

การชักนำให้เกิดสายพันธุ์กลายออกซิโทรปจากเชื้อ *Penicillium* sp.
เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส



นางสาวภัทราพร แสงสว่าง
นางสาวพัชรี จารุวัฒนชัยกุล
นายอธิพงษ์ สายหยุด

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2543

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 39881

วัน, เดือน, ปี 11 ก.ค. 2544

.b.....

.1.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Induction of auxotrophic mutants of *Penicillium* sp.
for xylanase production



A Special Project Submitted in Fulfilment of the Requirement
for the degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology, Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การชักนำให้เกิดสายพันธุ์กลายออกซิโทรปจากเชื้อ *Penicillium* sp.
เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

โดย นางสาวภัทราพร แสงสว่าง
นางสาวพัชรี จารุวัฒนชัยกุล
นายอริพงษ์ สายหยุด

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
ลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์บัณฑิต

.....
(ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

คณะกรรมการโครงการพิเศษ

.....
(รศ.ดร.พรณี จูฑากิจิต)

ประธานกรรมการ

.....
(ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์)

กรรมการ

.....
(ดร.สมชาย ไกรรักษ์)

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การชักนำให้เกิดสายพันธุ์กลายออกซิโทรปในเชื้อ <i>Penicillium</i> sp. เพื่อการผลิตเอนไซม์ไโซลานเอส		
นักศึกษา	นางสาวภัทราพร	แสงสว่าง	รหัส 39054336
	นางสาวพัชรี	จารุวัฒนชัยกุล	รหัส 40053051
	นายอริพงษ์	สายหยุด	รหัส 40053078
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบุญรณ์		
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
ปีการศึกษา	2543		

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับการศึกษาการก่อการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Penicillium* sp. ที่แยกได้จากสภาพธรรมชาติ ดังนั้นเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไโซลานเอสวิธีการหนึ่งคือทำให้เกิดการกลายโดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้สปอร์ของเชื้อ *Penicillium* sp. เริ่มต้นประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ความเจือจางของสปอร์เท่ากับ 10^{-1} - 10^{-5} เป็นเวลา 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ตามลำดับเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยบ่มเชื้อในอาหาร complete medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าสปอร์มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ที่ความเจือจาง 10^{-1} และ 10^{-2} เป็นเวลา 8 นาที และ 9 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำสปอร์ที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ที่ได้มาเพิ่มสัดส่วนสายพันธุ์กลายโดยวิธี nystatin enrichment ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตรของปริมาณอาหาร เป็นเวลา 15 นาที บ่มเชื้อด้วยอาหารเหลว minimal medium เขย่าฟลasks ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดสายพันธุ์แท้ (wild type) ออก แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร complete medium เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายด้วยวิธี replica plating โดยการใช้ไม้จิ้มฟัน จากนั้นนำมาทดสอบสายพันธุ์กลายที่ได้โดยบ่มเชื้อใน selective medium ที่มีกรดอะมิโนและสารต่าง ๆ ผลสมอยู่เพื่อหาคุณสมบัติของสายพันธุ์กลายที่ได้ ขั้นสุดท้ายทำการทดสอบการผลิตและกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเอสโดยบ่มเชื้อด้วยอาหารที่มีฟางข้าวและไซแลนเป็นองค์ประกอบ พบว่าอัตราส่วนโคโลนีต่อวงใสรอบโคโลนีของสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) มีค่ามากกว่าสายพันธุ์แท้

Special Project Title	Induction of auxotrophic mutants of <i>Penicillium</i> sp. of xylanase production	
Name	Miss Pattraporn	Sangswarn
	Miss Patcharee	Jaruwattanachaikul
	Mr.Atipong	Saiyud
Special Project Adviser	Assistant Professor Aree Rittiboon	
Department	Applied Biology	
Academic Year	2000	

Abstract

Mutagenesis of *Penicillium* sp. isolated from nature by using ultraviolet treatment (254 nm) was studied spore suspension of *Penicillium* sp. was prepared rising slants with tween-80 solution and exposing the suspension to ultraviolet for 30 min, and selection for condition obtaining 10% survival of the treated spores population was studied. The 10^{-1} and 10^{-2} dilutions of medium agar plates at 30 °C for 4-5 days followed by exposing to UV light for, respectively. The mutants were then enriched 10 U/ml nystatin for 15 minutes. The spores were then incubated medium agar plates in the same conditions for mutant screening, Replica plating by using toothpick was chosen for mutant selections. The mutants were tested by being medium supplemented with various amino acids and vitamins for detecting the properties of auxotroph mutants. Xylanase production was tested in each auxotroph by culturing it on agar plates containing complete medium supplemented with either xylan or straws, and it was found that auxotroph A1 was the best strain for producing xylanase in both xylan and straws as carbon sources.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งทำสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน

ขอขอบพระคุณผศ.อารี ฤทธิบุรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษา ระหว่างการค้นคว้าวิจัย ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง รวมถึงการตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณรศ.ดร.พรรณี สุริยาภิชาติ และดร.สมชาย ไกรรักษ์ ที่เป็นคณะกรรมการในโครงการพิเศษ และช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และทุกท่านที่มีได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงการพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นางสาวภัทราพร แสงสว่าง

นางสาวพัชรี จารุวัฒนชัยกุล

นายอิทธิพงษ์ สายหยุด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง	
การผลิตเยื่อกระดาษ	4
กระบวนการฟอกสี	6
คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาลเนส	12
การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส	14
แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส	15
ทวิน 80 (tween 80)	16
ไนสเตติน (nystatin)	16
การนำเอนไซม์ไซลาลเนสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม	17
มิวเตชัน	21
ชนิดของมิวเตชัน	22
สิ่งที่ทำให้เกิดมิวเตชัน	26
วิธีตรวจสอบยีนมิวเตชัน	32
การซ่อมแซม DNA	36
มิวเตชันกับการนำไปใช้	39

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 การวิจัยและดำเนินการ	
สารเคมี	41
อุปกรณ์	41
ขั้นตอนและวิธีการ	42
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	45
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	65
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก อาหารสูตรต่าง ๆ ในการเลี้ยงและการเก็บรักษาจุลินทรีย์	71
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์และการคำนวณ	78

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ตารางแสดงสารเคมีที่เป็นพิษที่เกิดจากกระบวนการผลิตเยื่อและกระบวนการฟอกสี
2	อัตราการเกิดยีนมิวเตชันตามสภาพธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ
3	แสดงจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ <i>Penicillium</i> sp. ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่าง ๆ ในระดับความเจือจาง 10^{-1}
4	แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>Penicillium</i> sp. หลังใช้สารไนสเตติน (nystatin) ที่ความเข้มข้น 10,20,30 และ 50 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่ความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เป็นเวลา 15 นาที
5	แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>Penicillium</i> sp. หลังใช้สารไนสเตติน ที่ความเข้มข้น 10,20,30 และ 50 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่ความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เป็นเวลา 30 นาที
6	แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>Penicillium</i> sp. หลังใช้สารไนสเตติน ที่ความเข้มข้น 10,20,30 และ 50 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่ความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เป็นเวลา 45 นาที
7	แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>Penicillium</i> sp. หลังใช้สารไนสเตติน ที่ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร
8	ผลการคัดเลือกเชื้อ
9	แสดงผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคลาเนสของสายพันธุ์แท้ กับเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) และเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) จากวงโคโลนีในอาหารที่มีไคเลนเป็นแหล่งคาร์บอน
10	แสดงผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคลาเนสของสายพันธุ์แท้ กับเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) และเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) จากวงโคโลนีในอาหารที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน
11	แสดงปริมาณความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ในการเตรียม stock solution และปริมาณที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สารอนุพันธ์ต่าง ๆ ที่เกิดจากการย่อยสลายโมเลกุลของลิกนิน	11
2	สูตรโครงสร้างของไนสเตติน	16
3	แสดงเปอร์เซ็นต์การยู่รอดของเชื้อ <i>Penicillium</i> sp. และเชื้อ <i>Aspergillus</i> sp.	19
4	มิวเตชันเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่ความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมและความหลากหลายของสปีชีส์ในกระบวนการวิวัฒนาการ	23
5	การเกิดไทมินไดเมอร์เนื่องจากผลของแสงอัลตราไวโอเลต การเกิดไดเมอร์แบบนี้จะขัดขวางการแบ่งตัวหรือการสร้างตัวแทนของ DNA และมีมิวเตชันเกิดขึ้นในที่สุด	29
6	แผนภาพวิธีการทำเรพลิคาเพลตติ้งเพื่อแสดงให้เห็นว่ายีนมิวเตชันเกิดขึ้นในสภาพธรรมชาติปกติ ในที่นี้แสดงให้เห็นเพียง 4 โคโลนีเท่านั้นเพื่อความสะดวก ความจริงแล้วในจานอาหารแต่ละจานจะมีโคโลนีของแบคทีเรียประมาณ 50-100 โคโลนี	33
7	วิธีการตรวจสอบมิวเตชันที่เกี่ยวข้องกับความต้องการชนิดของอาหารใน <i>Neurospora crassa</i>	35
8	การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยวิธีโฟโตรีแอคทีเวชัน	37
9	การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ถูกทำลายโดยแสงอัลตราไวโอเลต	38
10	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยู่รอดของเชื้อ <i>Penicillium</i> sp. ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเวลาต่าง ๆ ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}	46
11	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยู่รอดของเชื้อ <i>Penicillium</i> sp. โดยไนสเตตินที่ความเจือจาง 10^{-1} และ 10^{-2}	49
12	ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์แท่นอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน	52
13	ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) บนอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน	53
14	ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) บนอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน	54
15	ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์แท่นอาหารที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16	ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) บนอาหารที่มีฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน	56
17	ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) บนอาหารที่มีฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน	57
18	ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของสายพันธุ์แท้บนอาหารที่มีไซแลนหรือฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน	58
19	ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) บนอาหารที่มี ไซแลนหรือฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	59
20	ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) บนอาหารที่มี ไซแลนหรือฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	60
21	ลักษณะการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) บนอาหาร วุ้นเอียง	61
22	ลักษณะการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) บนอาหาร วุ้นเอียง	62

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษนับวันยิ่งมีความสำคัญมากขึ้น จากอดีตถึงปัจจุบัน ความต้องการใช้กระดาษมีปริมาณมากขึ้นทุก ๆ ปี ดังจะเห็นว่าปริมาณความต้องการกระดาษในปี 2540 เท่ากับ 3,635,600 ตัน (สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม, 2540) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่กำลังการผลิตภายในประเทศมีไม่เพียงพอ ทั้งนี้เพราะอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษต้องใช้เทคโนโลยีและการลงทุนค่อนข้างสูงและจำเป็นต้องมีวัตถุดิบปริมาณมากพอและสม่ำเสมอเพื่อป้อนเข้าโรงงาน เมื่อกำลังการผลิตภายในประเทศมีไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงมีการนำเข้าเยื่อกระดาษรวมทั้งเคมีภัณฑ์จากต่างประเทศ อุตสาหกรรมผลิตกระดาษนั้นอาจแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ การผลิตเยื่อ และการผลิตกระดาษ สำหรับขั้นตอนการผลิตเยื่อกระดาษนั้นประกอบด้วยกรรมวิธีการผลิตเยื่อ (pulping process) และการฟอกเยื่อ (bleaching) กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเส้นใยออกจากองค์ประกอบอื่น ๆ ของเนื้อไม้สามารถทำได้หลายวิธีทั้งทางวิธีเคมีและเชิงกล สำหรับขั้นตอนการฟอกเยื่อมีจุดประสงค์เพื่อกำจัดลิกนินออกไปซึ่งจะทำให้มีความขาวสว่างเพิ่มมากขึ้นโดยใช้สารเคมีกำจัดลิกนินในเนื้อไม้

โดยทั่วไปโรงงานผลิตกระดาษจะใช้สารเคมีเพียงครั้งเดียวจึงเป็นผลให้มีปริมาณมลภาวะที่สูงในกระบวนการฟอกสี ซึ่งอาจมีค่าบีโอดี 40 เปอร์เซนต์ ปริมาณของแข็งแขวนลอย 25 เปอร์เซนต์และสีที่เป็นมลพิษที่ออกมา 70 เปอร์เซนต์ ตัวเลขที่ออกมานี้จะขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัยรวมทั้งลำดับในการฟอกสี สภาพในการฟอกสี ชนิดของไม้และชนิดของกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ

โรงงานผลิตเยื่อกระดาษส่วนใหญ่มักใช้คลอรีนสำหรับการล้างหมึกพิมพ์และการฟอกสีกระดาษ เพราะคลอรีนเป็นสารเคมีที่มีราคาถูกแต่มีผลข้างเคียงที่อันตรายที่สุด โดยมีผลกระทบต่อร่างกายและเกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก ดังนั้นทางโรงงานจะต้องมีการควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ในขั้นตอนการผลิตเป็นอย่างดี ทั้งยังต้องมีการบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำให้ได้ตามมาตรฐานของกระทรวงอุตสาหกรรมที่กำหนดไว้

จากปัญหาดังกล่าวอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษอาจมีทางเลือกใหม่โดยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ปัจจุบันการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่สำคัญที่สุดคือใช้ในขั้นตอนการฟอกสี (prebleaching) ของเยื่อคราฟท์ ซึ่งเอนไซม์ไคลา-

เนสเป็นเอนไซม์ที่ให้ผลมากที่สุดในการฟอกสี โดยเอนไซม์ไซลาเนสได้มีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นในการเป็นตัวช่วยฟอกทางชีวภาพ (biobleaching agent) โดยนำมาใช้แทนสารเคมีเป็นพิษ เทคโนโลยีการฟอกสีด้วยเอนไซม์ไซลาเนสได้มีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ซึ่งประสบความสำเร็จในการนำไปใช้ในระดับการผลิตในชั้นอุตสาหกรรมในต้น ค.ศ. 1990 และเป็นครั้งแรกในโลกที่มีการนำเอนไซม์มาใช้ในกระบวนการผลิตกระดาษ (Pratima, 1999) ซึ่งการใช้เอนไซม์จะไปมีผลทำให้ขั้นตอนของการใช้สารเคมีสกัดแยกกลินินออกมานั้นสามารถเกิดได้ง่ายขึ้นและเป็นผลให้เยื่อที่ได้มีความขาวสว่างเพิ่มมากขึ้นเป็นการลดการใช้สารเคมีให้น้อยลงและยังช่วยลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

จากการศึกษาวิจัยพบว่าเชื้อ *Penicillium* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสซึ่งคิดว่าจะมีประโยชน์ในการฟอกสีกระดาษและประโยชน์ด้านอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมการทำน้ำผลไม้โดยเอนไซม์ทำให้น้ำผลไม้ใส อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เป็นต้น ดังนั้นโครงการนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องโดยทำการศึกษานหาสภาวะการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มปริมาณและประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเพื่อที่จะนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในโรงงานอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อ *Penicillium* sp. โดยวิธีการฉายแสงอัลตราไวโอเลต
2. เพื่อศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เป็นออซิโทรฟิกส์มิวแทนต์ (auxotrophic mutant)
3. นำสายพันธุ์ออซิโทรฟิกส์มิวแทนต์ มาทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเปรียบเทียบกับสายพันธุ์แท้
4. เพื่อศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์แท้และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการทดลอง

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. ศึกษาการก่อกลายพันธุ์โดยวิธีการฉายแสงอัลตราไวโอเลต
2. คัดเลือกเชื้อที่เป็นออซิโทรฟิกส์มิวแทนต์
3. นำเชื้อสายพันธุ์กลายมาผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เพื่อศึกษากายภาพในการผลิตเอนไซม์โดยใช้ฟางข้าวหรือไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน
4. ศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราสายพันธุ์แท้และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีการใช้แสงอัลตราไวโอเลตและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยวิธี auxotrophism
2. อาจจะได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผ่านการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้สูงขึ้น



บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

การผลิตเยื่อกระดาษ

การผลิตเยื่อกระดาษมีหลายวิธี การที่จะใช้วิธีใดนั้นขึ้นกับว่าเยื่อกระดาษที่ได้จะนำไปทำกระดาษชนิดใด นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับชนิดไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ กรรมวิธีที่ใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษ แบ่งตามกรรมวิธีใหญ่ ๆ ดังนี้

1. **กรรมวิธีใช้กำลังกล (mechanical process)** วิธีใช้แรงอัด อัดท่อนไม้ที่ปลอกเปลือกแล้วให้สัมผัสหินบด (grinding stone) ซึ่งผิวหน้าของหินบดมีลักษณะมีคม เช่นเดียวกับหินลับมีด ไม้จะถูกบดออกมาเป็นชิ้นเล็ก ๆ เครื่องจักรที่ใช้ผลิตเยื่อชนิดนี้ เรียกว่า เครื่องบด (grinder) เนื่องจากขณะที่ไม้ถูกฝนอยู่นั้นจะมีความร้อนจากการเสียดทานเกิดขึ้น อุณหภูมิ 60 – 80 องศาเซลเซียส จึงจำเป็นต้องพ่นน้ำให้เป็นละอองอยู่ตลอดเวลา และส่วนหนึ่งของหินบดจะหล่ออยู่ในอ่างน้ำ เยื่อที่ถูกบดออกมาจะอยู่ในอ่างนี้ และจะถูกกระบายออกจากอ่างน้ำตลอดเวลา การผลิตเยื่อโดยวิธีนี้ให้ผลผลิตสูงมากถึง 90 – 95 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักไม้ที่เป็นวัตถุดิบ แต่คุณสมบัติของกระดาษที่ได้จากการผลิตเยื่อกระดาษวิธีนี้มีคุณภาพต่ำ จึงใช้เป็นส่วนผสมในการทำกระดาษบางประเภทจะให้คุณสมบัติด้านทึบแสง เส้นใยเดี่ยวซึ่งไม่ค่อยสมบูรณ์อาจมีการฉีกขาดและยังคงมีลิกนินตกค้างอยู่มากทำให้พันธะระหว่างเส้นใยต่ำไม่เหมาะที่จะนำไปทำกระดาษที่ต้องรับแรงดึงสูงแต่มีราคาถูก เช่น กระดาษห่อของ กล่องใส่ของ ซึ่งไม่มีความจำเป็นต้องเก็บไว้นาน ๆ

2. **กรรมวิธีทางเคมี (chemical process)** วิธีนี้ใช้สารเคมีบางชนิดละลายลิกนินที่ทำหน้าที่เป็นกาวยึดเซลล์ของไม้เข้าด้วยกัน ทำให้แต่ละเซลล์ของไม้ก็แยกหลุดออกจากกัน กรรมวิธีทางเคมีนี้แบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

2.1 **กรรมวิธีซัลไฟต์ (sulphite process)** กรรมวิธีนี้เกิดขึ้นครั้งแรกในยุโรป เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้ เรียกว่า เยื่อกระดาษซัลไฟต์ (sulphite pulp) สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำยา ได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ นำมาละลายในน้ำที่มีด่างบางตัวละลายอยู่ เบสที่ใช้ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม แอมโมเนียม หรือโซเดียม ซึ่งซัลเฟอร์ไดออกไซด์ละลายอยู่ในน้ำในสภาพ

กรดซัลฟิวรัส การใช้ต่างแต่ละตัวค่าพีเอชของน้ำยาที่ได้จะแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้พีเอชของน้ำยาที่ต้องการจึงจำเป็นต้องเลือกต่างที่เหมาะสม ในการย่อยกระดาษนั้นขึ้นไม้จะถูกลำเลียงลงสู่ถังย่อยพร้อมด้วยน้ำยาสำหรับย่อย จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 – 10 ชั่วโมง แล้วแต่ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ วิธีการต้มและชนิดของถังย่อย ลิกนินในไม้จะรวมกับไฮโดรเจนซัลไฟด์เกิดเป็นลิกโนซัลเฟอร์เนท ซึ่งละลายน้ำได้ จึงทำให้ไฟเบอร์ของไม้แยกหลุดออกจากกันเป็นชิ้นไม้ เมื่อถูกย่อยดีแล้วน้ำยาจะถูกระบายออกจากถังย่อยและบางครั้งยังสามารถนำกลับไปใช้ได้ อีก สำหรับชิ้นไม้จะถูกระบายออกจากถังย่อย

การร่อนเยื่อ (screening) ชิ้นไม้ที่ย่อยแล้วจะถูกล้างด้วยน้ำเพื่อเอาน้ำยาออก และกรองด้วยตะแกรงแบบต่าง ๆ เพื่อเอาส่วนที่เป็นตาไม้ซึ่งไม่ถูกย่อย หรือสิ่งสกปรกต่าง ๆ ออกจากการทำหลายขั้นตอนด้วยกันเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสิ่งสกปรกเจือปนอยู่ เยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีซัลไฟด์มีสีค่อนข้างจางเกือบเป็นสีขาว สามารถนำไปทำกระดาษบางประเภทได้เลย เช่น กระดาษหนังสือพิมพ์รายวัน รายปักษ์ โดยเฉพาะเยื่อกระดาษที่ทำจากไม้ที่มียางได้แก่ ไม้สน สำหรับคุณสมบัติของเยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีอื่นก็คือ เมื่อนำไปทำกระดาษแล้วให้ความแข็งแรงกว่าเยื่อกระดาษที่ได้จากวิธีกล แต่ผลผลิตที่ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักไม้ที่ใช้

