สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การก่อกลายพันธุ์เชื้อราและการแยกสายพันธุ์กลายของเชื้อรา เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

MUTAGENESIS AND ISOLATION OF MUTANTS OF FUNGI FOR ENHANCING XYLANASE PRODUCTION

ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์

หัวหน้าโครงการวิจัย

ปีงบประมาณ 2546

RCH
QP
702
.X87
Q658ร

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 58914
วัน,เดือน,ปี 17 ก.พ. 2549

.b 11479403
.i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การศึกษาการก่อการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อราจากธรรมชาติ จากดินในเขตจังหวัดชลบุรี ที่ผ่านการจำแนกเชื้อแล้วว่าเป็น *Aspergillus niger* (เรวดี, 2547) ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าหลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเลตให้กับสปอร์เชื้อราที่เวลา 3.5 นาที ความอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus niger* เหลือประมาณร้อยละ 10 ดังนั้นจึงใช้เวลาในการฉายแสงนั้น มาทำการก่อกลายพันธุ์เชื้อราจาก *Aspergillus niger* เพื่อนำมาศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายบนอาหาร minimal medium ได้สายพันธุ์กลายของเชื้อ *Aspergillus niger* 18 สายพันธุ์ จึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 6 เชื้อราสายพันธุ์กลาย *Aspergillus niger* หมายเลข ML 1 มีค่าอัตราส่วนของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุดเท่ากับ 3.16 ที่พีเอชเท่ากับ 7 เชื้อราสายพันธุ์กลาย *Aspergillus niger* หมายเลข ML 13 มีค่าอัตราส่วนสูงสุดเท่ากับ 3.39 และที่พีเอชเท่ากับ 8 เชื้อราสายพันธุ์กลาย *Aspergillus niger* หมายเลข ML 249 มีค่าอัตราส่วนสูงสุดเท่ากับ 3.61 เมื่อนำมาเลี้ยงในสภาวะการเลี้ยงเชื้ออาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้อาหารสูตรปรับปรุง (เรวดี, 2547) แล้วพบว่าเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 นั้นมากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุด (18.565 ยูนิตต่อมล.) รองมาคือ ML 1 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 16.148 ยูนิตต่อมล. ซึ่งมีค่าสูงกว่าสายพันธุ์เดิม (13.110 ยูนิตต่อมล.) ในการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว และเมื่อใช้ซังข้าวโพดร้อยละ 2 ของน้ำหนักโดยปริมาตร และทริปโตน 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 นั้นส่งเสริมให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อกลายพันธุ์ ML3 ดีที่สุด มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 118.216 ยูนิตต่อมล. และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย (0.105 ยูนิตต่อมล.) ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าสายพันธุ์เดิม(41.899 ยูนิตต่อมล.) ในอาหารสูตรเรวดี (2547) ถึง 2.82 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The mutation and isolation of soil fungi in Chonburi province, Thailand were studied at 37°C. The mutants of *Aspergillus niger* were isolated after exposure of fungal spores to ultraviolet (UV) radiation at the wavelength of 254 nm for 3.5 min. The survival of soil fungi after UV irradiation treatment was 10 %. The irradiated fungi were plated out on minimal media containing xylan as the only carbon source. A total of eighteen mutants of *A. niger* were screened for xylanase activity by measuring a ratio between the diameter of clear zone formed around the colony and the diameter of colony. Results demonstrated that the mutant strains ML1, ML13, and ML249 had the maximum ratios between the diameter of clear zone and the diameter of colony of 3.16, 3.39, and 3.61, respectively. The optimum pH that provided the maximum xylanase activity for the mutant strains ML1, ML13, and ML249 were 6, 7, and 8, respectively. The maximum xylanase activity of 18.565 Unit/mL was obtained when the mutant ML13 was grown in a minimal liquid medium containing xylan as the sole carbon source. The mutant strain ML1 showed the second highest xylanase activity after ML13. The xylanase activity of mutant ML1 was 16.148 which significantly increased comparing to 13.11 Unit/mL of its wild-type. In addition, mutants, strain ML13, had a level of xylanase 2.28 fold higher than its wild-type strain in medium containing 20 g/L of corn cobs and 3 g nitrogen/l of tryptone at initial pH 6. Cellulase was also detected at the level of 0.105 unit/ml in mutant ML13 when corn cob was used as nitrogen source.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....I

สารบัญ.....III

สารบัญตาราง.....VI

สารบัญรูป.....VII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย..... 2

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 ไซแลน.....3

2.2 ไซลาโนไลติกเอนไซม์ 7

2.3 เอนไซม์เซลลูเลส.....9

2.4 การทำการกลายพันธุ์ 10

2.5 ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส.....25

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....28

3.1 วัสดุ.....28

3.1.1 วัตถุดิบ.....28

3.1.2 จุลินทรีย์.....28

3.3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....28

3.1.4 สารเคมี.....28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 อุปกรณ์.....29
3.3 วิธีการ.....30
3.3.1 การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ของเชื้อรา
หลังจากทำการฉายแสงอัตราไวโอเลตที่ระยะเวลาต่างๆกัน.....30
3.3.2 การคัดแยกเชื้อราสายพันธุ์กลาย.....31
3.3.3 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยเปรียบเทียบกิจกรรมของ
เอนไซม์ไซลาเนสจากขนาดวงใสรอบโคโลนี
ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง.....32
3.3.4 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยเปรียบเทียบกิจกรรมของ
เอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว.....32
3.3.5 การศึกษาหา แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และพีเอชที่เหมาะสม
ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้.....33
3.3.6 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ
สายพันธุ์ดั้งเดิมและเชื้อราสายพันธุ์กลาย.....34

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....35
4.1 ผลการศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (% survival) ของสปอร์เชื้อรา
ของ *Aspergillus niger* หลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลต
ที่ระยะเวลาต่างๆกัน.....35
4.2 ผลการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อราหลังผ่านการฉายแสง
อัลตราไวโอเลตที่เวลาที่ทำให้มีเปอร์เซ็นต์จากอยู่รอดเหลือร้อยละ 37
4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา
สายพันธุ์กลายของ *Aspergillus niger* ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง.....37
4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา
สายพันธุ์กลายของ *Aspergillus niger*ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว.....41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 การศึกษาหา แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และพีเอชที่เหมาะสม
ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *Aspergillus niger* ML3 44
4.6 เปรียบเทียบการผลิตไซลาเนสจากเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลาย ML 3.....50

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....52

บรรณานุกรม.....54

ภาคผนวก ก.....62

ภาคผนวก ข.....66

ภาคผนวก ค.....73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงอัตราการเกิดมิวเตชั่นของยีนตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ.....13

4.1 แสดงจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *Aspergillus niger* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆในระดับความเจือจาง 10^{-4}.....35

4.2 แสดงค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีของเชื้อรา สายพันธุ์กลายของ *Aspergillus niger* และสายพันธุ์เดิมในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง เพื่อทดสอบ ที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเท่ากับ 6 38

4.3 แสดงค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีของเชื้อรา สายพันธุ์กลายของ *Aspergillus niger* และสายพันธุ์เดิมในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง เพื่อทดสอบที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเท่ากับ 7 39

4.4 แสดงค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีของเชื้อรา สายพันธุ์กลายของ *Aspergillus niger* และสายพันธุ์เดิมในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง เพื่อทดสอบที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเท่ากับ 8 40

4.5 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์เดิมของ *Aspergillus niger* ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว.....42

4.6 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว.....49

ตารางภาคผนวก.....73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ส่วนประกอบของ arabino-4-O-methylglucuronoxylan.....3

2.2 ส่วนประกอบของ O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan.....4

2.3 โครงสร้างของ O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan
ในพืชล้มลุกและ พืชตระกูลหญ้า.....5

2.4 แสดงโครงสร้างของไซแลนที่ได้จากพืชและแสดงบริเวณที่เข้าจับ
ของเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมใน xylanolyticeenzyme โดยจุลินทรีย์..... 6

2.5 การทำงานที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซแลน.....9

2.6 มิวเตชั่นเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่ความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรม
และความหลากหลายของสปีชีส์ในกระบวนการวิวัฒนาการ.....11

2.7 การเกิดไทมีนไดเมอร์เนื่องจากผลของแสงอัลตราไวโอเลต 17

2.8 แสดงวิธีการทำเรพลิคาเพลติง.....20

2.9 การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยวิธีโฟโตรีแอคติเวชั่น (photoreactivation).....22

2.10 การซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ถูกทำลายโดยแสงอัลตราไวโอเลต.....23

4.1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus niger*
ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}.....37

4.2 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์เดิม
และสายพันธุ์กลาย ML 3 ในสภาวะอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน.....45

4.3 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* ML3
ในสภาวะอาหารเหลวที่มีการแปรผันความเข้มข้นของซังข้าวโพด.....47

4.4 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* ML3
ในสภาวะอาหารเหลวที่มีการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้น.....51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.5 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* ML3 ในสภาวะอาหารเหลวที่มีการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้น.....51

4.6 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* ML3 กับสายพันธุ์เดิมในอาหารเหลวที่มีสภาวะส่งเสริมการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส.....53

ภาคผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส.....71

ภาคผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส.....72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ในปัจจุบัน ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากเอนไซม์ไซลาเนสนั้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ (Viikari *et. al,* 1993) ซึ่งในกระบวนการผลิตกระดาษจำเป็นที่จะต้องฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดลิกนินที่เป็นตัวกำหนดคุณภาพและทำให้เกิดสีในเยื่อกระดาษออก การฟอกสีเยื่อกระดาษนิยมใช้สาร oxidizing agent เช่นคลอรีนและคลอรีน-ไดออกไซด์ร่วมกับด่าง ซึ่งสารเหล่านี้เมื่อทำปฏิกิริยากับลิกนินจะก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม แต่เมื่อมีการใช้เอนไซม์ไซลาเนสแปรสภาพเยื่อกระดาษในขั้นต้น จะสามารถลดปริมาณการใช้สารเคมีพวก oxidizing agent ที่ใช้ในการฟอกสีเยื่อกระดาษได้ โดยเอนไซม์ไซลาเนสจะเข้าไปย่อยสลายไซแลนที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสในเยื่อกระดาษทำให้เกิดเป็นรูพรุน oxidizing agent ที่ใช้ในการฟอกสีจึงเข้าไปสกัดเอาลิกนินออกได้ง่ายขึ้นและและยังทำให้เยื่อกระดาษมีความสว่างมากขึ้นอีกด้วย (Dietmar และคณะ, 1996) นอกจากนั้นยังมีการใช้ไซลาเนสในอื่น เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในการสกัดกาแฟ น้ำมันพืช (Wong and Saddler, 1992) เพิ่มคุณค่าอาหารสัตว์ (Kuhad and Singh, 1993) และการทำนำผลไม้ (Biely, 1985) เป็นต้น มีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และแอคติโนมัยสิด เป็นต้น เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้นั้นได้รับความสนใจในการพัฒนาเพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular) นอกจากนั้นยังมีระดับการผลิตที่สูงกว่าแบคทีเรีย และยูแบคทีเรียอีกด้วย (Dietmar *et. al* , 1996)

การทำการกลายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตนั้นเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความสนใจ เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการผลิตที่ดีขึ้น ซึ่งวิธีการทำการกลายพันธุ์มีทั้งที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (Graham *et. al.,*1993) เกิดจากการกระตุ้นโดยรังสี แสงที่มีความยาวคลื่นต่ำ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต หรือการใช้สารเคมี (Toyama and Toyama, 1990a, b) และได้มีการทดลองการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี (Anwar *et. al*, 1996; Mikhailova *et. al*, 1998; Steiner *et. al*, 1998) และพบว่าการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นวิธีการก่อกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กับเชื้อรา (ชวนพิศ ดีเอกนามกุล, 2536) เช่น เชื้อรา *Fusarium oxysporum* NTG-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19 เป็นเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยใช้อัลตราไวโอเลตและ N-methyl-N'-nitrosoguanidine (NTG) ก่อกลายพันธุ์ทำสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงขึ้นจากสายพันธุ์เดิม (Kuhad *et. al*, 1998)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการก่อกลายพันธุ์เชื้อราที่ได้จากธรรมชาติและคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้โดยมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่สูงขึ้นจากสายพันธุ์เดิมและสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่ำด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการก่อกลายพันธุ์เชื้อราที่ได้จากการแยกและคัดเลือกตามธรรมชาติโดยวิธีฉายแสงอัลตราไวโอเลต

1.2.2 เพื่อศึกษาการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

1.2.3 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อเชื้อราสายพันธุ์กลาย

1.3 ขอบข่ายของโครงงานวิจัย

1.3.1 ทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแก่สปอร์เชื้อราที่ได้จากการแยกและคัดเลือกตามธรรมชาติที่ระยะเวลาต่างกัน

1.3.2 คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.3 คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในสภาวะการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.4 ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยทำการแปรผันแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และค่าพีเอชเริ่มต้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อให้ได้สายพันธุ์เชื้อราที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูง

1.4.2 เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยขั้นสูงในการขยายขนาด (Large scale) ให้มีการผลิตที่สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

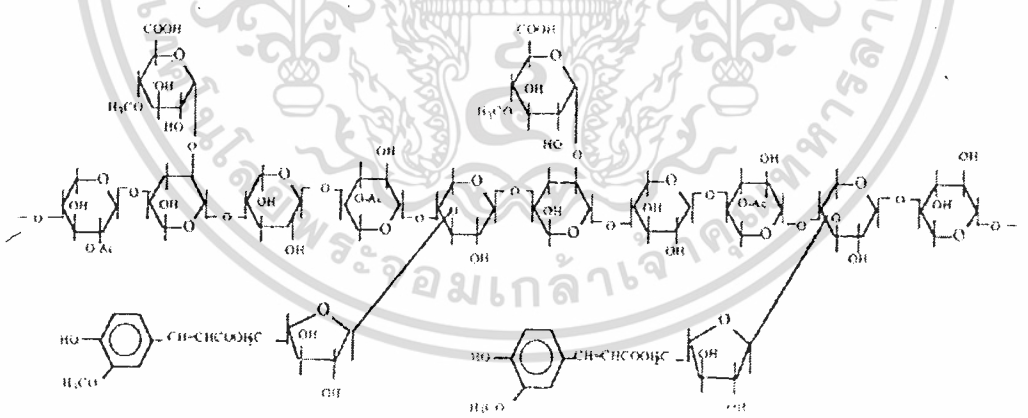
บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไซแลน

2.1.1 โครงสร้างของไซแลน

ไซแลนเป็นคาร์โบไฮเดรตหลักที่พบในผนังเซลล์พืช ในไม้เนื้ออ่อนพบร้อยละ 7 ถึง 10 ไม้เนื้อแข็งพบประมาณร้อยละ 15 ถึง 30 และในไม้ล้มลุกพบมากกว่าร้อยละ 30 ไซแลนมีโครงสร้างหลักเป็น β-D-xylose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะβ-1,4-glycosidic และมีโซ่กิ่งเป็นพวก acetyl, 4-O-methy-D-glucurosyl และ L-arabinofuranosyl group

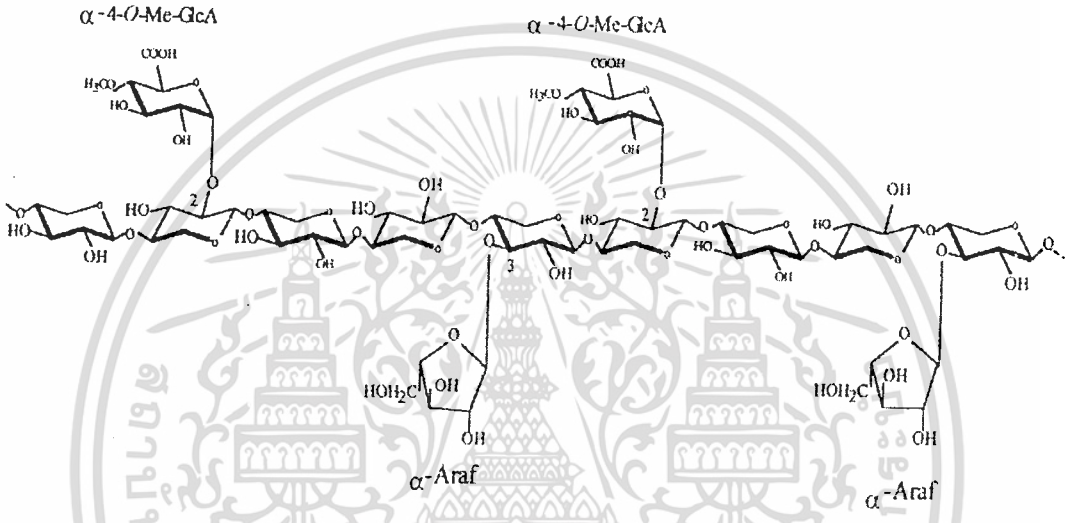
ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนได้แก่ arabino-4-O-methyl-glucuronoxylan (รูปที่ 2.1) 4-O-methylglucuronic acid สร้างพันธะ α-1,2 glycosidic bond ที่ตำแหน่ง C2 ของไซโลสในโครงสร้างหลัก และมี L-arabinofuranoside เชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักที่ C3 ของน้ำตาลไซโลส ด้วยพันธะ α-1,3 glycosidic bond ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนไม่พบ acetyl residue และไซแลนในไม้เนื้ออ่อนมีอัตราส่วนของไซโลส ต่อ 4-O-methylglucuronic acid ต่อ arabinose เท่ากับ 8 ต่อ 1.6 ต่อ 1



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบของ arabino-4-O-methylglucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้ออ่อน)
ที่มา : Viilkari *et. al.* (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

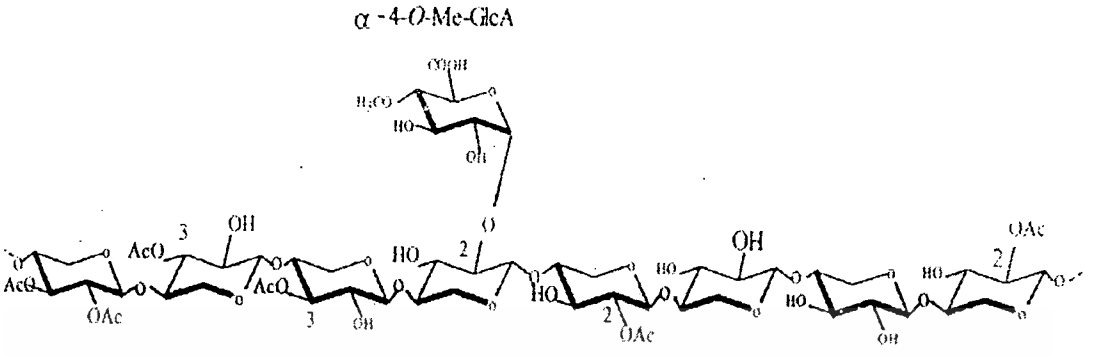
ไซแลนในไม้เนื้อแข็งได้แก่ O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan (รูปที่ 2.2) ไซแลนในไม้เนื้อแข็งจะมีอัตราส่วนของไซโลส ต่อ 4-O-methylglucuronic acid ต่อ acetic acid เท่ากับ 10 ต่อ 1 ต่อ 7 โดยที่ไซแลนในไม้เนื้อแข็งมี acetyl residue เชื่อมต่อกับไซโลสในสายโครงสร้างหลักที่ตำแหน่ง C2หรือC3 อยู่เป็นจำนวนมาก และทุกๆ 10 โมเลกุลของไซโลสพบ 4-O-methylglucuronic acid เชื่อมต่อกับไซโลสที่ตำแหน่ง C2 ของไซโลส



รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบของ O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้อแข็ง)
ที่มา: Viilkari *et. al* .(1993)

