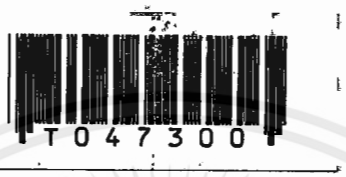
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Q1,16-16

# การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* บางสายพันธุ์ของลูกแป้งเหล้า




นางสาวศิรประภา อนันตชัย
นางสาวสิริมนต์ คำเหล็ก
นายอติศักดิ์ ปัญญา

ปพ.
ศ A391 ก
2545

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 47300
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2546

b.....
i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b11308831x

# Study on genetic variation in some species of *Aspergillus* from Look-panglao.


**Miss Siraprapa Anantachai**

**Miss Sirimon Khomlek**

**Mr.Atisak Panya**


**A Special Project in Partial Fulfillment 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 2002**


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| หัวข้อโครงงานพิเศษ | การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* บางสายพันธุ์ของลูกแป้งเหล้า | |
| โดย | นางสาวศิรประภา | อนันตชัย |
| | นางสาวสิริมนต์ | คำเหล็ก |
| | นายอติศักดิ์ | ปัญญา |
| ภาควิชา | ชีววิทยาประยุกต์ | |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีชีวภาพ | |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รศ.ดร.นวลพรรณ | ณ ระนอง |

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

| คณะกรรมการตรวจสอบ | | | ลายมือชื่อ |
|---|---|---|---|
| ประธานกรรมการ | ผศ.เนาวรัตน์ | ปานแย้ม | |
| กรรมการ | รศ.ดร.นวลพรรณ | ณ ระนอง | |
| กรรมการ | ผศ.วีนา | ชูโชติ | |

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อโครงงานพิเศษ** การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* บางสายพันธุ์ ของลูกแป้งเหล้า

**นักศึกษา** นางสาวศิรประภา อนันตชัย
นางสาวสิริมนต์ คำเหล็ก
นายอติศักดิ์ ปัญญา

**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์

**สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ

**ปีการศึกษา** 2545

**อาจารย์ที่ปรึกษา** รองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

## บทคัดย่อ

เชื้อราสกุล *Aspergillus* 20 ไอโซเลต ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า 8 จังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นำมาศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของไรโบโซมอลดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Restiction Fragment Length Polymorphism (RFLP) โดยทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ ITS ไพรเมอร์ ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Hae*III *Hin*dIII และ *Hin*fI จากผลการทดลองพบว่าไรโบโซมอลดีเอ็นเอของราทั้งหมดไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อนำราทั้งหมดมาศึกษาถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารสูตรดัดแปลงของ Czapek agar โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็ง Glucose-peptone agar พบว่า *Aspergillus* sp. RE3 ให้บริเวณโซนใสรอบๆ โคโลนีมากที่สุด และผลิตกรดโคจิกด้วย เมื่อนำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลวที่เติมแป้งมันสำปะหลังปริมาณต่าง ๆ กัน (ร้อยละ 2 5 และ 10) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 1203 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 10 และให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 52.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบร้อยละ 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Special Project Title** Study on genetion variation in some species of *Aspergillus* from Look-pang lao.

**Name** Miss Siraprapa Anuntachai

Miss Sirimon Khomlek

Mr. Atisak Punya

**Department** Appiled Biology

**Academic Year** 2002

**Special Project Advisor** Associate Professor Dr. Nuanphan Naranong

## Abstract

Twenty isolates of *Aspergillus* which isolated from Look-panglao from 8 provinces in North-eastern of Thailand were used for study on genetic variation by Restriction Fragment Length Polymorphysm(RFLP)of ribosomalDNA (rDNA). The internal trascribed spacer (TIS) primer was used to DNA amplification by PCR technique and the DNA fraction were digested with 3 restriction endnucleases (*Hae*III , *Hin*dIII , and *Hin*fI). From the results, it was found that ribosomalDNAs of all isolates were not different. All of them are tested for amylase production in modified Czapek agar using cassava starch as carbon source and glucose-peptone agar , respectively. The *Aspergillus* sp. RE3 showed the formation of the largest clear zone and produced kojic acid too, so it was selected for amylase production in modified Czapek liquid medium containing various amoumts of cassava starch (2 , 5 , 10%). It was found that the higest activity of amylase was 1,203 U/ml in day 4 when the medium containing 10%cassava starch . Moreover , it produced 52.9 U/ml of amylase when 10% raw cassava starch was used in the medium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้คำแนะนำรวมทั้งตรวจทานแก้ไข ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม และ ผศ.วีนา ชูโชติ ที่กรุณาร่วมเป็นคณะกรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ คุณดึกฤทธิ์ ศิลาลัย รวมทั้งพี่ๆ ปริญญาโททุกๆ ท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือทางด้านอุปกรณ์ และความรู้ต่างๆ ในการทำโครงงานพิเศษ คุณพยอม เกียรติกำจร และคุณประเสริฐวิทย์ แพงคำ ที่เอื้อเฟื้อความรู้ทางด้านการเตรียมสารเคมีและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย คุณอนันตพัฒน์ อนันตชัย ที่เอื้อเฟื้อในการจัดพิมพ์โครงงานหน้าสีทั้งหมด นอกจากนี้ที่ขาดเสียไม่ได้ในกำลังใจอันยิ่งใหญ่ในการทำโครงงานครั้งนี้ คือ คุณพ่อ และคุณแม่ของทางคณะผู้จัดทำ ตลอดจนเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำโคงงานพิเศษด้วยดีมาโดยตลอดจนโครงงานพิเศษได้เสร็จสมบูรณ์