2.2 กรรมวิธีซัลเฟต (sulphate process) หรือเรียกอีกอย่างว่า กรรมวิธีคราฟท์ (kraft process) การที่เรียกอย่างนี้เพราะว่าในการที่เอาโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำยาที่ใช้แล้วกลับมาใช้อีกจะต้องเติมโซเดียมซัลเฟตลงไปจึงเรียกกรรมวิธีนี้ว่า กรรมวิธีซัลเฟต หรือเนื่องจากว่าเยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีนี้มีลักษณะเหนียวแข็งแรง สารเคมีที่ใช้สำหรับกรรมวิธีนี้คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์กับโซเดียมซัลไฟด์เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้อาจมีโซเดียมคาร์บอเนตและโซเดียมซัลเฟตบ้างเล็กน้อย การย่อยเยื่อกระดาษทำในถังย่อยเช่นเดียวกับวิธีซัลไฟด์ อุณหภูมิที่ใช้ 170 องศาเซลเซียส เวลา 3 – 4 ชั่วโมง กรรมวิธีนี้ใช้ได้กับเยื่อไม้ทุกชนิดทั้งไม้สนและไม้เนื้อแข็ง เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้จะมีลักษณะสีคล้ำ แต่เหนียว สามารถนำไปใช้ทำกระดาษที่ต้องการความแข็งแรงมาก ๆ ได้ดี เช่น ถุงกระดาษใส่ซีเมนต์ ปุ๋ย ถุงใส่ของ กล่องกระดาษ ส่วนสีสามารถทำให้ขาวได้โดยการฟอกสี

2.3 กรรมวิธีโซดา (soda process) เป็นกรรมวิธีทางเคมีวิธีแรกที่ค้นพบและนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมโดยชาวอังกฤษในระหว่างปี 1853 – 1854 กรรมวิธีนี้ใช้สารเคมีที่สำคัญคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรรมวิธีนี้ย่อยไม้เนื้อแข็งได้ดีกว่าไม้เนื้ออ่อน เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้ให้ผลผลิตน้อย คือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักของไม้ และความแข็งแรงของเยื่อเมื่อนำมาทำกระดาษค่อนข้างต่ำ ต่ำกว่าเยื่อที่ได้โดยวิธีซัลเฟต และมีสีน้ำตาลคล้ำ แต่อาจทำให้ขาวได้

โดยการฟอกสี การย่อยเยื่อกระดาษจะย่อยในถัง ปริมาณสารเคมีที่ใช้คือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 – 20 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งของไม้ อุณหภูมิที่ใช้ 160 – 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 – 6 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้และผลผลิตที่ต้องการ

กระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ

สำหรับขั้นตอนการฟอกเยื่อมีจุดประสงค์เพื่อกำจัดลิกนินออกไปซึ่งจะทำให้เยื่อมีความขาวสว่างมากขึ้นโดยใช้สารเคมีทำปฏิกิริยากับลิกนินในเนื้อไม้ การฟอกเยื่อประกอบด้วยหลายขั้นตอน มีชื่อเรียกตามสารเคมีที่ใช้ในการฟอกและเรียงตามลำดับตัวอักษรตัวแรกของแต่ละขั้นตอน โดยสารเคมี สัญลักษณ์และชื่อขั้นตอนการฟอกต่าง ๆ มีดังนี้

สารเคมี	สัญลักษณ์	ชื่อเรียกขั้นตอนการฟอก
คลอรีน	C	ขั้นคลอรีนชัน (chlorination stage)
โซเดียมไฮดรอกไซด์	E	ขั้นแยกแทรกชัน (extraction stage)
แคลเซียมไฮโปคลอไรต์	H	ขั้นไฮโปคลอไรต์ (hypochlorite stage)
คลอรีนไดออกไซด์	D	ขั้นคลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide stage)
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	P	ขั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide stage)
ออกซิเจน	O	ขั้นออกซิเจน (oxygen stage)
โอโซน	Z	ขั้นโอโซน (ozone stage)

ตัวอย่างของขั้นตอนการฟอก เช่น CEH, CEDED, CEDEP, CEOP ซึ่งทางโรงงานจะเลือกวิธีการฟอกโดยพิจารณาจากชนิดของกระดาษที่ต้องการผลิต มีความจำเป็นอย่างมากในการเลือกวิธีการฟอกให้เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อคุณภาพของเยื่อและลดต้นทุนการผลิตให้น้อยที่สุด

เยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ฟอกจะมีสีคล้ำ โดยเฉพาะเยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีซัลเฟตและโซดา การนำไปใช้จำเป็นต้องฟอกสีก่อน เว้นแต่ในกระดาษบางชนิดที่ถือว่าสีมีความสำคัญเป็นอันดับรอง ๆ ลงมาจึงไม่จำเป็นต้องฟอกสีก่อน เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีซัลไฟด์ปกติสีจะจางค่อนข้างขาว และที่ได้โดยวิธีกลเหมือนสีของไม้ที่ใช้ แต่เนื่องจากว่ามีสารที่ให้สีต่าง ๆ ปนอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น แทนนิน ลิควิน เเรซิน ดังนั้นเมื่อทำเป็นกระดาษแล้วเมื่อเก็บไว้นาน ๆ หรือถูกแสงแดดสีจะเปลี่ยนไป ซึ่งเยื่อกระดาษชนิดนี้เหมาะสำหรับใช้ทำกระดาษพิมพ์ หนังสือคุณภาพต่ำ หรือกระดาษห่อของ การฟอกสีเยื่อกระดาษมีหลักในการพิจารณาขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ ถ้าการฟอกนั้นต้องเอาลิควินและสารให้สีต่าง ๆ ออกจากเยื่อกระดาษ ในกรณีนี้จะฟอกเยื่อกระดาษที่มีลิควินปนอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ถ้าเยื่อกระดาษที่มีลิควินเหลืออยู่มากก็ไม่เป็นการประหยัด การเอาลิควินออกจากไม้ทำได้โดยใช้เทคนิคในการต้ม (cook) ไม่ดีกว่าการฟอก

โรงงานผลิตเยื่อและกระดาษส่วนใหญ่ใช้คลอรีนในการฟอกสีกระดาษเพราะมีราคาถูกแต่มีผลข้างเคียงมากมายโดยโรงงานที่ใช้คลอรีนฟอกสีกระดาษจะถ่ายเทสารไดออกซิน (dioxin) ซึ่งไดออกซินจะไปจับกับดีเอ็นเอซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดอาการปวดตามข้อ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่ทำงานตามปกติทั้งยังมีผลให้ตัวอ่อนของสัตว์เป็นโรคบวม และยังมีการวิจัยพบสารไดออกซินในน้ำนมมารดาอีกด้วย ทั้งนี้ยังมีการใช้สารประกอบคลอรีนในรูปที่ สลายตัวได้ง่าย คือ สารคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide , ClO_2) เป็นก๊าซที่มีสีเหลืองแดงซึ่งมีผลในการฟอกสีมากกว่า 2 เท่าของคลอรีน (Brady และคณะ, 1993) ปัจจุบันนี้เพื่อให้ได้เยื่อกระดาษที่ขาวและมีความบริสุทธิ์มากขึ้น จึงใช้สารเคมีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ คลอรีน โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไฮโปคลอไรต์ คลอรีนไดออกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ขั้นตอนในการฟอกสีตลอดจนสภาวะต่าง ๆ ในการฟอกสีที่แตกต่างกันไป โดยคำนึงถึงความสะดวกของเยื่อที่ได้ และเยื่อได้รับความเสียหายเนื่องจากการฟอกน้อยที่สุด

การผลิตเยื่อและการฟอกสีโดยกระบวนการทางเคมีนั้นถึงแม้จะมีข้อดีคือได้เยื่อที่มีคุณภาพสูงภายในระยะเวลาสั้น ๆ แต่ต้องอาศัยเงินทุนจำนวนมากในแง่ของเครื่องจักรและสารเคมี นอกจากนี้ยังพบว่ามีการพิษที่เกิดจากกระบวนการทั้งสองออกมามากดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 : ตารางแสดงสารเคมีที่เป็นพิษที่เกิดจากกระบวนการผลิตเยื่อและกระบวนการฟอกสี

กระบวนการ	สารเคมีที่เป็นพิษ
debarking	Resin acids include abietic , dehydroabietic , isopimaric , palustric , pimaric , dandaracopimaric , and neoabietic. Unsaturated fatty acids include oleic , linoleic , and palmitoleic. Diterpene alcohols include pimarol , isopimarol , abienol , 12- β -abienol , and 13-epimanool.
kraft pulping	Resin acids include abietic , dehydroabietic , isopimaric , palustric, pimaric , sandaracopimaric , and neoabietic . Unsaturated fatty acids include oleic , linoleic , linolenic , and palmitoleic.
sulfite pulping	Resin acids include abietic, dehydroabietic , isopimic ,palustric, pimaric , sandaracopimaric , and neoabietic. Unsaturated fatty acids include oleic ,linolenic,linoleic , and palmitoleic. Juvabines include juvabione , juvabiol, Δ^1 -dehydrojuvabione , and, Δ^1 -dehydrojuvabiol. Lignin degradation products include eugenol , isoeugenol, and 3,3'dimethoxy-4-and 4'-dihydroxystilbene.
mechanical pulping	Resin acids include abiedtic , dehydroabietic , isopimaric,palustric , pimaric , sandaracopimaric , and neoabietic. Unsaturated fatty acids include oleic , linolenic , and palmitoleic. Diterpene alcohols include pimarol. Isopimarol,abienol , 12- β -abienol and 13-epimanool.
bleaching and caustic extraction	Juvabiones include juvabione,juvabiol, Δ^1 -dehydrojuvabione, and, Δ^1 -dehydrojuvabiol. Chlorinated resin acids include monchloro and dichloro-dehydroabietic. Unsaturated fatty acid derivatives include epoxystearic acid and dichlorostearic acid . Included also are 3,4,5-trichloroguaiacol and 3,4,5-tetrachloroguaiacol .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

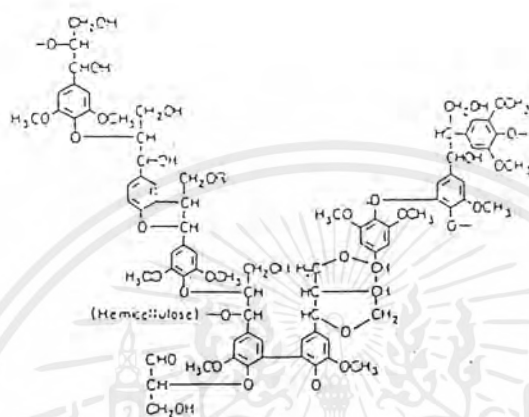
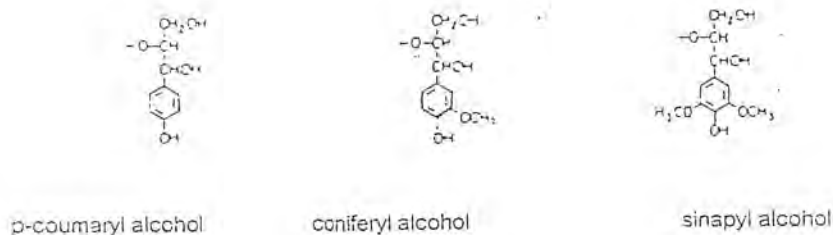
นอกจากกระบวนการข้างต้นจะเห็นได้ว่าลิกนินถูกสกัดออกมาจะอยู่ในรูปของ chlorolignin และ chlorinated phenol (Britt, 1979) สารดังกล่าวจะออกมากับน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกเยื่อ และสาร chlorinated phenol และ guaiacols เป็นสารที่มีพิษจากกระบวนการผลิตเยื่อเช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่นในน้ำทิ้งที่ออกมาจากขั้นตอนแรกของการสกัดด้วยต่างจะมีสารพวกคลอรีนที่เป็นสารอันตรายมากมายซึ่งมี chlorinated phenol เป็นสารประกอบหลัก (Guo และคณะ, 1990) และจำเป็นต้องมีการบำบัดก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งหากไม่มีการบำบัดสารประกอบดังกล่าวอาจมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำและอาจก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางน้ำตามมาอีกด้วย ปัญหาของสีในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษ และกระดาษก็เป็นปัญหาที่สำคัญ ปัญหาหนึ่งซึ่งเกิดจาก 3 กระบวนการที่แตกต่างกัน คือ การผลิตโดยกระบวนการทางเคมี การฟอกสีเยื่อกระดาษและการผลิตกระดาษสี กระบวนการฟอกสีจะผลิตสีออกมาปริมาณมากกว่ากระบวนการทำเยื่อกระดาษ (Britt, 1979) โดยมีผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อน้ำ คือสีจะขัดขวางการผ่านของแสงอาทิตย์ซึ่งมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงทำให้ลดปริมาณสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ เกิดปัญหากับกระบวนการต่างๆในอุตสาหกรรม ค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียสูง สีที่มีโลหะอินทรีย์ปน เช่น เหล็กหรือทองแดง จะไปขัดขวางกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตในสายใยอาหาร (Britt, 1979)

ตามมาตรฐานกระทรวงอุตสาหกรรมกำหนดไว้ว่าน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงานฟอกสีต้องมีสารแขวนลอยไม่มากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าบีโอดี (BOD) ที่ 20 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน ไม่มากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และสีที่ใช้ในกระบวนการผลิตต้องมีโลหะจำพวก ตะกั่ว พรอท แคดเมียม (+6) เป็นสารประกอบ หรือต้องเป็นสีที่ได้รับการรับรองตามกฎหมายเกณฑ์ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทยหรือหน่วยงานที่รับผิดชอบของประเทศต่าง ๆ หรือโครงการฉลากเขียวของประเทศต่าง ๆ (สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม, 2540)

จากปัญหาข้างต้นอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษดังกล่าวอาจมีแนวทางใหม่ให้เลือก อาทิ เช่นแนวทางการนำเทคโนโลยีการฟอกเยื่อด้วยวิธีทางชีวภาพเข้ามาเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการฟอกเยื่อด้วยวิธีทางเคมี นับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากเพราะสามารถลดต้นทุนการผลิตและไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ ในสมัยก่อนการนำเอนไซม์จากจุลินทรีย์มาใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษมีขอบเขตจำกัด เช่นต้องมีการดัดแปลงแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการประยุกต์เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเยื่อและกระดาษก็ยังมีศึกษากันอย่างมากในปัจจุบัน

เป็นเวลานานกว่าสิบปีที่มีการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเยื่อและกระดาษ ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่นำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษคือกลุ่ม

ของเชื้อรา เช่นกลุ่มของ white rot fungi ความสำคัญของเชื้อราในกลุ่มนี้คือ มีศักยภาพในการย่อยสลายลิกนินได้ โดยเชื้อราในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายสารพวกลิกนินในเซลล์ไม้ได้นั้นเพราะเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิด อาทิเช่น ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) และเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์หมู่ฟีนอลในโมเลกุลของลิกนิน เช่นเอนไซม์แลกเคส (laccase) เอนไซม์ดังกล่าวสามารถออกซิไดซ์โมเลกุลของลิกนินให้มีขนาดเล็กลง จะเห็นได้ว่าเชื้อราในกลุ่มนี้มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Phanerocheate chrysosporium* ซึ่งได้มีการศึกษาและพัฒนานำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษอย่างแพร่หลาย เอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นมาเป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์และเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีคุณสมบัติในการออกซิไดซ์หน่วยเล็ก ๆ ของฟีนอลิกให้เป็น aryl cation radical มีผลทำให้พันธะ C-C และ C-O แตกหักออกจากกันและสามารถออกซิไดซ์กลุ่มของอาร์ลิวโพรเพน (arylpropane) ซึ่งเป็นโซ่กิ่งในโมเลกุลลิกนินทำให้พันธะ C-C แตกหักออกตรงตำแหน่ง $C_{\alpha}-C_{\beta}$ ทำให้โมเลกุลวงแหวนของลิกนินเปิดออก อิเล็กตรอนถูกปล่อยออกมาแล้วมารวมตัวกับอนุมูลอิสระซึ่งมีประจุเป็นบวก (cation radical) ยังไม่มีความเสถียร อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซีกับโมเลกุลของน้ำหรือออกซิเจนทำให้เกิดผลิตภัณฑ์หลายชนิด อาทิเช่น vanillin, syringaldehyde, isovanillic acid, vanillic acid และอื่น ๆ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 สารอนุพันธ์ต่าง ๆ ที่เกิดจากการย่อยสลายโมเลกุลของลิกนิน

เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นที่สามารถย่อยสลายลิกนินซึ่งได้แก่พวก brown rot fungi ในสภาพธรรมชาติ มีรายงานว่าเชื้อรา *Poria placenta* *Gloeophyllum trabeum* สามารถย่อยสลายลิกนินได้ ส่วนเชื้อแบคทีเรียในชั้นแอคติโนมัยซีตีส (actinomycetes) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกสามารถย่อยสลายลิกนินได้ดีกว่าพวก brown rot fungi โดยเฉพาะในสกุลสเตรปโตไมเซส (streptomyces) และยังมีแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายลิกนินได้เช่น *Micromonospora*, *Microbispora*, *Thermomonospora*, *Nocardia*, *Rhodococcus* และ *Arthrobacter* เป็นต้น

ส่วนในกระบวนการฟอกสีพบว่าเอนไซม์ไลลาเนสมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นในการเป็นตัวช่วยฟอกทางชีวภาพ (biobleaching agent) (Viikari และคณะ, 1990) โดยนำมาใช้แทนสารเคมีที่มีส่วนประกอบของคลอรีนซึ่งเป็นพิษ คุณสมบัติในการย่อยของเอนไซม์ไลลาเนสได้ช่วยในการย้ายลิกนินที่เหลืออกจากเยื่อกระดาษคราฟท์ที่ผ่านขั้นตอนการฟอกสีทางเคมีเป็นผลให้เยื่อมีความขาวสว่างมากขึ้น เป็นการลดการใช้สารเคมีให้น้อยลงและยังช่วยลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

ถึงแม้ว่าลิกนินจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่มากมายในธรรมชาติ แต่เชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายลิกนินได้จะนำลิกนินมาใช้ในการเจริญเติบโตก็ต่อเมื่อแหล่งอาหารอื่น ๆ ที่มีอยู่หมดลง เชื้อราส่วนใหญ่ใช้ลิกนินเพียงแค่ว่าเป็นแหล่งของพลังงานหรือแหล่งคาร์บอนเสริมมิใช่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งคาร์บอนหลัก ดังนั้นอาจถือได้ว่ากระบวนการย่อยสลายลิกนินเป็นเพียงโคเมตาบอลิซึม (cometabolism) ซึ่งเกิดขึ้นร่วมกับการใช้แหล่งพลังงานหรือแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ เช่น เฮมิเซลลูโลส เซลโลไบโอสและคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ถึงแม้ว่าจะมีข้อมูลเกี่ยวกับการใช้ไซลานเนสบนเยื่อเซลล์ไฟต์จะมีไม่มากเมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อคราฟท์ แต่ในการทดลองของ Christov และคณะ (1999) ได้ทดลองให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเอนไซม์ไซลานเนสสามารถแสดงผลในการเป็นตัวส่งเสริมการฟอกสีซึ่งให้ผลที่ใกล้เคียงกับการใช้สารเคมีในการผลิต

ได้มีเอนไซม์ที่มีขายทางการค้ามาหาว่าที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ฟอกสีด้วยเอนไซม์ไซลานเนส ซึ่งพบว่าค่าเปอร์ออกไซด์ต่อค่าออกซิเจนของเยื่อกระดาษ pulp ที่ได้จาก soft woods และ red cedars มีค่าเพิ่มขึ้น และได้มีการใช้เอนไซม์แทนการใช้เปอร์ออกไซด์เพื่อใช้ในการฟอกสี พบว่ามีค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นประมาณ 1-1.5 เปอร์เซ็นต์ (Wong และคณะ 1996)

คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลานเนส

1. เอนไซม์ไซลานเนส

การย่อยสลายไซแลนซึ่งมีกิ่งก้านสาขาอาศัยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่

1.1 Endoxylanase ($1,4\text{-}\beta\text{-D-xylanohydrolase}$; EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายไซแลน และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายยาว ๆ โดยเป็นการย่อยแบบสุ่มที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของสายจำแนกได้ 4 รูปแบบ ตามผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ

- 1) Non-arabinose liberating endoxylanases เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ไม่สามารถย่อยสายไซของไซแลนได้มี 2 แบบคือ
 - เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถย่อย L-arabinosyl initiated branch ที่ตำแหน่ง $\beta - (1,4)$ linkages ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือ ไซโลไบโอสและไซโลส สามารถย่อยไซโลไตรโอสได้ แต่อัตราการย่อยจะต่ำกว่าไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายยาว
 - เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถตัดสายไซที่ตำแหน่ง แอลฟา (1-2) และแอลฟา (1-3) ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์มากกว่าไซโลไบโอส ไม่สามารถย่อยไซโลเตตระโอสรวมทั้งไซโลไบโอส
- 2) Arabinose liberating endoxylanases มี 2 แบบคือ
 - เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยสายไซของไซแลน ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ ไซโลไบโอส ไซโลส และอะราบินอส

- ผลิตภัณฑ์ที่ได้คืออะราบินอส และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดกลาง
Endoxylanase สามารถตรวจสอบโดยใช้ไซแลนเป็นสับสเตรต

1.2 Exo-xylanase(1,4- β -D-xylanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยไซแลนและโอลิโกแซคคาไรด์ทางด้าน non-reducing end ได้ผลิตภัณฑ์คือไซโลส โดยอัตราการเกิดไซโลสจากการย่อยไซแลนสูงกว่าจากการย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น

1.3 1,3- β -Xylosidase หรือ Xylobiase ทำหน้าที่ย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น เช่น ไทโลไบโอสไดไซโลส วิเคราะห์เอนไซม์นี้โดยใช้ p-nitrophenyl- β -D-xyloside เป็นสับสเตรต (สมรักษ์, 2537)

โดยทั่วไปกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสจากจุลินทรีย์ที่เหมาะสมอยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แต่สำหรับพืชเอนไซม์ที่เหมาะสมพบว่าเอนไซม์ไซแลเนสจากแบคทีเรียและแอคติโนมัยซิสมีพืชที่เหมาะสมค่อนข้างเป็นกลางแต่ของเชื้อรา ค่อนข้างจะเป็นกรด ส่วนความคงตัวของเอนไซม์และความคงตัวของความร้อนของเอนไซม์จะต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์

2. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส

Christov และคณะ (1999) ได้ศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไซแลเนสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 และ *Gliocladium viride* CBS 658.70 พบว่าเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 60 องศาเซลเซียสและ *Gliocladium viride* CBS 658.70 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 50 องศาเซลเซียส

Connerton และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตไซแลเนสจากเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ D3 พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 75 องศาเซลเซียส

จากการทดลองของ Milagres และคณะ (1993) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium janthinellum* คือ 40 องศาเซลเซียสและมีความเสถียรของอุณหภูมิที่ 20-40 องศาเซลเซียส

Tan และคณะ (1987) รายงานว่าเชื้อ *Trichoderma harzianum* E58 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนสคือ 50 องศาเซลเซียส

3. ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส

Christov และคณะ (1999) ได้ศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 และ *Gliocladium viride* CBS 658.70 พบว่าเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 และ *Gliocladium viride* CBS 658.70 มีพีเอชที่เหมาะสมที่พีเอชเท่ากับ 6.0

Connerton และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตไซลานเนสจากเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ D3 พบว่ามีค่าพีเอชที่เหมาะสมที่ 6.5 และมีกิจกรรมของไซลานเนสที่ช่วงพีเอชที่กว้าง

Milagres และคณะ (1993) รายงานว่ากิจกรรมของไซลานเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Penicillium janthinellum* มีค่าพีเอชที่เหมาะสมที่พีเอชเท่ากับ 5.5 และมีค่าความเสถียรของพีเอชเท่ากับ 6.0

รายงานของ Tan และคณะ (1987) แสดงเชื้อ *Trichoderma harzinum* E58 มีค่าพีเอช ที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลานเนสคือ 4.8

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส

กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดยวิธีการใช้กรดไดไนโตรซาลิซิลิก (dinitrosalicylic acid) วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปล่อยจาก oat spelt xylan และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสตามลำดับ

1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ กำหนดได้จากปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยแล้วปล่อย 1 ไมโครโมลของน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคสต่อ 1 นาทีของการเกิดปฏิกิริยา (Christov และคณะ, 1999)

Milagres และคณะ (1993) หากิจกรรมของไซลานเนสจากการบ่มส่วนฟิวเตรต (filtrate) ที่ผ่านการเจือจางปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรด้วยสารแขวนลอยของไซแลน 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 6.0) นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller โดยใช้สารละลายไซโลสเป็นมาตรฐานในการอ้างอิง

Milagres และคณะ (1993) ได้ศึกษาราสายพันธุ์ *Penicillium janthinellum* ที่ถูกแยกมาจากวัสดุที่ทำจากพืชซึ่งถูกพบในโรงปลูก เมื่อเปรียบเทียบกับ *T. reesei* ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจะถูกเหนี่ยวนำโดยไซแลน น้ำตาลขานอ้อย หรือไซโลส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน การเหนี่ยวนำโดยไซแลนถูกควบคุมโดยน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 5.5 มีสภาวะที่เหมาะสม สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร 1 ยูนิต (U) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับเซตรตให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้วิธีวิเคราะห์แบบมาตรฐาน (Tan, 1987)

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

Christov และคณะ (1999) ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันคือ รำข้าวสาลี แขนผักข้าวโพด oat spelt xylan และของเหลวจากโรงงานฟอกสี พบว่า oat spelt xylan และแกนผักข้าวโพด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 และ *Gliocladium viride* CBS 658.70 มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้ผลิตไซลานเนสได้สูง ในขณะที่ของเหลวจากโรงงานฟอกสีก็เป็นตัวเหนี่ยวนำในการผลิตไซลานเนสที่ปราศจากเซลลูโลสได้ดี ซึ่งของเหลวจากโรงงานฟอกสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแหล่งที่มีคาร์บอนมากมายและราคาถูก ดังนั้นจึงเป็นจุดที่น่าสนใจในขณะนี้ในการเป็นสารตั้งต้นให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไคลาเนส

Connerton และคณะ (1999) ได้ศึกษาการผลิตไคลาเนสจากเชื้อ *Bacillus* D3 โดยใช้ birch wood xylan ที่ละลายได้เป็นสารตั้งต้น พบว่าไคลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อนี้มีกิจกรรมเท่ากับ 960 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนการใช้ oat spelt xylan ที่ละลายได้และไม่สามารถละลายได้มีค่าเท่ากับ 775 และ 440 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ

Milagres และคณะ (1993) ศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตไคลาเนสพบว่า การใช้ไซแลนเป็นสารตั้งต้นมีผลเหนี่ยวนำให้มีกิจกรรมของไคลาโนไลติกสูงและมีกิจกรรมของเซลลูโลไลติกต่ำ

ไซแลน (xylan) เป็นสารประกอบของโครงสร้างหลักของผนังเซลล์ของพืช และส่วนใหญ่ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ประกอบด้วย พันธะ 1,4 กับ β -D-xylopyranosyl annual plants ไม้เนื้อแข็ง (hardwoods) และไม้เนื้ออ่อน (softwoods) จะมีไซแลน 20-25 เปอร์เซ็นต์ และ 7-12 เปอร์เซ็นต์ไซแลนตามลำดับ เอนไซม์ไคลาเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำได้และสามารถย่อยไซแลนได้อย่างสมบูรณ์ (Gupta, 1999)

วิเชียร กิจปรีชาวนิช และคณะ (2535) ได้ศึกษาพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F คือฟางข้าว โดยศึกษาเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ คือ ชานอ้อย ชังข้าวโพด และรำข้าวสาลี

ฟางข้าวเป็นอาหารหยาบที่มีคุณค่าทางอาหารต่ำสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องมีการย่อยได้เพียง 45-50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งฟางข้าวประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นเนื้อเซลล์ 21 เปอร์เซ็นต์ และผนังเซลล์ 79 เปอร์เซ็นต์ซึ่งส่วนผนังเซลล์นี้แบ่งเป็นส่วนที่เป็นเซลลูโลส 33 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 26 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน 7 เปอร์เซ็นต์ และซิลิกา 13 เปอร์เซ็นต์ (Jackson, 1977) และการย่อยฟางข้าวแบบ In vitro มีค่าประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การย่อยแบบ In vivo ประมาณ 24-30 เปอร์เซ็นต์

Chahar (1985) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesie* QMY 1 ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของฟางข้าวแตกต่างกันคือ 1 เปอร์เซ็นต์ (เซลลูโลส 0.1 เปอร์เซ็นต์) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (เซลลูโลส 2 เปอร์เซ็นต์) พบว่าเซลลูเลสมีกิจกรรมสูงสุดในฟางข้าวสาลี 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1.65 หน่วยต่อมิลลิลิตร ได้ผลผลิตของเซลลูเลส เท่ากับ 412 หน่วยต่อกรัมเซลลูโลส ในขณะที่ความเข้มข้นของฟางข้าวสาลี 5 เปอร์เซ็นต์ จะมีเวลาในการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 7 วัน เป็น 11 วัน และ

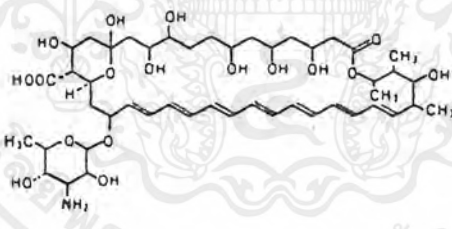
กิจกรรมของเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 6 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่ผลผลิตของเซลล์ลดลงเป็น 100 หน่วยต่อกรัมเซลล์

ทวิน 80 (tween 80)

ทวิน 80 ในความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีผลในการกระตุ้นการปลดปล่อยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ให้มีปริมาณมากขึ้น (Linko และคณะ, 1977)

ไนสเตติน (nystatin)

ไนสเตตินเป็นยาปฏิชีวนะที่มี polyene เป็นองค์ประกอบ สูตรโครงสร้างของยานี้แสดงดังรูปที่ 2 ขอบเขตในการทำลายไนสเตตินใช้ยับยั้งการเจริญของยีสต์และเชื้อราต่าง ๆ แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือโปรโตซัวหรือไวรัส สำหรับผลข้างเคียงของยานี้ยังไม่พบความร้ายแรง (ดวงพร, 2530)



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของไนสเตติน

ที่มา : ดวงพร (2530)

การนำเอนไซม์ไซลาเนสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

อุตสาหกรรมการฟอกสีกระดาษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยการประยุกต์ใช้ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมการเกษตรเป็นสารอาหารให้กับเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการปรับปรุงในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษหรืออุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ เอนไซม์ที่ใช้ต้องมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำ (Milagres, 1993) โดยรายงานของ Roberto และคณะ (1994) พบว่าเชื้อราพวกที่ทนความร้อนได้ดีเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้เป็นอย่างดี แต่เอนไซม์เซลลูเลสที่ถูกปล่อยออกมาด้วยนั้นมีผลทำให้คุณภาพของเยื่อกระดาษแยกลงโดยมีผลให้ดัชนีการดึง (strength index) และดัชนีการฉีก (tear index) ของเยื่อกระดาษมีค่าต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไซลาเนส (Viikari และคณะ, 1990) มีทางเลือกหนึ่งที่ค้นพบมาคือ การใช้วิธีการแยกที่เหมาะสมเพื่อที่จะทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จากการปนเปื้อนของเอนไซม์เซลลูเลส อีกทางเลือกหนึ่งคือการนำจุลินทรีย์มาผ่านวิธีทางพันธุวิศวกรรมเพื่อที่จะให้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ประโยชน์และการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตจะดูจากการที่เชื้อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสหรือมีกิจกรรมของเซลลูเลสเล็กน้อย เอนไซม์ไซลาเนสจะมีผลในการเคลื่อนย้ายส่วนของลิกนินที่ใหสีที่ไม่ต้องการนั้นหลุดออก ดังนั้นจึงใช้ไซลาเนสเข้ามามีส่วนร่วมในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษร่วมกับการใช้สารเคมี เช่นคลอรีนเพื่อลดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ (Connerton และคณะ, 1999) ทั้งนี้ยังมีรายงานอีกว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Trichoderma reesei* ยังช่วยเพิ่มค่าดัชนีการฉีกซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่าความหนาแน่นและดัชนีการยืดดึงของกระดาษ ซึ่งค่านี้เป็นดัชนีแสดงความเหนียวและความแข็งแรงของกระดาษเมื่อนำไปผ่านเครื่องจักรที่ผลิตกระดาษและความกดของการพิมพ์ (pressure printing) (Kibblewhite และคณะ, 1999) และได้มีการใช้ไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Trichoderma harzianum* E58 ในการฟอกสีเยื่อกระดาษพบว่าเยื่อกระดาษที่ได้มีคุณภาพดีเยี่ยม (high grade) จากนั้นได้มีการนำเอนไซม์นี้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide eletrophoresis ทำให้มีกิจกรรมสูงขึ้นถึง 2400 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนเมื่อเพาะเลี้ยงในปริมาณ 17 ลิตร ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้ในการออกแบบเพื่อขยายปริมาณการผลิตในระดับขั้นอุตสาหกรรมเพื่อให้เอนไซม์มีราคาถูกลง (Tan และคณะ, 1987)

เนื่องจากในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษมีอุณหภูมิและพีเอชที่สูงประมาณ 10-11 ดังนั้นในการประยุกต์นำเอนไซม์ไซลาเนสมาใช้ในการกระบวนการจึงต้องการไซลาเนสที่มีคุณสมบัติที่ทนความร้อนได้สูงและพีเอชในสภาวะที่เป็นต่างมาก ๆ ได้ จากการทดลองของ Connerton และคณะ,

(1999) ได้นำเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ D3 ที่ได้มาจากการทำการกลายพันธุ์ด้วยการใช้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methanesulfonate) จากสายพันธุ์ XE ซึ่ง *Bacillus* สายพันธุ์ D3 เป็นจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนได้สูงและสามารถผลิตไซลาเนสที่มีคุณสมบัติทนความร้อนสูงได้ดีไปใช้ในขั้นตอนการบำบัดของกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษเพื่อย่อยสลายของไซแลนในขณะที่ต้องการคงส่วนของเซลลูโลสไว้

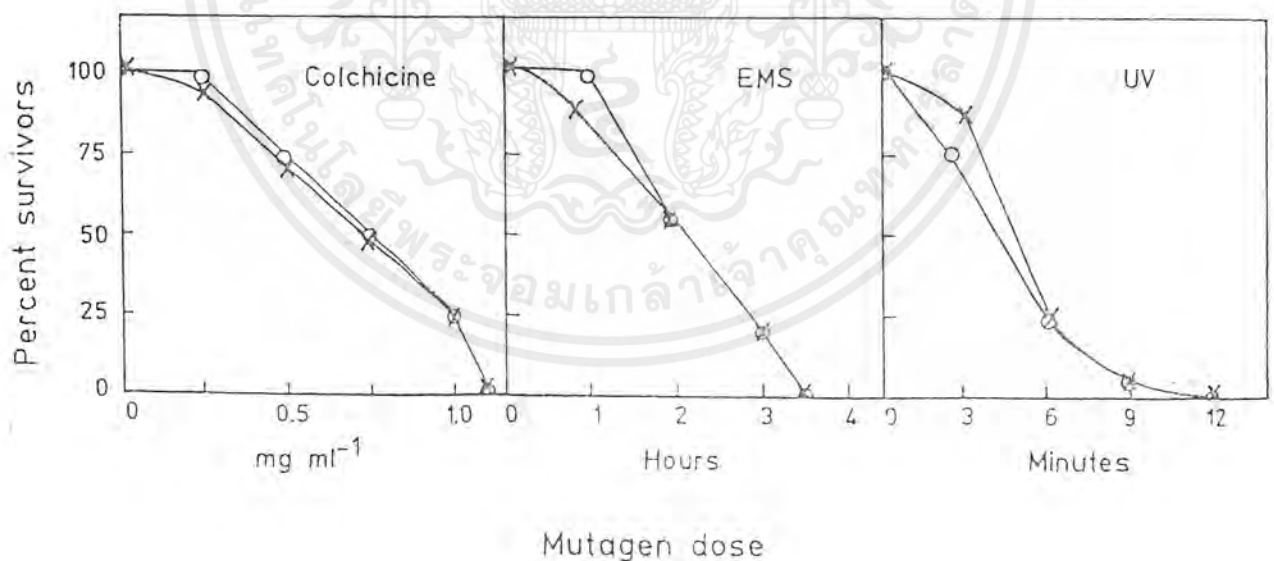
Christov และคณะ (1999) ได้ทดลองโดยนำจุลินทรีย์ 7 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาโดยเชื้อทั้ง 7 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลส (cellulase – free xylanase) โดยนำไปใช้ในขั้นตอนการบำบัดในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษซัลไฟต์ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ได้มีการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ ข้าวสาลี แคนดิกข้าวโพด oat spelt xylan และของเหลวจากโรงงานฟอกสี พบว่าการเจริญของเชื้อ *Aspergillus foetidus* ATCC 14916 บนแคนดิกข้าวโพดสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ปริมาณ 547.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่มีกิจกรรมของเซลลูเลสเท่ากับ 6.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 และ *Gliocladium viride* CBS 658.70 สามารถผลิตไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสได้ปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงบน oat spelt xylan และทำการคัดเลือกเชื้อที่ไม่มีการผลิตเซลลูเลสออกมาด้วย จากการทดลองจึงใช้ crude xylanase ที่แยกได้จากจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 และ *Gliocladium viride* CBS 658.70 มาหาคุณสมบัติของค่าพีเอชที่เหมาะสมและอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้เป็นมาตรฐานของสภาวะที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้กับเยื่อกระดาษ พบว่าความสามารถของไซลาเนสทั้งสองชนิดทำให้มีค่าความขาวสว่างมากขึ้น 1.4 จุด และสามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสจากเยื่อกระดาษได้ 7 เปอร์เซ็นต์

Milagres และคณะ (1993) ได้ศึกษาการผลิตไซลาเนสจากเชื้อ *Penicillium janthinellum* ที่แยกมาจากวัสดุที่ทำจากพืช พบว่ามีกิจกรรมของไซลาเนสที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Trichoderma reesei* ทั้งนี้ยังเป็นหนึ่งในเชื้อราที่มีอัตราส่วนของไซลาเนสต่อเซลลูเลสสูงที่สุด นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Schmidt และคณะ (1999) ว่าเชื้อ *Penicillium simplicissimum* สามารถผลิตไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสได้สูงและสามารถนำไปใช้ในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษได้สำเร็จ

ในบางกรณีการปรับปรุงให้เชื้อมีความสามารถต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ในที่นี้หมายถึงการผลิตไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสอาจทำได้โดยการทำให้เกิดการกลายและทำการคัดเลือกสายพันธุ์เพราะว่าการคัดเลือกการต้านทานของสายพันธุ์ก็คล้ายกับการควบคุมการสลายแหล่งคาร์บอนได้ประสบความสำเร็จในระบบของเชื้อราหลาย ๆ ชนิดรวมถึงระบบการผลิตเซลลู

เลสของเชื้อ *Trichoderma reesei* (Milagres และคณะ, 1993) และจากรายงานของ Anwar และคณะ (1996) รายงานว่ามีการนำเชื้อ *Penicillium purpurogenum* P-26 มาผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าสายพันธุ์กลายของเชื้อนี้ที่คัดเลือกมามีประสิทธิภาพมากขึ้นในการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส ภายใต้สภาวะความเข้มข้นกลูโคสสูง ๆ และพบว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ทั้งนี้ยังมีรายงานอีกว่าการกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติและไม่มีลักษณะจำเพาะในธรรมชาติ ถ้าสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสมกับเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ จะทำให้เซลล์มีโอกาสอยู่รอดได้น้อยและอาจทำให้เซลล์มีจำนวนลดลง

Agrawal และคณะ 1999 ได้ทดลองทำการกลายพันธุ์เชื้อ *Penicillium* sp. และเชื้อ *Aspergillus* sp. โดยวิธีการฉายแสงอัลตราไวโอเลต โคชิซิน (colchicine) และ ethylmethanesulfonate (EMS) พบว่าเชื้อกลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต โดยวิธีของ Rupp (1971) มีความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์มากขึ้นเป็น 8 เท่า ในขณะที่การเหนี่ยวนำด้วยโคชิซินและ EMS เพิ่มขึ้นเพียง 1.5 และ 2 เท่าตามลำดับและได้มีการทดลองหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดโดยใช้สารทั้ง 3 ได้ผลดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเชื้อ *Penicillium* sp.(o) และเชื้อ *Aspergillus* sp.(x)

ที่มา : Agrawal และคณะ (1999)

คุณลักษณะ 3 ประการที่มีการนำเอนไซม์ไซลาลเนสที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมกรรมการฟอกสีกระดาษ

1. มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสูงและมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง สิ่งนี้จะช่วยประหยัดพลังงานและจะช่วยประหยัดได้มาก
2. มีพีเอชที่เหมาะสมสูงและมีความเสถียรที่พีเอชสูงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและลดราคาต้นทุนในการจัดหาเครื่องมือเพื่อปรับค่าพีเอช ซึ่งสามารถช่วยแก้ปัญหาได้โดยการนำไปผสมกับเยื่อกระดาษ และสามารถใช้น้ำหมุนเวียนได้
3. มีค่า pI (isoelectric point) ที่แตกต่างกันสูง เอนไซม์ไซลาลเนสยังคงเกาะติดอยู่กับสารตั้งต้นเมื่อค่าพีเอชมีค่าต่ำกว่า pI ของเอนไซม์ การเกาะกับสารตั้งต้นแสดงให้เห็นว่าเป็นการช่วยส่งเสริมการย่อยสารตั้งต้น ดังนั้น เอนไซม์ไซลาลเนสที่มีค่า pI เป็นค่าสูงจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นมาก อย่างไรก็ตาม ในสภาวะที่จะมีการนำเอนไซม์มาใช้ใหม่ จะต้องพิจารณาที่ค่า pI สูง ๆ ซึ่งสิ่งนี้ก็ขึ้นอยู่กับสภาวะหนึ่งที่ต้องทำการศึกษากันต่อไป

อุตสาหกรรมอื่น ๆ

ได้มีการนำเอนไซม์ไซลาลเนสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมการทำน้ำผลไม้โดยเอนไซม์ทำให้น้ำผลไม้ใส อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ซึ่งเอนไซม์นี้จะช่วยในการย่อยอาหารสัตว์ เป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์ นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์ไซลาลเนสในการเตรียมวัตถุดิบในการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ เช่น ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของโพลิแซคคาไรด์ และผนังเซลล์ของพืช (Wong และคณะ 1988) และมีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันปาล์ม เช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส และเพคตินเอส ในอัตรา 200-1000 กรัมต่อตัน ที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง เพื่อแปรรูปภาพเนื้อเยื่อพืชก่อนนำไปสกัด นอกจากนี้ยังใช้ช่วยปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันและน้ำทิ้งโดยลดปริมาณเนื้อเยื่อของพืชที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงทำให้เกิดความหนืดและข้น เช่น กลูแคน เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และเพคติน ซึ่งช่วยในการทำให้อุ่น (clarification) ในกระบวนการแยกน้ำมัน (Godfrey, 1983)

สิ่งที่จำเป็นสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษคือ ใช้เอนไซม์ไซลาลเนสที่ปราศจากเซลลูเลส (cellulase) ซึ่งสามารถลดการทำลายเส้นใยของเยื่อให้น้อยลง และยังช่วยคุณภาพแพ็คเกจที่ทำจากไม้ (rayon) สูงขึ้น และมีการใช้วัสดุที่มีประโยชน์มากมายเช่นเศษเหลือจากการเกษตรซึ่งมีราคาที่ไม่สูงมากมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสให้สูงขึ้น (Gupta, 1999)