ไซแลนในไม้ล้มลุกและพืชตระกูลหญ้าได้แก่ O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan (รูปที่ 2.3) ไซแลนในไม้ล้มลุกมีโซ่กิ่งเป็น 4-O-methylglucuronic acid น้อยกว่าในไม้เนื้อแข็ง โดยส่วนใหญ่เป็น L-arabinofuranosyl group ซึ่งเชื่อมต่อกับไซโลสในโครงสร้างหลักที่ตำแหน่ง C2, C3 หรือทั้งสองตำแหน่ง นอกจากนั้นพบ acetyl group ร้อยละ 2 ถึง 5 เชื่อมที่ตำแหน่ง C2 และ C3 ในน้ำตาลไซโลสของโครงสร้างหลัก และมี arabinosyl side chain ประมาณร้อยละ 6 และมี *p*-coumarosyl ประมาณร้อยละ 3 (Viilkari *et. al*, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan ในพืชล้มลุก พืชตระกูลหญ้า

ที่มา : Viilkari *et. al* .(1993)

2.1.2 การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นสารโมเลกุลเดี่ยวสามารถย่อยสลายโดยการใช้สารเคมี (chemmical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน

2.1.2.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยสารเคมี แบ่งเป็น 2 วิธี คือ

1) การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด

การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดเพื่อผลิตน้ำตาลไซโลสเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว แต่มีการเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษ เช่น เฟอฟูรัล ซึ่งมีผลต่อการนำไปเลี้ยงจุลินทรีย์ และยังต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดและอุณหภูมิสูงได้

2) การย่อยสลายด้วยไซแลนด้วยด่าง

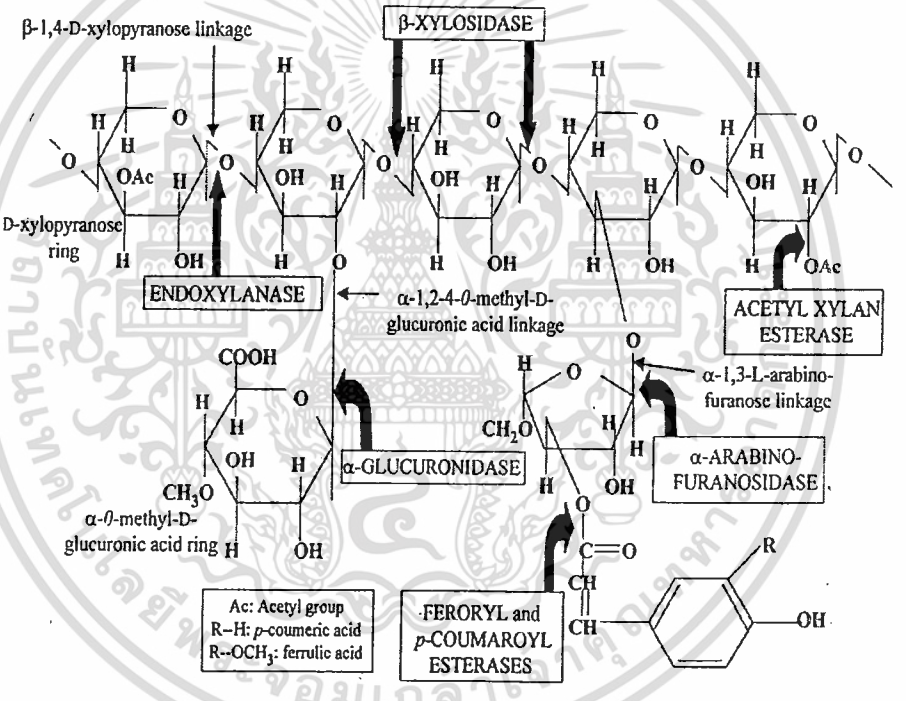
การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำกระดาษ ในขั้นตอน kraft cooking ซึ่งจะนำชิ้นของเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ยและกำจัดลิกนินที่อยู่ในชั้นของลิกโนเซลลูโลสออกบางส่วน หลังจากนั้นจะนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยการใช้สารเคมีที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide) ก๊าซคลอรีน (Cl_2) เป็นต้น ที่อุณหภูมิสูงไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส และมีความเป็นกรดด่างไม่ต่ำกว่า 10 แต่ทำให้เกิดสารพิษพวกไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอไรด์ที่เป็นพิษชนิดอื่นๆด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะกว่าการใช้สารเคมีในการย่อยสลายเนื่องจากภาวะที่ใช้ขณะทำงานเป็นกลาง นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษและสารเคมีตกค้าง ทำให้สามารถนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปใช้ผลิตสารอื่นๆต่อไป เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการ คือการใช้ในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ ลดความหนืดของอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมอาหาร (Wong and Saddler, 1988)

จากเอนไซม์ในการย่อยสลายไซแลนทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว สามารถแสดงแผนภาพรวมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้เพื่อย่อยสลายโครงสร้างของไซแลนได้ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของไซแลนที่ได้จากพืชและแสดงบริเวณที่เข้าจับของเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมใน xylanolytic enzyme system โดยจุลินทรีย์

ที่มา : Beg *et. al.,* (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการย่อยสลายไซแลนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆนี้จะเรียกว่า xylanolytic enzyme system เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก โดยเกิดจากการสลายแขนงของหมู่อะซิติลในโครงสร้างของไซแลนโดยใช้เอนไซม์ทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนโด-1,4-เบต้า-ไซลาเนส (endo-1,4-β-xylanase) หรือไซลาเนสที่เข้าจับที่พอลิแซคคาร์ไรด์ และเบต้า-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) ที่ไฮโดรไลสไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ไปเป็น ดี-ไซโลส (D-xylose)

2.2 ไซลาโนไลติกเอนไซม์ (Xylanolytic enzymes)

ไซลาโนไลติกเอนไซม์เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเฮมิเซลลูโลส ไซลาโนไลติกเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.2.1 กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก

1) บีต้า 1,4 เอนโดไซลาเนส (1,4-β-D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.8)

ย่อยสลายพันธะ β-1,4 glycosidic จากด้านในสายของไซแลนอย่างสุ่ม การย่อยสลายขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น เช่น ความยาวของสายไซแลนและจำนวนกิ่งก้าน ในช่วงแรกของการย่อยสลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ เมื่อเกิดการย่อยสลายต่อไซโลโอ-ลิโกแซคคาไรด์จะถูกย่อยสลายเป็นไซโลไตรโอส ไซโลไบโอสและไซโลส ตามลำดับ (Sunna and Antranikian, 1997)

2) บีต้า-ไซโลซิเดส (β-D-xyloside xylohydrolase; EC 3.2.1.37)

เป็น exoglycosidase ที่ย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ และไซโลไบโอสจากปลายด้าน non-reducing และสามารถย่อยสลาย artificial substrate เช่น *p*-nitrophenyl-β-D-xyloside การทำงานของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสต่อการย่อยสลายไซโลโอลิ-โกแซคคาไรด์ลดลงเมื่อสายของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายไซแลนได้แต่อัตราการย่อยสลายเกิดได้ช้ามากโดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส (Kormelink *et. al.*,, 1993)

2.2.2 กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้าน

1) อัลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (α-L-arabinofuranosidase; EC 3.2.1.55) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายไซแลนโดยเฉพาะไซแลนในไม้เนื้ออ่อน อะราบิโนฟูราโนซิเดสแบ่งออกเป็น 2 ชนิดได้แก่ exo-acting α-L-arabinofuranosidase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(EC 3.2.1.55) ซึ่งสามารถย่อยสลาย *p*-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside และสาขาของ arabinan ส่วนอีกชนิดหนึ่งคือ endo-1,5-α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.99) มีผลเฉพาะต่อ arabinan ที่เป็นเส้นตรงเท่านั้น และพบว่าการทำงานร่วมกันของอัลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดสกับไซลาเนสทำให้ได้ไซโลส ไซโลไบโอสและอะราบิโนส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนเพิ่มขึ้น (Kormelink *et. al.*,, 1993)

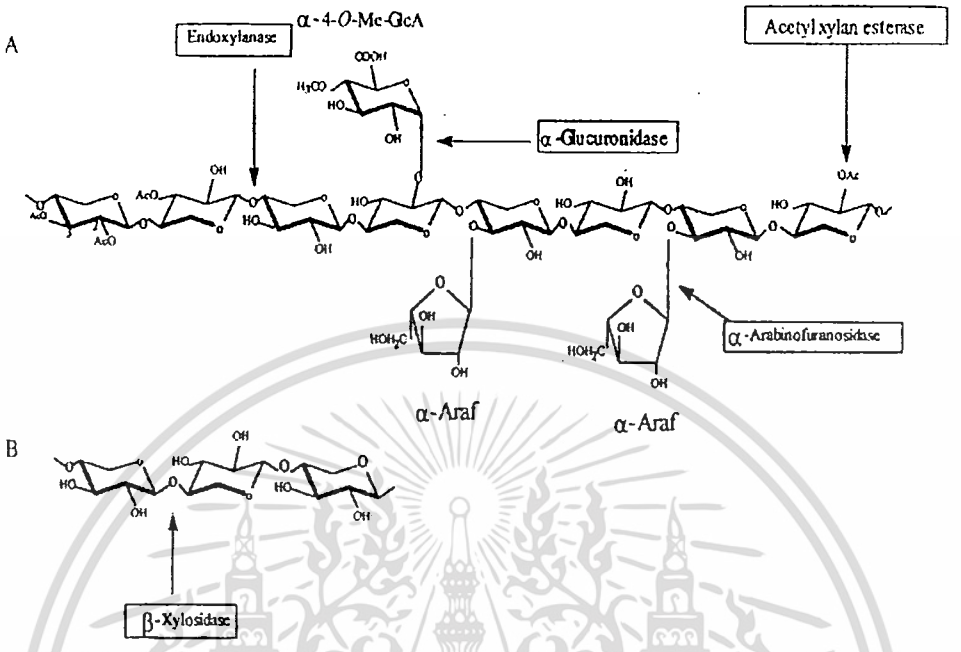
2) อัลฟา-กลูคูโรนิเดส (α-glucuronidase, EC 3.2.1.139) ย่อยสลายสลาย α-1,2 linkage ระหว่างไซโลส และD-glucuronic acid หรือ 4-O-methyl ether พบในกลูคูโรโนไซแลน ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์อัลฟา-กลูคูโรนิเดสขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์ (Kormelink *et. al.*,, 1993)

3) อะซิทิลไซแลนเอสเตอเรส (acetylxylan esterase, EC 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะระหว่าง O-acetyl residue ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในสายของ acetylxylan (Kormelink *et. al.*,, 1993)

2.2.3 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกเอนไซม์

ไซแลนมีโครงสร้างที่ซับซ้อน การย่อยสลายให้สมบูรณ์จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันในกลุ่มของไซลาโนไลติกเอนไซม์หลายชนิดเข้าช่วยในการทำปฏิกิริยา (ดังรูปที่ 2.5) ซึ่งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลักได้แก่ เอนโดไซลาเนส และ บีต้า-ไซโลซิเดส ส่วนเอนไซม์ที่ย่อยสลายส่วนที่เป็นกิ่งก้านได้แก่ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส แอลฟา-กลูคูโรนิเดสและอะซิทิล ไซแลนเอสเตอเรส Haltrich *et. al.*, (1994) รายงานว่า *Sclerotium rolfsii* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส รวมทั้งมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในการย่อยสลาย ไซแลนไปเป็นไซโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 (A) การทำงานที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซแลน Ac: Acetyl group; α-Araf: α-4-O-Me-GlcA: α-4-O-mrthylglucuronic acid

(B) การย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์โดยเบต้าไซโลซิเดส

ที่มา : Sunna and Antranikian (1997)

2.3 เอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีน มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตต่อ โปรตีน เท่ากับ 1:1 ละลายน้ำได้ ไม่ต้องการโคแฟคเตอร์ หรือโลหะ อื่นในการเข้าทำปฏิกิริยา เป็นเอนไซม์เชิงซ้อน ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ส่วน ซึ่ง Enari (1983) รายงานไว้ดังนี้

2.3.1เอนโดกลูโคเนส (1,4-beta-D-glucanohydrolase : EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อย beta-1,4-glucosidic linkage แบบสุ่มได้กลูโคส เซลโลบิโอส เซลโลไตรโอส ไม่ย่อยเวลโลบิโอสแต่ย่อยเวลโลเดรกซ์ตริน (CMC) และไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (HEC) และสามารถย่อยเซลลูโลสรูปผลึก (crystalline cellulose) ได้ด้วย ความจำเพาะของเอนไซม์ไม่สูงมากนัก วิเคราะห์เอนไซม์โดยใช้ CMC และ HEC เป็นสับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 เซลโลไบโอไฮโดรเลส (1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase:EC 3.2.1.9) ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลด้าน non-reducing end ของเส้นสายได้เซลโลไบโอส การวิเคราะห์เอนไซม์นี้ใช้สำลี อวิเซลและ Amorphous cellulose เป็นสับสเตรต

2.3.3 บีต้า-กาแลคโตซิเดส (beta-D-glucohydrolase : EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอส และเซลโล-โอลิโกแซคคาไรด์ (Cellooligosaccharide) ได้กลูโคสแต่ไม่ย่อยเซลลูโลสหรือเซลโลเดรกซ์ตริน วิเคราะห์เอนไซม์นี้โดยใช้เซลโลไบโอส –พี-ไนโตรฟีนิล-เบต้า-ดี-กลูโคไซด์ (Cellobiose-p-nitrophenyl-beta-D-glucoside) หรือซาลิซิน (Salicin) เป็นสับสเตรต

2.4 การทำการกลายพันธุ์ (mutation)

2.4.1 ประวัติการศึกษาเกี่ยวกับมิวเตชั่น (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2533)

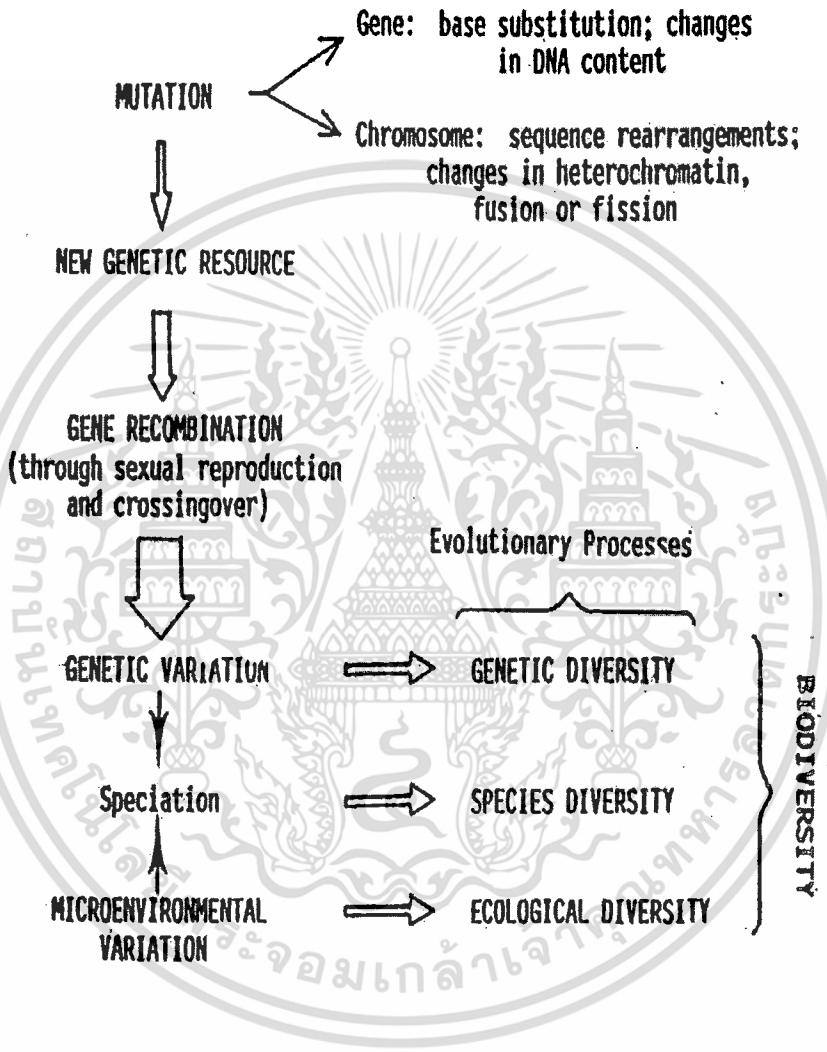
มีความเชื่อว่าความแปรปรวนทั้งหลายที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตจนกระทั่งได้พวกใหม่หรือพันธุ์ใหม่อันเรียกว่า sports นั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทีละเล็กละน้อยแบบค่อยเป็นค่อยไปจนกระทั่งถึงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 Hugo De Vries นักพฤษศาสตร์ชาวเนเธอแลนด์ได้พบความจริงซึ่งแตกต่างไปจากข้อเสนอของ Darwin ทั้งนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงในสิ่งมีชีวิตอาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลันทันทีและพืชหรือสัตว์สามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงนั้นไปยังลูกหลานได้ เรียกการเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้ว่า มิวเตชั่น

2.4.2 มิวเตชั่น

มิวเตชั่น หมายถึง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับหน่วยควบคุมลักษณะ เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ฉับพลัน และพืชหรือสัตว์สามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงอันนี้จะรวมไปถึงการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม แต่คำว่ามิวเตชั่นในปัจจุบันมักจะมีหมายความถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปยังอีกสภาพหนึ่ง ดังนั้นอาจเรียกการเปลี่ยนแปลงอันนั้นว่า “gene หรือ point mutation” ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของดีเอ็นเอ คือนิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งเข้าไปแทนที่นิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง

การเปลี่ยนแปลงทางกรรมพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับลักษณะรูปร่างทั่วไปหรือเกี่ยวกับลักษณะทางสรีระ ทางชีวเคมีหรือลักษณะทางพฤติกรรมของสปีชีส์ มิวเตชั่นเป็นสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิตและเป็นกลไกสำคัญอันดับแรกที่ทำให้เกิดความแปรผันในองค์ประกอบทางพันธุกรรม (genetic variation) อันเป็นพื้นฐานจำเป็นสำหรับกระบวนการวิวัฒนาการแสดงดังรูปที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 มิวเตชั่นเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่ความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมและความหลากหลายของสปีชีส์ในกระบวนการวิวัฒนาการ

ที่มา: วิสุทธิ์ ใบไม้ (2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 ชนิดของมิวเตชั่น

ชนิดของมิวเตชั่นที่ศึกษากันมักเป็นพวกที่แสดงออกมาให้เห็นในรูปของลักษณะอย่างชัดเจน ตัวอย่างของมิวเตชั่นชนิดนี้ ได้แก่ ลักษณะตาสีขาว ปีกสั้น ปีกกุด ฯลฯ ของแมลงหวี่ ดังนั้นเราจึงเรียกวมิวเตชั่นดังกล่าวว่าเป็นพวก "สังเกตได้ (visible)" ซึ่งมีอยู่ร้อยละ 1 ของมิวเตชั่นทั้งหมด และไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่สิ่งมีชีวิตมากนัก แต่มิวเตชั่นส่วนใหญ่คือร้อยละ 80 ได้แก่ พวก "แสดงผลในทางเสื่อม (dertrimental)" ซึ่งไม่อาจตรวจผลได้แน่ชัด แต่เข้าใจว่าจะกระทบกระเทือนต่อการเจริญเติบโตของพืชหรือสัตว์ได้อย่างมาก ในมิวเตชั่นชนิดนี้ยีนที่เปลี่ยนไปแต่ละยีนก่อผลเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อรวมผลของทุกยีนก็จะรุนแรงขึ้น มิวเตชั่นอีกพวกหนึ่งคือพวก "ก่อผลถึงตาย (lethal)" ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 10 ถ้ายีนอยู่ในภาพ homozygous มิวเตชั่นชนิดนี้จะกระทบกระเทือนต่อขบวนการทางสรีระจนพืชหรือสัตว์ไม่อาจจะมีชีวิตอยู่ได้

ในสิ่งมีชีวิตพวก haploid เช่น เชื้อรา recessive lethal จะก่อผลถึงตาย ในสิ่งมีชีวิตพวกนี้มียีนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอีกประเภทหนึ่งซึ่งไม่ก่อผลให้ถึงตาย เราเรียกยีนนี้ว่า conditional lethal ตัวอย่างเช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิดของเชื้อรา Neurospora อาจเปลี่ยนไปจากเดิม เราเรียกยีนที่เปลี่ยนไปนี้ว่าเป็น conditional lethal ทั้งนี้เชื้อราที่มียีนนี้จะไม่เจริญหรือขยายพันธุ์ใน minimal medium แต่กลับเจริญตามปกติเมื่อเสริมกรดอะมิโนบางชนิดลงใน selective medium