ศิรประภา อนันตชัย
สิริมนต์ คำเหล็ก
อติศักดิ์ ปัญญา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | ฉ |
| สารบัญภาพ | ช |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ | 2 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ | 3 |
| 2.1 ลูกแป้ง | 3 |
| 2.2 เชื้อรา *Aspergillus* sp. | 15 |
| 2.3 เทคนิค PCR | 17 |
| 2.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ | 20 |
| 2.5 Restriction Fragment Length Polymorphism | 28 |
| บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง | 34 |
| 3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี | 34 |
| 3.2 วิธีวิจัย | 36 |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง | 39 |
| 4.1 ผลการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของ *Aspergillus* | 39 |
| 4.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็ง | 44 |
| 4.3 ผลการศึกษาการหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว | 47 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)


| | หน้า |
|---|---|
| 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา | 51 |
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ | 53 |
| เอกสารอ้างอิง | 54 |
| ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ | 56 |
| ภาคผนวก ข สารเคมี | 58 |
| ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม | 60 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2-1 | ลูกแป้งสุรา | 5 |
| 2-2 | เชื้อราในลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ | 9 |
| 2-3 | ยีสต์ในลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ | 11 |
| 2-4 | จุลินทรีย์ เอนไซม์ที่ผลิตและจุดตัดของเอนไซม์ | 26 |
| 4-1 | เชื้อราที่คัดแยกได้จากลูกแป้งเหล้าทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ | 39 |
| 4-2 | ผลการย่อยแป้งมันสำปะหลังและการผลิตกรดโคจิก | 46 |
| 4-3 | การจำแนกเชื้อ Aspergillus sp. จากการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการผลิตกรดโคจิก | 47 |
| 4-4 | กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส และค่าความเป็นกรดด่างที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2 | 48 |
| 4-5 | กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส และค่าความเป็นกรดด่างที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 5 | 49 |
| 4-6 | กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส และค่าความเป็นกรดด่างที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 10 | 50 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2-1 | ลูกแป้งชนิดต่างๆ | 4 |
| 2-2 | แผนภูมิการผลิตลูกแป้ง | 8 |
| 2-3 | แผนภูมิการหมักน้ำส้มสายชูจากข้างเหนียว | 13 |
| 2-4 | ลักษณะเส้นใยและลักษณะโคนิดิโอฟอร์ของ *Aspergillus* | 16 |
| 2-5 | ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความแตกต่างที่จุดจับ จุดตัด และสับสเตรท | 21 |
| 2-6 | แบบของการจดจำลำดับเบสที่จำเพาะ | 22 |
| 2-7 | รูปร่างทั้ง 3 แบบที่มีการจดจำลำดับเบสที่จำเพาะ | 23 |
| 2-8 | การตัดดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่งโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ | 28 |
| 2-9 | โพลิมอร์ฟีซึมที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอ V1 และ V2 | 29 |
| 2-10 | ขั้นตอนการทำ RFLP | 30 |
| 4-1 | การเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR | 40 |
| 4-2 | ผลการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Hae*III | 41 |
| 4-3 | ผลการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII | 41 |
| 4-4 | ผลการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Hin*fI | 42 |
| 4-5 | ผลการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII กับ *Hae*III | 42 |
| 4-6 | ผลการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Hin*fI กับ *Hae*III | 43 |
| 4-7 | การย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อ *Aspergillus* ในอาหาร Czapek ดัดแปลง | 45 |
| 4-8 | การผลิตกรดโคจิกในอาหาร glucose-peptone ager | 45 |
| 4-9 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2 | 48 |
| 4-10 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 5 | 49 |
| 4-11 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 10 | 50 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 4-12 | ลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็ง | 52 |
| 4-13 | ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า | 52 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