เอนไซม์ไโซลาเนสและจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไโซลาเนสได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ของการย่อยของเสียจากโรงงานทางการเกษตรไปเป็นสารอาหารในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ลิกโนเซลลูโลสและในกระบวนการผลิตอาหาร การผลิตเส้นใยทางการเกษตร (agrofiber) และเยื่อกระดาษ ในกรณีของการผลิตเส้นใยทางการเกษตร และในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ เอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีกิจกรรมของเซลลูเลสที่ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้เชื้อ *Penicillium janthinellum* ที่ถูกคัดเลือกออกมามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไโซลาเนสที่มีกิจกรรมที่สูง และมีกิจกรรมของเซลลูเลสต่ำ ภายใต้สภาวะต่าง ๆ เหมือนกันกับ *M. albomyces* ไม่มีคุณสมบัติในการย่อยเซลลูโลส เชื้อ *Penicillium janthinellum* แสดงให้เห็นว่าเป็นหนึ่งในเชื้อราที่มีอัตราส่วนของเอนไซม์ไโซลาเนสต่อเซลลูเลสสูงที่สุด

Milagres และคณะ (1993) พบว่าการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการทำให้เกิดการกลายของเชื้อ *T. reesei* ทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงขึ้น

มิวเตชัน (mutation)

ประวัติของการศึกษาเกี่ยวกับมิวเตชัน

มีความเชื่อว่าความแปรปรวนทั้งหลายที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตจนถึงกับได้พวกใหม่หรือพันธุ์ใหม่ อันเรียกว่า sports นั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทีละเล็กทีละน้อยแบบค่อยเป็นค่อยไปจนกระทั่งถึงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 Hugo De Vries นักพฤกษศาสตร์ชาวเนเธอร์แลนด์ได้พบความจริงซึ่งแตกต่างจากข้อเสนองานของ Darwin ทั้งนี้พบว่า การเปลี่ยนแปลงในสิ่งมีชีวิตอาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลันทันทีและพืชหรือสัตว์สามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ เรียกการเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้ว่า มิวเตชัน

มิวเตชันคืออะไร

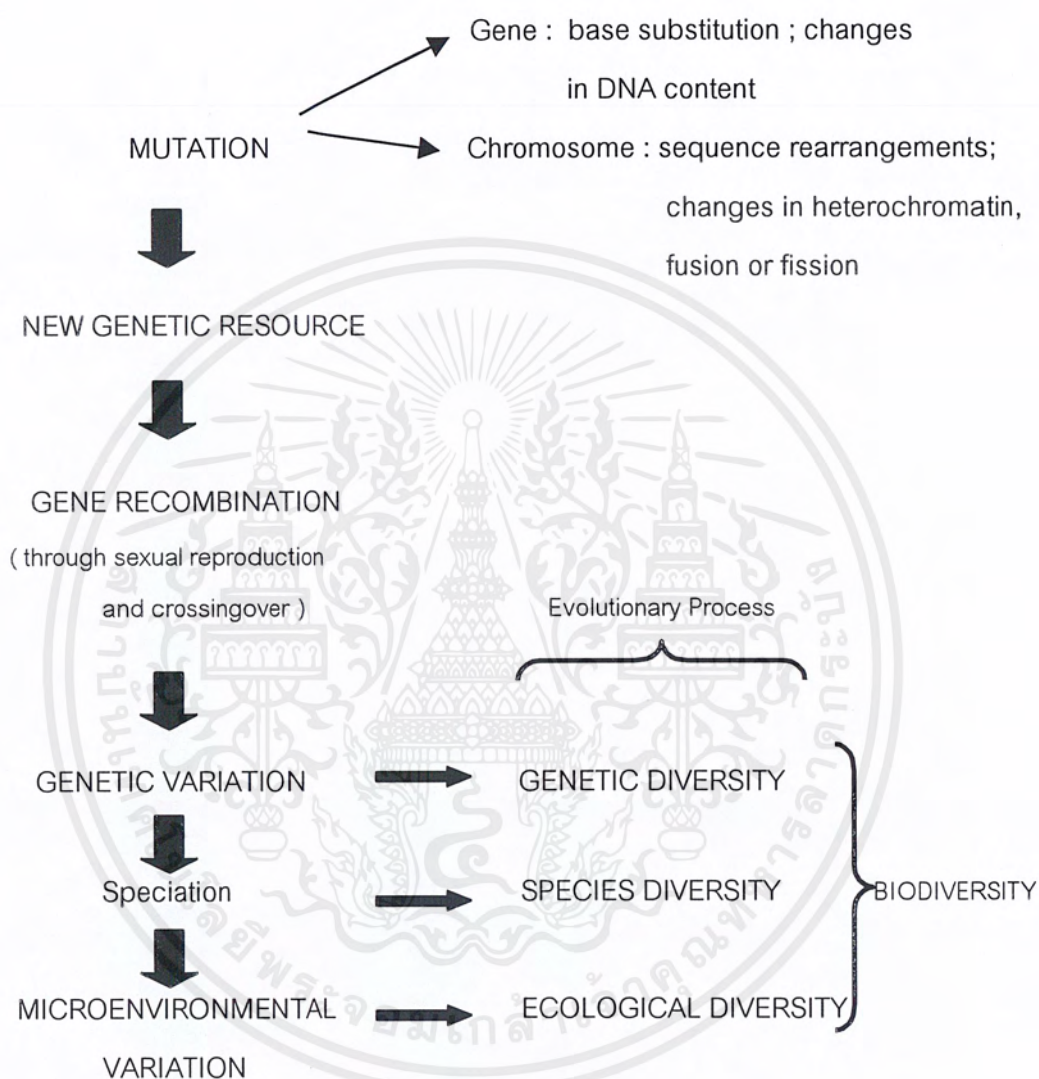
มิวเตชัน หมายถึง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับหน่วยควบคุมลักษณะ เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ฉับพลัน และพืชหรือสัตว์สามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงอันนี้จะรวมไปถึงการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม แต่คำว่ามิวเตชันในปัจจุบันมักจะหมายถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปยังอีกสภาพหนึ่ง ดังนั้นอาจเรียกการเปลี่ยนแปลงอันนี้ว่า "gene หรือ point mutation" ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของดีเอ็นเอ คือ นิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งเข้าไปแทนที่นิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง

การเปลี่ยนแปลงทางกรรมพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับลักษณะรูปร่างทั่วไปหรือเกี่ยวกับลักษณะทางสรีระหรือทางชีวเคมีหรือลักษณะทางพฤติกรรมของสปีชีส์ มิวเตชันเป็นสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิตและเป็นกลไกสำคัญอันดับแรกที่ทำให้เกิดความแตกต่างแปรผันในองค์ประกอบทางพันธุกรรม (genetic variation) อันเป็นพื้นฐานจำเป็นสำหรับกระบวนการวิวัฒนาการแสดงดังรูปที่ 4

ชนิดของมิวเตชัน

ชนิดของมิวเตชันที่ศึกษากันมักเป็นพวกที่แสดงออกมาให้เห็นในรูปของลักษณะอย่างชัดเจน ตัวอย่างของมิวเตชันชนิดนี้ได้แก่ ลักษณะตาสีขาว ปีกสั้น ปีกกุด ฯลฯ ของแมลงหวี่ ดังนั้นเราจึงเรียกมิวเตชันดังกล่าวว่าเป็นพวก “สังเกตได้ (visible)” ซึ่งมีอยู่ราว 1 เปอร์เซ็นต์ของมิวเตชันทั้งหมด และไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่สิ่งมีชีวิตมากนัก แต่มิวเตชันส่วนใหญ่คือราว 80 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่พวก “แสดงผลในทางเสื่อม (detrimental)” ซึ่งไม่อาจตรวจผลได้แน่ชัด แต่เข้าใจว่าจะกระทบกระเทือนต่อการเจริญเติบโตของพืชหรือสัตว์ได้อย่างมาก ในมิวเตชันชนิดนี้ยีนที่เปลี่ยนไปแต่ละยีนก่อผลเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อรวมผลของทุกยีนก็จะรุนแรงขึ้น มิวเตชันอีกพวกหนึ่งคือพวก “ก่อผลถึงตาย (lethal)” ซึ่งมีอยู่ประมาณ 19 เปอร์เซ็นต์ ถ้าอยู่ในภาพ homozygous มิวเตชันชนิดนี้จะกระทบกระเทือนต่อขบวนการทางสรีระจนพืชหรือสัตว์ไม่อาจจะมีชีวิตอยู่ได้

ในสิ่งมีชีวิตพวก haploid เช่น เชื้อรา recessive lethal จะก่อผลถึงตาย ในสิ่งมีชีวิตพวกนี้มียีนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอีกประเภทหนึ่งซึ่งไม่ก่อผลถึงตาย เราเรียกยีนนี้ว่า conditional lethal ตัวอย่างเช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิดของเชื้อรา *Neurospora* อาจเปลี่ยนไปจากเดิม เราเรียกยีนที่เปลี่ยนไปนี้ว่าเป็น conditional lethal ทั้งนี้เชื้อราที่มียีนนี้จะไม่เจริญหรือขยายพันธุ์ใน minimal medium แต่กลับเจริญตามปกติเมื่อเสริมกรดอะมิโนบางชนิดลงไป ใน selective medium



รูปที่ 4 มิเวตชั้นเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่ความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมและความหลากหลายของสปีชีส์ในกระบวนการวิวัฒนาการ
ที่มา : วิสุทธิ์ (2533)

มิวเตชันที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

มิวเตชันชนิดนี้เป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทอโทเมอร์ชิฟต์ (tautomeric shift) หรือการก่อให้เกิดไอออน (ionization) ในโมเลกุลของเบสดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (ประดิษฐ์, 2543) มิวเตชันที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีอัตราต่ำมาก อัตราโดยเฉลี่ยประมาณ 10^{-5} - 10^{-10} ต่อเซลล์ต่อรุ่นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมโดยแตกต่างกันออกไปตามตำแหน่งและชนิดของยีนและแล้วแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต (ประเสริฐ, 2536) (ตารางที่ 2) ยีนมิวเตชันอาจอาจเกิดในทางไปข้างหน้า (forward mutation : $A \rightarrow a$) คือลักษณะปกติเปลี่ยนไปเป็นลักษณะกลายหรืออาจเกิดขึ้นในทางกลับกัน (back mutation หรือ reverse mutation : $a \rightarrow A$) คือจากมิวแตนต์ยีนเปลี่ยนกลับไปเป็นยีนปกติตามเดิม (วิสุทธิ์, 2533) อย่างไรก็ตามถือว่าเป็นมิวเตชันที่มีความสำคัญและก่อให้เกิดวิวัฒนาการขึ้นในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ายีนแทบทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ๆ เคยผ่านการเปลี่ยนแปลงโดยมิวเตชันมาแล้วในอดีต จากการคัดเลือกอันเข้มงวดของธรรมชาติ ยีนซึ่งก่อผลในทางเสียก็ค่อย ๆ หายไปจากหมู่ประชากรของพืชและสัตว์ เมื่อปราศจากมิวเตชันในธรรมชาติแล้ว ก็แทบจะกล่าวได้ว่าสิ่งมีชีวิตไม่อาจดำรงเผ่าพันธุ์หรือมีวิวัฒนาการมาจนถึงทุกวันนี้

จากการศึกษาอัตราของมิวเตชันของยีนต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนไปยังสภาพอื่นและการเปลี่ยนแปลงกลับสู่สภาพเดิมมีอัตราการเกิดไม่เท่ากัน นอกจากนั้นยีนของพืชและสัตว์ชั้นสูงมีอัตรามิวเตชันสูงกว่ายีนของแบคทีเรียและไวรัส

มิวเตชันที่เกิดจากการกระตุ้น (induced mutation)

นอกจากจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแล้ว มิวเตชันก็อาจจะถูกทำให้เกิดขึ้นได้โดยใช้วิธีการกระตุ้น โดยได้เริ่มใช้รังสีเอกซ์ (X-rays) เพื่อกระตุ้นให้เกิดมิวเตชันในแมลงหวี่ พบว่าอัตราของมิวเตชันที่เกิดขึ้นจะสูงกว่าพวกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติถึงราว 150 เท่า ต่อมาได้พบว่ารังสีเอกซ์นี้ได้ก่อให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) โดยการใช้รังสีเอกซ์มักจะก่อผลในทางเสีย และมิวเตชันที่เกิดขึ้นก็คงมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม บางยีนอาจถูกทำลายก็ได้หรือบางส่วน of โครโมโซมอาจขาดหายไป

ตารางที่ 2 อัตราการเกิดยีนมิวเตชันตามสภาพธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

สิ่งมีชีวิต	อัตราการเกิดมิวเตชัน
ฟาจก์ (T4)	
SM23	1×10^{-4}
SM37	3×10^{-5}
UV102	1×10^{-6}
SM32	2×10^{-7}
UV248	1×10^{-8}
UV237	1×10^{-9}
UV1	5×10^{-10}
แบคทีเรีย (<i>Escherichia coli</i>)	
ยีนที่ต่อต่อยาสเตรปโตมัยซิน	4×10^{-4}
ยีนที่ต้องการฮิสทีดีน	2×10^{-6}
ราขนมปัง (<i>Neurospora crassa</i>)	
ยีนที่ไม่ต้องการสารฮิโนซิโตล	1.5×10^{-5}
ยีนที่ไม่ต้องการสารอะดีนีน	4.3×10^{-5}
ยีสต์ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
ยีนที่ไม่ต้องการอาร์จินีน	9.3×10^{-7}
ยีนที่ไม่ต้องการฮิสทีดีน	3×10^{-9}
ข้าวโพด (<i>Zea mays</i>)	
เมล็ดสีแดง	4.92×10^{-4}
เมล็ดสีม่วง	1.1×10^{-5}
เมล็ดมีน้ำตาลสูง	2.4×10^{-6}
แมลงหวี่ (<i>Drosophila melanogaster</i>)	
ตัวสีเหลือง	1.2×10^{-4}
ตาสีขาว	2.9×10^{-5}

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สิ่งมีชีวิต	อัตราการเกิดมิวเตชัน
มนุษย์ (<i>Homo sapiens</i>)	
กระดูกเล็ก (เตี้ย-แคระ)	3×10^{-5}
เป็นไข้	1.1×10^{-5}
ตาบอดสี	2.8×10^{-5}
ผิวเผือก	3.7×10^{-5}
กล้ามเนื้อแขนขาลีบ	5×10^{-6}

ที่มา : วิสุทธิ์ (2533)

สิ่งที่ทำให้เกิดมิวเตชัน (mutagens)

1. สิ่งทีก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ อุณหภูมิ รังสีต่าง ๆ

อุณหภูมิ จากการทดลองเลี้ยงแมลงหวี่ในอุณหภูมิต่าง ๆ กัน พบว่ายีนด้อยที่ทำให้การตายบนโครโมโซม X (sex linked recessive lethal gene) ในอัตราที่แตกต่างกันดังนี้

อุณหภูมิ	14	องศาเซลเซียส	เกิด	0.87	เปอร์เซ็นต์
	22	องศาเซลเซียส	เกิด	0.188	เปอร์เซ็นต์
	28	องศาเซลเซียส	เกิด	0.325	เปอร์เซ็นต์

รังสีและแสง เป็นสิ่งทีก่อการกลายพันธุ์ที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถแบ่งแสงและรังสีตามช่วงความยาวคลื่นออกเป็นพวก ๆ ดังนี้

10^{-4} - 10^{-1}	ชม.	คลื่นวิทยุ
10^{-2} - 10^{-3}	ชม.	แสงอินฟราเรด (infrared)
10^{-4}	ชม.	แสงที่มองเห็น
10^{-5} - 10^{-6}	ชม.	แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet)
10^{-7} - 10^{-8}	ชม.	รังสีเอกซ์ (X-rays)
10^{-9} - 10^{-10}	ชม.	รังสีแกมมา (gamma rays)
10^{-11}	ชม.	รังสีคอสมิก (cosmic rays)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลื่นวิทยุ แสงและรังสี คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีช่วงคลื่นขนาดต่าง ๆ กัน คลื่นวิทยุมีช่วงคลื่นที่ยาวมาก คือมีความยาวระหว่าง 10^4 - 10^1 ซม. แสงที่เรามองเห็นมีช่วงคลื่น 10^{-4} ซม. (1 ไมครอน) คลื่นที่มีช่วงสั้นกว่านี้เช่น แสงอัลตราไวโอเลต รังสีเอกซ์ จัดว่าเป็นคลื่นที่มีพลังงานสูง ทั้งนี้เมื่อช่วงคลื่นยิ่งสั้นลงพลังงานก็ยิ่งสูงขึ้น การที่แสงบางอย่างและรังสีมีพลังงานสูงนี้เอง จึงสามารถแทรกซึมวัตถุและก่อผลให้เกิดมิวเตชันในสิ่งมีชีวิต เราอาจแยกคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและพลังงานในรูปมวล (จากสารที่อาจแผ่รังสี (radioactive isotope)) ออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ

รังสี (ionizing radiation) คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหรือพลังงานในรูปมวลที่มีพลังงานสูงเมื่อกระทบกับเป้าแล้วจะทำให้มีการผลิตไอออน (ions) และรังสีนี้จัดเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมสูง

แสง (nonionizing radiation) คือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีพลังงานไม่สูงพอที่จะทำให้เกิดการผลิตไอออน และเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมต่ำ

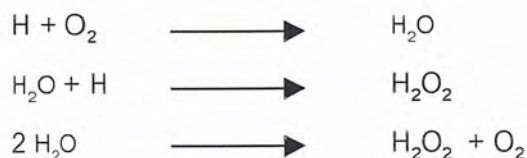
2. รังสี (ionizing radiation)

รังสีมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน แต่ละชนิดอาจมีแหล่งที่เกิดและแรงแทรกซึมแตกต่างกัน รังสีเหล่านี้ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีคอสมิก รังสีแอลฟา รังสีเบตาและนิวตรอน รังสีบางชนิดในจำนวนนี้ได้จากการแผ่รังสีของธาตุที่อาจแผ่รังสีได้ (radioactive elements) เช่น รังสีแอลฟาซึ่งประกอบด้วยโปรตอนและนิวตรอน และรังสีเบตาซึ่งประกอบด้วยอิเล็กตรอนเป็นต้น

รังสีทำให้เกิดมิวเตชันโดยวิธีการที่ทำให้เกิดไอออน ทั้งนี้เมื่อรังสีวิ่งไปกระทบกับอะตอมของวัตถุก็จะทำให้อะตอมนั้นยิงอิเล็กตรอนออกไป หลังจากสูญเสียอิเล็กตรอนไปแล้ว ทั้งนี้เพราะมีโปรตอนมีอิเล็กตรอนอยู่ 1 หน่วยนั่นเอง ดังนั้นอิเล็กตรอนที่ถูกยิงออกไปจะถูกจับไว้โดยอะตอมข้างเคียงจึงทำให้อะตอมนั้นกลายเป็นไอออนที่มีประจุลบ โดยเหตุนี้เองไอออนจึงเกิดเป็นคู่ ๆ เสมอ รังสีอาจก่อให้เกิดมิวเตชันได้หลายวิธี เช่น เมื่อไอออนนั้นอยู่ในส่วนของยีน การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดกับไอออนนั้นก็จะทำให้ยีนเปลี่ยนแปลงไป ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือรังสีอาจทำให้น้ำที่อยู่ภายในเซลล์ผลิตไอออนของไฮโดรเจน (H) และกลุ่มไฮดรอกซิล (OH) แล้ว H จะรวมตัวกับออกซิเจนได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา คืออาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ โปรตีน หรือโครโมโซมก็ได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับโครโมโซมก็จะทำให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซมหรือเกิดมิวเตชันของยีนได้



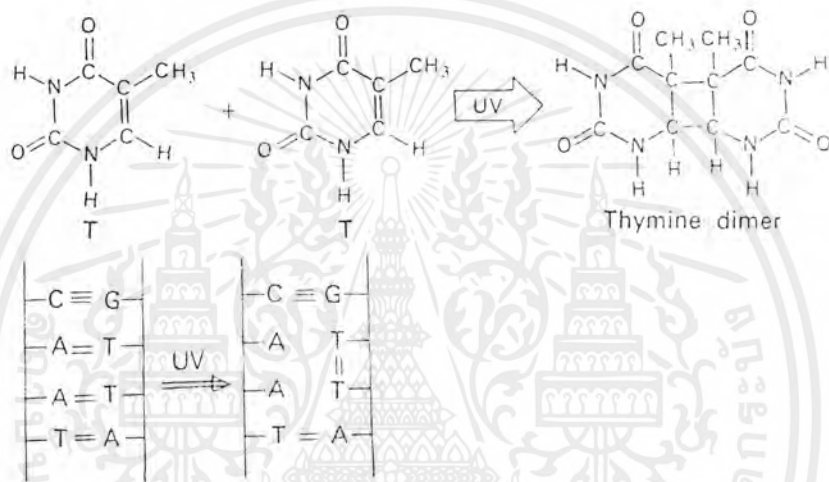
ในที่ที่มีออกซิเจน ไฮโดรเจนอะตอมที่เกิดจากโมเลกุลของน้ำจะเปลี่ยนเป็น
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ง่าย ดังปฏิกิริยา



3. แสง (nonionzing radiation)

คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าช่วงยาว ๆ ไม่ทำให้มีการผลิตอิออน ทั้งนี้เพราะพลังงานที่มีอยู่นั้น
ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นเราเรียกคลื่นพวกนี้ว่าแสง แสงที่อาจก่อให้เกิดมิวเตชันได้แก่ แสง
อัลตราไวโอเลต (UV) แสงชนิดนี้มีช่วงคลื่นยาวกว่ารังสีเอกซ์ และเนื่องจากมีพลังงานต่ำนี้เอง แสง
อัลตราไวโอเลตจึงมีแรงแทรกซึมน้อย และไม่อาจแทรกซึมผ่านส่วนของร่างกายที่มีความหนาแน่น
สูง ๆ ดังนั้นจึงมักใช้กับส่วนเล็ก ๆ ของพืช เช่น อาจใช้กับอับละอองเกสร เป็นต้น หรือใช้กับบาง
ส่วนของไขแมลงหิวและมักใช้ได้ดีกับเชื้อรา แบคทีเรียและไวรัส แสงอัลตราไวโอเลตสามารถทำ
ให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในส่วนของโพลาร์แคป (polar cap) ของไขแมลงหิว รังสีอัลตราไวโอเลต
อาจจะทำให้โครโมโซมผิดปกติแต่ประสิทธิภาพน้อยกว่ารังสีเอกซ์ (ประติษฐ์, 2543)

เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตไม่ทำให้มีการผลิตอิออน ดังนั้นมิวเตชันที่เกิดขึ้นก็
เนื่องมาจากการที่เซลล์ดูดแสงเข้าไปโดยตรง ส่วนของเซลล์ที่ดูดแสงได้ดีคือ กรดนิวคลีอิกหรืออาจ
กล่าวลงไปให้แน่ชัดได้อีกว่า การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเบส โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ไพริมิดีนนั่นเอง
เมื่อเบสกระทบกับแสงอัลตราไวโอเลตก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับเกาะของพันธะ (bond)
เปลี่ยนไปคือ ทำให้มีการจับเกาะระหว่างเบสชนิดเดียวกัน เบสที่จับเกาะกันนี้เรียกว่าเป็นไดเมอร์
(dimer) การจับเกาะที่เกิดขึ้นง่ายที่สุดคือการจับเกาะระหว่างไทมีน (thymine) ซึ่งทำให้เกิดไทมีน
ไดเมอร์ (thymine dimer) (รูปที่ 5) ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนในเส้นนิวคลีโอไทด์เส้นเดียวกัน
ก็จะมีการขัดขวางไม่ให้ดีเอ็นเอแบ่งตัว ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนของเส้นตรงกันข้ามก็ทำให้
คุณสมบัติในการจับคู่ของไทมีนกับอะดีนีน (thymine กับ adenine : T-A) เปลี่ยนไป ดังนั้นทำให้ไท
มีนไปจับกับกวานีนซึ่งจะยังผลให้ T-A เปลี่ยนไปเป็น C-G ซึ่งจัดเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบทรานซิช
ัน (transition) ส่วนไดเมอร์ชนิดอื่นที่พบคือไซโตซีนไดเมอร์ (cytosine dimer : C-C) เกิดขึ้นน้อย
กว่าพวกแรก ไดเมอร์ชนิดนี้ก่อให้เกิดมิวเตชันโดยการที่ NH_2 ถูกขับออกไปจึงทำให้ได้ยูราซิลได
เมอร์ (uracil dimer : U-U) แต่ยูราซิลจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับไทมีน ดังนั้นจึงทำให้ G-C เปลี่ยน
เป็น A-T



รูปที่ 5 การเกิดไทมีนไดเมอร์เนื่องจากผลของแสงอัลตราไวโอเล็ต การเกิดไดเมอร์แบบนี้จะขัดขวางการแบ่งตัวหรือการสร้างตัวแทนของ DNA และมีมิวเตชันเกิดขึ้นในที่สุด
ที่มา: ไพศาล (2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของแสงอัลตราไวโอเลตที่มีต่อสิ่งมีชีวิตก็คือ มันทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครโมโซมและยีน (gene mutation) เช่นเดียวกับการใช้รังสีเอกซ์ แต่มีรายงานว่าในขนาดการใช้ที่อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนได้เท่ากันนั้น รังสีเอกซ์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมได้มากกว่า คุณสมบัติอีกประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลตก็คือ แสงที่มีช่วงคลื่นต่างกันจะมีผลทางมิวเตชันไม่เท่ากัน ช่วงคลื่นที่มีผลในทางมิวเตชันดี คือ พวกที่ DNA สามารถดูดซับเอาไว้ได้มาก แสงอัลตราไวโอเลตไม่สามารถผ่านแก้วได้แต่สามารถทำลายสายตาได้ (Gerald, 1973)

ผลของมิวเตชันจากการใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะไม่สอดคล้องกับทฤษฎีการกระทบเป้า (target theory) ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ (dosage) และอัตรามิวเตชันจะไม่เป็นแบบเส้นตรง แต่จากการทดลองกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ปรากฏว่าได้กราฟเส้นโค้งหลาย ๆ แบบ เช่นนี้แล้วก็แสดงว่ามิวเตชันย่อมเกิดจากการกระทบกับเป้าหมายหลาย ๆ ครั้ง ซึ่งการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นวิธีการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กับเชื้อรา (ชวนพิศ, 2536) ซึ่งความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์จะใกล้เคียงกับการแผ่รังสีอัลตราไวโอเลต ความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถคำนวณได้จากอัตราการอยู่รอดของจำนวนโคโลนีภายหลังการฉายแสง ถ้าให้แสงอัลตราไวโอเลตสูงขึ้นจะทำให้อัตราการกลายและอัตราการตายเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงให้อัตราการกลายพันธุ์สัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของจุลินทรีย์ภายหลังได้รับแสงอัลตราไวโอเลต (Gerald, 1973)

ผลอันน่าสนใจประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลตก็คือ การเกิด photoreactivation คือ ผลของการใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะบรรเทาหลงหรือหมดไป เมื่อให้เซลล์ถูกกับแสง (visible light) และได้มีการค้นพบถึงความผิดปกติที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายของแสงอัลตราไวโอเลต กล่าวคือแสงอัลตราไวโอเลตที่มองเห็นด้วยตาเปล่าสามารถทำให้เซลล์ถูกเปลี่ยนแปลงไปจากสภาพเดิมได้ (Gerald, 1973) ปรากฏการณ์เช่นนี้ได้มีการพบในแบคทีเรียและไวรัส ทั้งนี้เกิดจากการที่มีเอนไซม์บางชนิดเข้าไปตัดให้ไทมีนในไทมีนไดเมอร์แยกจากกัน และทำให้ DNA กลับคืนสู่สภาพเดิม การซ่อม DNA หรือการทำให้มิวเตชันเปลี่ยนกลับโดยขบวนการที่กล่าวมานี้จะเกิดได้ดีในแสงสีน้ำเงิน อย่างไรก็ตามก็ยังมีการพบว่าใน *E. coli* นั้นอาจมีการขจัดไดเมอร์โดยวิธี dark reactivation ซึ่งหมายถึงว่าปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นโดยไม่ต้องแสง (visible light) การขจัดแบบนี้พบว่าเกิดจากการที่มีเอนไซม์บางอย่างตัดไดเมอร์จาก DNA ทั้งแล้วจะมีนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าไปแทนที่ในส่วนนั้น

การแสดงออกของยีนที่เกิดความล่าช้า เนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ หลายปัจจัยมีดังต่อไปนี้

- 1.) การกลายพันธุ์ของยีนไม่สามารถเกิดได้ทันทีหลังจากได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต
- 2.) ยีนที่จะกลายพันธุ์ต้องใช้เวลามากกว่าปกติเพื่อให้เกิด metabolic activity ก่อนที่จะเกิดการกลายพันธุ์ต่อไป
- 3.) การแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์จะเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ

2. สิ่งก่อการกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen)

ระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามค้นคว้าเพื่อหาว่าสารเคมีชนิดใดที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชหรือในสัตว์ จนทราบว่าสารเคมีเป็นจำนวนมากที่เป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น กรดไนโตรส (nitrous acid) ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Aspergillus* spp. มีรายงานพบว่าสารไนโตรเจน มัสตาร์ด และซัลเฟอร์มัสตาร์ด สามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ได้ ทั้งนี้สารฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ไดเอธิลซัลเฟต (diethylsulfate) ไดอะโซมีเทน (diazomethane) และสารประกอบอื่น ๆ ก็เป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และมีผลรุนแรงต่อผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมีสารบางชนิดที่ก่อให้เกิดมะเร็ง

อย่างไรก็ตามสารเคมีบางชนิดอาจจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งแต่จะไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง สารเคมีบางชนิดอาจจะมีผลในช่วงที่มีการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตหรือมีผลเฉพาะในเพศใดเพศหนึ่งเท่านั้น เช่น สารฟอร์มัลดีไฮด์จะก่อเกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ตัวผู้ระยะที่เป็นตัวหนอน แต่จะไม่มีผลต่อตัวเมียระยะที่เป็นตัวหนอน นอกจากนี้สารเคมีแต่ละชนิดก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีนแต่ละตำแหน่งด้วยความถี่ที่แตกต่างกัน

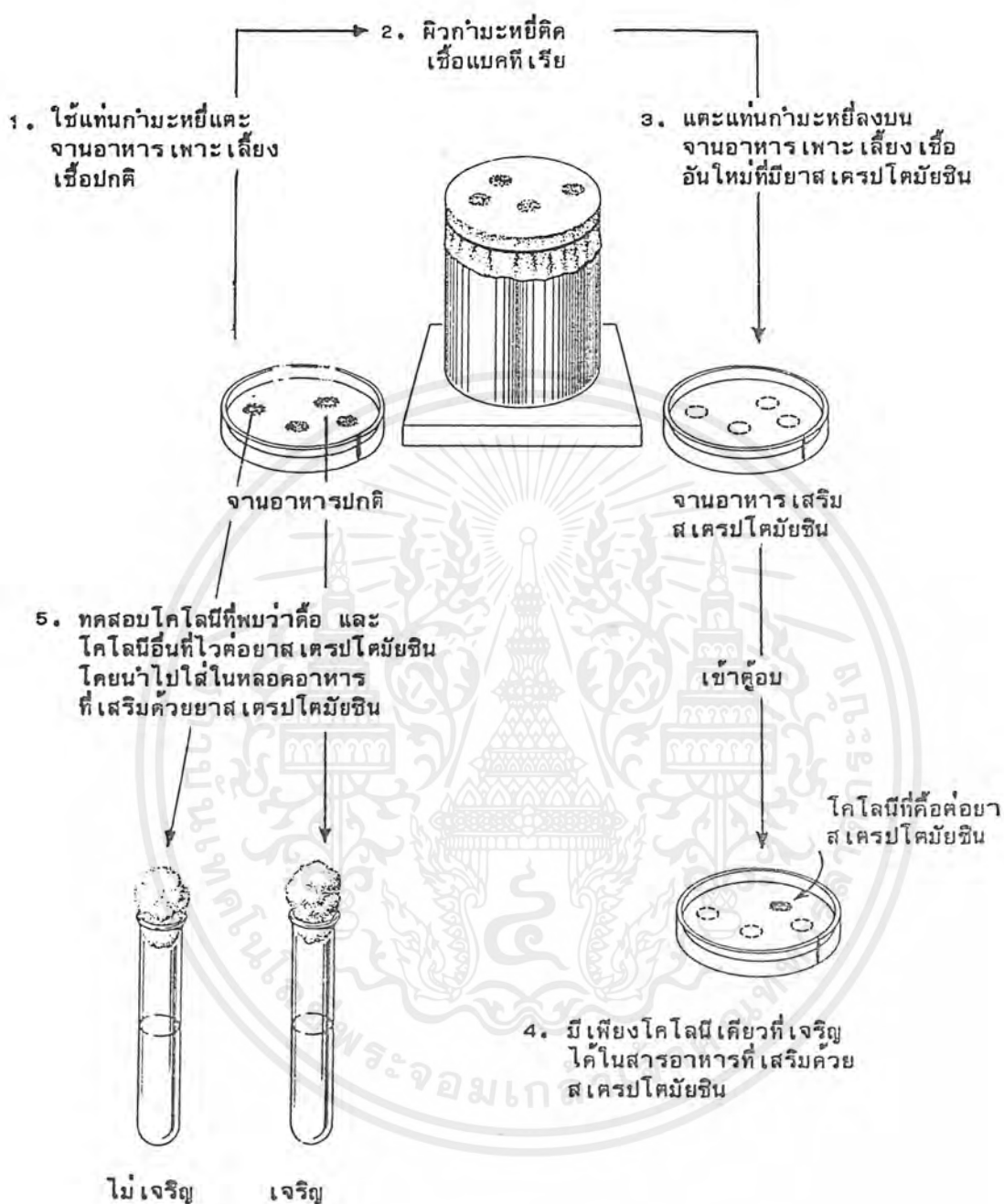
มีรายงานว่าสารแมงกานีสคลอไรด์ (manganese chloride) สามารถชักนำให้แบคทีเรียที่ต้องการสารอาร์จินีน (arginine-requiring mutant) เปลี่ยนแปลงเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์แท้ได้ด้วยความถี่ 1720×10^{-8} และชักนำให้แบคทีเรียที่ต้องการสารฟีนิลอะลานีน (phenylalanine-requiring mutant) เปลี่ยนแปลงเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์แท้ได้ด้วยความถี่ 11×10^{-8}

วิธีตรวจสอบยีนมิวเตชัน

วิธีเรพลิคาเพลตติง (replica plating)

ได้มีการพัฒนาวิธีการศึกษาทดลองในแบคทีเรีย *E. coli* เพื่อแสดงว่ายีนมิวเตชันเกิดขึ้นเองเสมอตามสภาวะการณธรรมชาติ เรียกว่าเรพลิคาเพลตติง โดยใช้หลักการง่าย ๆ คือนำสารละลายเชื้อจากที่มีเซลล์แบคทีเรียจำนวนไม่มากนักใส่ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์แท้ แล้วเอาเข้าตู้อบนานพอสมควรเพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแต่ละเซลล์เจริญแบ่งตัวจนได้โคโลนี จากนั้นใช้แท่งกลมหรือจานแก้วสะอาดขนาดใกล้เคียงกับจานเพาะเชื้อโดยมีผ้าก๊อชห่อหุ้มอยู่ด้านหนึ่งเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวพิมพ์ ใช้แทนผ้าก๊อชห่อหุ้มแต่ละบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่หลาย ๆ จาน ซึ่งแต่ละจานจะทำเครื่องหมายที่ตำแหน่งตรงกันกับจานอาหารเพาะเชื้อต้นแบบเสมอ จานอาหารบางจานมีอาหารปกติและบางจานเสริมด้วยยาสเตรปโตมัยซิน โดยวิธีการนี้จานอาหารที่เสริมด้วยยา สเตรปโตมัยซินไม่ควรมีเชื้อแบคทีเรียเจริญเป็นโคโลนีได้ แต่พบว่าจานอาหารบางจานที่เสริมด้วยยานี้มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเจริญได้ดี (รูปที่ 6) แสดงว่าโคโลนีแบคทีเรียนี้เป็นพันธุ์ที่มีความดื้อต่อยาสเตรปโตมัยซินทั้ง ๆ ที่ก่อนหน้านี้เชื้อแบคทีเรียไม่เคยสัมผัสกับยานี้มาก่อนเลย กล่าวคือแบคทีเรียมีมิวเตนต์ยีนที่ดื้อต่อยาสเตรปโตมัยซินเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและเซลล์แบคทีเรียที่กลายพันธุ์นี้มีโอกาสเจริญในสภาวะแวดล้อมของสารอาหารที่มียานี้จึงอยู่รอดได้และปรับตัวเจริญแพร่พันธุ์ต่อไปดีกว่าพวกอื่น ๆ ที่ผิดปกติในส่วนของยีนดังกล่าว

เมื่อต้องการทดสอบฟีโนไทป์ของโคโลนีเดียวจากการทำให้สายพันธุ์บริสุทธิ์หรือจากทรานสฟอร์มแมนต์ว่ามียีน marker ที่ถูกต้องหรือไม่จะนิยมใช้เทคนิคนี้โดยการเพาะเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็งบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารแตกต่างกันไปโดยให้ตำแหน่งที่ลงเชื้อบนอาหารแต่ละชนิดให้ตรงกันทุก ๆ จานเลี้ยงเชื้อ วิธีการนี้มีจานดั้งเดิม (master plate) เป็นอาหาร complete medium ที่คัดเลือกโคโลนีไว้แล้ว ส่วนจานอื่น ๆ อาจเป็น complete medium ที่ผสมยาปฏิชีวนะในกรณีที่ต้องการตรวจสอบการดื้อยา หรือ minimal plate ที่ไม่มีสารอาหารที่จะเป็นในกรณีที่ต้องการตรวจสอบคุณสมบัติของออกซิโทรปเป็นต้น (ซีนจิตต์, 2536)



รูปที่ 6 แผนภาพแสดงวิธีการทำเพลลิกเพดิง เพื่อแสดงให้เห็นว่ายีนมิวเตชันเกิดขึ้นในสภาพ
ธรรมชาติปกติ ในที่นี้แสดงให้เห็นเพียง 4 โคโลนีเท่านั้นเพื่อความสะดวก ความจริงแล้วในจาน
อาหารแต่ละจานจะมีโคโลนีของแบคทีเรียประมาณ 50-100 โคโลนี

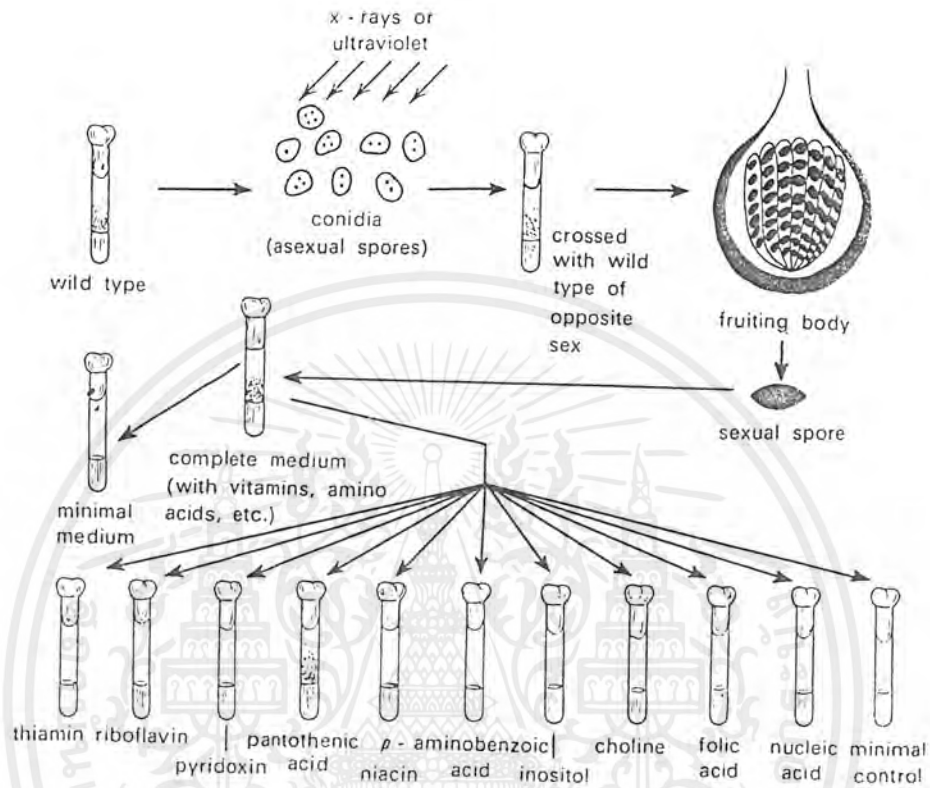
ที่มา : วิสุทธิ์ (2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ใน *Neurospora*

ในสิ่งมีชีวิตพวก haploid นั้นทุก ๆ ยีนจะแสดงอาการชัด คือแสดงผลออกมาอย่างชัดเจน ดังนั้นจึงเหมาะแก่การศึกษาถึงมิวเตชันเป็นอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามข้อที่ยากที่ต้องเผชิญก็คือการตรวจสอบมิวเตชันนั่นเอง ต่อมาได้มีการคิดค้นวิธีการตรวจสอบมิวเตชันบางชนิดในเชื้อรา *Neurospora* ได้สำเร็จ ทั้งนี้โดยการตรวจสอบดูการเจริญหรือไม่เจริญในอาหารเลี้ยงชนิดต่าง ๆ นั่นเอง การทำให้เกิดการกลายโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตหรือใช้สารเคมีจะทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่ต้องการอาหารเฉพาะ สายพันธุ์กลายที่ต้องการอาหารเฉพาะ หมายถึง จุลินทรีย์สายพันธุ์กลายที่สูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์สารบางชนิด เช่น กรดอะมิโน เนื่องจากขาดเอนไซม์หนึ่งหรือหลายชนิดในกระบวนการสังเคราะห์นั้น ๆ ดังนั้นจึงต้องเติมสารอาหารหรือกรดอะมิโนชนิดที่ขาดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium จุลินทรีย์สายพันธุ์กลายนั้นจึงเจริญได้เป็นปกติ (เช่น จิตต์, 2536)

รา *Neurospora crassa* สายพันธุ์แท้ สามารถเจริญได้ในอาหาร minimal medium คือเพียงให้มีเกลืออินทรีย์บางชนิด น้ำตาล เช่น ซูโครส (sucrose) หรือกลูโคส (glucose) วิตามินไบโอตินและสารที่ให้ไนโตรเจน เช่น ammonium nitrate จากวัตถุดิบเหล่านี้ เชื้อราสายพันธุ์แท้ก็สามารถสังเคราะห์สารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตเช่น กรดอะมิโนต่าง ๆ วิตามินและเบส (purines และ pyrimidines) ได้เอง ในการสังเคราะห์สารแต่ละชนิดนั้นจำเป็นต้องมีเอนไซม์เป็นตัวควบคุม ดังนั้นถ้าทำให้เอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์สารบางอย่างเกิดมิวเตชันคือเปลี่ยนสภาพไปจนทำหน้าที่ไม่ได้ปกติแล้ว เชื้อราพวกที่มีเอนไซม์เปลี่ยนไปนี้ (mutant หรือ auxotroph) ก็ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ขาดวิตามิน เบส หรือกรดอะมิโนบางอย่าง อย่างไรก็ตามก็เชื้อราสายพันธุ์แท้และพวกสายพันธุ์กลายต่างก็เจริญได้ในอาหาร complete medium คือเป็นอาหารที่มีกรดอะมิโน วิตามินและสารประกอบอินทรีย์ทุกอย่างครบ ในการตรวจสอบอาหารเหล่านี้เป็นอย่างดี ๆ ไป ถ้าพบว่าเมื่อใส่อาหารชนิดใดลงไปแล้วเชื้อราสามารถเจริญได้ ก็แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับยีนซึ่งสังเคราะห์อาหารชนิดนั้น (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 วิธีการตรวจสอบมิวเตชันเกี่ยวกับความต้องการชนิดของอาหารใน *Neurospora crassa* เมื่อคอนิเดีย (conidia) ได้รับการกระตุ้นให้เกิดมิวเตชันโดยใช้รังสีเอกซ์หรือแสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วก็ทำการผสมกับพวกสายพันธุ์แท้ที่มีเพศตรงกันข้าม แล้วแยกสปอร์มาเลี้ยงใน complete medium คือเป็นอาหารที่มีเกลืออินทรีย์ วิตามินและกรดอะมิโนทุกชนิดครบ ต่อจากนั้นก็นำไปเลี้ยงใน minimal medium ที่มีเฉพาะกรดอะมิโน หรือเฉพาะวิตามิน ถ้าพบว่าเจริญในอาหารที่มีวิตามินเท่านั้น ก็ทดลองเลี้ยงต่อในอาหารที่ผสมวิตามินเป็นอย่าง ๆ ไป ถ้าพบว่าเจริญในอาหารที่มีกรด pantothenic (วิตามิน B₅) เท่านั้น ก็แสดงว่ายีนที่ควบคุมการสังเคราะห์วิตามินชนิดนี้เปลี่ยนแปลงไป