2.4.4 มิวเตชั่นที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

มิวเตชั่นชนิดนี้เป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทัวโทเมอริกชิฟท์ (tautomerric shift) หรือการก่อให้เกิดไอออน (ionization) ในโมเลกุลของเบสดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ มิวเตชั่นที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีอัตราต่ำมาก อัตราโดยเฉลี่ยประมาณ 10^{-5}-10^{-10} ต่อเซลล์ต่อรุ่น ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมโดยแตกต่างกันออกไปตามแต่ตำแหน่ง ชนิดของยีนและชนิดของสิ่งมีชีวิต (ประเสริฐ สันตินานาเลิศ, 2536) ดังตารางที่ 2.1 ยีนมิวเตชั่นอาจเกิดในทางไปข้างหน้า (forward mutation : A $\rightarrow$ a) คือลักษณะปกติเปลี่ยนไปเป็นลักษณะกลายหรืออาจเกิดขึ้นในทางกลับกัน (back mutation : a $\rightarrow$ A) คือจากมิวแตนต์ยีนเปลี่ยนกลับไปเป็นยีนปกติตามเดิม (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2533) มิวเตชั่นเป็นสิ่งที่สำคัญและก่อให้เกิดวิวัฒนาการขึ้นในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ายีนแทบทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆเคยผ่านการเปลี่ยนแปลงโดยมิวเตชั่นมาแล้วในอดีต จากการคัดเลือกอันเข้มงวดของธรรมชาติ ยีนซึ่งก่อผลในทางเสื่อมก็ค่อยๆหายไปจากหมู่ประชากรของพืชและสัตว์ เมื่อปราศจากมิวเตชั่นในธรรมชาติแล้วก็แทบจะกล่าวได้ว่าสิ่งมีชีวิตไม่อาจดำรงเผ่าพันธุ์หรือมีวิวัฒนาการมาจนถึงทุกวันนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาอัตราของมิวเตชั่นของยีนต่างๆของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนไปยังสภาพอื่นและการเปลี่ยนแปลงกลับสู่สภาพเดิมมีอัตราการเกิดไม่เท่ากัน นอกจากนั้นยีนของพืชและสัตว์ชั้นสูงมีอัตรามิวเตชั่นสูงกว่ายีนของแบคทีเรียและไวรัส

2.4.5 มิวเตชั่นที่เกิดจากการกระตุ้น (Induced mutation)

นอกจากจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแล้ว มิวเตชั่นก็อาจจะถูกทำให้เกิดขึ้นได้โดยใช้วิธีการกระตุ้น โดยได้เริ่มใช้รังสีเอกซ์ (X-rays) เพื่อกระต้นให้เกิดมิวเตชั่นในแมลงหวี่ พบว่าอัตราของมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นจะสูงกว่าพวกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติถึงราว 150 เท่า ต่อมาได้พบว่ารังสีเอกซ์นี้ได้ก่อให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) โดยการใช้รังสีเอกซ์มักก่อผลในทางเสื่อม และมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นก็คงมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซมบางยีนอาจถูกทำลายหรือบางส่วนของโครโมโซมอาจขาดหายไป

ตารางที่ 2.1 แสดงอัตราการเกิดยีนมิวเตชั่นตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

สิ่งมีชีวิต	อัตราการเกิดมิวเตชั่น
ฟาจก์ (T4)	
SM23	$1X\ 10^{-4}$
SM37	$3X10^{-5}$
UV102	$1X10^{-6}$
SM32	$2X10^{-7}$
UV248	$1X10^{-8}$
UV237	$1X10^{-9}$
UV1	$5X10^{-10}$
แบคทีเรีย (*Escherichia coli*)	
ยีนดื้อต่อยาสเตรปโตมัยซิน	$4X10^{-4}$
ยีนที่ต้องการฮีสทิดีน	$2X10^{-6}$
ราขนมปัง (*Neurospora crassa*)	
ยีนที่ไม่ต้องการสารอิโนซิตอล	$1.5X10^{-5}$
ยีนที่ไม่ต้องการสารอะดีนีน	$4.3X10^{-5}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงอัตราการเกิดยีนมิวเตชั่นตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

สิ่งมีชีวิต	อัตราการเกิดมิวเตชั่น
ยีสต์ (*Saccharomyces cerivisiae*)	
ยีนที่ไม่ต้องการอาร์จินีน	$9.3X10^{-7}$
ยีนที่ไม่ต้องการฮิสทิดีน	$3X10^{-9}$
ข้าวโพด (*Zea mays*)	
เมล็ดสีแดง	$4.92X10^{-4}$
เมล็ดสีม่วง	$1.1X10^{-5}$
เมล็ดมีน้ำตาลสูง	$2.4X10^{-6}$
แมลงหวี่ (*Drosophila meianogaster*)	
ตัวสีเหลือง	$1.2X10^{-4}$
ตาสีขาว	$2.9X10^{-5}$
มนุษย์ (*Homo sapiens*)	
กระดูกเล็ก (เตี้ย-แคระ)	$3X10^{-5}$
เป็นใบ้	$1.1X10^{-5}$
ตาบอดสี	$2.8X10^{-5}$
ผิวเผือก	$3.7X10^{-5}$
กล้ามเนื้อแขนขาลีบ	$5X10^{-6}$

ที่มา: วิสุทธิ์ ใบไม้ (2533)

2.4.6 สิ่งที่ทำให้เกิดการมิวเตชั่น (mutagens)

1) สิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ อุณหภูมิ รังสีต่างๆ

อุณหภูมิ จากการทดลองเลี้ยงแมลงหวี่ในอุณหภูมิต่างๆกัน พบว่ายีนด้อยที่ทำให้การตายบนโครโมโซม X (sex linked recessive lethal gene) ในอัตราที่แตกต่างกันดังนี้

อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เกิดร้อยละ 0.87

22 องศาเซลเซียส เกิดร้อยละ 0.188

28 องศาเซลเซียส เกิดร้อยละ 0.325

รังสีและแสง เป็นสิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถแบ่งแสงและรังสีตามช่วงความยาวคลื่นออกเป็นพวกๆดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10^{-4}-10^{-1} ซม. คลื่นวิทยุ

10^{-2}-10^{-3} ซม. แสงอินฟราเรด (infrared)

10^{-4} ซม. แสงที่มองเห็น

10^{-5}-10^{-6} ซม. แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet)

10^{-7}-10^{-8} ซม. รังสีเอกซ์ (X-rays)

10^{-9}-10^{-10} ซม. รังสีแกมมา (gamma rays)

10^{-11} ซม. รังสีคอสมิค (cosmic rays)

คลื่นวิทยุ แสงและรังสี คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีช่วงคลื่นขนาดต่างๆกัน คลื่นวิทยุมีช่วงคลื่นที่ยาวมาก คือมีความยาวระหว่าง 10^{-4}-10^{-1} ซม. แสงที่เรามองเห็นมีช่วงคลื่น 10^{-4} ซม. (1 ไมครอน) คลื่นที่มีช่วงสั้นกว่านี้ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต รังสีเอกซ์ จัดว่าเป็นคลื่นที่มีพลังงานสูง ทั้งนี้เมื่อช่วงคลื่นยิ่งสั้นลงพลังงานก็ยิ่งสูงขึ้น การที่แสงบางอย่างและรังสีที่มีพลังงานสูงนี่เองจึงสามารถแทรกซึมวัตถุและก่อผลให้เกิดมิวเตชั่นในสิ่งมีชีวิต เราอาจแยกคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและพลังงานในรูปมวล (จากสารที่อาจแผ่รังสี (radioactive isotope)) ออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆคือ

รังสี (ionizing radiation) คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหรือพลังงานในรูปมวลที่มีพลังงานสูงเมื่อกระทบกับเป้าแล้วจะทำให้มีการผลิตอิออน (ions) และรังสีนี้จัดเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมสูง

แสง (nonionizing radiation) คือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีพลังงานไม่สูงพอที่จะทำให้มีการผลิตอิออน และเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมต่ำ

2.4..6.1 รังสี (ionizing radiation)

รังสีมีอยู่หลายชนิด แต่ละชนิดอาจมีแหล่งที่เกิดและแรงแทรกซึมแตกต่างกัน รังสีเหล่านี้ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีคอสมิค รังสีแอลฟา รังสีบีต้าและนิวตรอน รังสีบางชนิดในจำนวนนี้ได้จากการแผ่รังสีของธาตุที่อาจแผ่รังสี (radioactive elements) เช่น รังสีแอลฟา ซึ่งประกอบด้วยโปรตอนและนิวตรอน และรังสีเบต้าซึ่งประกอบด้วยอิเลกตรอน เป็นต้น

รังสีทำให้เกิดมิวเตชั่นโดยวิธีการที่ทำให้เกิดไอออน ทั้งนี้เมื่อรังสีวิ่งไปกระทบกับอะตอมของวัตถุก็จะทำให้อะตอมนั้นสูญเสียอิเลกตรอน หลังจากสูญเสียอิเลกตรอนไปแล้ว ทั้งนี้เพเนื่องจากมีโปรตอนมีอิเลกตรอนอยู่ 1 หน่วยนั้นเอง ดังนั้นอิเลกตรอนที่สูญเสียออกไปจะถูกจับไว้โดยอะตอมข้างเคียงจึงทำให้อะตอมนั้นกลายเป็นอิออนที่มีประจุลบ โดยเหตุนี้เองอิออนจึงเกิดเป็นคู่ๆ เสมอ รังสีอาจก่อให้เกิดมิวเตชั่นได้หลายวิธี เช่น เมื่ออิออนนั้นอยู่ในส่วนของยีน การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดกับอิออนนั้นก็จะทำให้ยีนเปลี่ยนสภาพไป ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือรังสีอาจทำให้น้ำที่อยู่ภายในเซลล์ผลิตอิออนของไฮโดรเจน (H) และกลุ่มไฮดรอกซิล (OH) และ H จะรวมตัวกับออกซิเจนได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คืออาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ โปรตีน หรือโครโมโซมก็ได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับโครโมโซมก็จะทำให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซมหรือเกิดมิวเตชั่นของยีนได้

$$H_2O \longrightarrow H + OH$$

ในสภาพที่มีออกซิเจน ไฮโดรเจนอะตอมที่เกิดจากโมเลกุลของน้ำจะเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ง่าย ดังปฏิกิริยา

$$H + O_2 \longrightarrow H_2O$$

$$H_2O + H \longrightarrow H_2O_2$$

$$2H_2O \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

2.4.6.2 แสง (nonionizing radiation)

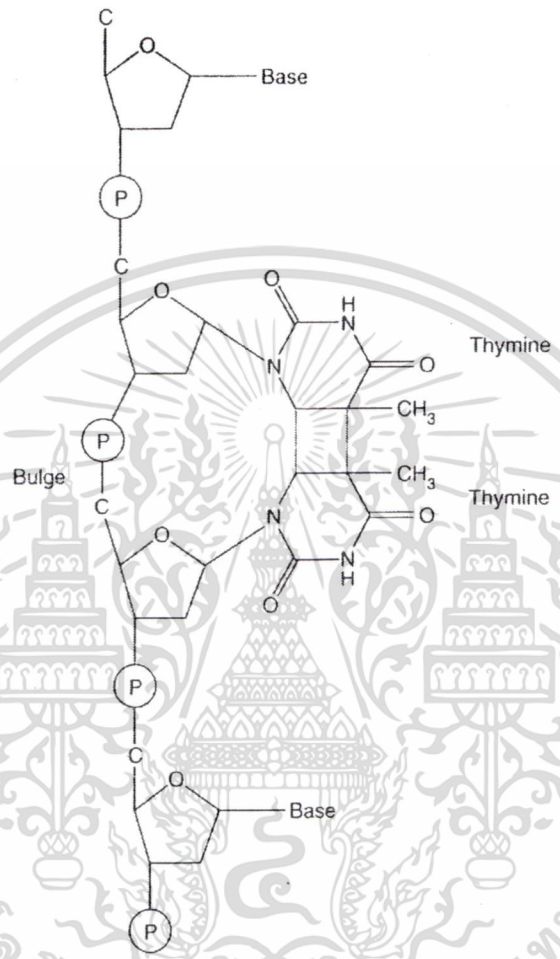
คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าช่วงยาวๆไม่ทำให้มีการผลิตอิออน ทั้งนี้เพราะพลังงานที่มีอยู่นั้นค่อนข้างต่ำ ดังนั้นเราเรียกคลื่นพวกนี้ว่าแสง แสงที่อาจก่อให้เกิดมิวเตชั่นได้แก่ แสงอัลตราไวโอเลต (UV) แสงชนิดนี้มีช่วงคลื่นยาวกว่ารังสีเอกซ์ และเนื่องจากมีพลังงานต่ำนี่เอง แสงอัลตราไวโอเลตจึงมีแรงแทรกซึมน้อย และไม่อาจแทรกซึมผ่านส่วนของร่างกายที่มีความหนาแน่นสูงๆ ดังนั้นจึงมักใช้กับส่วนเล็กๆของพืช เช่น อาจใช้กับอับละอองเกสร เป็นต้น หรือใช้กับบางส่วนของไข่แมลงหวีและมักใช้ได้ผลดีกับเชื้อรา แบคทีเรียและไวรัส แสงอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในส่วนของโพลาร์แคป (polar cap) ของไข่แมลงหวี่ อัลตราไวโอเลตอาจจะทำให้โครโมโซมผิดปกติแต่ประสิทธิภาพน้อยกว่ารังสีเอกซ์ (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2543)

เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตไม่ทำให้มีการผลิตอิออน ดังนั้นมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นก็เนื่องมาจากการที่เซลล์ดูดแสงเข้าไปโดยตรง ส่วนของเซลล์ที่ดูดแสงได้ดีคือ กรดนิวคลีอิก หรืออาจกล่าวลงไปให้แน่ชัดได้อีกว่า การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเบส โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ไพริมิดีนนั้นเองเมื่อเบสกระทบกับแสงอัลตราไวโอเลตก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับเกาะของพันธะ (bond) เปลี่ยนไปคือ ทำให้มีการจับเกาะระหว่างเบสชนิดเดียวกัน เบสที่จับเกาะกันนี้เรียกว่าเป็นไดเมอร์ (dimer) การจับเกาะที่เกิดขึ้นง่ายที่สุดคือการจับเกาะระหว่างไทมีน (thymine) ซึ่งทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) ดังรูปที่ 2.7 ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนในเส้นนิวคลีโอไทด์เส้นเดียวกันก็จะมีการขัดขวางไม่ให้ดีเอ็นเอแบ่งตัว ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนของเส้นตรงกันข้ามก็ทำให้คุณสมบัติในการจับคู่ของไทมีนกับอะดีนีน (thymine กับ adenine: T-A) เปลี่ยนไป ดังนั้นทำให้ไทมีนไปจับกับกัวนีนซึ่งจะยังผลให้ T-A เปลี่ยนไปเป็น C-G ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบทรานซิชั่น (transition) ส่วนไดเมอร์ชนิดอื่นๆที่พบคือไซโตซีนไดเมอร์ (cytosine dimer: C-C) เกิดขึ้นน้อยกว่าพวกแรก ไดเมอร์ชนิดนี้ก่อให้เกิดมิวเตชั่นโดยการที่ NH_2 ถูกขับออกไปจึงทำให้ได้ยูราซิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ไดเมอร์ (uracil dimer U-U) แต่ยูราซิลจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับไทมีน ดังนั้นจึงทำให้ G-C เปลี่ยนเป็น A-T



รูปที่ 2.7 การเกิดไทมีนไดเมอร์เนื่องจากผลของแสงอัลตราไวโอเลต การเกิดไทเมอร์แบบนี้จะขัดขวางการแบ่งตัวหรือการสร้างตัวแทนของ DNA และมีมิวเตชั่นเกิดขึ้นในที่สุด
ที่มา: Robert (1993)

ผลของแสงอัลตราไวโอเลตที่มีต่อสิ่งมีชีวิตก็คือ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครโมโซมและยีน (gene mutation) เช่นเดียวกับการใช้รังสีเอกซ์ แต่มีรายงานว่าในขนาดการใช้ที่อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนได้เท่ากันนั้น รังสีเอกซ์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมได้มากกว่า คุณสมบัติอีกประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลตก็คือ แสงที่มีช่วงคลื่นต่างกันจะมีผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
58914

ทางมิวเตชั่นไม่เท่ากัน ช่วงคลื่นที่มีผลในทางมิวเตชั่น คือ พวกที่ DNA สามารถดูดซับเอาไว้ได้มาก แสงอัลตราไวโอเลตไม่สามารถผ่านแก้วได้แต่สามารถทำลายสายตา (Gerald, 1973)

ผลของมิวเตชั่นจากการใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะสอดคล้องกับทฤษฎีการกระทบเป้า (target theory) ความสัมพันธุ์ระหว่างอัตราการใช้ (dosage) และอัตรามิวเตชั่นจะเป็นแบบเส้นตรง แต่จากการทดลองกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ปรากฏได้กราฟเส้นโค้งหลายๆแบบ เช่นนี้แล้วก็แสดงว่ามิวเตชั่นย่อมเกิดจากการกระทบกับเป้าหลายๆครั้ง ซึ่งการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นวิธีการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กับเชื้อรา (ชวนพิศ ดีเอกนามกุล, 2536) ซึ่งความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์จะใกล้เคียงกับการแผ่รังสีอัลตราไวโอเลต ความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถคำนวณได้จากอัตราการอยู่รอดของของจำนวนโคโลนีภายหลังจากการให้แสง ถ้าให้แสง-อัลตราไวโอเลตสูงขึ้นจะทำให้อัตราการกลายและอัตราการตายเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงให้อัตราการกลายพันธุ์สัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของจุลินทรีย์ภายหลังได้รับแสงอัลตราไวโอเลต (Gerald, 1973)

ผลอันน่าสนใจประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลตก็คือ การเกิด photoreactivation คือผลของการใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะหมดไป เมื่อให้เซลล์ถูกแสง (visible light) และได้มีการค้นพบถึงความผิดปกติที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายของแสงอัลตราไวโอเลต กล่าวคือแสงอัลตราไวโอเลตที่มองเห็นด้วยตาเปล่าสามารถทำให้เซลล์ถูกเปลี่ยนไปจากสภาพเดิมได้ (Gerald, 1973) ปรากฏการณ์เช่นนี้ได้มีการพบในแบคทีเรียและไวรัส ทั้งนี้เกิดจากการที่มีเอนไซม์บางชนิดเข้าไปตัดให้ไทมีนในไทมีนไดเมอร์แยกจากกัน และทำให้ DNA กลับคืนสู่สภาพเดิม การซ่อม DNA หรือการทำให้มิวเตชั่นเปลี่ยนกลับโดยขบวนการที่กล่าวมานี้จะเกิดได้ดีในแสงสีน้ำเงิน

อย่างไรก็ดียังมีการพบว่าใน *E.coli* นั้นอาจมีการขจัดไดเมอร์โดยวิธี dark reactivation ซึ่งหมายถึงว่าปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นโดยไม่ต้องการแสง (visible light) การขจัดแบบนี้พบว่าเกิดจากการที่มีเอนไซม์บางอย่างตัดไดเมอร์จาก DNA ทิ้งแล้วจะมีนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าไปแทนที่ในส่วนนั้น

การแสดงออกของยีนที่เกิดความล่าช้า เนื่องมาจากปัจจัยต่างๆหลายปัจจัยมีดังต่อไปนี้

1) การกลายพันธุ์ของยีนไม่สามารถเกิดได้ทันทีหลังจากได้รับแสงอัลตราไวโอเลต

2) ยีนที่จะกลายพันธุ์ต้องใช้เวลามากกว่าปกติเพื่อให้เกิด metabolic activity ก่อนที่จะเกิดการกลายพันธุ์ต่อไป

3) การแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์จะเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ

4) สิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

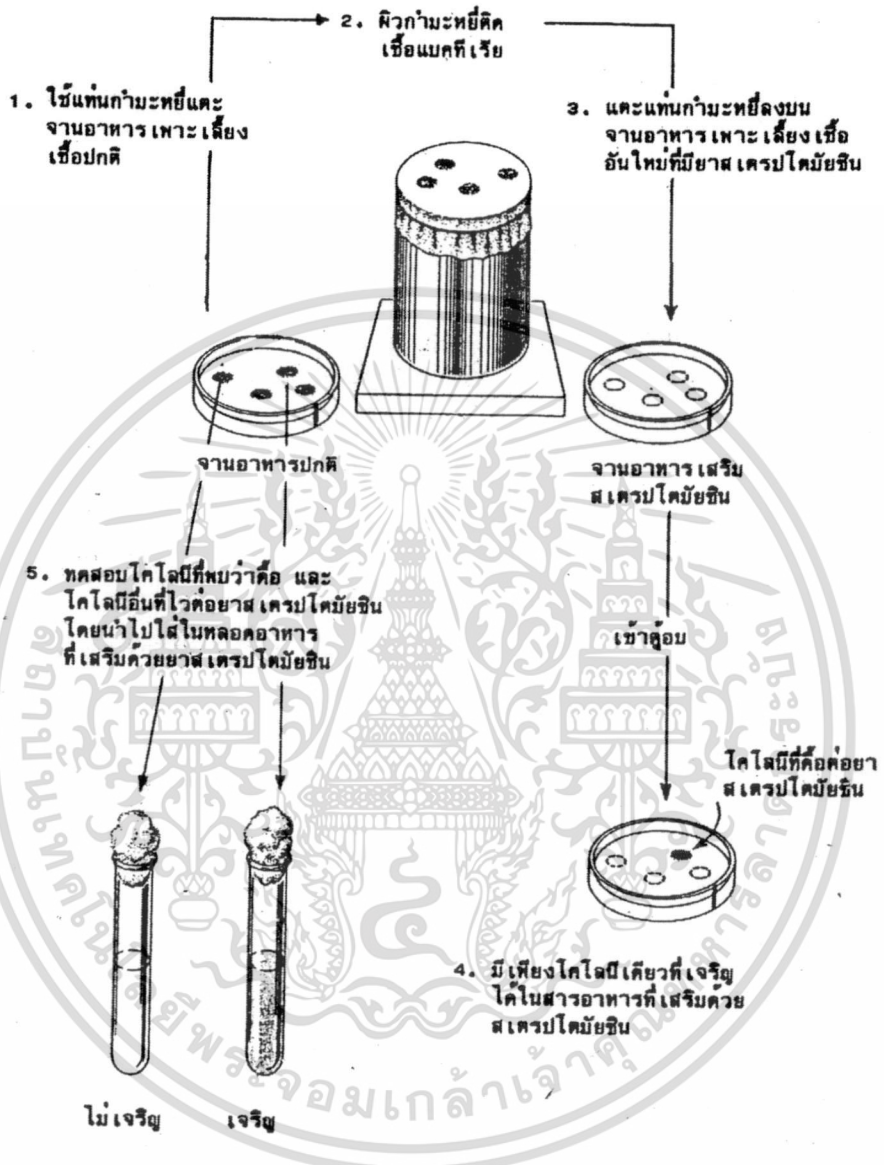
2.4.7 วิธีตรวจสอบมิวเตชั่น

วิธีเรพลิคาเพลดิง (replica plating) (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2533)

ได้มีการพัฒนาวิธีการศึกษาทดลองในแบคทีเรีย *E.coli* เพื่อแสดงว่ายีนมิวเตชั่นเกิดขึ้นเองเสมอตามสภาวะการณ์ธรรมชาติ เรียกว่าเรพลิคาเพลติง โดยใช้หลักการง่ายๆคือนำสารละลายเจือจางที่มีเซลล์แบคทีเรียจำนวนไม่มากนักใส่ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์แท้แล้วเอาเข้าตู้บ่มนานพอสมควรเพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแต่ละเซลล์เจริญแบ่งตัวจนได้โคโลนี จากนั้นใช้แท่นกลมหรือจานแก้วสะอาดขนาดใกล้เคียงกับจานเพาะเชื้อ โดยมีผ้ากำมะหยี่หุ้มอยู่ด้านหนึ่งเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวพิมพ์ ใช้แท่นผ้ากำมะหยี่แตะลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่หลายๆจาน ซึ่งแต่ละจานจะทำเครื่องหมายที่ตำแหน่งตรงกันกับจานอาหารเพาะเชื้อต้นแบบเสมอ จานอาหารบางจานมีอาหารปกติและบางจานเสริมด้วยยาสเตรปโตมัยซิน โดยวิธีการนี้จานอาหารที่เสริมด้วยยาสเตรปโตมัยซินไม่ควรมีเชื้อแบคทีเรียเจริญเป็นโคโลนีได้ แต่พบว่าจานอาหารบางจานที่เสริมด้วยยานี้มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเจริญได้ดี (รูปที่ 2.8) แสดงว่าโคโลนีแบคทีเรียนี้เป็นพันธุ์ที่มีความดื้อต่อยาสเตรปโตมัยซินทั้งๆที่ก่อนหน้านั้นเชื้อแบคทีเรียไม่เคยสัมผัสกับยานี้มาก่อนเลย กล่าวคือแบคทีเรียมีมิวแตนต์ที่ดื้อต่อยาสเตรปโตมัยซินเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและเซลล์แบคทีเรียที่กลายพันธุ์นี้มีโอกาสเจริญในสภาวะแวดล้อมของสารอาหารที่มียานี้จึงอยู่รอดได้และปรับตัวเจริญแพร่พันธุ์ต่อไปดีกว่าพวกอื่นๆที่ผิดปกติในส่วนของยีนดังกล่าว

เมื่อต้องการทดสอบฟีโนไทป์ของโคโลนีเดี่ยวจากการทำให้สายพันธุ์บริสุทธิ์หรือจากทรานสฟอร์มแมนต์ว่ามียีน marker ที่ถูกต้องหรือไม่จะนิยมใช้เทคนิคนี้โดยการเพาะเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็งบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารแตกต่างกันไป โดยให้ตำแหน่งที่ลงเชื้อบนอาหารแต่ละชนิดให้ตรงกันทุกๆจานเลี้ยงเชื้อ วิธีการนี้มีจานตั้งต้น (master plate) เป็นอาหาร complete medium ที่คัดเลือกโคโลนีไว้แล้ว ส่วนจานอื่นๆอาจเป็น complete medium ที่ผสมยาปฏิชีวนะในกรณีที่ต้องการตรวจสอบการดื้อยา หรือ minimal plate ที่ไม่มีสารอาหารที่จะเป็นในกรณีที่ต้องการตรวจสอบคุณสมบัติของออกโซโทรป เป็นต้น (ชื่นจิต บุญเฉิด, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 แสดงวิธีการทำเรพลิคาเพลติง เพื่อแสดงให้เห็นว่ายีนมิวเตชั่นเกิดขึ้นในสภาพธรรมชาติปกติ ในทีนี้แสดงให้เห็นเพียง 4 โคโลนีเท่านั้นเพื่อความสะดวก ความจริงแล้วในจานอาหารแต่ละจานจะมีโคโลนีของแบคทีเรียประมาณ 50-100 โคโลนี

ที่มา: วิสุทธิ์ ใบไม้ (2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.8 การซ่อมแซ่มดีเอ็นเอ (DNA repair) (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2543)

โมเลกุลของดีเอ็นเออาจเกิดการเสียหายหรือชำรุดได้หลายทาง ถ้าเสียหายมากมีผลต่อการดำรงชีวิต อย่างไรก็ตามในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีกลไกในการซ่อมแซมโมเลกุลดีเอ็นเอที่จะเสียหาย ให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ รูปแบบของการเสียหายของโมเลกุลของดีเอ็นเอที่พบบ่อยๆได้แก่

1) เกิดการแตกหักบนสายใดสายหนึ่งหรือทั้งสองสายของโมเลกุลของดีเอ็นเอ เนื่องจากการโค้งงอหรือบิด

2) เกิดการสูญเสียโมเลกุลของเบสไปจากโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสภายในเซลล์

3) เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสตัวหนึ่งหรือหลายๆตัวในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เนื่องจากสารเคมีเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว

4) สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ เช่น รังสีเอกซ์ แสงอัลตราไวโอเลต รังสีแกมมา สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติของเบสในนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอได้ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต ทำให้เกิดการจับกันของเบสไทมีนในสายเดียวกัน

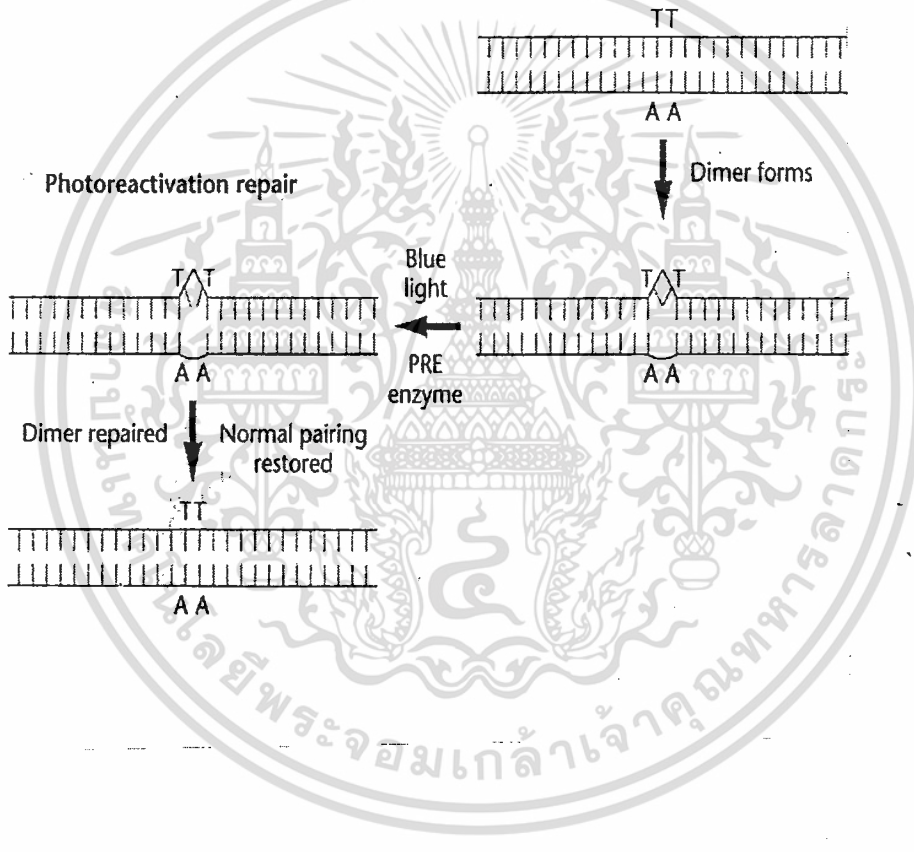
กลไกการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอ มีหลายวิธีดังนี้

1) โฟโตรีแอคติเวชั่น (photoreactivation) เป็นการซ่อมแซมความผิดปกติของโมเลกุลของดีเอ็นเอ เช่น ในกรณีที่เกิดไทมีนไดเมอร์เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งเกิดจากการเกาะกันของเบส T ในสายเดียวกันเป็นไซโคลบิวเทนริง (cyclobutane ring) โดยใช้เอนไซม์โฟโตรีแอคติเวติง (photoreactivating enzyme) หรือเอนไซม์ดีเอ็นเอโฟโตไลเอส (DNA photolyase) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้เริ่มต้นด้วย เอนไซม์ดีเอ็นเอโฟโตไลเอสจะเข้าไปเกาะที่ตำแหน่งที่เกิดไทมีนไดเมอร์และเอนไซม์นี้จะดูดซับแสงสว่าง (visible light) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เอนไซม์นี้เข้าทำลายไซโคลบิวเทนริงที่ยึดระหว่างเบสไทมีนด้วยกัน ทำให้เบสไทมีนสามารถไปเข้าคู่กับเบสอะดีนีนของสายตรงกันข้ามได้เหมือนเดิม หลังจากนั้นเอนไซม์ชนิดนี้ก็จะหลุดจากตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ผิดปกติ ก็จะได้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปกติเหมือนเดิม ดังรูปที่ 2.9

ในกรณีที่เกิดความผิดปกติของโมเลกุลของดีเอ็นเอเนื่องจากมีหมู่เมธิล (methyl group) เกินมาจากปกติที่ตำแหน่ง O^6 ของเบสกัวนิน (O^6methylguanine) ก็จะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอเธิลทรานสเฟอเรส (O^6-mGua DNA methyltransferase : O^6 -mGua) ทำหน้าที่กำจัดหมู่เมธิลที่เกินมาออกจากโมเลกุลของเบสกัวนิน ก็จะทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปกติเหมือนเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) เอกซ์ซิชั่นรีแพร์ (excision repair) เป็นกระบวนการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ผิดปกติทั่วๆไป โดยจะมีการตัดส่วนของดีเอ็นเอที่เสียหายหรือผิดปกติออกไปโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆและจะมีการเติมส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกต้องแทนส่วนที่ถูกตัดออกไปนี้ การซ่อมแซมดีเอ็นเอดังกล่าวนี้มีหลายแบบ เช่น การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เสียหายจากแสงอัลตราไวโอเลต เป็นต้น

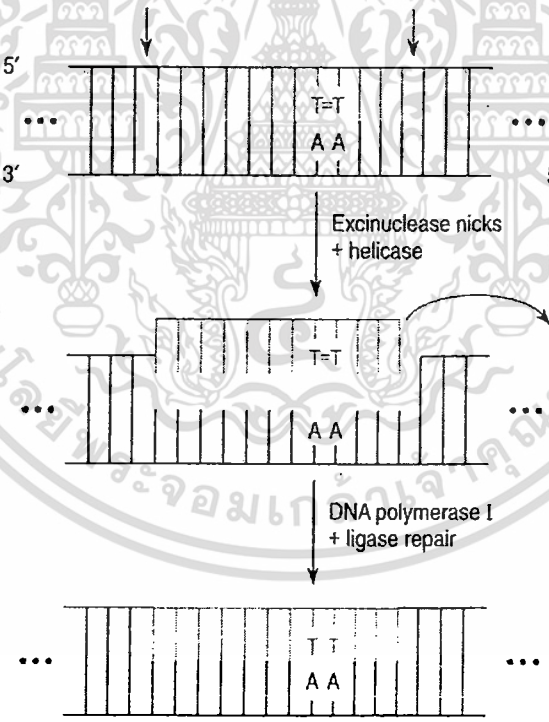


รูปที่ 2.9 การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยวิธีโฟโตรีแอคติเวชั่น (photoreactivation)
ที่มา: William (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.9 การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เสียหายจากแสงอัลตราไวโอเลต (UV damage repair)

เมื่อโมเลกุลของดีเอ็นเอได้รับแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดไทมินไดเมอร์ขึ้นภายในเวลา 1-2 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่มีการซ่อมแซมโดยวิธีโฟโตรีแอคติเวชั่นแล้ว การซ่อมแซ่มโมเลกุลของดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดไทมินไดเมอร์จะเกิดขึ้นโดยมีเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (endonuclease) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ย่อยอีก 3 ชนิด คือ A,B,C เอกซ์ซินิวคลีเอส (A B C excinuclease) ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยยีน uvr A, uvr B และ uvr C เอนไซม์ย่อยเหล่านี้จะทำหน้าตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 8 นับจากปลาย 5′ ของบริเวณที่เกิดไทมีนไดเมอร์และตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 4 นับจากปลาย 3′ ของบริเวณที่เกิดไทมีนไดเมอร์ จากนั้นจะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส 1 (DNA polymerase I) และไลเกส (ligase) ทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องตรงบริเวณช่องว่างที่ถูกตัดออกไปให้สมบรูณ์ ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 การซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ถูกทำลายโดยแสงอัลตราไวโอเลต

ที่มา: Robert (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anwar *et. al.*(1996) รายงานว่าสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Penicillum purpurogenum* P – 26 ก่อกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและการทรีตด้วยสาร N- methyl - N' – nitro – N- nitrosoquanidine โดยการใช้สปอร์อายุ 6 วัน ละลายในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต พีเอชเท่ากับ 6.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยมีจำนวนสปอร์ 10^6 – 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ก่อกลายพันธุ์โดยแสงอัลตราไวโอเลตให้มีอัตราการอยู่รอดประมาณร้อยละ 2–3 และทรีตด้วยสาร N- methyl - N' – nitro – N- nitrosoquanidine ให้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณร้อยละ 30 และคัดเลือกสายพันธุ์กลายนี้ต้านทาน catabolite repression

Steiner *et. al.* (1998) ได้แยกสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Penicillum purpurogenum* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเบต้า-ไซลาโลซิเดส โดยการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และนำสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดมาทรีตซ้ำด้วย N- methyl - N' – nitro – N- nitrosoquanidine โดยการใช้สปอร์ที่มีอายุ 7 วัน นำสปอร์ 2×10^7 สปอร์/มล. มาละลายในบัฟเฟอร์อะซิเตต พีเอช 5.5 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จากนั้นฉายแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ระยะระหว่างจากเพาะเชื้อและแหล่งกำเนิดแสง 18 ซม. ให้มีอัตราการอยู่รอดประมาณร้อยละ 0.1 และนำไปเลี้ยงในอาหาร PDA ที่มี trionx – 100ร้อยละ 0.1ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำไปทรีตด้วย ด้วย N- methyl - N' – nitro – N- nitrosoquanidine ความเข้มข้น 400 มก/มล. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 0.5 จากนั้นนำโคโลนีกลายพันธุ์ไปเลี้ยงในอาหาร Mandel's solution เพื่อดูอัตราของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้อัตราของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุด พบว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีไซเลนร้อยละ 0.75 ร่วมกับรำข้าวสาลีร้อยละ 0.25 สายพันธุ์กลายมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 124.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมผลิตได้ 67 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Fiedurek and Gromada (1997) ทำการชักนำการกลายพันธุ์เชื้อ *Aspergillus niger* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์คะตะเลสโดยใช้สารละลายสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมล. ทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและสาร nitroquanidine ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 พบว่าสามารถเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์คะตะเลสเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

Kuhad *et. al.* (1998) ก่อกลายพันธุ์เชื้อรา *Fusarium oxysporum* NTG-19 จากเชื้อราสายพันธุ์เดิมคือ *Fusarium oxysporum* DSM 841 โดยทำการก่อกลายพันธุ์ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและทรีตด้วย N- methyl - N' – nitro – N- nitrosoquanidine เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีประสิทธิภาพมากกว่าสายพันธุ์เดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

2.5.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์ การเป็นแหล่งพลังงานและการสังเคราะห์ของเซลล์ ซึ่งในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์นั้น จำเป็นต้องมีแหล่งคาร์บอนที่เป็นเฮมิเซลลูโลส เช่น ไซแลน เป็นต้น เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหนี่ยวนำให้เกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เช่น

Gasper *et. al.* (1997) ได้ศึกษาการผลิตไซลาโนไลติกเอนไซม์โดยเชื้อ *Penicillum caneseens* 10-10c พบว่าการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อใช้ถั่วเหลืองป่นหรือฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อใช้กลูโคส ไซโลส และกาแลคโทสนั้นจะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์

Alam *et. al.* (1994) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และศึกษาลักษณะของไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูงจากเชื้อ *Thermomyces langinosus* สายพันธุ์ RT 9 และ BJT9 และเปรียบเทียบกับเชื้อ *Thermoascus aurantiacus* โดยเลี้ยงบนอาหารที่มีลิกโนเซลลูโลสในสภาวะการหมักบนอาหารแข็ง พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดสามารถผลิตไซลาเนสโดยใช้รำข้าวสาลี เป็นสับสเตรทที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเชื้อ *T. langinosus* นั้นสามารถผลิตไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสปนได้ ส่วนเชื้อ *Thermoascus aurantiacus* นั้นมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเล็กน้อยไซแลนร้อยละ 0.7 ที่เติมลงในอาหารที่ใช้ในการบ่มนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตไซลาเนสในเชื้อ *T. langinosus* เพิ่มขึ้นร้อยละ 28.0

