเยอไมยางพารา 90% + แป้งข้าวเจ้า 10% (Rice Flour) โดยน้ำหนัก

สูตรที่ 3 ซีลีเยอไมยางพารา 90% + แป้งข้าวโพด 10% (Corn Flour) โดยน้ำหนัก

สูตรที่ 4 ซีลีเยอไมยางพารา 90% + แป้งข้าวสาลี 10% (Wheat Flour) โดยน้ำหนัก

นำวัสดุแต่ละสูตรมาผสมให้เข้ากัน ใช้วัสดุเพาะน้ำหนัก 500 กรัมต่อถุง สูตรละ 50 ถุง ใช้น้ำทำให้มีความชื้นประมาณ 65-70% นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้อบความดันไอน้ำ เป็นเวลา 60 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจึงแยกเชื้อที่เลี้ยงไว้ในเมล็ดข้าวฟ่างลงไป บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บันทึกการเจริญเติบโตของเส้นใยใน 2 แนวตั้งฉากกัน ในหน่วยมิลลิเมตรแล้ววิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับกรรมวิธีควบคุม (control treatment) ใช้แผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี ๆ ละ 50 ซ้ำ

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายในเห็ดเรืองแสงในเชิงปริมาณ ทำการเตรียม crude extracellular protein ของเชื้อ ตามวิธีการของสวิดา (2549) หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ดังต่อไปนี้

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของสวิดา (2549) ใช้กลูโคส

(glucose) เป็นน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐาน ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) ที่ถูกย่อยออกจาก carboxymethylcellulose sodium salt ตามวิธีการของ Somogyi (1952)

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ pectinase ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Fellows และ Worgan (1984) ใช้ galacturonic acid เป็นมาตรฐาน ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ amylase ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Yang และ Wang (1999) ใช้กลูโคสเป็นมาตรฐาน ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ถูกย่อยจาก soluble starch ตามวิธีการของ Somogyi (1952)

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ protease ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Yang และ Wang (1999) ใช้ tyrosine เป็นมาตรฐาน ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (nm)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การเจริญเติบโตของเส้นใย (hyphal distance) ในซีลีเยอไมยางพาราผสมอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่าไอโซเลต KKU2 มีการอัตราการเจริญของเส้นใยเร็วกว่าไอโซเลต PW 2 ในสูตรอาหารทุกสูตร ไอโซเลต KKU2 เจริญได้เต็มถุงวัสดุภายใน 21 วัน ในขณะที่ไอโซเลต PW2 เจริญเต็มถุงได้ช้ากว่า กล่าวคือใช้เวลา 28 วัน (Table 1-2) สูตรอาหารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของไอโซเลต PW2 ดีที่สุด คือซีลีเยอไมยางพาราผสมแป้ง

ข้าวโพด 10% (Table 1) ส่วนไอโซเลต KKU2 สูตรอาหารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเส้นใยได้ดีที่สุดคือ จี้อย่างพาราผสมแป้งข้าวสาลี 10% (Table 2) เส้นใยเดินเต็มก่อนเชื้อในเวลา 21 วัน และเส้นใยเจริญเต็มก่อนเชื้อในอาหารทุก ๆ สูตรภายในวันที่ 24 ของการทดลอง ขณะที่ไอโซเลต PW2 เส้นใยใช้เวลาในการเดินเต็มก่อนถึง 28 วันในสูตรจี้อย่างพาราผสมแป้งข้าวโพด ขณะที่อาหารสูตรอื่น ๆ ใช้เวลามากถึง 40 วัน เส้นใยจึงจะเดินเต็มก่อนเชื้อ

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (Extracellular degrading enzymes) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase, pectinase, amylase, และ protease ของเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลต มีค่าอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน (Table 3). การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ของเชื้อเห็ดเรืองแสง *N. nambi* พบว่าไอโซเลต PW2 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 6.02 $\mu\text{mol-glucose equivalent/mg protein/hr}$ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ pectinase พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในปริมาณที่สูง ไอโซเลต PW4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ pectinase สูงที่สุดเท่ากับ 151.1 $\mu\text{mol-galacturonic acid equivalent/mg protein/hr}$ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ amylase ของทุกไอโซเลตอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ ไอโซเลตที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ปริมาณสูงที่สุดคือ ไอโซเลต PW4 มีค่าเท่ากับ 0.63 $\mu\text{mol-glucose equivalent/mg protein/hr}$ การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ protease พบว่าไอโซเลต PW1 มีปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ protease โดยมีค่า 13.8 $\mu\text{mol-tyrosine equivalent/mg protein/hr}$.

การเพาะเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารต่างๆ พบว่าเชื้อเห็ดเรืองแสง *N. nambi* สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้เป็นอย่างดี เอนไซม์ย่อยสลายที่น่าจะมี

บทบาทในการย่อยสลายสารอาหารจากจี้อย่างและแป้งข้าว (soluble starch) มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน คือ เอนไซม์ cellulase, pectinase และ amylase มีการรายงานว่าเอนไซม์ cellulase มีบทบาทสำคัญต่อการเพาะเห็ดในตระกูล *Pleurotus* sp. (Mona et al. 2009) ขณะที่การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ amylase แม้จะพบว่าปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่อนข้างต่ำ แต่ก็เพียงพอต่อการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนจากการเติมอาหารเสริม เช่น รำข้าว และแป้งข้าวต่างๆ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ ที่เอื้อเพื่อเชื้อเห็ดเรืองแสง *N. nambi* งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สว. AG-BIO/PERDO-CHE) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