ที่มา : ไพศาล (2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

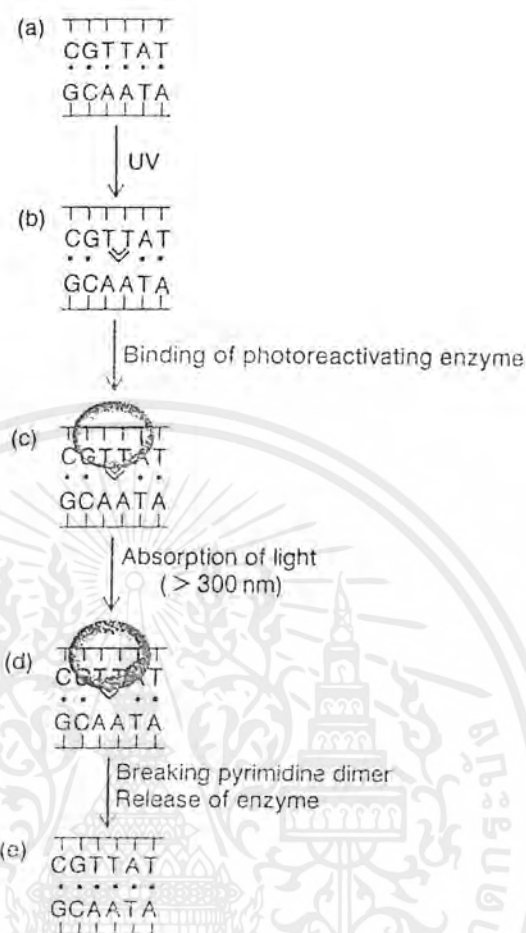
การซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair)

โมเลกุลของดีเอ็นเออาจเกิดการเสียหายหรือชำรุดได้หลายทาง ถ้าเสียหายมากอาจมีผลต่อการดำรงชีวิต อย่างไรก็ตามในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีกลไกในการซ่อมแซมโมเลกุลดีเอ็นเอที่เสียหายให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ รูปแบบของการเสียหายของโมเลกุลของดีเอ็นเอที่พบบ่อย ๆ ได้แก่

1. เกิดการแตกหักบนสายใดสายหนึ่งหรือทั้งสองสายของโมเลกุลของดีเอ็นเอ เนื่องจากการโค้งงอหรือบิด
2. เกิดการสูญเสียโมเลกุลของเบสไปจากโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสภายในเซลล์
3. เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสตัวหนึ่งหรือหลาย ๆ ตัวในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เนื่องจากสารเคมีเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว
4. สิ่งก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ เช่น รังสีเอกซ์ แสงอัลตราไวโอเลต รังสีแกมมา สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติของเบสในนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอได้ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต ทำให้เกิดการจับกันของเบสไทมินในสายเดียวกัน

สำหรับกลไกในการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอ มีหลายวิธีแตกต่างกันดังนี้

1.โฟโตรีแอคทีเวชัน (photoreactivation) เป็นการซ่อมแซมความผิดปกติของโมเลกุลของดีเอ็นเอ เช่น ในกรณีที่เกิดไทมีนไคเมอร์เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งเกิดจากการเกาะกันของเบส T ในสายเดียวกันเป็นไซโคลบิวเทนริง (cyclobutane ring) โดยใช้เอนไซม์โฟโตรีแอคทีเวติง (photoreactivating enzyme) หรือเอนไซม์ดีเอ็นเอโฟโตไลเอส (DNA photolyase) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้เริ่มต้นด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโฟโตไลเอสจะเข้าไปเกาะที่ตำแหน่งที่เกิดไทมีนไคเมอร์และเอนไซม์นี้จะดูดซับแสงสว่าง (visible light) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เอนไซม์นี้เข้าทำลายไซโคลบิวเทนริงที่ยึดระหว่างเบสไทมินด้วยกัน ทำให้เบสไทมินสามารถไปเข้าคู่กับเบสอะดีนีนของสายตรงกันข้ามได้เหมือนเดิม หลังจากนั้นเอนไซม์ชนิดนี้ก็หลุดจากตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ผิดปกติ ก็จะได้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปกติเหมือนเดิม (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยวิธีโฟโตรีแอคทีเวชัน
ที่มา : ประดิษฐ์ (2543)

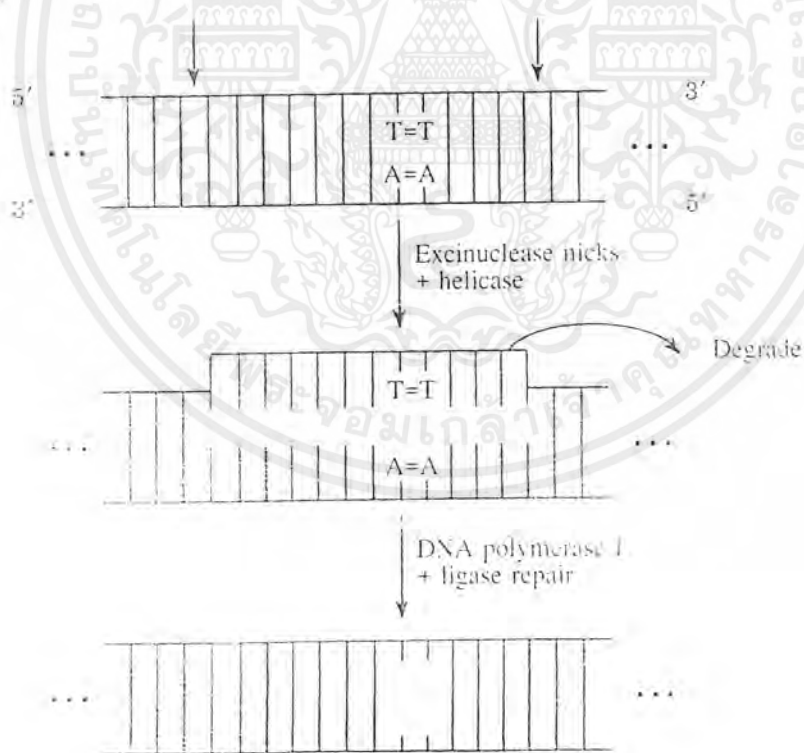
ในกรณีที่เกิดความผิดปกติของโมเลกุลของดีเอ็นเอเนื่องจากมีหมู่เมทิล (methyl group) เกินมาจากปกติที่ตำแหน่ง O^6 ของเบสกวานีน (O^6 methylguanine) ก็จะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (O^6 -mGua DNA methyltransferase : O^6 -mGua) ทำหน้าที่กำจัดหมู่เมทิลที่เกินมาออกจากโมเลกุลของเบสกวานีน ก็จะทำให้ได้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปกติเหมือนเดิม

2.เอกซ์ซิชั่นรีแพร์ (excision repair) เป็นกระบวนการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ผิดปกติทั่วไป โดยจะมีการตัดส่วนของดีเอ็นเอที่เสียหายหรือผิดปกติออกไปโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และจะมีการเติมส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกต้องแทนส่วนที่ถูกตัดออกไปนี้ การซ่อมแซมดีเอ็นเอดังกล่าวนี้มีหลายแบบด้วยกัน เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เสียหายจากแสงอัลตราไวโอเลต (UV damage repair)

เมื่อโมเลกุลของดีเอ็นเอได้รับแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดไทมีนไดเมอร์ขึ้นภายในเวลา 1-2 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่มี การซ่อมแซมโดยวิธีโฟโตรีแอคทีเวชันแล้ว การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอ บริเวณที่เกิดไทมีนไดเมอร์จะเกิดขึ้นโดยมีเอนไซม์เอ็นโดนิวคลีเอส (endonuclease) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ย่อยอีก 3 ชนิด คือ A,B,C เอกซ์ซินิวคลีเอส (A B C excinuclease) ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยยีน *uvr A*, *uvr B* และ *uvr C* เอนไซม์ย่อยเหล่านี้จะทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 8 นับจากปลาย 5' ของบริเวณที่เกิดไทมีนไดเมอร์และตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 4 นับจากปลาย 3' ของบริเวณที่เกิดไทมีนไดเมอร์ จากนั้นจะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอเฮลิเคส 2 (DNA helicase II) ซึ่งถูกสังเคราะห์จากยีน *uvr D* ทำหน้าที่แยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยเบส 12 เบส นั้นออกมาซึ่งชิ้นส่วนดังกล่าวจะถูกย่อยสลายไป ต่อจากนั้นจะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส 1 (DNA polymerase I) และไลเกส (ligase) ทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องตรงบริเวณช่องว่างที่ถูกตัดออกไปให้สมบูรณ์ (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ถูกทำลายโดยแสงอัลตราไวโอเลต

ที่มา : ประดิษฐ์ (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิวเตชันกับการนำไปใช้

นอกจากมิวเตชันจะเป็นกลไกสำคัญทำให้เกิดความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมและเป็นรากฐานสำคัญของกระบวนการวิวัฒนาการแล้ว มิวเตชันยังเป็นปัจจัยสำคัญในการศึกษาพันธุศาสตร์และการผสมพันธุ์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สัตว์และพันธุ์พืชที่มีประโยชน์ทางการเกษตรทั้งพวกพืชสวน พืชไร่และพวกไม้ประดับต่าง ๆ ซึ่งเป็นที่นิยมกันอยู่โดยทั่วไปในปัจจุบัน การชักนำให้เกิดยีนมิวเตชันในสัตว์โดยเฉพาะแมลงที่เป็นพาหะนำโรคหรือแมลงศัตรูพืชนับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากในการคัดเลือกพันธุ์แมลงเพื่อผลประโยชน์ทางการควบคุมหรือการกำจัดแมลงพาหะหรือแมลงศัตรูนั้น ๆ โดยวิธีการทางพันธุศาสตร์

การศึกษามิวเตชันควบคู่กับการคัดเลือกพันธุ์ในพวกจุลินทรีย์มีประโยชน์อย่างยิ่งในทางอุตสาหกรรมบางประเภทที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของพวกจุลินทรีย์ อันได้แก่การผลิตยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลลิน สเตรปโตมัยซิน การคัดเลือกพันธุ์ไรโซเบียมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน เหล่านี้เป็นต้น จากรายงานของ Anwar และคณะ (1996) พบว่าจากการใช้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อก่อให้เกิดการกลายกับ *Penicillium purpurogenum* สามารถต้านการข่มของคะตะบอไลต์ในกระบวนการผลิตได้ และรายงานของ Anwar และคณะ (1996) พบว่าสายพันธุ์กลายของ *Penicillium camebertii* สามารถผลิตกรดไซโคลเปียโซนิก (cyclopiazonic : CA) ได้ปริมาณมากขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์แท้ และเส้นใยของเชื้อชนิดนี้สามารถนำมาผลิตไวท์ชีท (white cheese) ได้

ความเจริญก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อเอื้ออำนวยความสะดวกสบายในรูปแบบต่าง ๆ แก่มนุษย์โดยไม่ใช้ความระมัดระวังให้ดีแล้วจะส่งผลกระทบย้อนกลับมาให้โทษแก่มนุษย์อย่างไม่มีทางหลีกเลี่ยง ดังจะเห็นว่าโครงการปฏิรูปปรมาณู รังสีเอกซ์ และแสงอัลตราไวโอเลตที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมและการแพทย์ เครื่องรับโทรทัศน์สี สารกัมมันตรังสี รวมทั้งพวกสารเคมีกันบูดในอาหาร สีย้อมผ้า ยาพลาสติก เป็นต้น ซึ่งล้วนแล้วแต่ให้คุณอนันต์แต่อาจเป็นโทษมหันต์ได้ถ้าหากใช้ไม่ถูกต้องตามหลักวิชาการ

ดังนั้นปัจจัยที่มีฤทธิ์ชักนำให้เกิดมิวเตชันในสิ่งมีชีวิตทั่วไปรวมทั้งในคนจึงมีบทบาทอย่างยิ่งต่อสังคมมนุษย์ทั้งในปัจจุบันและอนาคต เพราะมิวเตนต์ยีนที่เกิดขึ้นส่วนมากเป็นยีนไม่ดีและบางกรณีอาจเป็นอันตรายต่อชีวิตไม่ว่ายีนนั้นมีสมบัติเด่นหรือด้อยก็ตาม หรืออาจเป็นยีนที่เป็นต้นเหตุของโรคทางกรรมพันธุ์ต่าง ๆ ที่สามารถถ่ายทอดกระจายไปในกลุ่มยีนของมนุษย์ต่อไปอย่างไม่หยุดยั้ง อันจะเป็นการต่อเศรษฐกิจและสังคมของมนุษยชาติที่มีราคาแพงและหลีกเลี่ยงไม่พ้น ยิ่งไปกว่านั้นนักวิทยาศาสตร์ยังพบข้อมูลที่แสดงว่าปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวนอกจากจะสามารถชักนำให้เกิดมิวเตชันได้แล้วก็ยังอาจเป็นต้นเหตุของโรคมะเร็งอีกด้วย กระนั้นก็ตามโทษที่อาจเกิดจากปัจจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่าง ๆ เหล่านี้ถ้ารุนแรงขนาดถึงแก่ชีวิตก็ยังคงไม่โหดร้ายไปกว่าตัวการที่ทำให้เกิดมิวแตนต์ยีนที่
 เลวซึ่งอาจถ่ายทอดต่อไปในกลุ่มประชากรและสร้างปัญหาให้แก่สังคมมนุษย์ในระยะยาว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

การวิจัยและการดำเนินการ

สารเคมี

1. ทวิน 80 (tween 80) 0.02 เปอร์เซ็นต์
2. ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0
3. ไนสเตติน (nystatin)
4. ส่วนประกอบของสารอาหารเลี้ยงเชื้อ (stock solution) (ภาคผนวก ก)
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)
6. คองโก เรด (congo red)
7. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

อุปกรณ์

แท่งกวนสารแม่เหล็ก (magnetic bar)	ตู้อบแห้ง
เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)	ตู้บ่มเชื้อ
กล้องจุลทรรศน์	Hot plate
ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อ (laminar flow)	ตะเกียงแอลกอฮอล์
จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)	เครื่องแก้ว
นาฬิกาจับเวลา	เครื่องเขย่าหลอด (vortex mixer)
ที่เขี่ยเชื้อ	ผ้าสีดำผืนใหญ่
แผ่นกรองซิลเทอรักลาส (siltered glass filter)	เครื่องเขย่า (shaker)
ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer)	เครื่องวัดพีเอช
ฟลask	เครื่องชั่ง
ตู้อบ	คอร์ก บอยเลอร์ (cork boiler)
ตู้ฉายแสงอัลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนและวิธีการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (% survival)

1.เลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. หมายเลข 4 (อารี, 2541) ถ่ายเชื้อลงในอาหาร PDA เป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดสปอร์เต็มๆ จากนั้นใช้สปอร์ของเชื้อรา จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (โดยใช้วิธีการนับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์) ในสารละลายที่มีทวิน 80 0.02 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นกำจัดเส้นใยเชื้อราออกโดยการกรองสารละลายสปอร์ด้วยแผ่นกรองซิลเทอริกกลาส เตรียมสารละลายสปอร์ 10 มิลลิลิตร ใส่จานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อสำหรับเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (S) และไม่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (C) อย่างละชุด

2.เตรียมอุปกรณ์ฉายแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยวางเครื่องกวนสารให้ห่างจากหลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต ประมาณ 15 เซนติเมตร

3.วางจานเพาะเชื้อที่มีสปอร์ของเชื้อราที่ต้องการก่อการกลายพันธุ์บนเครื่องกวนสาร ใส่แท่งกวนสารแม่เหล็ก ที่อบฆ่าเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ ปรับความเร็วการหมุนของ Magnetic bar ชั่วๆ (ความเร็วอยู่เลข 2-3) ส่วนจานเพาะเชื้อให้วางไว้ในตู้ปลอดเชื้อ (ทุกขั้นตอนหลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต พยายามอย่าให้สารละลายสปอร์โดนแสง)

4.ใช้นาฬิกาจับเวลาเป็นระยะๆ เพื่อเก็บตัวสารละลายสปอร์ทั้ง 2 ชุด มาหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (survival) โดยดูมา 0.1 มิลลิลิตร แล้วเทเพลทด้วย complete medium ที่ความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} อย่างละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ตามลำดับ เก็บไว้ในที่มีด 3 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน นับจำนวนและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเทียบกับเวลาเริ่มต้น 0 นาที

5.เขียนกราฟระหว่างเวลากับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดได้ killing curve เพื่อใช้ในการคัดเลือกตัวที่เกิดการกลายพันธุ์ต่อไป โดยเลือกเอาเวลาใดเวลาหนึ่งที่เหมาะสม สำหรับการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตจะใช้เวลาที่เซลล์เริ่มต้นตายไป 90 เปอร์เซ็นต์ หรือเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 10 เปอร์เซ็นต์

6.ครั้งต่อไปทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลต โดยใช้ระยะเวลาที่แสงอัลตราไวโอเลตทำให้เซลล์เหลือเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 10 เปอร์เซ็นต์ ตามเวลาที่ได้ในข้อ 5 แล้วเก็บสารละลายสปอร์ที่ได้ไว้ในที่มีด 3 ชั่วโมง เพื่อทำการเพิ่มสัดส่วนสายพันธุ์กลายต่อไป

การทดลองที่ 2 ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดโดยการใส่สารไนสเตติน

1. ทำการศึกษาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสายพันธุ์แท้ด้วยไนสเตตินโดยใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (โดยใช้วิธีการนับฮีมาไซโตมิเตอร์) ลงฟลาस्कด้วย liquid minimal medium 150 มิลลิลิตร บ่มโดยการเขย่านาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงใส่ไนสเตตินความเข้มข้น 50, 30, 20 และ 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ข้ำ (Sigma Chemical Co.,USA, 5,400 USP ยูนิตต่อมิลลิกรัม ซึ่งละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร)
2. เก็บตัวอย่างทุกครึ่งชั่วโมงครั้งละ 1 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางที่ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่ยังเหลืออยู่ โดยใช้อาหาร minimal media ตามลำดับ
3. ตรวจนับโคโลนีและนำผลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

การทดลองที่ 3 ศึกษาการเพิ่มสัดส่วนสายพันธุ์กลายโดยใช้ไนสเตติน

1. ทำการเพิ่มสัดส่วนสายพันธุ์กลายโดยใช้สปอร์ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตและเก็บในที่มืดแล้ว 3 ชั่วโมงจากการทดลองที่ 1 ใส่ใน liquid minimal medium 150 มิลลิลิตร บ่มโดยการเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ใส่ไนสเตตินความเข้มข้นที่หาได้และบ่มเชื้อตามเวลาที่ได้จากการทดลองที่ 2 เพื่อให้ได้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ในการทำการศึกษาการเพิ่มสัดส่วนสายพันธุ์กลาย
3. ทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายในอาหารคัดเลือกเฉพาะต่อไป

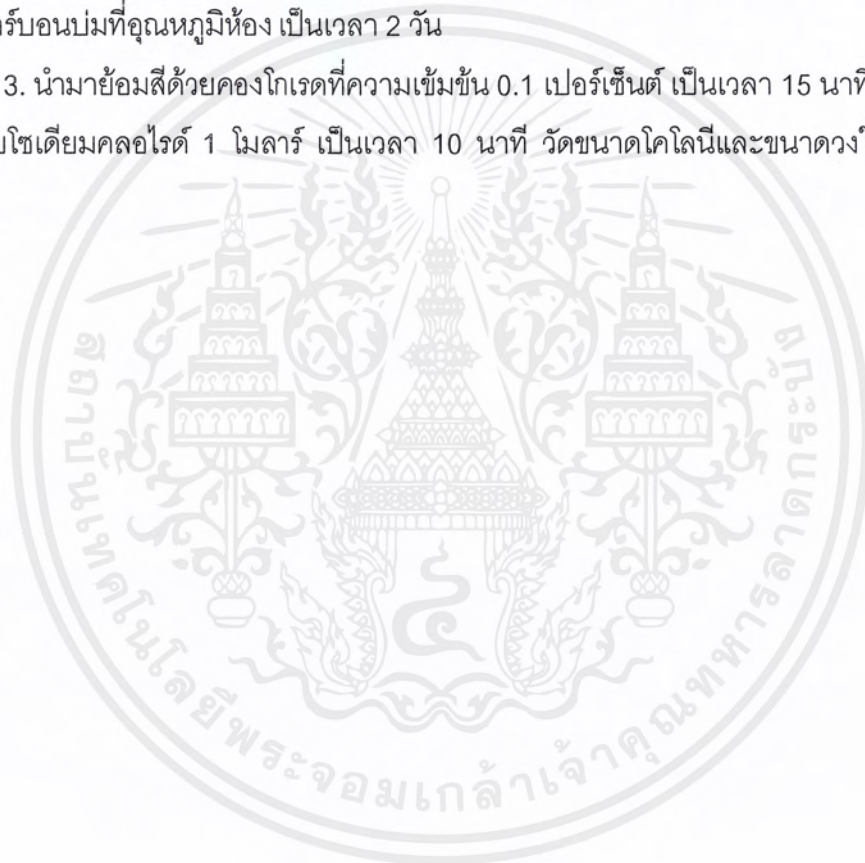
การทดลองที่ 4 ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