Kuhad *et. al.* (1998) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยสายพันธุ์กลายเชื้อ *Fusarium oxysporum* NTG–19 พบว่าการใช้เศษวัสดุเหลือทางการเกษตรและไซแลน รำข้าวสาลีร้อยละ 4 น้ำหนักต่อปริมาตร จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด จากการศึกษาการผลิตที่อุณหภูมิและที่ค่าพีเอชต่างๆ พบว่าอุณหภูมิและค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตคืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 3.0 - 3.5 และพบว่า ทวีน 80 และน้ำมันโอลีฟ ความเข้มข้นร้อยละ 1 จะเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ แต่ Steiner *et. al.* (1998) พบว่าการเติม ทวีน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 1 ไม่ได้กระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

Siedenberg *et. al.* (1998) พบว่าเชื้อรา *Aspergillus awamari* CBS 11.52 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นสับสเตรตนั้น มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเมื่อ เทียบกับการใช้ไซโลสเป็นสับสเตรท

Hoq and Decker (1995) เปรียบเทียบการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* สายพันธุ์ RT9 และ MH4 ในอาหารเหลวโดยแปรผันแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ทำให้เชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีกิจกรรมเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซลาเนสโดยมีค่ากิกรรมเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสเท่ากับ 2.6 และ 6.5 นาโนคะตาล/มล. ซึ่งสูงกว่าการใช้ไซแลน และรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน

Saha (2001) ใช้เชื้อรา *Fusarium oxysporum* NRRL 26518 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้ใยข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถใช้เส้นใยข้าวโพดได้ถึงร้อยละ 60 ในการผลิตไซลาเนสได้ 8 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในการเลี้ยงเชื้อระดับฟลาสก์ที่มีอาหาร 50 มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *Fusarium verticillioides* ที่ใช้ birchwood xylan เป็นสับสเตรต

Ufuk *et. al.* (2001) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* โดยการหมักในอาหารเหลวที่ใช้ซังข้าวโพดร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้มีค่ากิจรรมเอนไซม์ไซลาเนส สูงที่สุดเท่ากับ 2.81 ยูนิต/มล. ในวันที่ 5 ของการหมัก ซึ่งสูงกว่าการใช้รำข้าวสาลี เปลือกข้าวสาลี ถั่วเหลืองบดและไซแลนในสภาวะทดลองเดียวกัน

2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสารมารถในการนำไปใช้แตกต่างกัน เพื่อให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและสามารถมีผลผลิตเอนไซม์ที่สูง ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึงขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ เช่น

Rotto *et. al.* (1992) รายงานว่า *Bacillus circulan* VTT-E-87-305 สามารถใช้ไซแลนจากบีชเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุด ในการผลิตไซลาโนไลติกเอนไซม์

Hoq *et. al.* (1994) ใช้เชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* RT 9 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าการใช้แอมโมเนียมฟอสเฟต

Ufuk และคณะ (2001) พบว่าเชื้อ *Rhizopus oryzae* โดยการหมักในอาหารเหลวที่ใช้ซังข้าวโพดร้อยละ 3 ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนจากถั่วเหลืองบดร้อยละ 1 และแอมโมเนียม-ซัลเฟตร้อยละ 1 ของน้ำหนักโดยปริมาตร นั้นส่งเสริมการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดเท่ากับ 23.3 ยูนิต/มล. ในวันที่ 5 ของการหมัก และมีค่ามากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนจากอื่นๆ เช่น ยีสต์สกัดร้อยละ 1 ร่วมกับทริปโตนร้อยละ 1 เป็นต้น

Kohil *et. al.* (2001) มีรายงานว่าเชื้อ *Themoactinomyces thalophilus* มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 23.6 ยูนิต/มล. เมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการใช้ทริปโตนร้อยละ 0.1 น้ำหนักโดยปริมาตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในเวลา 96 ชั่วโมง

Smith and Wood (1991) ศึกษาผลของการแปรผันแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ยีสต์สกัด เปปโตน ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรต คาซีโตน (casitone) และน้ำแช่ข้าวโพด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(corn steep liquor) เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับเชื้อ *Aspergillus awamori* CMI 142717 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในระดับฟลาสก์ พบว่าคาซีโตน (casitone) นั้นส่งเสริมการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่สุด ซึ่งเท่ากับ 15.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.5.3 ค่าพีเอชเริ่มต้น

พีเอชที่เหมาะสมต่อสภาพการเจริญของจุลินทรีย์นั้นเป็นสิ่งสำคัญอีกปัจจัยหนึ่ง โดยที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความชอบต่างกัน เช่น จุลินทรีย์บางชนิดชอบสภาวะที่เป็นกรด บางชนิดชอบสภาวะที่เป็นด่าง ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมพีเอชให้เหมาะสมเพื่อให้เกิดผลผลิตสูงสุด เช่น

Kang *et. al.* (1996) พบว่าเชื้อรา *Cephalosporium sp.* RYM-202 เป็นราที่สามารถเจริญในสภาวะที่เป็นด่างได้ดี โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสระหว่าง 9.5 ถึง 10.0 เมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 7.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Hoq *et. al.* (1994) พบว่าเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* RT9 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยปราศจากเอนไซม์เซลูเลส ในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนและมีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นในช่วง 5.0 ถึง 8.0 พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 6.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อย

3.1.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัยเป็นเชื้อราในธรรมชาติจากจังหวัดชลบุรี ในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย ซึ่งผ่านการแยกเชื้อจนบริสุทธิ์และผ่านการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วว่าเป็นเชื้อรา *Aspergillus niger*.

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.3.1 อาหาร potato dextose agar (PDA) (ภาคผนวก ก)

3.1.3.2 อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์ (Xylan medium) ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก)

3.1.3.3 อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์ (Xylan medium) (เรวดี, 2547) ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว (ภาคผนวก ก)

3.1.3.4 อาหารสูตร Minimum medium (ภาคผนวก ก)

3.1.3.5 อาหารสูตร Complete medium (ภาคผนวก ก)

3.1.4 สารเคมี

กรดไฮดรอคลอริก (HCL)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

คาร์บอกซีเมลทิลเซลูโลส (CMC)

ไซแลน (oat spelt xylan)

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพแทสเซียมคลอไรด์(KCl)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)

เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)

โพแทสเซียมไดไฮดรอเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

ไดแอมโมเนียมไฮดรอเจรฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)

ซิงซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)

แมงกานีสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MnSO_4.7H_2O$)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

คองโกเรด

ยูเรีย (NH_4CONH_4)

น้ำแช่ข้าวโพด

กลูโคส

มอลโตส

เปปโตน

สารสกัดจากมอลล์

สารสกัดจากยีสต์

ทริปโตน

ผงวุ้น

3.2 อุปกรณ์

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน (Autoclave)

ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้

ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge)

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)

แท่งกวนสารแม่เหล็ก (magnetic bar)

จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร)

หลอดทดลอง (Test tube)

ตู้อบแห้ง (Hot air oven)

ไมโครปิเปตต์ (Micropipet)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

แผ่นกรองซิลเทอร์กลาส

เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.3 วิธีการ

3.3.1 การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ของเชื้อรา หลังจากทำการฉายแสงอัตราไวโอเลตที่ระยะเวลาต่างๆกัน

3.3.1.1 เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่แยกบริสุทธิ์แล้วจากดินในจังหวัดชลบุรี ในอาหารวุ้นเอียงเป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.3.1.2 เติมน้ำกลั่นทวีน 80 ร้อยละ 0.02 ลงในอาหารวุ้นเอียงที่มีเชื้อราเจริญอยู่ เพื่อเตรียมเป็นสารละลายสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.3 กำจัดเส้นใยเชื้อราออกโดยกรองสารละลายสปอร์ด้วยแผ่นกรองซิลเทอร์กลาส

3.3.1.4 ตรวจนับจำนวนสปอร์และเตรียมสารละลายสปอร์ให้มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (โดยใช้วิธีการนับด้วยไซโตมิเตอร์) ในน้ำกลั่นผสมทวีน 80 ร้อยละ 0.02

3.3.1.5 นำสารละลายสปอร์เข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่จานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อเพื่อนำมาฉายแสงอัลตราไวโอเลต และไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลตอย่างละหนึ่งชุด

3.3.1.6 เตรียมอุปกรณ์ฉายแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยวางเครื่องกวนสารให้ห่างจากหลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต ประมาณ 15 เซนติเมตร

3.3.1.7 วางจานเพาะเชื้อที่มีสปอร์ของเชื้อราที่ต้องการก่อกลายพันธุ์บนเครื่องกวนสาร ใส่แท่งกวนสารแม่เหล็กที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพาะเชื้อ ปรับความเร็วการหมุนของ Magnetic bar ช้าๆ

3.3.1.8 ฉายแสงอัลตราไวโอเลตให้กับสารละลายสปอร์ในจานเพาะเชื้อ โดยจับเวลาและเก็บสารละลายสปอร์ในแต่ละช่วงเวลาตั้งแต่ 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ทั้งชุดที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลตและไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต โดยดูดสารละลายสปอร์ 0.1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองหุ้มฟลอยด์ และเก็บไว้ในที่มืดนาน 3 ชั่วโมง

3.3.1.9 นำมาทำการเจือจางสารละลายสปอร์ที่ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ จากนั้นดูดสารละลายสปอร์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อเพื่อทำการ pour pate ด้วย complete medium (Demzin, 1986) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนับจำนวนโคโลนีและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (จากค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.2.2.8 เขียนกราฟระหว่างเวลาและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดได้ killing cure เพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายต่อไปโดยเลือกเวลาใดเวลาหนึ่งที่เหมาะสม สำหรับการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะใช้เวลาที่ทำให้เซลล์เริ่มต้นตายไป 90 เปอร์เซ็นต์ หรือมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 10 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

3.3.2.1 นำสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* จากดินในเขตภาพตะวันออก มาผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 3.5 นาที เก็บในที่มืดนาน 3 ชั่วโมง และ pour plate ด้วย complete medium บ่มนาน 2-3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.3.2.2 ใช้ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อลงบน minimal medium บ่ม นาน 2 วัน โดยโคโลนีที่ไม่สามารถเจริญใน minimal medium แสดงว่าเป็นสายพันธุ์กลาย

3.3.3 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากขนาดวงใสรอบโคโลนีในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง

3.3.3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการเลี้ยงเชื่อแบบอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก) ที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 7.0 และ 8.0

3..3.3.2 เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายที่ได้จากการคัดแยกได้ (จากข้อ 3.3.2.2) ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน จากนั้นนำคอร์กบอยเลอร์เจาะโคโลนีเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA นำไปวางตรงจุดกึ่งกลางอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส และนำไปบ่มที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการวัดขนาดโคโลนี

3.3.3.3 นำมาย้อมสีด้วยคองโกเรด ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 นาน 15 นาที และล้างออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 1 โมลาร์ นาน 10 นาที ทำการวัดขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อรา

3.3.3.4 คำนวณค่าอัตราส่วนของขนาดวงใสรอบขนาดโคโลนีกับขนาดของโคโลนี และเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์เดิมโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ วิธีการของ Duncan ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว

3.3.4.1 ใส่สารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารเหลว (ภาคผนวก ก) ที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนโดยบรรจุอาหารปริมาณ 70 มิลลิลิตรใน ฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับ 6.0 (Motenecourt and Eveligh, 1977) บ่มเชื้อเป็นเวลานาน 6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

3.3.4.2 เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากฟลาส์กที่เลี้ยงเชื้อราในวันที่ 2 ,3, 4, 5 และ 6 ของการเลี้ยงเชื้อมาแยกเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และนำมาวัดค่าพีเอช วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (Tang *et.al.,* 1987) และเอนไซม์เซลลูเลส (Mandels and Weber, 1969) (ภาคผนวก ข)

3.3.4.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติตามวิธีการของ Duncan ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่สูงสุด โดย 1 ยูนิต หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที

3.3.5 การศึกษาหาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

3.3.5.1 การศึกษาหาชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.4.3 ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวที่ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้แก่ ไซแลน ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และชานอ้อย ที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ให้มีขนาด 0.75 มิลลิเมตร โดยให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ กับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง (เรวดี, 2547) และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ วิธีการของ Duncan ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5.2 การศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

จากชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในข้อ 3.3.5.1 นำมาแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์กลาย โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ วิธีการของ Duncan ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.3.5.3 การศึกษาหาชนิดของแหล่งไนโตรเจน

3.3.5.3.1 แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับไดแอมโมเนียไฮโดเจนฟอสเฟต

เมื่อได้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากข้อ 3.3.5.1 และข้อ 3.3.5.2 จากนั้นแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้ไดแอมโนเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) 1.4 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ คือ เปปโตน มอลต์สกัด ยีสต์สกัดและน้ำแช่ข้าวโพด ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร และอาหารที่เติมเฉพาะไดแอมโนเนียมไฮดรอเจนฟอสเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร แล้ววิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ วิธีการของ Duncan ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.3.5.3.2 แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์

เมื่อได้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากข้อ 3.3.5.1 และข้อ 3.3.5.2 จากนั้นแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ คือ เปปโตน มอลต์กัด ยีสต์สกัดและน้ำแช่ข้าวโพด โดยกำหนดความเข้มข้นให้เท่ากันคือ 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ วิธีการของ Duncan ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.3.5.3 การศึกษาหาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

ศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้น โดยการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.1 3.3.5.2 และ 3.3.5.3 ตามลำดับ นำมาแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ วิธีการของ Duncan ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์เดิมและเชื้อราสายพันธุ์กลาย

จากการศึกษาหาชนิดของแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์กลายแล้ว นำมาเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ใช้อาหารเหลวสูตรเดิม(จากข้อ 3.1.3.3) ในการเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์เดิม โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ วิธีการของ Duncan ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (% survival) ของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus niger* จากดินในเขตภาคตะวันออก หลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลาต่างๆกัน

จากการทดลองฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ให้กับสปอร์ของเชื้อราที่ระยะเวลาต่างๆ และนำมาตรวจนับโคโลนีที่ขึ้นบน complete medium (ชุดทดลอง) เทียบกับจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่ไม่ผ่านการฉายแสง (ชุดควบคุม) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} โดยนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด พบว่าที่เวลา 3 นาที หลังจากได้รับแสงอัลตราไวโอเลต จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อรา *Aspergillus niger* ประมาณร้อยละ 12.18 และที่เวลา 5 นาที จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณร้อยละ 7.01 ดังตารางที่ 2 เมื่อพลอตกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดกับระยะเวลาที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเลตจากกราฟ killing curve ในรูปที่ 4.1 จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์เชื้อราจากเกาลัดหลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเลตเท่ากับร้อยละ 10 ที่เวลาประมาณ 3.5 นาที

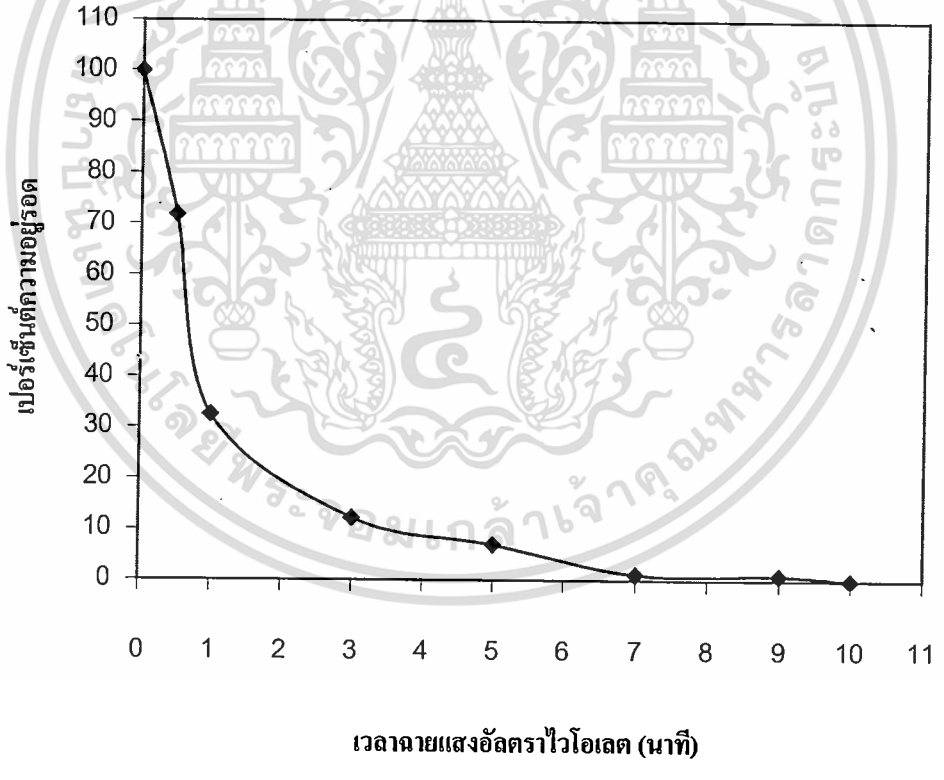
ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆในระดับความเจือจาง 10^{-4}

เวลา (นาที)	จำนวนโคโลนีของเชื้อรา ต่อมิลลิลิตร (X 10000)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)
0	60.33	100
0.5	43.33	71.82
1	19.67	32.60
3	7.35	12.18
5	4.23	7.01
7	1.20	2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1(ต่อ) แสดงจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆในระดับความเจือจาง 10^{-4}

เวลา (นาที)	จำนวนโคโลนีของเชื้อรา ต่อมิลลิลิตร (X 10000)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)
9	1	1.65
10	0	0
15	0	0



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus niger* หลังจากผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาที่ทำให้มีเปอร์เซ็นต์จากอยู่รอดเหลือร้อยละ 10

หลังจากการทดลองฉายแสงอัลตราไวโอเลตแก่สปอร์เชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายออกโซโทรฟ (auxotroph) ที่มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดร้อยละ 10 นำเชื้อรามาทดสอบการกลายพันธุ์โดยเลี้ยงเชื้อราใน complete medium บ่มนาน 2-3 วัน และย้ายเชื้อราโคโลนีต่อโคโลนี ลงใน minimal medium พบว่ามีสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ไม่สามารถเจริญบน minimal medium ได้จำนวน 18 สายพันธุ์ จากนั้นจึงนำสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus niger* มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะแบบอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งเพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อนำสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus niger* 18 สายพันธุ์ มาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสกับเชื้อราสายพันธุ์เดิมบนอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อราสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้บนอาหารแข็งและสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ทุกสายพันธุ์ แสดงได้ดังตารางที่ 4.1 4.2 และ 4.3 โดยที่พีเอชเท่ากับ 6 เชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายหมายเลข ML 3, ML 2, ML 241, ML 209, ML 115, ML 405, ML 217, ML 5,ML 201, ML 249, ML 13, และ ML 1 มีค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีมากกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายหมายเลข ML 1 ให้ค่าอัตราส่วนสูงสุดเท่ากับ 3.17 (ตารางที่ 4.2) ที่พีเอชเท่ากับ 7 เชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายML 3, 2, 254, 115, 217, 4051, 201, 13และ 249 มีค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีมากกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML 249 ให้ค่าอัตราส่วนสูงสุดเท่ากับ 4.66 (ตารางที่ 4.3) และที่พีเอชเท่ากับ 8 (ตารางที่ 4.3) เชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 209, 5, 115, 405, 217, 1, 13, 239 และ 249 มีค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีมากกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะเชื้อราสายพันธุ์กลายML 249 ให้ค่าอัตราส่วนสูงสุดเท่ากับ 3.61 (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงขนาดโคโลนี ขนาดวงใสรอบโคโลนีและค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งเพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสค่าพีเอชเท่ากับ 6 ที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