สุริย์พร บัวอาจ. 2550. ข้อมูลลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ในส่วนไรโบโซมอลดีเอ็นเอของเห็ดเรืองแสงและผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดต่อไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

- สุวิดา แสไพศาล. 2545. การศึกษาเบื้องต้นในการใช้
เห็ดเรืองแสงเพื่อยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช.
ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาโรคพืชวิทยา
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- สุวิดา แสไพศาล. 2549. เอนไซม์ย่อยสลาย
ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลี
โอไทด์ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA
และการโคลนยีนไคไคเนสของเชื้อรา
Trichoderma spp. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
ขอนแก่น.
- Fellows, P.J. and J.T. Worgan. 1984. An investigation
into the pectinolytic activity of the yeast
Saccharomyces fibuligens. *Enz. Microb.*
Technol. 6 : 405-410.
- Lowry, O.H., N.J. Roasebrough, A.L. Fan, and R.S.
Randail. 1951. Protein measurement with
the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193
: 265-275.
- Mona, M.R., M.A Hala, E.M. Abeer, and U.N.
Mohamed. 2009. Nutritional analysis and
enzyme activities of *Pleurotus Ostreatus*
cultivated on *Citrus limonium* and *Carica*
papaya Wastes. *Australian J. Basic Applied*
Sci. 3 : 3352-3360.
- Saksirirat, W., N. Sanoamuang, K. Komain, and S.
Saepaisan. 2003. A new record of
luminescent mushroom (*Omphalotus* sp.) in
Thailand and studies on its cultivation and
application. pp. 251-257. In *Proceeding of*
Medicinal Mushroom & Biodiversity and
Bioactive Compound. BIOTEC, PEACH
pattaya, Chon Buri, Thailand. Somogyi, M.
1952. Notes in sugar determination. *J. Biol.*
Chem. 195 : 19-23.
- Yang, S.S. and Y. Wang. 1999. Protease and amylase
production of *Streptomyces rimosus* in
submerged and solid state cultivations. *Bot.*
Bull. Acad. Sin. 40 : 259-265.

Table 1 Hyphal distance of *Neonothopanus nambi* isolate PW2 grown on different supplemented para rubber sawdust
3-28 days after inoculation

Formula	Hyphal distance (mm.)								
	3 Days	6 Days	9 Days	12 Days	15 Days	18 Days	21 Days	24 Days	28 Days
RB 10% ^{1/}	50.15 a	70.59 a	70.50 a	110.39 a	120.56 b	200.19 a	230.85 a	240.89 a	300.21 b
RF 10% ^{2/}	30.56 b	40.74 c	60.10 b	90.23 b	120.93 b	200.50 a	210.25 b	240.43 a	300.11 b
CF 10% ^{3/}	50.03 a	60.86 b	70.03 a	110.94 a	150.40 a	160.64 b	200.28 c	210.68 b	320.00 a
WF 10% ^{4/}	50.61 a	70.09 a	70.40 a	90.95 b	100.79 c	160.36 b	200.18 c	210.83 b	230.10 c
C.V. (%)	11.69	7.75	3.58	4.69	2.08	2.76	2.85	4.24	1.22

Means in the same column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$ by DMRT

^{1/} RB10%: 10% Rice bran, ^{2/} RF10%: 10% Rice flour, ^{3/} CF10%: 10% Corn flour, ^{4/} WF10%: 10% Wheat flour

Table 2 Hyphal distance of *Neonothopanus nambi* isolate K KU2 grown on different supplemented para rubber sawdust 3-28 days after inoculation

Formula	Hyphal distance in mm.								
	3 Days	6 Days	9 Days	12 Days	15 Days	18 Days	21 Days	24 Days	28 Days
RB 10% ^{1/}	60.23 b	70.65 b	60.96 b	140.86 a	180.04 b	250.46 b	320.00 a	320.00 a	320.00 a
RF 10% ^{2/}	40.65 c	50.00 c	70.65 b	110.03 c	160.58 c	240.21 c	290.44 b	320.00 a	320.00 a
CF 10% ^{3/}	70.08 a	90.69 a	90.69 a	120.89 b	160.60 c	220.56 d	320.00 a	320.00 a	320.00 a
WF 10% ^{4/}	60.49 b	70.74 b	100.46 a	140.65 a	200.73 a	300.65 a	320.00 a	320.00 a	320.00 a
C.V. (%)	4.74	5.15	4.57	4.35	1.86	2.76	1.79	0	0

Means in the same column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$ by DMRT

^{1/} RB10%: 10% Rice bran, ^{2/} RF10%: 10% Rice flour, ^{3/} CF10%: 10% Corn flour, ^{4/} WF10%: 10% Wheat flour

Table 3 Enzymatic activity of 6 isolates *Neonothopanus nambi*

Isolate	Enzyme activity ($\mu\text{mol/mg protein/hr}$)			
	Cellulase	Pectinase	Amylase	Protease
PW1	3.59 b	86.96 d	0.31 b	13.8 a
PW2	6.02 a	108.13 c	0.48 ab	7.08 b
PW3	3.97 b	134.61 b	0.11 c	7.44 b
PW4	5.29 ab	151.1 a	0.63 a	6.16 b
K KU1	3.25 b	132.28 b	0.28 b	13.32 a
K KU2	1.85 c	145.62 b	0.12 c	7.26 b
C.V. (%)	22.11	5.37	17.20	19.52

Means in the same column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$ by DMRT