1. เซลล์ที่ผ่านการเพิ่มสัดส่วนสายพันธุ์กลายแล้ว ให้นำมาคัดเลือกสายพันธุ์กลาย โดยใช้ 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายเซลล์ที่ได้จากการทดลองที่ 3 spread plate ลงบน complete medium บ่มเป็นเวลา 2-3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เชื้อเชื้อลงบน minimal medium ต่อไป
2. เตรียมส่วนประกอบของสารอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะทดสอบ (ตารางที่ 11 ในภาคผนวก ก) โดยความเข้มข้นที่จะใช้ในแต่ละงานเพาะเชื้อเป็นมิลลิโมลาร์ ทำการละลายและนึ่งฆ่าเชื้อของสารต่าง ๆ ก่อน แล้วให้แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกลุ่ม ๆ (ตารางที่ 12 ในภาคผนวก ก) เพื่อที่จะทราบได้ว่าสายพันธุ์กลายที่ทดสอบเป็นออกซิโทรปชนิดใด

การทดลองที่ 5 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไคลาเนสจากงูไฮ

เป็นขั้นตอนการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบการสร้างเอนไซม์คืออาหารที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน หรืออาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน
2. เลี้ยงเชื้อในจานเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อเตรียมสปอร์ของเชื้อรา จากนั้นนำคอร์กบอยเวอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร เจาะอาหาร PDA ที่มีสปอร์ของเชื้อราไปวางตรงจุดกึ่งกลางอาหารที่มีฟางข้าวหรืออาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน
3. นำมาย้อมสีด้วยคองโกเรดที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที วัดขนาดโคโลนีและขนาดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ



บทที่ 4

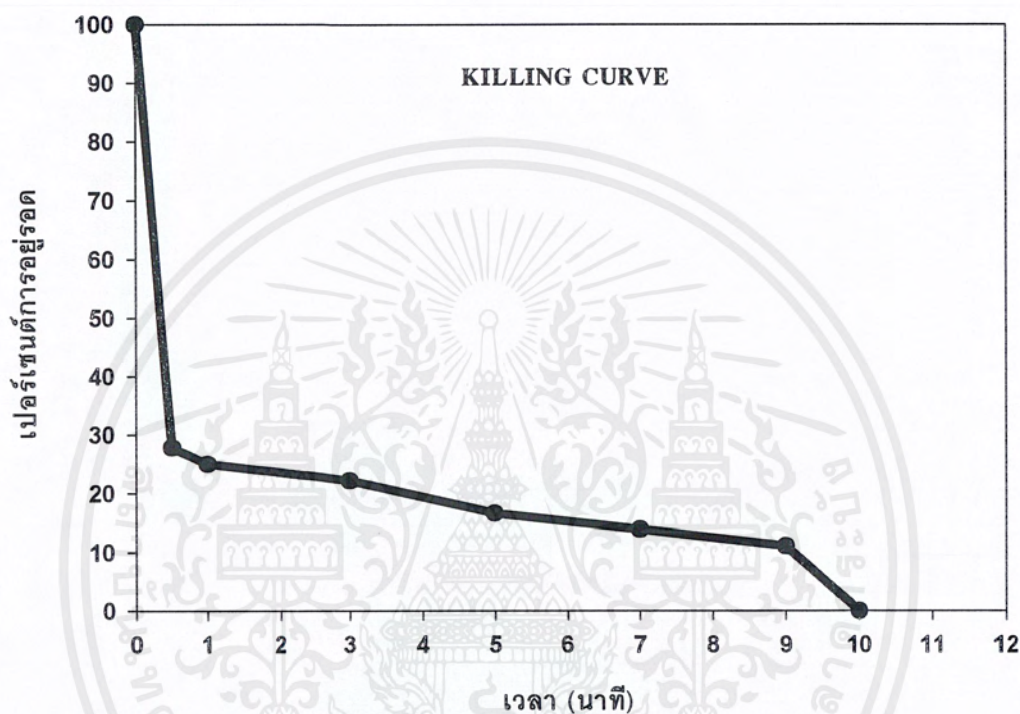
ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (% survival)

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Penicillium* sp. ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่าง ๆ ในระดับความเจือจาง 10^{-1}

เวลา (นาที่)	จำนวนโคโลนีของเชื้อ ต่อมิลลิลิตร ($\times 10$)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)
0	36	100
0.5	10	27.78
1	9	25
3	8	22.22
5	6	16.67
7	5	13.89
9	4	11.11
10	0	0

จากผลการทดลองหลังการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต ตรวจนับโคโลนีที่เวลา 0 นาที่ เชื้อที่ไม่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (ตัวควบคุม) ได้ 36×10 โคโลนี เมื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดโดยเทียบกับโคโลนีของเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (ตัวทดลอง) ที่เวลา 9 นาที่ จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณ 11.11 และได้คัดเลือกเอาเวลาที่ 8 นาที่ จากกราฟ killing curve ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับทฤษฎีที่เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 10 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายอโซโทรฟิกที่มีคุณสมบัติผลิตเอนไซม์ไคลาเนสด้วย (Agrawal และคณะ 1999)



รูปที่ 10 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Penicillium* sp. ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต เวลาต่าง ๆ ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}

2. ศึกษาหาความเข้มข้นของไนสเตดินและเวลาที่เหมาะสม สำหรับเพิ่มสัดส่วนมิวแทนท์ ความเข้มข้นของไนสเตดิน และเวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์แท้ ที่ได้จากการทดลองแสดงได้ดังตารางที่ 4, 5, 6 และ 7

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *Penicillium* sp. หลังใช้สารไนสเตดินที่ความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 50 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่ความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เป็นเวลา 15 นาที

ความเข้มข้น (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)		
	ความเจือจาง 10^{-1}	ความเจือจาง 10^{-2}	ความเจือจาง 10^{-3}
10	11.486	5.86	0.00
20	0.00	0.00	0.00
30	0.00	0.00	0.00
50	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *Penicillium* sp. หลังใช้สารไนสเตดินที่ความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 50 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่ความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เป็นเวลา 30 นาที

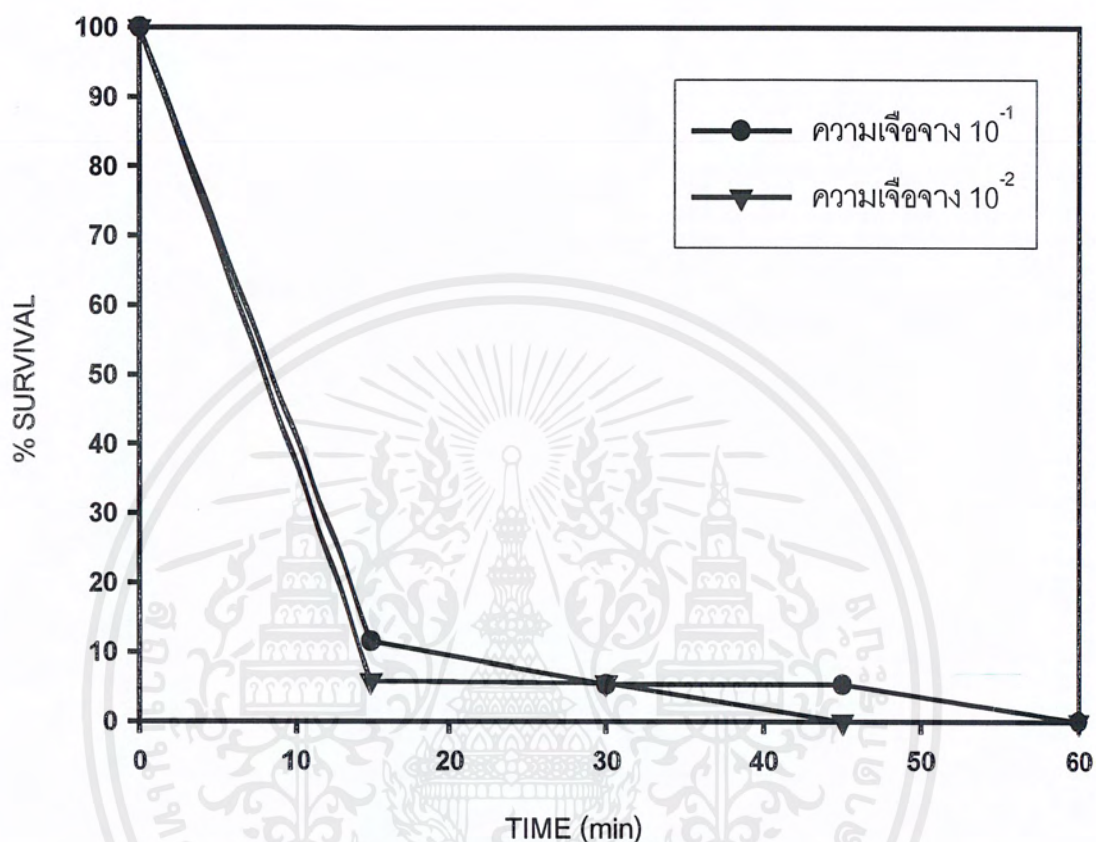
ความเข้มข้น (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)		
	ความเจือจาง 10^{-1}	ความเจือจาง 10^{-2}	ความเจือจาง 10^{-3}
10	5.357	5.55	0.00
20	0.00	0.00	0.00
30	0.00	0.00	0.00
50	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *Penicillium* sp. หลังใช้สารไนสเตตินที่ความเข้มข้น 10,20,30 และ 50 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่ความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เป็นเวลา 45 นาที

ความเข้มข้น (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)		
	ความเจือจาง 10^{-1}	ความเจือจาง 10^{-2}	ความเจือจาง 10^{-3}
10	5.319	0.00	0.00
20	0.00	0.00	0.00
30	0.00	0.00	0.00
50	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *Penicillium* sp. หลังใช้สารไนสเตตินที่ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร

เวลา (นาที)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)	
	ความเจือจาง 10^{-1}	ความเจือจาง 10^{-2}
0	100	100
15	11.49	5.86
30	5.36	5.55
45	0.00	0.00



รูปที่ 11 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Penicillium* sp. โดยโนสเตรินที่ความเจือจาง 10^{-1} และ 10^{-2}

จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของโนสเตริน 10 หน่วยต่อมิลลิตร สปอร์ของเชื้อราที่ความเจือจาง 10^{-1} เป็นเวลา 15 นาที จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์แท้อยู่ประมาณ 11.49 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับทฤษฎีของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่เหมาะสมที่ 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อนำไปเพิ่มสัดส่วน *Penicillium* sp. สายพันธุ์กลายต่อไป

4 ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

ตารางที่ 8 ผลการคัดเลือกเชื้อ

สูตรอาหาร	เชื้อ Auxotroph	
	A1	A33
1	เจริญ	-
2	-	-
3	-	-
4	-	เจริญ
5	-	-
6	เจริญ	เจริญ
7	-	เจริญ
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-

หมายเหตุ

- เชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป A1 (Auxotroph A1) มาจากการผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นเวลา 9 นาที ความเจือจางของสปอร์เชื้อราที่ 10^{-1}
- เชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป A33 (Auxotroph A33) มาจากการผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นเวลา 8 นาที ความเจือจางของสปอร์เชื้อราที่ 10^{-2}

จากผลการทดลองจะได้ว่า

- เชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) ขาดความสามารถในการสังเคราะห์ adenine เพื่อใช้ในการเจริญ
- เชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) ขาดความสามารถในการสังเคราะห์ methionine และ lysine เพื่อใช้ในการเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ศักยภาพกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสจากวงไส

ตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสของสายพันธุ์แท้กับเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) และเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) จากวงไสรอบโคโลนีในอาหารที่มีไโซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดวงไสรอบโคโลนี (ซม.)	อัตราส่วนวงไสรอบ โคโลนีต่อวงโคโลนี
สายพันธุ์แท้	0.7	1.0	1.43
	1.0	1.5	1.5
สายพันธุ์กลาย	1.4	2.3	1.64
ออกซิโทรป (A1)	1.5	2.5	1.67
สายพันธุ์กลาย	0.9	0.0	0.0
ออกซิโทรป (A33)	1.0	0.0	0.0

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสของสายพันธุ์แท้กับเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) และเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) จากวงไสรอบโคโลนีในอาหารที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

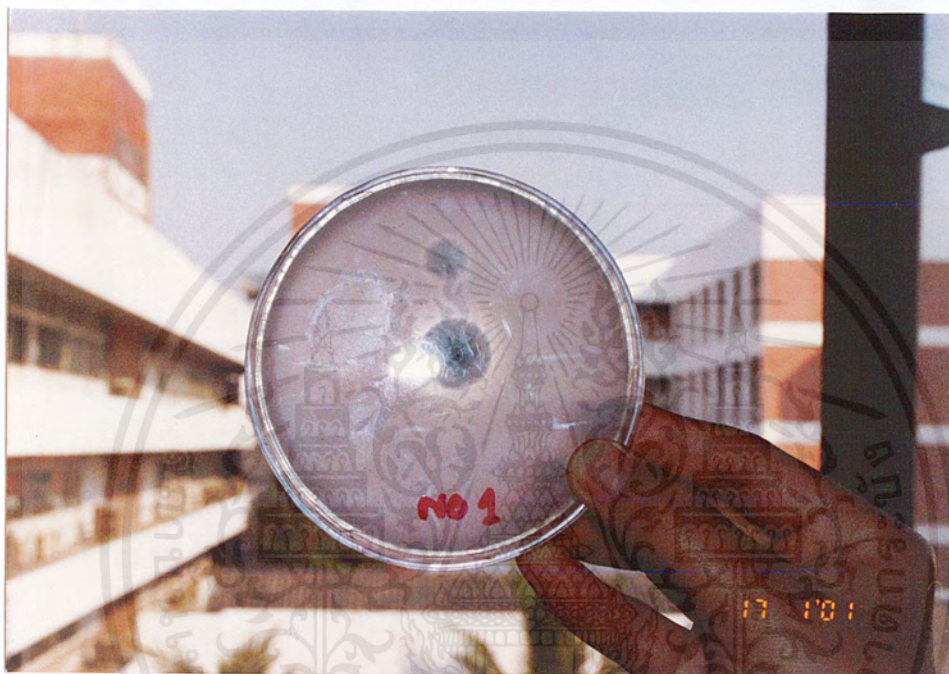
เชื้อ	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดวงไสรอบโคโลนี (ซม.)	อัตราส่วนวงไสรอบ โคโลนีต่อวงโคโลนี
สายพันธุ์แท้	0.9	1.2	1.33
	0.8	1.0	1.25
สายพันธุ์กลาย	1.6	2.4	1.50
ออกซิโทรป (A1)	1.7	2.5	1.47
สายพันธุ์กลาย	1.0	0.0	0.0
ออกซิโทรป (A33)	0.7	0.0	0.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์แท่นอาหารที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 ลักษณะโคโลนีของเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทป (A1) บนอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 ลักษณะโคโลนีของเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทโรป (A33) บนอาหารที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



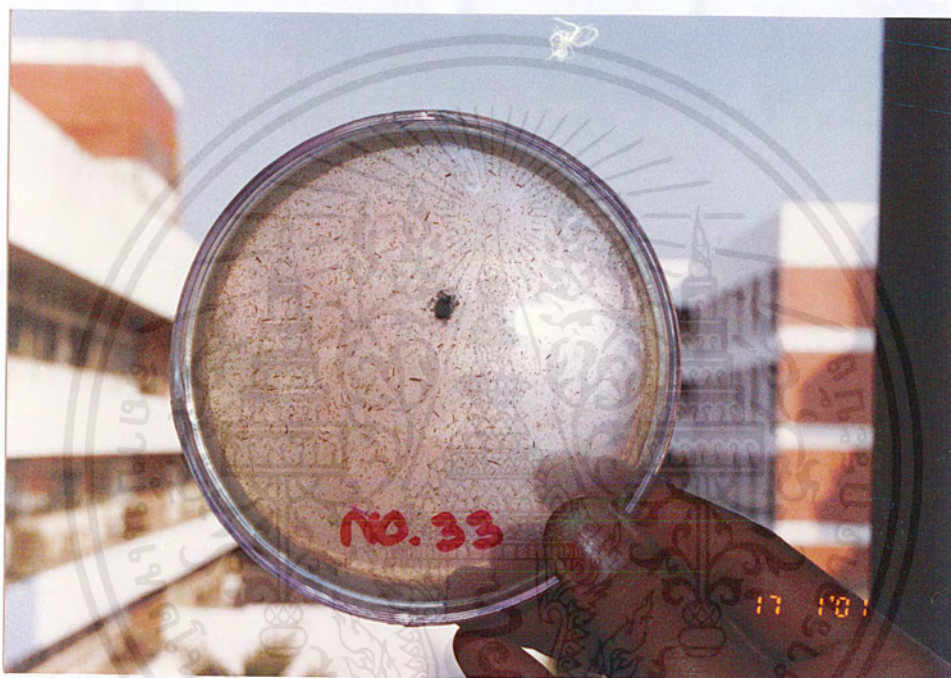
รูปที่ 15 ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์เห็บบนอาหารที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายออกซิโทโรป (A1) บนอาหารที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



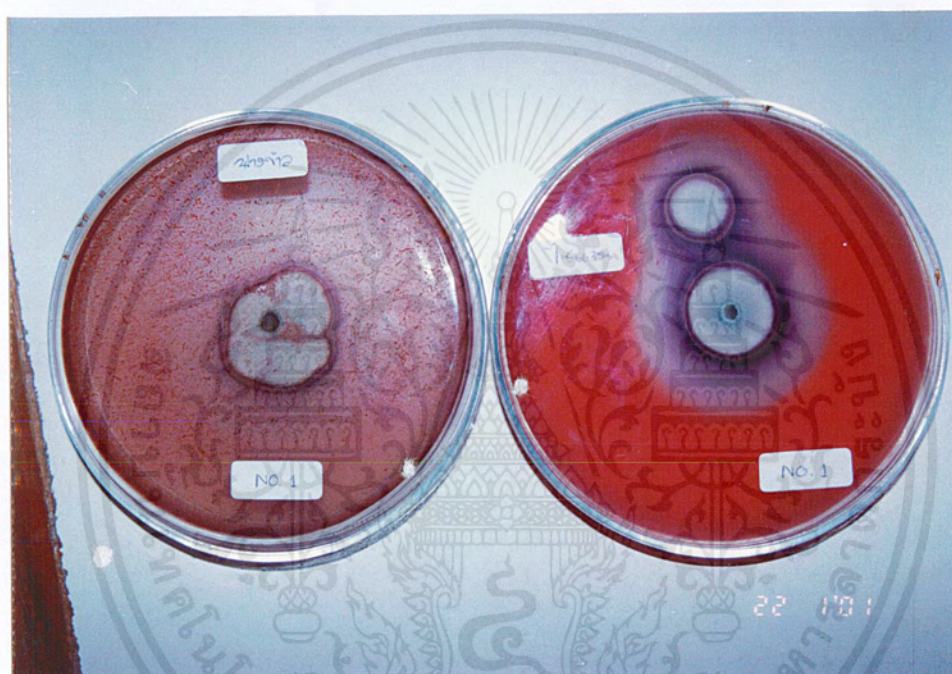
รูปที่ 17 ลักษณะโคโลนีของเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) บนอาหารที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของสายพันธุ์แท่นอาหารที่มีไฮแลนหรือฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 19 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทโรป (A1) บนอาหารที่มีไซแลน หรือฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของเชื้อสายพันธุ์กลายออกไซโทรป (A33) บนอาหารที่มีไธแลนหรือฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

6.1 เชื้อสายพันธุ์กล้วยออกไซโทรป (A1)

ลักษณะที่สังเกตได้คือ เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียวอมน้ำตาลเข้มกว่าสายพันธุ์แท้
ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 ลักษณะการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กล้วยออกไซโทรป (A1) บนอาหารวุ้นเยียง

6.2 เชื้อสายพันธุ์กลายออกโซโทรป (A33)

ลักษณะที่สังเกตได้คือ เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียวอมน้ำตาล ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 ลักษณะการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลายออกโซโทรป (A33) บนอาหารวุ้นเอียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (% survival) จากกราฟ killing curve เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ โดยเลือกเวลาที่เซลล์เริ่มต้นหายไป 90 เปอร์เซ็นต์หรือเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเลตได้ที่เวลา 8 (A33) และ 9 (A1) นาที ความเจือจางสปอร์ของเชื้อราที่ 10^{-1} , 10^{-2} ตามลำดับ จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณ 12 และ 11.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จุดประสงค์ที่ต้องทำการคัดเลือกเวลาที่ทำให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ของการอยู่รอดก็เพื่อจะได้ง่ายต่อการคัดเลือกเชื้อต่อไป

จากการศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดโดยใช้สารไนสเตตินที่ความเข้มข้น 50, 30, 20 และ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตรในอาหาร minimal medium พบว่าที่ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ความเจือจางของเชื้อรา 10^{-1} เป็นเวลา 15 นาทีจะทำให้เชื้อมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อนำผลที่ได้มาใช้กับเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 8 และ 9 นาที จะทำให้ได้สัดส่วนของเชื้อกลายมากขึ้นเพราะสารไนสเตตินมีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อสายพันธุ์แท้

เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) และเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) ไปทดสอบการคัดเลือกสายพันธุ์กลายตามจุดประสงค์ของการวิจัย พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) ขาดความสามารถในการสังเคราะห์อะนินได้ และเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) ขาดความสามารถในการสังเคราะห์เมทไธโอนีนและไลซีนเพื่อใช้ในการเจริญได้

จากการศึกษาหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสโดยสังเกตจากวงไฮรอปโคโลนีในอาหารที่มีฟางข้าวหรือไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยจากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์แท้ กับเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) และเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) พบว่าเชื้อเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A1) มีประสิทธิภาพมากที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส รองลงมาคือสายพันธุ์แท้ ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) แทบไม่มีประสิทธิภาพเลย

ข้อเสนอแนะ

ในขั้นตอนหลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตจะต้องระวังไม่ให้โดนแสงเพราะอาจมีผลทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์กลายน้อยลงคือเชื้อสามารถผันกลับเป็นเชื้อสายพันธุ์แท้ตามเดิมซึ่งเป็นสาเหตุมาจากปรากฏการณ์ “photoreactivity” หรือ “reverse mutation”

สาเหตุที่ได้เชื้อกลายน้อยหรือได้เชื้อที่มีคุณสมบัติในการผลิตไซลาเนสไม่มาก อาจเป็นเพราะช่วงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่คัดเลือกมาอาจมีเชื้อที่มีคุณสมบัติที่ต้องการน้อย เพราะเชื้อที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีประสิทธิภาพสูงอาจจะอยู่ในช่วง 90 เปอร์เซ็นต์ของการอยู่รอดที่ไม่ได้ทำการทดลอง แต่เนื่องจากเวลาการวิจัยจำกัดจึงคัดเอาแต่ช่วง 10 เปอร์เซ็นต์ของการอยู่รอดมาทำการวิจัยเท่านั้น เพราะฉะนั้นจึงควรต้องทำการทดลองในช่วง 90 เปอร์เซ็นต์ของการอยู่รอดที่เหลือด้วยถึงจะมีโอกาสได้เชื้อที่ต้องการสูง

ฟางข้าวหรือไซแลนที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ควรจะวิจัยหาแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ที่สามารถทดแทนกันได้ คือ วัสดุเศษเหลือจากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ชังข้าวโพด

ในขั้นตอนทดสอบคุณสมบัติของสายพันธุ์กลายที่ได้โดยอาหารคัดเลือกสายพันธุ์ อาจจะเติมแหล่งคาร์บอนที่เป็นตัวเหนียวนาเอนไซม์ไซลาเนสด้วยเพื่อที่จะศึกษาได้ว่าเชื้อที่ได้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้หรือไม่ เช่น เชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) ถ้าเราเติมแหล่งคาร์บอนลงไปด้วยก็อาจจะทราบได้ว่าเชื้อสายพันธุ์กลายออกซิโทรป (A33) ไม่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส อาจจะไม่ต้องนำไปศึกษาหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อไป

นอกจากทำการกลายพันธุ์ในเชื้อ *Penicillium* sp. เพื่อหาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสแล้ว ควรจะทำการกลายพันธุ์ในเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ด้วย หรืออาจจะทดลองใช้กรรมวิธีการก่อการกลายพันธุ์อื่น ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติตามที่เราต้องการ

ในการทดสอบหาคุณสมบัติของสายพันธุ์กลายว่าเป็นออกซิโทรปชนิดใด เพื่อที่จะได้ทราบถึงคุณสมบัติของสายพันธุ์กลายที่ได้ตามจุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งเมื่อทราบถึงคุณสมบัติของสายพันธุ์กลายที่ได้แล้วก็จะเป็นประโยชน์ในการที่จะนำสายพันธุ์กลายที่ได้มาเพิ่มประสิทธิภาพ เช่น อาจื่อนำสายพันธุ์กลายที่ได้ทั้ง 2 ชนิดมารวมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสายพันธุ์กลายให้สูงขึ้น ทั้งนี้อาจจะทดสอบหาคุณสมบัติของสายพันธุ์กลายวิธีอื่น ๆ ด้วย เช่น ทดสอบกับอาหารที่มียาปฏิชีวนะ ซึ่งถ้าเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้สามารถเจริญในอาหารที่มียาปฏิชีวนะนั้น แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์กลายมีคุณสมบัติในการต้านยานั้น

เชื้อสายพันธุ์กลายออกไฮโทรป (A1) ที่ได้ควรจะนำมาหาสภาวะต่าง ๆ สำหรับการเจริญ
รวมทั้งหาคุณสมบัติต่าง ๆ และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ชื่นจิตต์ บุญเชิด. 2536. การทำ Replica plating , ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ
สรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ) หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ,
เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม เล่มที่ 1, น.1.14-1.16,สมาคมเทคโนโลยี
ชีวภาพแห่งประเทศไทย.
- ชวนพิศ ดีเอกนามกุล. 2536. การทำให้เกิดการกลายในเชื้อรา. ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ
สรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ) หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ, เทคนิค
ทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม เล่มที่ 1, น. 20-33, สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่ง
ประเทศไทย.
- ดวงพร คันธโชติ. 2530. ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์, จุลชีวอุตสาหกรรม, โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
น. 119.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น. 237-260.
- ประเสริฐ สันตินานาเลิศ. 2536 การทำให้เกิดการกลายโดยการใส่แสงอัลตราไวโอเลต ใน วัฒนา
ลัยปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ) หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัย
เทคโนโลยีชีวภาพ, เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม เล่มที่ 1, น. 52,
สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2535. พันธุศาสตร์, ไทยวัฒนาพานิชย์, กรุงเทพฯ. น. 212-241.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช. วิเชียร สีสุข. อัญชริดา สวารชร และนภา โล่ห์ทอง. 2535. การผลิตเอนไซม์
ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนจากวัสดุเหลือทิ้งจากเกษตรกรรมโดยเชื้อ *Aspergillus*
fumigatus Fresenius รหัส 4-45-1F. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์,
กรุงเทพฯ. 26:296-305.
- วิสุทธิ ไบไม้. 2533. พันธุศาสตร์, เจ้าพระยาระบบการพิมพ์, กรุงเทพฯ. น. 127-135.

สมรักษ์ พันธุ์ผล. 2537. การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส และไคลาเนส จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่, สงขลา.

สำนักงานเลขานุการโครงการฉลากเขียว. 2540. สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย, ข้อกำหนดของกระดาดสำนักงานและกระดาดแปรรูป, สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ. 28 น.

อารี ฤทธิบุญ. 2541. การแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในสภาพธรรมชาติเพื่อการผลิตเอนไซม์ไคลาเนส. ว.เทคโนโลยีสุรนารี. 5:138-146.

Agrawal, R., Nazhath-UI-Ainn Deepika, Richard Joseph.1999. Strain Improvement of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. by Induced Mutation for Biotransformation of α - Pinene to Verbenol. Biotechnology and Bioengineering. 63(2):249-252.

Anwar , M.N., M. Suto , F. Tomita. 1996. Isolation of mutants of *Penicillium purpurogenum* resistant to catabolite repression, Appl Microbiol Biotechnol. p.684-687.

Brady, S., George, Clauser , R., Henry and McGraw-Hill. 1993. Material Handbook. 13th ed., Tokyo. 773 p.

Britt, W., and Kenneth. 1979. Handbook of Pulp and Paper Technology. 2nd ed., BS Publishers & Distributors 485, Jain Blaawan, Bhola Nath Nagar, Shahdara, Delhi-110032, India. 1356 p.

Chahal, D.S. 1985. Solid State Fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. Appl. Environ. Microbiol. 49(1):205-210.

Christov, L.P., G., Szakacs, and H. Balakrishnan. 1999. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. Process Biochemistry. 34:511-517.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Connerton, I., Cummings, N., Harris, G.W., P., Debeire, and Breton. 1999. A single domain thermophilic xylanase can bind insoluble xylan: evidence for surface aromatic clusters. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1433: 110-121.
- Demzin, A.L. and Solomon, N.A. 1986. *Manual of Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology Washington, D.C. p.181.
- Gerald James Stine. 1973. *Laboratory Exercise in Genetics*. Macmillan Publishing Co., Inc. New York. p.183-198.
- Godfrey. T. 1983. Edible Oils. *In Industrial Enzymology: The application of enzyme in Industry*. (Godfrey T. and Rreichelt. J. eds.). The nature press: New York . pp.424-427.
- Guo, H., H. Chang, T.W. Joyce, and J. Glaser. 1990. Degradation of chlorinated phenols and guaiacols by the White-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. p. 223. *In* T.k. Kirk and H.-m. Chang (eds.). *Biotechnology in pulp and paper manufacture*, Butterworth-Heinemann, Boston.
- Gupta S., B. Bhushan and G.S. Hoondal. 1999. Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus sp.* SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. *J. of Applied Microbiology*. 88:325-324.
- Jackson, M.G. 1977. Review Article: The Alkali Treatment of Straws. *Anin. Feed. Sci. Technol.* 2:105-130.
- Kibblewhite, R., P. and Wong, K.Y. 1999. Modification of a commercial radiata pine kraft pulp using carbohydrate degrading enzymes. *Appita*. 52:300-304.
- Linko, M. 1977. *Advances in Biochemical Engineering*. 5:27.
- Milagres, A., M.F., Lasis, L., S. and Prade, R., A. 1993. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. *Enzyme Microb. Technol.* 15:248-253.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pratima, B. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry.

<http://link.springer-ny.com/search.htm>.

Roberto Da Silva, Dong K Yim, Yong K. Park. 1994. Application of Thermostable Xylanases from *Humicola* sp. for Pulp Improvement. Journal of Fermentation and Bioengineering. 77(1):109-111.

Rupp Dean W., Charles E. Wilde III, Donna L. Reno, Paul Howard-Flanders. 1971. Exchanges Between DNA Strands in Ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 61:25-44.

Saxena, A., Kuhad, R.C., Saxena, R.K. and Gupta, R. 1994. Production and localisation of carboxymethylcellulase, xylanase and B-glucosidase from *Cellulomonas* and *Micrococcus* spp. Applied Microbiology and Biotechnology. 34:137-142.

Schmidt, A., Gubitz, G.M. and Kratky, C. 1999. Xylan Binding Subsite Mapping in the Xylanase from *Penicillium simplicissimum* Using Xylooligosaccharides as Cryo-Protectant. Biochemistry. 38:2403-2412.

Tan, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis-Seize, G.W. and Saddler, J.N. 1987. Inexpensive, Rapid Procedure for Bulk Purification of Cellulase-Free β -1,4-D-Xylanase of High Specific Activity. Biotechnology and Bioengineering. 30:96-100.

Viikari, L., Kantelinen, A., Poutanen, K. and M. Ranua. 1990. Characterization of pulp treated with hemicellulolytic enzymes prior to bleaching. pp. 145-151. In T.k. Kirk and H.-m. Chang (eds.). Biotechnology in pulp and paper manufacture, Butterworth-Heinemann, Boston.

Wong, K.K.Y., Lori A. Martin, F. Miguel Gama, John N. Saddler, and Ed de Jong. 1996. Bleach Boosting and Direct Brightening by Multiple Xylanase Treatments During Peroxide Bleaching of Kraft Pulps. Biotechnology and Bioengineering. 54:312-318.

- Wong, K.K.Y., Sandra L. Nelson, John N. Saddler. 1996. Xylanase treatment for the peroxide bleaching of oxygen delignified kraft pulps derived from three softwood species. *J. of Biotechnology*. 48:137-145.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. 1988. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganism: function and application. *Microbial. Rev.* 52(3):305-317.



ภาคผนวก ก

อาหารสูตรต่าง ๆ ในการเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ก. PDA medium

1. มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
2. เด็กซ์โทรส (dextrose)	20	กรัมต่อลิตร
3. น้ำ	15	กรัมต่อลิตร

ข. complete medium (Demzin, 1986)

1. มอลโตส (BDH)	40	กรัมต่อลิตร
2. เปปโตน (oxoid)	10	กรัมต่อลิตร
3. มอลลัสกัต (oxoid)	24	กรัมต่อลิตร
4. น้ำ	20	กรัมต่อลิตร

ค. minimal medium (Demzin, 1986)

1. NaNO_3	3	กรัมต่อลิตร
2. KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัมต่อลิตร
4. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัมต่อลิตร
5. KH_2PO_4	1	กรัมต่อลิตร
6. กลูโคส (glucose)	40	กรัมต่อลิตร

ง. minimal medium agar

ใส่น้ำ 18 กรัมต่อลิตร ใน minimal medium เดิมโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์

จ. อาหารคัดเลือกเฉพาะ (selective medium)

1. เตรียมกรดอะมิโนให้อยู่ในรูปส่วนประกอบของสารอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ดังตาราง ที่ 11 โดยเก็บส่วนประกอบของสารอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. minimal medium agar



ตารางที่ 11 แสดงปริมาณความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ในการเตรียมส่วนผสมของสารอาหารเลี้ยงเชื้อและปริมาณที่ใช้

Nutrient	Stock solution (% w/v)	Plate	Sterilize	Dissolved
		Concentration (mM)		
Adenine	1.4	5.0	F	0.1 N HCl
Alanine	0.9	0.5	A	
Arginine	2.5	0.6	A	
Asparagine	0.9	0.3	F	
Biotin	0.5	0.1	A	
Cysteine	0.7	0.3	F	
DAP	0.4	0.1	A	
Glutamic acid	15.0	5.0	F	
Glutamine	15.0	5.0	A	
Glycine	0.2	0.15	A	
Guanine	0.5	0.3	A	0.1 N HCl
Histidine	1.7	0.1	A	
Isoleucine	0.8	0.3	A	
Leucine	0.8	0.3	A	
Lysine	1.0	0.3	A	
Methionine	0.9	0.3	A	
Nicotinic acid	0.3	0.1	A	
Pantothenate Ca	0.5	0.1	A	
Phenylalanine	1.0	0.3	A	0.1 N HCl
Proline	4.6	2.0	A	
Pyridoxine HCl	0.4	0.1	A	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Nutrient	Stock solution (% w/v)	Plate Concentration (mM)	Sterilize	Dissolved
Serine	8.4	4.0	A	
Thiamine	0.3	0.05	A	
Threonine	0.7	0.3	A	
Thymine	0.8	0.3	A	
Tryptophan	0.4	0.1	F	
Tyrosine	0.4	0.1	F	
Uracil	0.2	0.1	A	
Valine	0.7	0.3	A	

หมายเหตุ

- A คือ สารที่สามารถนิ่งฆ่าเชื้อได้ F คือ สารที่ไม่สามารถนิ่งฆ่าเชื้อได้ แต่ในการวิจัยนี้สารทุกตัวใช้วิธีการกรองจุลินทรีย์ด้วยสวินเน็กซ์ (swinnex) และกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน
- ในการวิจัยครั้งนี้ขาดสาร biotin , DAP, guanine, thiamine, thymine นอกเหนือจากที่ละลายใน 0.1 N HCl สารอาหารที่เหลือจะละลายในน้ำกลั่น

ตารางที่ 12 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 11 ชนิด ที่ประกอบด้วยสารต่าง ๆ เพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

Medium	1	2	3	4	5
6	adenine	guanine	cysteine	methionine	hymine
7	histidine	leucine	isoleucine	lysine	valine
8	phenylalanine	tyrosine	tryptophan	threonine	proline
9	glutamine	asparagine	uracil	aspartic acid	arginine
10	thymine	serine	glutamic acid	DAP	glycine
11	pyrloxine	nicotinic acid	biotin	pantothenate	alanine

จ. อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์

ส่วนที่ 1

1. KH_2PO_4	2	กรัมต่อลิตร
2. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$	1.4	กรัมต่อลิตร
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3	กรัมต่อลิตร
4. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3	กรัมต่อลิตร
5. ยูเรีย	0.3	กรัมต่อลิตร
6. โปรติเอสเปปโต	0.23	กรัมต่อลิตร
7. Yeast extract	0.1	กรัมต่อลิตร

ส่วนที่ 2

แร่ธาตุผสม

1. $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร
2. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.40	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร
3. $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.56	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร
4. CoCl_2	2.0	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์ (PDA medium)

1. ชั่งอาหาร PDA ในสัดส่วนให้ได้ปริมาตรตามต้องการ
2. ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
3. นำไปปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.0
4. บรรจุลงในหลอดฝาเกลียว
5. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
6. เติงอาหารลงในหลอดฝาเกลียว จนกระทั่งแน่นแข็งโดยวิธีปลอดเชื้อ

ข. วิธีการเตรียมอาหาร complete medium

1. ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. นำไปปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.0
3. เติมน้ำลงไป ต้มจนละลาย บรรจุลงในขวดอาหาร
4. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
5. เทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อ

ค. วิธีการเตรียมอาหาร minimal medium

1. ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. นำไปปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.0
3. บรรจุลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร
4. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ง. วิธีการเตรียมอาหาร minimal medium agar

1. ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. นำไปปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.0
3. เติมน้ำลงไป ต้มจนละลาย บรรจุลงในขวดอาหาร
4. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
5. เทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อ

จ. วิธีการเตรียมอาหารเพื่อคัดเลือกเชื้อ

1. ดูดกรดอะมิโนจาก stock solution ที่เตรียมไว้ในปริมาณความเข้มข้นที่กำหนดไว้ในแต่ละจานเพาะเชื้อ (ตารางที่ 11) จากแต่ละสูตรตามตารางที่ 11 ลงในจานเพาะเชื้อ
2. ดูดอาหารปริมาณ 10 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ
3. หมุนจานเบา ๆ ให้อาหารและกรดอะมิโนเข้ากัน
4. ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วทำการทดสอบต่อไป

ฉ. วิธีการเตรียมอาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์

1. แบ่งอาหารออกเป็น 2 ส่วน ละลายสารทั้งหมดทั้งส่วนที่ 1 (ยกเว้น $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และส่วนที่ 2 (ยกเว้นไซแลนและฟางข้าว) เข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร
2. นำส่วนที่สองผสม 0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร ในส่วนแรกตามสัดส่วนที่กำหนดไว้
3. ปรับค่าพีเอชด้วย HCl เข้มข้น 1 นอร์มอล จากนั้นเติมฟางข้าวหรือไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์และเติมน้ำลงไป
4. ต้มให้ร้อนละลาย แล้วเติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (เพื่อป้องกันไม่ให้ Mg ไปจับทำให้เกิดตะกอน)
5. บรรจุลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
6. นำอาหารที่เตรียมไว้ไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
7. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ ที่แยกไว้นำไปกรองจุลินทรีย์ด้วยแผ่นกรองขนาด 0.25 ไมครอน
8. สารจากข้อ 6 ที่ได้พออุ่น ๆ ให้นำไปผสมกับ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ ที่กรองจุลินทรีย์แล้วตามสัดส่วน

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์และการคำนวณ

1. การตรวจนับสเปิร์มของเชื้อราโดยใช้ haemocytometer

1. เตรียมตัวอย่างที่จะตรวจนับ ถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมาตรวจนับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ละลายในน้ำกลั่นในปริมาตรที่ต้องการก่อน เช่น ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร (จะได้ความเจือจางเป็น 1:10) หรืออาจต้องทำการเจือจางมากขึ้นในกรณีที่มีสปอร์จำนวนมาก เช่น เจือจางเป็น 1:100 หรือ 1:1000 เท่า เป็นต้น
2. ปิดเปิดตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงใน haemocytometer (ที่ปิดด้วย cover slip แล้ว) โดยใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อดูตัวอย่างมา 1-2 หยด หยดลงด้านข้างของแผ่น cover slip
3. ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ หัว objective กำลังขยาย 40 เท่า
4. นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก หรือถ้านับช่องใหญ่ให้หาค่าเฉลี่ยและนำมาคูณด้วย 4×10^6 จะได้เป็นปริมาณสปอร์ต่อกรัมหรือต่อมล.

วิธีคำนวณหาปริมาณสปอร์

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในตารางใหญ่ มีค่า เท่ากับ $0.05 \times 0.05 = 0.0025$ ตร.มม.

ความลึกระหว่าง cover slip และตาราง(ผู้ผลิตจะกำหนดไว้) = 0.1 มม.

ดังนั้นปริมาตร 1 ช่องเล็ก จะมีค่า $0.0025 \times 0.1 = 0.00025$ ลบ.ซม.

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

"	1	"	"	$= \frac{Z \times 1000}{0.0025}$
---	---	---	---	----------------------------------

$= Z \times 4 \times 10^6$ เซลล์ต่อมล.หรือเซลล์ต่อกรัม
(สปอร์ต่อมล.หรือสปอร์ต่อกรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ (จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

จำนวนจุลินทรีย์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) = จำนวนโคโลนีที่นับได้ X ระดับความเจือจาง

3. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของจุลินทรีย์หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต

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

โดยกำหนดให้

X = จำนวนจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ไม่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต (ตัวควบคุม) ในแต่ละเวลาและความเจือจาง

S = จำนวนจุลินทรีย์ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตในแต่ละเวลาและความเจือจาง

4. การเตรียมโนสเทดิน

เตรียมเป็นสารเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 50 หน่วยต่อมิลลิลิตรและ 150 มิลลิลิตร แล้วนำไปเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้น 40, 30 และ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามสมการ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

โดย

C_1 = ความเข้มข้นสารเริ่มต้น (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

V_1 = ปริมาตรของสารเริ่มต้น (มิลลิลิตร)

C_2 = ความเข้มข้นที่ต้องการ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรของความเข้มข้นที่ต้องการ (มิลลิลิตร)

5. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของจุลินทรีย์หลังการใช้ในสแตติน

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{100(B)}{A}$$

โดยกำหนดให้

A = จำนวนจุลินทรีย์สายพันธุ์แท้ที่ไม่มีการใช้ ในสแตติน (ตัวควบคุม) ในแต่ละเวลาและความเจือจาง (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

B = จำนวนจุลินทรีย์สายพันธุ์แท้ที่มีการใช้ ในสแตตินในแต่ละความเจือจาง (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

6. การเปรียบเทียบหาอัตราการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์

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