สายพันธุ์กลายของเชื้อราเกาลัด	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใส (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสต่อขนาดโคโลนี (ซม.)
สายพันธุ์เดิม	2.58	4.55	1.76^{defg}
ML 5	2.28	4.54	1.99^{d}
ML 241	2.76	5.00	1.81^{h}
ML 201	2.07	4.81	2.32^{c}
ML 223	2.87	5.02	1.74^{efg}
ML 254	2.71	4.55	1.67^{fgh}
ML 13	1.46	4.56	3.12^{a}
ML 412	2.41	3.53	1.46^{defg}
ML 405	2.40	4.69	1.95^{de}
ML 247	2.86	4.81	1.71^{gh}
ML 168	2.92	4.92	2.23^{fgh}
ML 239	2.83	4.72	1.66^{fgh}
ML 115	2.30	4.39	1.90^{def}
ML 249	1.67	4.32	2.58^{b}
ML 217	2.24	4.41	1.96^{de}
ML 209	2.26	4.13	1.82^{defg}
ML 1	1.44	4.57	3.17^{a}
ML 3	2.67	4.72	2.65^{b}
ML 2	2.64	4.75	1.79^{defg}

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซ็นต์ (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงขนาดโคโลนี ขนาดวงใสรอบโคโลนีและค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งเพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสค่าพีเอชเท่ากับ 7 ที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

สายพันธุ์กลายของเชื้อราเกาลัด	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใส (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่างวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนี (ซม.)
สายพันธุ์เดิม	2.36	4.64	1.96^{fg}
ML 5	1.51	2.11	1.39^{h}
ML 241	2.34	4.53	1.93^{fg}
ML 201	1.58	4.59	2.90^{b}
ML 223	2.47	4.62	1.86^{fg}
ML 254	2.16	4.41	2.04^{efg}
ML 13	1.41	4.77	3.38^{a}
ML 412	2.10	2.67	1.27^{h}
ML 405	2.04	4.84	2.37^{cd}
ML 247	2.38	4.54	1.90^{fg}
ML 168	2.28	4.41	1.93^{fg}
ML 239	2.22	3.75	1.68^{g}
ML 115	2.13	4.71	2.21^{cdef}
ML 249	1.38	3.64	2.60^{cd}
ML 217	2.14	4.81	2.24^{cd}
ML 209	2.23	4.14	1.85^{fg}
ML 1	1.66	4.72	2.84^{c}
ML 3	1.82	4.47	2.65^{cd}
ML 2	2.40	4.86	2.02^{def}

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซ็นต์ (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงขนาดโคโลนี ขนาดวงใสรอบโคโลนีและค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งเพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสค่าพีเอชเท่ากับ 8 ที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

สายพันธุ์กลายของเชื้อราเกาลัด	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใส (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนี (ซม.)
สายพันธุ์เดิม	2.14	4.62	2.15^{gh}
ML 5	1.91	4.20	2.19^{fgh}
ML 241	2.15	4.53	2.10^{hi}
ML 201	1.36	2.60	1.91^{j}
ML 223	1.95	4.01	2.05^{fg}
ML 254	2.13	4.53	2.12^{gh}
ML 13	1.60	4.69	2.93^{c}
ML 412	1.35	1.82	1.34^{k}
ML 405	1.71	4.11	2.40^{ef}
ML 247	2.06	4.08	1.98^{ig}
ML 168	2.10	4.07	1.93^{ig}
ML 239	1.11	3.39	3.05^{b}
ML 115	1.65	3.92	2.37^{ef}
ML 249	1.15	3.61	3.61^{a}
ML 217	1.69	4.15	2.45^{e}
ML 209	1.82	3.97	2.18^{defg}
ML 1	1.76	4.63	2.63^{d}
ML 3	2.06	4.37	2.30^{fg}
ML 2	2.16	4.12	1.90^{j}

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซ็นต์ (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว

เมื่อคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเชื้อราเกาลัดสายพันธุ์เดิม จำนวน 12 สายพันธุ์ ได้แก่ ML 1, 2, 3, 5, 13, 115, 201, 209, 217, 241, 249 และ 405 มาเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวสูตรปรับปรุง (เรวดี, 2547) ที่บรรจุอาหาร 70 มิลลิลิตรในฟลาก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ไซแลนร้อยละ 1 โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 6 วัน พบว่า เชื้อราสายพันธุ์กลายทั้งหมดสามารถเจริญได้ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวและเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสได้ โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML 3 จากกราฟที่ 4.2 โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 18.565 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพียงเท่ากับ 0.298 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากสายพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งเท่ากับ 13.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และผลิตเอนไซม์เซลูเลสเท่ากับ 0.248 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แสดงว่าเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอยู่ 1.41 เท่า โดยมีค่ากิจรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ใกล้เคียงกัน และสายพันธุ์กลาย ML 3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสมากว่าสายพันธุ์กลายตัวอื่นของการทดลองนี้ โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงได้ดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 บ่มนาน 5 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

เชื้อราเกาลัด	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมล.)
สายพันธุ์เดิม	13.11^{cd}
ML 1	16.148^{b}
ML 2	16.031^{b}
ML 3	18.565^{a}
ML 5	14.33^{bcd}
ML 13	16.178^{b}
ML 115	13.494^{cd}
ML 201	14.551^{bc}
ML 209	13.345^{bc}
ML 217	13.937^{bc}
ML 241	14.344^{bcd}
ML 249	12.485^{d}
ML 405	12.835^{cd}

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซ็นต์ (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

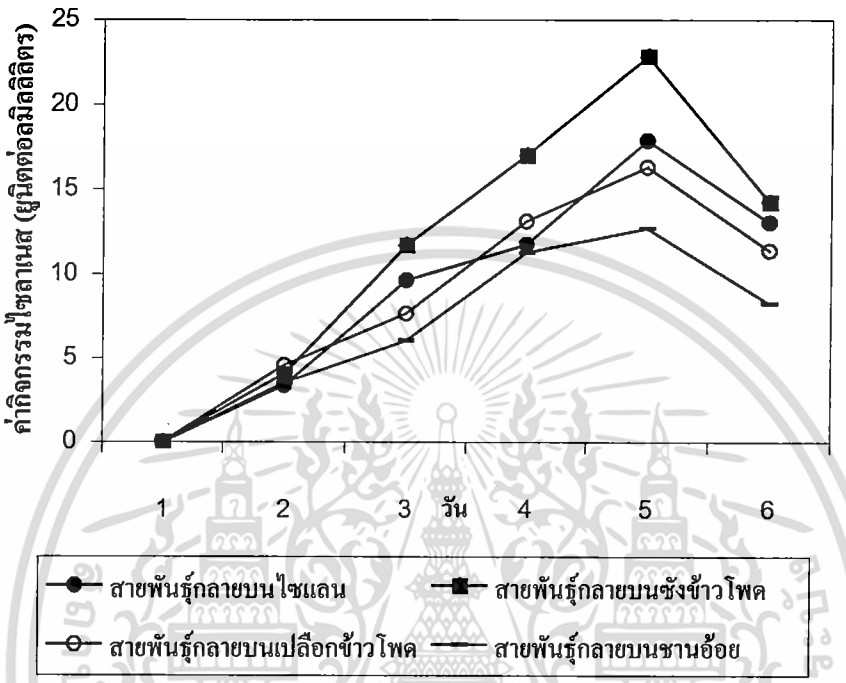
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การศึกษาหาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

4.6.1 ผลของการแปรผันชนิดแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML 3 และเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 70 มิลลิลิตร ที่มีการแปรผันชนิดแหล่งคาร์บอนโดยใช้ ไซแลน ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และ ชานอ้อยเป็นสับสเตรต โดยกำหนดความเข้มข้นเป็นร้อยละ 1 เท่ากัน พบว่าเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML 3 สามารถเจริญและเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสได้ในทุกสับสเตรต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต จะทำให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 22.865 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสได้ต่ำสุดเมื่อใช้ชานอ้อยเป็นสับสเตรตซึ่งเท่ากับ 12.717 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 14.292 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.052 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ไซแลนเป็นสับสเตรต ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารซังที่ข้าวโพดเป็นสับสเตรตเท่ากับ 17.728 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีเอนไซม์เซลูเลสสเท่ากับ 0.089 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นสับสเตรตนั้นมากกว่าและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสายพันธุ์ดั้งเดิมแสดงได้ดังรูปที่ 4.2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hoq and Deckwer (1995) ที่มีการใช้เชื้อ *Thermomyces lanuginosus* สายพันธุ์ RT9 และ MH4 ผลิตเอนไซม์ เบต้าไซโลซิเดส (β-xylosidase) ได้สูงสุดเท่ากับ 2.6 และ 6.5 n kat/ml ตามลำดับ โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไซแลนและรำข้าวสาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* พันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลาย ML 3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างกัน โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 เซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 6 วัน (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

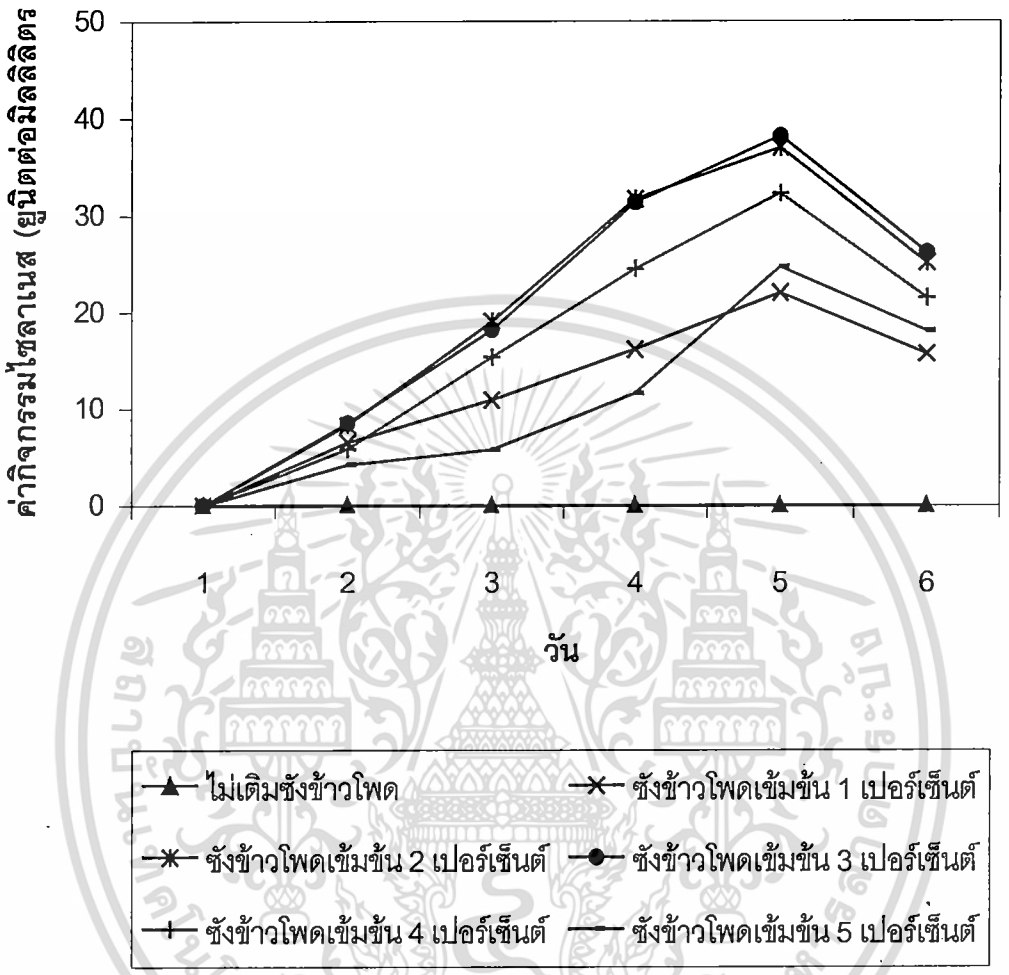
4.6.2 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต โดยแปรผันความเข้มข้นของซังข้าวโพดเป็นร้อยละ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 พบว่าที่ความเข้มข้นของซังข้าวโพดเป็นร้อยละ 3 นั้นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 38.211 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีกิจกรรมเอนไซม์เซลูเลสเท่ากับ 0.165 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และรองลงมาคืออาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเข้มข้นร้อยละ 2 มีกิจกรรมเอนไซม์เซลูเลสเท่ากับ 0.162 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 36.986 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าชุดเปรียบเทียบที่ใช้ราสายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารสูตรปรับปรุง (เรวดี, 2547) ซึ่งมีค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 20. 445 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเซลลูเลสเท่ากับ 0.144 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อาหารเหลวที่ไม่เติมซังข้าวโพดเป็นสับสเตรทนั้น เชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 สามารถเจริญได้เล็กน้อยและไม่มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ดังรูปที่ 4.3 เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่ากิจกรรมที่เกิดขึ้นในทางสถิติแล้วนั้น ที่ความเข้มข้นของซังข้าวโพดร้อยละ 2 และร้อยละ 3 นั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะเห็นได้ว่าถึงแม้สับเตรตจะใส่ในปริมาณมากเช่นการใช้ซังข้าวโพดร้อยละ 5 กิจกรรมเอนไซม์ก็เกือบไม่สูงขึ้นเลย อาจเป็นได้ว่าเกิดการมีสับสเตรตมากเกินไปจนขัดขวางการผลิตเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kuhad *et. al.*(1998) ที่ใช้ *Fusaruim oxysporum* ในการผลิตไซลาเนส ซึ่งสามารถผลิตไซลาเนสได้ดีเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรำข้าวสาลีร้อยละ 4 ของน้ำหนักโดยปริมาตร และมีกิจกรรมไซลาเนสน้อยสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นเป็นร้อยละ 5 ต่อน้ำหนักโดยปริมาตร และงานวิจัยของ Yang *et. al.*(1995) พบว่าเชื้อ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ V1-4 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากสุดเมื่อใช้ไซแลนจากต้นบริชร้อยละ 2 ของน้ำหนักต่อปริมาตร รองลงมาคือร้อยละ ของน้ำหนักต่อปริมาตร ดังนั้นจึงใช้อาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นสับสเตรตในการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML 3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวที่มีการแปรผันความเข้มข้นของซังข้าวโพด โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50 เซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 6 วัน (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.3 ผลของการแปรผันชนิดแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองที่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจนโดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์คือ มอลต์สกัด ยีสต์สกัด เปปโตน ทริปโตน น้ำแช่ข้าวโพด ที่ความเข้มข้น 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง และการใช้แหล่งไนโตรเจนจากไดแอมโมเนียมไดไฮดรอเจนฟอสเฟต 1.4 กรัมต่อลิตรร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่ความเข้มข้น 0.3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยใช้ซังข้าวโพด 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรทนั้น ได้ผลการทดลองว่าอาหารที่เติมเฉพาะทริปโตนนั้นช่วยส่งเสริมให้เชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 นั้นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 93.599 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.119 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองมาคืออาหารที่เติมเฉพาะเปปโตนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 90.008 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.106 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เติมไดแอมโมเนียมไฮดรอเจนฟอสเฟตร่วมกับไนโตรเจนจากอินทรีย์สาร จะเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ในอาหารที่เติมเฉพาะทริปโตน หรือเปปโตนเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งนั้น ส่งเสริมให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีกว่า อาจเนื่องมาจากการให้แหล่งไนโตรเจนที่มากเกินพอของไดแอมโมเนียมไฮดรอเจนฟอสเฟตร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์สารจนทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ ส่วนการใช้มอลต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองนี้นั้นทำให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสน้อยเท่ากับ 30.602 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.196 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าชุดเปรียบเทียบที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 44.926 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.413 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีงานวิจัยของ Kohli *et. al.* (2001) ได้ใช้ทริปโตนร้อยละ 0.1 ของน้ำหนักโดยปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดเมื่อเทียบกับ ยีสต์สกัด ถั่วเหลืองบด หรือเปปโตนจากเชื้อ *Themoacti nomuces thalophilus* Kuhad และคณะ (1998) พบว่าเชื้อ *Fusarium oxysporum* NTG-19 นั้นผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่สุดเมื่อใช้เปปโตนร้อยละ 1 ของน้ำหนักโดยปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจนเมื่อเทียบกับ ยีสต์สกัด แอมโนเนียมไนเตรต แอสพาราจีน (asparagine) เคซีน และ โพแทสเซียมไนเตรต ซึ่งจะเห็นได้ว่าแหล่งไนโตรเจนนั้นมีผลกระทบอย่างมากต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยที่แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จะส่งเสริมให้เชื้อนั้นสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เช่น การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus awamari* (Smith and Wood, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยมีซังข้าวโพดเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบเป็นเวลา 6 วัน

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมล.)
อาหารชุดเปรียบเทียบ	38.886^{h}
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร	41.362^{h}
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	78.631^{cd}
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร+ มอลต์สกัด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	39.812^{h}
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร+ ยูเรีย 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	71.411^{f}
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร+ ยีสต์สกัด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	75.586^{ef}
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร+ เปปโตน 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	74.678^{de}
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร+ น้ำแช่ข้าวโพด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	34.784^{l}
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร+ ทริปโตน 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	80.707^{c}
มอลต์สกัด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	30.602^{k}
ยูเรีย 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	74.792^{ef}
ยีสต์สกัด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	79.750^{c}
เปปโตน 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	90.008^{b}
น้ำแช่ข้าวโพด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	80.067^{c}
ทริปโตน 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	93.599^{a}

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซ็นต์ (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

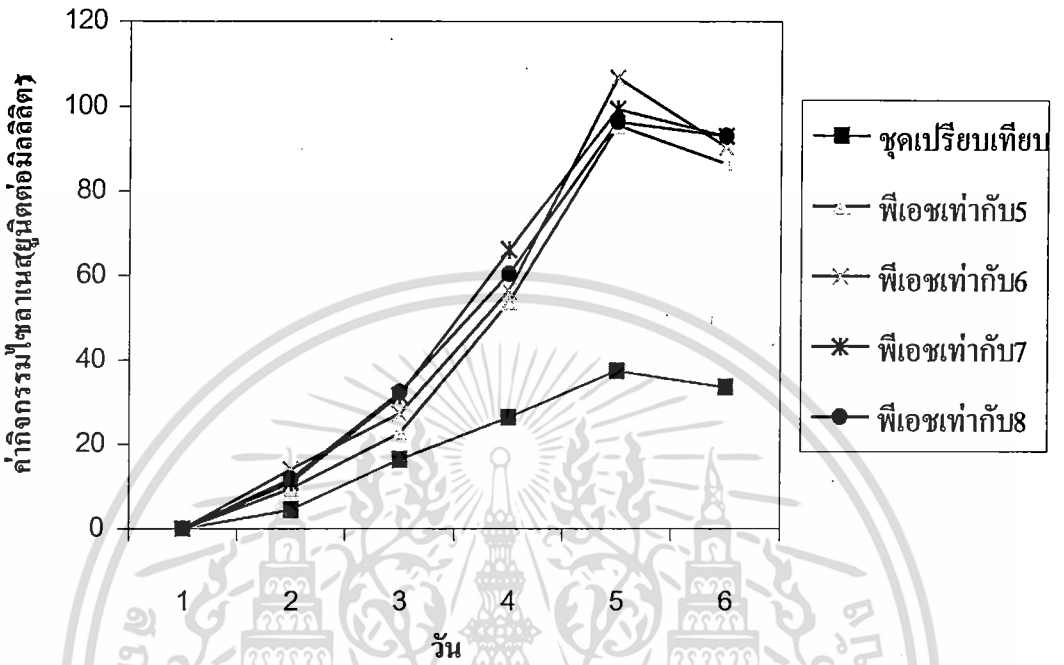
: ชุดอาหารเปรียบเทียบคืออาหารสูตรเรวดี (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.4 ค่าพีเอชเริ่มต้น

เมื่อทำการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อรารา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมีทริปโตน 0.3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น เมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เชื้อราสามารถเจริญได้ดีในพีเอช 5 6 7 และ 8 และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 7 8 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 106.755, 99.372, 96.444, และ 95.652 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเกิดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเพียงเล็กน้อย รูปที่ 4.6 แสดงกราฟค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่พีเอชเริ่มต้น โดยที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 มีค่าพีเอชเปลี่ยนไปเป็น 4.31 ในวันที่มีการผลิตเอนไซม์สูงที่สุด (วันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ) ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 มีค่าพีเอชที่เปลี่ยนไปเป็น 4.69 ในวันที่มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุด ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 มีค่าพีเอชที่เปลี่ยนไปเป็น 4.79 ในวันที่มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุด และที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 มีค่าพีเอชที่เปลี่ยนไปเป็น 4.17 ในวันที่มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุด ซึ่งเห็นได้ว่าค่าพีเอชนั้นค่อนข้างเป็นกรดอ่อน และมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าเชื้อนั้นสามารถเกิดกิจกรรมเอนไซม์ได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน โดยสภาวะที่มีค่าเป็นกรดระหว่างค่าพีเอชเท่ากับ 4.0-6.0 (Bajpai, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



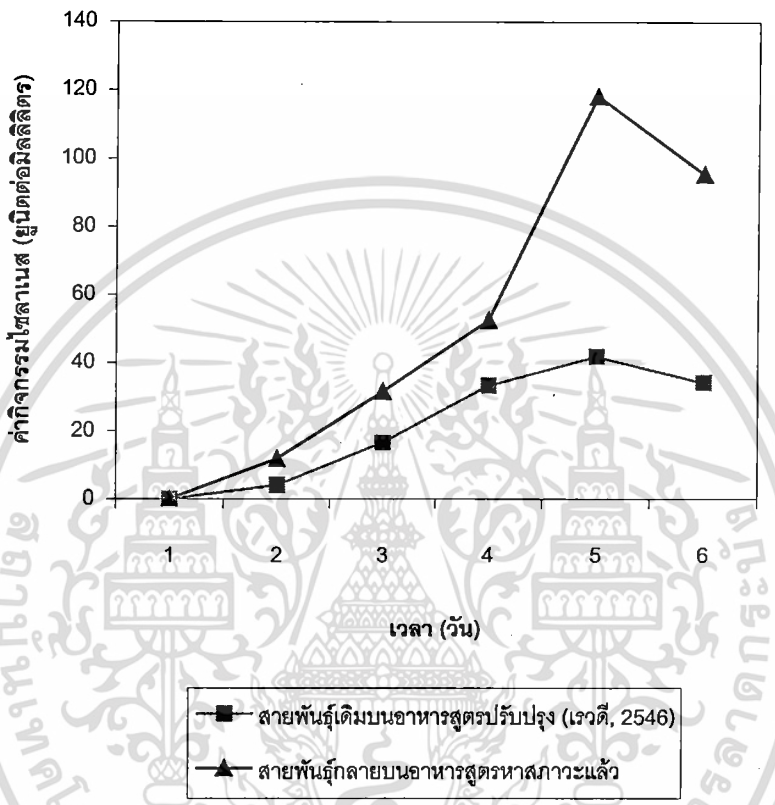
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML 3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวที่มีการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้น โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 6 วัน (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมและเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3

จากการทดลองเปรียบเทียบระหว่างเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์เดิมในอาหารเหลวสูตรปรับปรุง (เรวดี, 2547) กับเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 ที่เลี้ยงในอาหารที่ซังข้าวโพดร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน และ ทริปโตน 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 6 วัน พบว่า เชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 นั้นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อซังข้าวโพดสูงสุดที่วันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ มีค่ากิจรรมเท่ากับ 118.216 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.105 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่ากิจรรมเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าเชื้อราสายพันธุ์เดิมซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 41.899 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.111 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ดังรูปที่ 4.5 อาจแสดงได้ว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารสูตรนี้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าสายพันธุ์เดิมในอาหารสูตรปรับปรุง (เรวดี, 2547) เท่ากับ 2.82 เท่า สังเกตได้ว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อราสายพันธุ์เดิมนั้นมีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในการคัดเลือกเชื้อ อาจเกิดจากการแปรผันทางพันธุ์กรรมของเชื้อ ที่มีการต่อเชื้อและเก็บรักษาเชื้อที่ไม่เสถียร อาจส่งผลดีให้เชื้อมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีขึ้น เช่นเดียวกับเชื้อสายพันธุ์กลาย ML 3 ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นจากเดิมในสภาวะที่มีอาหารชนิดเดียวกับตอนคัดเลือกเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อราเกาลัดสายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารที่มีสภาวะเหมาะสมเทียบกับสายพันธุ์เดิมบนอาหารสูตรปรับปรุง (เรวดี, 2547) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50 เซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 6 วัน (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลงานวิจัย

จากผลการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ได้แยกจากธรรมชาติ เพื่อนำมาผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยทำการก่อกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต เพื่อให้สปอร์ที่เหลือร้อยละ 10 สปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* ใช้เวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 3.5 นาที โดยจุดประสงค์ของการคัดเลือกเวลาที่ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดร้อยละ 10 นั้นเพื่อให้ง่ายต่อการคัดเลือกเชื้อต่อไป และจากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ได้จากธรรมชาติ ในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 6, 7,และ 8 พบว่าเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ได้นั้น สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ทุกตัว โดยสังเกตได้จากการเกิดวงใสรอบโคโลนี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดการย่อยไซแลนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารแข็ง โดยที่พีเอชเท่ากับ 6 เชื้อราสายพันธุ์กลายจากเกาลัด ML 1 และ ML 13 มีค่าอัตราส่วนของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุด ที่พีเอชเท่ากับ 7 เชื้อราสายพันธุ์กลายของเกาลัด ML 13 มีค่าอัตราส่วนสูงสุด และที่พีเอชเท่ากับ 8 เชื้อราสายพันธุ์กลายของเกาลัด ML 249 มีค่าอัตราส่วนสูงสุด ซึ่งเห็นได้ว่าเชื้อราหลังจากผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาที่ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเพียงร้อยละ 10 แล้วนั้นได้สายพันธุ์กลายจำนวนน้อย อาจเนื่องจากในระหว่างการทดลองฉายแสงอัลตราไวโอเลตนั้น เชื้อราโดนแสงจึงทำให้จากเชื้อราสายพันธุ์กลาย เกิดการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ถูกแสงอัลตราไวโอเลตทำลายเบสบางตัวไปแล้ว เกิดการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยวิธีโฟโตรีแอคติเวชั่น (photoreactivation) (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2543) และจากการทดลองเพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ในการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นเป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น ดังนั้นเมื่อนำมาทดสอบในการเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวแล้วพบว่าเชื้อราสายพันธุ์กลายบางส่วนนั้นสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้น้อยกว่าเชื้อราสายพันธุ์เดิม จึงแสดงให้เห็นว่า การคัดเลือกโดยการเลี้ยงในสภาวะแบบอาหารแข็งนั้นไม่เพียงพอต่อการตัดสินเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด อาจได้เพียงแค่ศึกษาความสามารถที่จะมีการผลิตเอนไซม์ได้เท่านั้น เพราะเมื่อทำการคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวแล้วค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่ดีที่สุดคือพีเอชเท่ากับ 6 ส่วนในสภาวะการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และ 8 นั้นเชื้อเจริญได้แต่ผลิตไซลาเนสได้น้อยกว่า และมีจำนวนเชื้อราสายพันธุ์กลายเพียงเล็กน้อยที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีกว่าสายพันธุ์เดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML 3 นั้นสามารถที่จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่สุดในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 ซึ่งได้ดีกว่าสายพันธุ์เดิมเท่ากับ 1.41 เท่าในการขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อในสภาวะอาหารเหลว(เรวดี, 2547) และเมื่อทำการศึกษาหาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมแล้ว พบว่าการใช้ซังข้าวโพดเข้มข้นร้อยละ 2 ของน้ำหนักโดยปริมาตร ทริปโตน 0.3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร และค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 นั้นสามารถส่งเสริมค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* สายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเรวดี (2547) มากกว่าถึง 2.82 เท่า ดังนั้นผลจากการทดลองนี้จึงน่าจะใช้เป็นแนวทางเพื่อพัฒนาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายในระดับสูงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ชื่นจิตต์ บุญเฉิด. 2536. การทำ Replica plating. ใน วัฒนาวิทยาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง . อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ) หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. เทคนิคทางอณูพันธุ์ศาสตร์และพันธุ์วิศวกรรม เล่มที่ 1. น1.14-1.16. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

ชวนพิศ ดีเอกนามกุล. 2536. การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา. ในวัฒนาวิทยาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ) หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. เทคนิคทางอณูพันธุ์ศาสตร์และพันธุ์วิศวกรรม เล่มที่ 1. น.20-33. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธ์ศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น.237-260.

ประเสริฐ สันตินานาเลิศ. 2536 การทำการเกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัตราไวโอเลตใน วัฒนาวิทยาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ) หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. เทคนิคทางอณูพันธุ์ศาสตร์และพันธุ์วิศวกรรม เล่มที่ 1. น.5. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2535. พันธุ์ศาสตร์, ไทยวัฒนาพาณิชย์, กรุงเทพฯ. น. 212-241.

เรวดี ปรีบัว. 2546. การแยกและคัดเลือกเชื้อราจากดินในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิเชียร กิจปรีชาวนิช. วิเชียร สีสุข. อัญชริดา สวารชร และนภา โลห์ทอง. 2535. การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนจากวัสดุเหลือทิ้งจากเกษตรโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์, กรุงเทพฯ. 26: 196-305.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2533. พันธุ์ศาสตร์, เจ้าพระยาระบบการพิมพ์, กรุงเทพฯ. น.127-135.

สมรักษ์ พันธ์ผล. 2537. การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยี-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่,สงขลา.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2541. การแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในสภาพธรรมชาติเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส. ว.เทคโนโลยีสุรนารี. 5:น.138-146.

Anwar, H.N. Suto M. and Tomita F.. 1996. Isolation of mutant of *Penicillum purpurogenum* resistant to catabolite repression. App. Microbiol. Biotechnol. 45: 684-687.

Alam, M., Gomes I., Mohiuddin, G., and Hoq, M.M.. 1994. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. Enzyme Microb. Technol. 16:298-302.

Bajpai, P.. 1997. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. Advances in Appl. Microb. 43:141-194.

Beg, O.K., Kapoor, M., Mahajan L. and Hoondal, G.S.. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl. Microb and Biotechnol. 56: 326-338 .

Biely, B.. 1985. Microbiol xylanolytic system. Trends. Biotechnol. 3: 286-290 .

Biswas, S.R., Mishra A.K. and Nanda G.. 1988. Xylanase and β-xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. Biotechnol. Bioeng. 31: 613-616.

Dekker, R.L. and Richards, G.N.. 1976. Hemicellulose : Their occurrence purification, properties and mode of the action. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 32: 277-352.

Demzin, A.L. and Solomon, N.A.. 1986. Manual of Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbilology Washington, D.C. p.181.

Dietmar, H., Bern, N., Klaus, D.K., Walter, S. and Silvia, Z.. 1996. Production of fungal xylanases. Biores. Technol. 58:137-161 .

Enari, T.M.. 1983. Microbial cellulases. Applied Science Publishers, London and New York. pp. 183-223.

Fiedurek, J. and Gromada, A.. 1997. Selection of biochemical mutant of *Aspergillus niger* with enhanced catalase production. Appl. Microl. Biotechnol. 45:684-687.

Garg, A.P., Roberts, J.C., and McCarthy, A.. 1998. Bleach boosting effect of cellulase-free xylanase of *Steptomyces thermoviolaceus* and its comparison with two commercial enzyme preparations on birchwood kraft pulp. Enzyme Mirob Biotechnol 22: 594-598.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gargham, L.D., Haggett, K.D., Jennings, P.A., Le, Broque D.C., Whittaker, R.G. and Schober, P.A.. 1993. Random mutagenesis of the substrate-binding site of a serine protease can generate enzymes with increased activity and altered primary specificities. Biochem. 32: 6250-6258.

Gasper, A., Cosson, T. and Thonart, P.. 1997. Study on the production of a xylanolytic complex from *Penicillium cannessens* 10-10c. Appl. Microl. Biotechnol. 67:45-58.

Gerald, J. S.. 1973. Laboratory Exercise in Genetics. Macmilla Pulishing Co.' Inc. New York. Pp.183-198.

Haltrich, D., Laussamayer, B. and Steiner, W.. 1994. Xylanase formation by *Sclerotium rolfsii:* Effect of growth substrates and deverlopment of a culture medium using statically designed experiments. Appl. Microb and Biotechnol. 42: 522-530.

Hamzah, A., and Abdulrashid, M.. 1999. Charaaterization of xylanase produced by *Bacillus pumilis* strain PJ19. World J Microbiol Bitechnol. 9:157-162.

Herbert, D, Phipps, P.J., and Strange, R.E.. 1972. Chemical analysis of microbial cell. *In*: Norris JR, and Ribbon DW, editors. Methods in microbiology. Academic Press, New York. P.275-279.

Hoq, M.M. and Deckwer, W.D.. 1995. Cellulose-free xylanase by thermophilic fungi: a comparison of xylanase production by two *Thermomyces lanuginosus* strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 604-609.

Hoq, M.M., Hempel, C. and Deckwer, W.D.. 1994. Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9: Effect of agitation and medium components on production. J. Biotechnol. 37:49-58.

Iwamoto, T., Sasaki, T. and Inaoka, M.. 1973. Hemicellulase : Their occurrence, purification, properties and mode of action. Advance Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. 32 : 277-352.

Jeffries, T.W.. 1992. Enzmatic treatment of pulps. Emwerging Technologies for Material and Chemicals for Biomass. ACS Symp Ser. 476: 313-329.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kang, K.M., Maeng, J.P. and Rhee, H.Y. 1996. Purification and Characterization of two Xylanase from Alkalophilic *Cephalosporium sp.* Strain RYM-202. Appl. Environ. Microbiol. 62: 348-3482.

Keskar, S.S.. 1992. High activity xylanase from termotolelant *Streptomyces* T7 cultural condition and enzyme properties. 14:481-486.

Khanonguch, C., Asada, K., Tsuruga, H., Ooi, T., Kinoshita, S., and Lumyong S.. 1998. Beta-mannase and xylanase of *Bacillus subtilis* 5H active for biobleaching of curde pulp. J Ferment Bioeng. 86: 461-466.

Kohil, U., Nigam, P., Singh, D. and haudhary, K.. 2001. Thermostable, alkalopphilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. Enzyme Mirob Biotechnol. 28: 606-610.

Kormelink, F.J.M., Sarle-van Lee ween Wood, T.M. and Voragen, A.G.J.. 1993. Purification and characterization of three endo-(1,4)-β-xylanase and one β-xylosidase from *Aspergillus awamori*. J Biotechnol. 27: 1249-265.

Kuhad, R.C. and Singh, A.. 1995. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. *Critical Reviews* in Biotechnology. 12:413-435.

Kuhad R.C., Manchanda M. and Singh A. 1998. Optimization of xylanase peroduction by a hyperxylanolytic mutant strian of *Fusarium oxysporum*. Process Biochem. 6:641-647.

Kuhad, R.C. 1999. Lignocellulose biotechnology : Current and future prospects. *Critical Resviews* in Biotechnol. 13 : 151-172.

Lias, M. and Hoq, M.M.. 1998. Effectof agitation rate on the growth and production of xylanases free of cellulase by *Themomyces lanuginosus* MH4 in bioreactor. World J microbiol Biotechnol. 14:765-767.

Mandel, M. 1975. Microbial soures of cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp. 5:81-105.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mikhailova, R.V., Lobanok, A.G., Sapunova, L.I., Shishko, Zh. F. and Zendovich, I.E.. 1998. Selection of a Mutant Strain of *Aspergillus alliaceus* Producing Pectin Hydrolases. Appl. Biochem. Microbiol. 34: 77-80.

Miller, G.L.. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31: 426 –428.

Marques, S., Alves, L., Ribero, S. and Girio, F.M. 1998.. Characterization of a thermotolerlant and alkalotolerlant xylanase from a *Bacillus sp*. Appl. Biochem. Biotechnol. 73:159-172.

Moreau, A., Sharock, F., Kluepfel, D., and Morosolf, R.. 1994. Increase in catalytic activity and thermostability of Xyalanase A of *S. lividans* 1326 by site specific mutagenesis. Enzyme Microbiol Technol . 16: 420-424.

Nelson, N.. 1944. A photometric adaptation of the smugly method for the determination of glucose. J Bio Chem. 153:375-380.

Okeke, B.C. and Obi, S.K.C.. 1993. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an *Arthrographis* sp. World J Microbiol Biotechnol. 9:345-359.

Polsinelli, M. and Bertta, M.. 1996. Genetic recombination in crosses between *Streptomyces aureofaciens* and *S. rimosus*. J. Bacteriol. 91: 63-68.

Puchart, V., Katapodis, P. Biely, P. and Kremnicky, L.. 1999. Production of xylanase, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lagnuginosus*. 24: 355-361.

Rao, M., Khadikar, S. and Despande, V.. 1995. Chemical modification of xylanase from *Chainia sp*. (NCL 82.5.1). Bitechnol. Lett. 17: 589-592 .

Robert, H. T.. 1993. Molecular Genetics. Principle of Genetics, Boston University. pp.441-480.

Robert, J. B.. 1999. Gene mutation and repair. Genetics: Analysis and principles, University of Minnesota. pp.454-481.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rotto, M., Poutanen D. and Viikari L.. 1992. Production of xylanolytic enzymes by an alkalitolerlant *Bacillus circulans* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:470-473.

Saha, B.C.. 2001. Xylanase from a newly isolated *Fusarium verticilliodes* capable of utiliizg corn fiber xylan. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:762-766.

Samith, C.D. and Wood, M.T.. 1991. Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of a Medium and Optimization of the Fermentation Parameters for the Production of Extracellular Xylanase and β-xylosidase while Maintaining Low Protease Production. Biotechnol. Bioeng. 38:883-890.

Shoham, Y., Zosim, Z., and Rosenberg, E.. 1993. Parical decolourization of kraft pulp at high temperature and at high values with an extracellular xylanase from *Bacillus stearothermophilus*. J Biotechnol. 30: 123-131.

Siedenberg, D., Gerlach, R. S. Schugeri, K. Giuesppin, F. L. M. and Hunik, J.. 1998. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures. Proc Biochem. 4:429-433.

Srinivasan, M.C. and Rele, M.V.. 1995. Cellulose free xylanase from microoganisms and their applications to pupl and paper biotechnology: an overview. Indian J Microbiol. 35: 93-101.

Steiner, J., Carmona, P., Ponce, C., Berti, M. and Eyzaguirre, J.. 1998. Isolation of mutants of *Penicillum purpurogenum* with enhanced xylanase and β - xylosidase production. World J. Microbiol. Biotechnol. 14:589-590.

Sunna, A. and Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews* in Biotechnol. 17: 39-67.

Tang L.U.L., Yu E.K.C., Louis-Seize G.W. and Saddler J.W. 1987. Inexpensive, rapid procedure for bulk purification of cellulase-free beta, 1-4, D-xylanase for high specific activity. Biotechnol and Bioeng. 30:96-106.

Toyama, H. and Toyama, N.. 1990a. Genetic variants derived from auxotopolyploid strains of *Trichoderma reesei* QM 9414. Agric. Biol. Chem. 54(9): 51-53.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Toyama, H. and Toyama, N.. 1990b. Autopolypoid formation of *Trichoderma reesei* M 9414 by colchicine treatment. J. Ferment. Bioeng. 69(1): 51-53.

Ufuk, B., Sebnem, Y., Ferda, G. and Aysegul, E. 2001.. An endo-β-1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. Enzyme Microb Technol 7:328-334.

Viikari, L., Panua, M., Kantelinen, A., Sudquist, J. and Linko, M.. 1986. Proceeding of the Third International Conference on Biotecnology in the Pulp and Paper Industry, Stochholm. pp.67-69.

Viikari, L., Temkanen, M., Buchert, J. Rotto, M., Bailey, M., Siika-aho, M. and Linko, M.. 1993. Hemicellulose for industrail appication, pp. 113-182. *In* J.N. Sanddler and C.A.B. Wallingford. (eds.) Bioconversation of forest and agricultural plant residues. New York: International public.

William S.K.. 1997. Gene mutation, DNA repair and transposable elements. Concepts of Genetic, The college of New Jersey. pp.389-428.

Wong, K.K.Y. and Saddler, J.N.. 1988. Mulitiplicity of β-1,4-xylanase in microorganisms: functions and application. Microbiol. Rev. 52:305-317.

Wong, K.K.Y. and Saddler, J.N.. 1992. *Trichoderma* xylanase, their properties and application *Critical Reviews* in Biotechnol. 12: 413-435.

Yang, V. Zhuang, Z. Elegir, G. and Jeffries, T.W.. 1995. Alkaline-Active Xylanase Produced by Alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolasted from Kraft Pulp. J. Ind. Microbiol. 15: 434-441.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารที่ใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์และการเลี้ยงเชื้อ

ก. PDA medium

มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
เดซโทส (Dextose)	20	กรัมต่อลิตร
วุ้น	15	กรัมต่อลิตร

ข. Complete medium (Demzin, 1986)

มอลโตส (BHD)	40	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (Oxoid)	10	กรัมต่อลิตร
มอลล์สกัด (Oxoid)	24	กรัมต่อลิตร
วุ้น	20	กรัมต่อลิตร

ค. Minimal medium (Demzin, 1986)

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	3	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัมต่อลิตร
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮดรอเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (glucose)	40	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง. Minimal medium agar

ใส่วุ้น 18 กรัมต่อลิตร ใน minimal medium เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์

จ.อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Xylan medium

ส่วนที่ 1

โพแทสเซียมไดไฮดรอเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัมต่อลิตร
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$)	1.4	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.3	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์เฮปตะไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	0.3	กรัมต่อลิตร
ยูเรีย	0.3	กรัมต่อลิตร
โปรตีเอสเปปโตน	0.23	กรัมต่อลิตร
Yeast extrct	0.1	กรัมต่อลิตร

ส่วนที่ 2 แร่ธาตุผสม

เฟอรัสซัลเฟตเตตะไฮเดรต ($FeSO_4.5H_2O$)	5	กรัมต่อลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	1.40	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสเฮปตะไฮเดรต ($MnSO_4.7H_2O$)	4.56	กรัมต่อลิตร
คาร์บอเนตไดคลอไรด์ ($CoCl_2$)	2.0	กรัมต่อลิตร

ฉ. อาหารสูตรปรับปรุง (เรวดี, 2547)

ยูเรีย	0.3	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	0.25	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	0.05	กรัมต่อลิตร
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$)	1.4	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทวีน 80	0.2	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์เฮปตะไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	0.3	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MnSO_4.7H_2O$)	0.3	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮดรอเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัมต่อลิตร
ไซแลน	1	เปอร์เซ็นต์

วิธีการเตรียมอาหารสูตรต่างๆในการเก็บรักษาจุลินทรีย์และการเลี้ยงเชื้อ

ก. วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์ (PDA medium)

1. ชั่งอาหาร PDA ในสัดส่วนให้ได้ปริมาตรตามต้องการ
2. ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
3. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.0
4. บรรจุลงในหลอดฝาเกลียว
5. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
6. เอียงหลอดอาหารจนกระทั่งวุ้นแข็ง

ข. วิธีการเตรียมอาหาร complete medium

1. ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.0
3. เติมผงวุ้นลงและต้มจนวุ้นละลาย นำบรรจุลงในขวดอาหาร
4. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
5. เทลงในจานเพาะเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค. วิธีการเตรียมอาหาร minimal medium

1. ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.0
3. เติมผงวุ้นลงและต้มจนวุ้นละลาย นำบรรจุลงในขวดอาหาร
4. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
5. เทลงในจานเพาะเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อ

ง. วิธีการเตรียมอาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์

1. แบ่งอาหารออกเป็นสองส่วน โดยละลายสารทั้งหมดของส่วนที่ 1 (ยกเว้น$(NH_4)_2HPO_3$ และ $MgSO_4.7H_2O$) และส่วนที่ 2 (ยกเว้นไซแลน) เข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. นำส่วนที่ 2 ผสม 0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร ในส่วนแรกตามสัดส่วนที่กำหนดไว้
3. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล จากนั้นเติมไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ และเติมวุ้นลงไป
4. ต้มให้วุ้นละลาย แล้วเติม $MgSO_4.7H_2O$ (เพื่อป้องกันไม่ให้ Mg ไปจับทำให้เกิดตะกอน)
5. บรรจุลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
6. นำอาหารที่เตรียมไว้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
7. $(NH_4)_2HPO_4$ ที่แยกไว้นำไปกรองจุลินทรีย์ด้วยแผ่นกรองขนาด 0.25 ไมครอน
8. นำสารจากข้อ 6 ที่ได้พออุ่นๆให้นำไปผสมกับ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่กรองจุลินทรีย์แล้วตามสัดส่วนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์และการคำนวณ

1. การตรวจนับสปอร์ของเชื้อราโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)

1. เตรียมตัวอย่างที่จะตรวจนับถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมาตรวจนับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ละลายในน้ำกลั่นในปริมาตรที่ต้องการก่อน เช่น ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร (จะได้ความเจือจางเป็น 1: 10) หรืออาจต้องทำการเจือจางมากขึ้นในกรณีที่มีสปอร์จำนวณมาก เช่น เจือจางเป็น 1 : 100 หรือ 1: 1000 เท่า เป็นต้น

2. ปิเปตต์ตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงใน haemacytometer (ที่ปิดด้วย cover slip แล้ว) โดยใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดูดตัวอย่างมา 1-2 หยด และหยดลงด้านข้างของแผ่น cover slip

3. ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า (เลนส์ใกล้วัตถุ10X)

4. นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก หรือนับช่องใหญ่แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับและนำไปคูณด้วย 4×10^6 จะได้เป็นปริมาณสปอร์ต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตร

2. วิธีการคำนวณหาปริมาณสปอร์

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในตารางใหญ่มีค่าเท่ากับ 0.05 X 0.05 = 0.0025 ตร.มม.

ความลึกระหว่าง cover slip และตาราง (ผู้ผลิตจะกำหนดไว้) = 0.1 มม.

ดังนั้นปริมาตร 1 ช่องเล็ก จะมีค่า 0.0025 X 0.1 = 0.00025 ลบ.ซม.

ปริมาตร 0.00025 ลบ.ซม. มีจุลินทรีย์ Z เซลล์ (สปอร์)

ปริมาตร 1 ลบ.ซม. มีจุลินทรีย์ $= \frac{Z \times 1000}{0.0025}$

$= Z \times 4 \times 10^6$ เซลล์ต่อมล.

หรือเซลล์ต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. วิธีการคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ (จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

จำนวนจุลินทรีย์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) = จำนวนโคโลนีที่นับได้ X ระดับความเจือจาง

4. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของจุลินทรีย์หลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเลต

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{100(S)}{X}$$

โดยกำหนดให้

X = จำนวนจุลินทรีย์สายพันธุ์แท้ที่ไม่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต (ตัวควบคุม) ในแต่ละเวลาและความเจือจาง

S = จำนวนจุลินทรีย์ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตในแต่ละเวลาและความเจือจาง

5. การเปรียบเทียบหาอัตราการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์

$$\text{อัตราการใช้แหล่งคาร์บอน} = \frac{\text{ขนาดวงใสรอบโคโลนี}}{\text{ขนาดของโคโลนี}}$$

6. การเตรียมกราฟมาตราฐานของกลูโคสและไซโลส ในการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย (เปอร์เซ็นต์)

1. ไดไนโตรซาลิไซลิค แอสิค (DNS)	1
2. ฟีนอล	0.2
3. โซเดียมโพแทสเซียมทาเทรต (Rochelle salt)	20
4. โซเดียมซัลไฟด์ (Na_2SO_3)	0.05
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียม DNS ragent

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเติมสารละลายอื่นๆลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ บรรจุใส่ขวดสีชาและเก็บไว้ในที่มืด

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคสสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (CMCase)

1. เตรียม stock solution ของกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร (ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เป็น blank)

3. เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร

4. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบทำให้เย็นโดยใช้น้ำธรรมดา

5. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณกลูโคส ดังแสดงในรูปผนวกที่ ข1

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลสสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (Xylanase)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐานของกลูโคส แต่ใช้สารละลายไซโลสแทนกลูโคส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณไซโลสดังแสดงในรูปผนวกที่ ข2

7. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสตามวิธีของ Tang และคณะ (1987)

1. เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายไซแลนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร และต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที

3. ทำให้เย็นด้วยน้ำธรรมดา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เติมน้ำกลั่นปริมาณ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไซโลส

6. ทำชุดควบคุม โดยการนำเอนไซม์ไปต้มเดือดนาน 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลายไซแลน และเติม DNS reagent ลงทันที นำไปต้มแล้วทำตามวิธีข้างต้น

การคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส

$$\text{ยูนิตต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส X 1000 X จำนวนเท่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลไซโลส X ระยะเวลาบ่ม X ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

8. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandels และคณะ (1969)

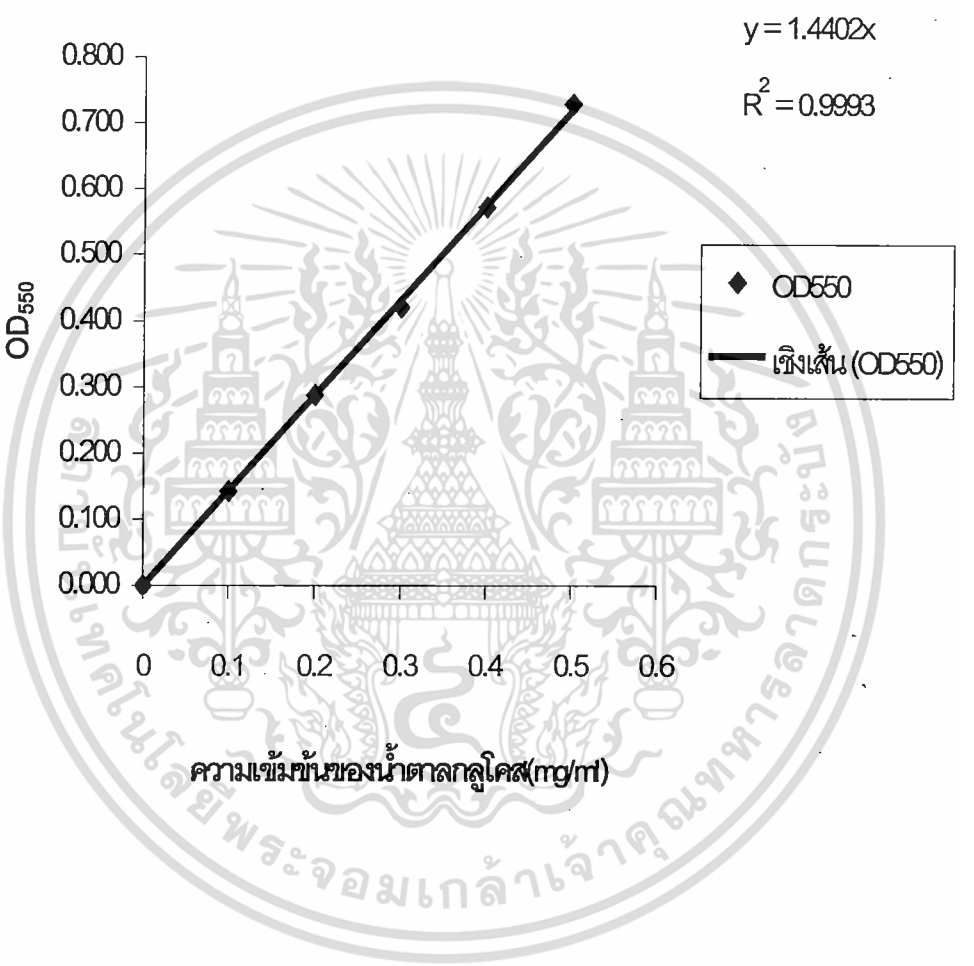
เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายคาร์บอกซิลเมททิลเซลลูโลส (CMC) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (ข้อ 7)

การคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

$$\text{ยูนิตต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของกลูโคส X 1000 X จำนวนเท่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส X ระยะเวลาบ่ม X ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

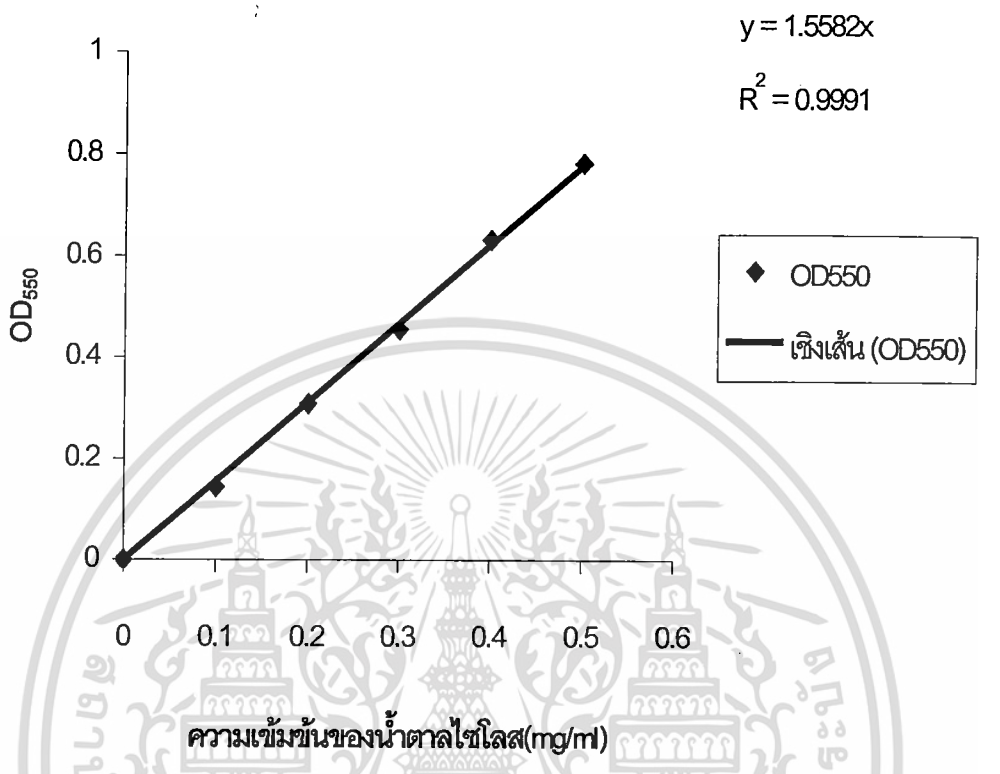
1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ค่าคำนวณและผลทางสถิติ

ตารางภาคผนวกค 1 แสดงค่าทางสถิติของอัตรส่วนระหว่างวงใสต่อขนาดโคโลนีเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายต่างๆที่อาหารแข็งไซแลนพีเอช 6.0 ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	N	Subset							
สายพันธุ์		1	2	3	4	5	6	7	8
412.	3	1.4600							
247	3	1.6233	1.6233						
239	3	1.6633	1.6633	1.6633					
254	3	1.6767	1.6767	1.6767					
168	3	1.6833	1.6833	1.6833					
223	3		1.7400	1.7400	1.7400				
เดิม	3		1.7600	1.7600	1.7600	1.7600			
2.00	3		1.7900	1.7900	1.7900	1.7900			
241	3		1.7967	1.7967	1.7967	1.7967			
209	3		1.8200	1.8200	1.8200	1.8200			
115	3			1.8900	1.8900	1.8900			
405	3				1.9533	1.9533			
217	3				1.9600	1.9600			
5	3					1.9833			
201	3						2.3467		
249	3							2.5800	
3	3							2.6533	
13	3								3.1167
1	3								3.1667
Sig.		.058	.111	.067	.073	.068	1.000	.480	.630

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 1.628E-02.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.; b Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกค 2 แสดงค่าทางสถิติของอัตรส่วนระหว่างวงใต่อขนาดโคโลนีเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายต่างๆที่อาหารแข็งไซแลนพีเอช 7.0 ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	N	Subset							
สายพันธุ์		1	2	3	4	5	6	7	8
412	3	1.2667							
5	3	1.3933							
239	3		1.6800						
209	3		1.8500	1.8500					
223	3		1.8667	1.8667					
247	3		1.9033	1.9033					
168	3		1.9267	1.9267					
241	3		1.9300	1.9300					
เดิม	3		1.9500	1.9500	1.9500				
254	3			2.0333	2.0333	2.0333			
2	3			2.1300	2.1300	2.1300	2.1300		
115	3				2.2067	2.2067	2.2067		
3	3					2.2333	2.2333		
217	3					2.2410	2.2410		
249	3					2.2600	2.2600		
405	3						2.3767		
1	2							2.7300	
201	3							2.8967	
13	3								3.3967
Sig.		.306	.061	.054	.061	.111	.083	.180	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 5.221E-02.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.923.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed. ;c Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกค 3 แสดงค่าทางสถิติของอัตรส่วนระหว่างวงใต่อขนาดโคโลนีเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายต่างๆที่อาหารแข็งไซแลนพีเอช 8.0 ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Duncan

	N	Subset											
สายพันธุ์		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
412	3	1.3467											
201	3		1.8967										
2	3		1.9000										
168	3		1.9300	1.9300									
247	3		1.9733	1.9733									
223	3			2.0533	2.0533								
241	3				2.1200	2.1200							
254	3				2.1267	2.1267							
เดิม	3				2.1500	2.1500							
209	3				2.1833	2.1833	2.1833						
5	3					2.1967	2.1967						
3	3						2.3033	2.3033					
115	3							2.3667	2.3667				
405	3							2.4000	2.4000				
217	3								2.4400				
1	3									2.6233			
13	3										2.9333		
239	3											3.0633	
249	3												3.6100
Sig.		1.000	.241	.052	.052	.252	.059	.126	.245	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 5.221E-02.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.923.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกด 4 แสดงค่าทางสถิติของอัตรส่วนระหว่างวงใต่อขนาดโคโลนีเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายต่างๆที่อาหารเหลวไซแลนพีเอช 6.0 ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Duncan

	N	Subset			
สายพันธุ์		1	2	3	4
ML 249	3	12.48467			
ML 405	3	12.83533	12.83533		
สายพันธุ์เดิม	3	13.11000	13.11000		
ML 209	3	13.34500	13.34500		
ML 115	3	13.49367	13.49367		
ML 217	3	13.93667	13.93667		
ML 5	3	14.33033	14.33033	14.33033	
ML 241	3	14.34400	14.34400	14.34400	
ML 201	3		14.55133	14.55133	
ML 2	3			16.03167	
ML 1	3			16.14867	
ML 13	3			16.17767	
ML 3	3				18.56533
Sig.		.054	.075	.051	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .968.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกค 5 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมไซลาเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML3 ในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารเหลวที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 6 วัน

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (ร้อยละ 1)	ค่ากิจกรรมไซลาเนส (ยูนิตต่อมล.)
ไซแลน	17.904[b]
ซังข้าวโพด	22.864[a]
เปลือกข้าวโพด	16.326[c]
ชานอ้อย	12.717[d]

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซ็นต์ (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางภาคผนวกค 6 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมไซลาเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML3 ในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารเหลวที่มีการแปรผันความเข้มข้นของซังข้าวโพด โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 6 วัน

ความเข้มข้นของซังข้าวโพด (ร้อยละ)	ค่ากิจกรรมไซลาเนส (ยูนิตต่อมล.)
0	0.007[e]
1	22.034[d]
2	36.986[a]
3	38.211[a]
4	32.303[b]
5	24.697[c]

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซ็นต์ (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกค 7 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมไซลาเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML3ในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารเหลวที่มีการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้น โดยมีซังข้าวโพดร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนและ ทริปโตน 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 6 วัน

ค่าพีเอชเริ่มต้น	ค่ากิจกรรมไซลาเนส (ยูนิตต่อมล.)
ชุดเปรียบเทียบ	37.462[c]
5	95.652[b]
6	96.444[a]
7	99.372[ab]
8	106.754[b]

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซ็นต์ (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

: ชุดเปรียบเทียบคืออาหารสูตรเรวดี (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้