อาหารหมักหมายถึง อาหารที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโดยจุลินทรีย์และได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ ซึ่งอาจอยู่ในรูปของเหลว กึ่งแข็งกึ่งเหลว หรือของแข็ง การหมักจะช่วยให้อาหารหมักที่ได้มีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้นและง่ายต่อการย่อย การหมักเป็นกรรมวิธีที่เก่าแก่วิธีหนึ่งที่ใช้ในการถนอมอาหารในแหล่งต่างๆ ทั่วโลกมีการผลิตอาหารหมักหลายชนิด ซึ่งในการผลิตอาหารเหล่านี้มีการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักจุลินทรีย์ที่จำเป็นในกระบวนการหมัก การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี คุณค่าทางอาหาร กลิ่นรสที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก และความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นในอาหารหมัก (ดุษณี, 2537)

ปัจจุบันแนวโน้มของการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์โดยใช้ลูกแป้งมีมากขึ้นดังจะเห็นได้จาก โครงการ1 ตำบล 1 ผลิตภัณฑ์ ที่มีการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากลูกแป้งออกมาอย่างมากมาย เช่น อุ กระแช่ สาโท และข้าวหมาก เป็นต้น จุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้งได้แก่ ยีสต์ *เช่น Saccharomyces cerevisiae Endomycopsis* sp. แบคทีเรีย เช่น *Bacillus* sp. *Lactobacillus* sp. เชื้อรา เช่น *Aspergillus* sp. *Mucor* sp. และ *Penicillium* sp. (วรวุฒิ,2538 )

ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ซึ่งจุลินทรีย์บางตัวอาจทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีและได้ผลิตภัณฑ์ตามความต้องการ ในการทดลองนี้จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *Aspergillus* spp. โดยเฉพาะที่มีสปอร์สีเขียวมาทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมเพื่อตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อในท้องที่แต่ละจังหวัดโดยเฉพาะลูกแป้งจากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้เทคนิค RFLP ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางด้านสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อใช้จำแนกความแตกต่างจากลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (Hiram,1991)

ความแปรผันทางพันธุกรรมอาจมีสาเหตุมาจากสภาวะแวดล้อมที่เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ ดังนั้นจากแนวทางการศึกษาดังกล่าวจะทำให้ทราบได้ว่าเชื้อรา *Aspergillus* จากลูกแป้งเหล้าจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างไร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เชื้อราในสกุล *Aspergillus* มีมากกว่า 600 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นแซโพรไฟต์ (saprophyte) และไม่ก่อให้เกิดโรคต่อคนและพืช พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ *Aspergillus* สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด และนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหาร เครื่องดื่ม และแอลกอฮอล์ (อรวรรณ,2531)

การจำแนกและการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีได้หลายวิธี เช่น การพิจารณาจากลักษณะทางสันฐานวิทยา การใช้เทคนิคทางเซลล์วิทยา และการใช้เทคนิคทางชีวเคมี การหาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยนั้นกระทำได้ยาก และเกิดความผิดพลาดขึ้นได้ง่าย เทคนิค RFLP เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาถึงความแตกต่างหรือความแปรผันทางพันธุกรรมของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากแหล่งต่างกันและมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป หรือมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนที่แตกต่างกัน ซึ่งเราจะทราบได้จากการทำอิเลคโทรโฟริซิส และสามารถใช้ข้อมูลที่ได้ดังกล่าวเป็นพื้นฐานในการศึกษาลักษณะของเชื้อ *Aspergiillus* spp. ได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* บางสายพันธ์ของลูกแป้งเหล้า
2. ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและผลิตกรดโคจิก

## 1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. เน้นการศึกษาเปรียบเทียบความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อ *Aspergillus* ของลูกแป้งเหล้าทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือด้วยเทคนิค RFLP
2. การผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดโคจิกจากเชื้อราที่นำมาศึกษา

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงลักษณะความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* จากลูกแป้งเหล้า ของท้องถิ่นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและหลักการ

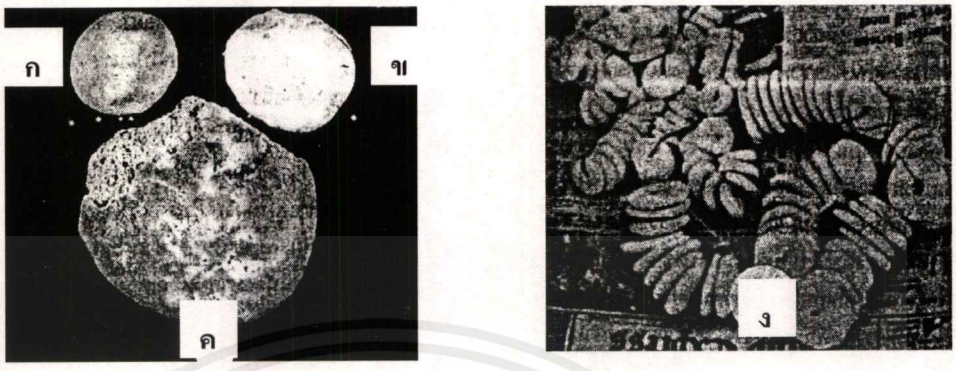
## 2.1 ลูกแป้ง

"ลูกแป้ง" คือ กล้าเชื้อจุลินทรีย์ (inoculum) ที่เก็บอยู่ในรูปเชื้อแห้งเพื่อใช้ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิดในประเทศแถบเอเชีย เทคโนโลยีการผลิตและการใช้ลูกแป้งมีมาแต่โบราณก่อนที่มนุษย์จะเข้าใจถึงศาสตร์ทางจุลชีววิทยา โดยเข้าใจกันว่ามีต้นกำเนิดจากประเทศจีนและได้ถ่ายทอดไปยังประเทศเพื่อนบ้าน เช่น ธิเบต อินเดีย เกาหลี และกลุ่มประเทศทางตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย กล้าเชื้อในลักษณะนี้มีชื่อเรียกตามภาษาท้องถิ่นของแต่ละประเทศ ส่วนการใช้ประโยชน์นั้นจะมีความคลายคลึงกันเป็นส่วนใหญ่ คือใช้ในการหมักที่มีกิจกรรมการเปลี่ยนแป้งในวัตถุดิบประเภทธัญพืชและพืชประเภทหัวให้เป็นน้ำตาล (saccharification) เพื่อผลิตอาหารหมักประเภทข้าวหมาก สุราและเมรัย เช่น กระแช่ สาโท หรือ อุ ยกเว้น "ราจิเทมเป้" ของอินโดนีเซียที่ใช้ในการผลิตเทมเป้ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง โดยกิจกรรมของกล้าเชื้อจะเป็นการย่อยสลายโปรตีน สำหรับประเทศไทยนั้นยังมีลูกแป้งที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูจากวัตถุดิบประเภทธัญพืช ซึ่งเรียกว่า "ส่าน้ำส้ม" ชาวตะวันตกเรียกลูกแป้งรวม ๆ กันว่า "Chinese yeast cake" โดยสรุปแล้วจะแบ่งลูกแป้งเป็นชนิดใหญ่ ๆ คือ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า ลูกแป้งน้ำส้มสายชู และลูกแป้งเทมเป้ (นภา , 2534)

### 2.1.1 ลักษณะทั่วไป

ลูกแป้งที่ดีจะโปร่งเบา สีขาวนวล ไม่มีรอยแตกร้าว ก้อนแป้งเป็นรูพรุน ซึ่งเกิดจากการฟูของลูกแป้งขณะบ่ม เมื่อขยี้จะยุ่ยเป็นผงละเอียด ไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว มีรูปร่างและขนาดต่าง ๆ กันลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งส่าเหล้าส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นครึ่งวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 เซนติเมตร ลูกแป้งน้ำส้มสายชูมักนิยมปั้นเป็นก้อนใหญ่ประมาณ 5-6 เซนติเมตร และมีกลิ่นเครื่องเทศฉุนจัด ลูกแป้งจากบางท้องถิ่น เช่น ลูกแป้งจากประเทศอินเดียและมาเลเซียมีลักษณะเป็นวงแหวน (ภาพที่ 2-1) ลูกแป้งเหล้าเกาเหลียงของจีนมีลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12-15 เซนติเมตร มีลักษณะคลายวงแหวนเช่นกัน ลูกแป้งที่ผลิตจากได้หวันเมื่อแห้งแล้วนิยมปั่นเป็นผงและบรรจุขายเป็นซอง ลูกแป้งที่ผลิตในแต่ละแหล่งจะมีประสิทธิภาพการหมักต่างกัน ซึ่งบางครั้งไม่สามารถบอกได้ด้วยลักษณะที่ปรากฏ (นภา , 2534)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




ภาพที่ 2-1 ลูกแป้งชนิดต่างๆ

ก. ลูกแป้งข้าวหมาก

ข. ลูกแป้งเหล้า

ค. ลูกแป้งน้ำส้มสายชู

ง. ลูกแป้งของอินเดีย

ที่มา : นภา (2534)

**2.1.2 การผลิตลูกแป้ง**

องค์ประกอบหลักของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตลูกแป้งได้แก่

1. แป้ง จากผลการศึกษาพบว่าลูกแป้งที่ผลิตโดยแป้งข้าวเจ้าล้วน ๆ จะมีคุณภาพดีกว่าที่ผลิตด้วยแป้งข้าวเหนียว หรือแป้งข้าวเจ้าผสมข้าวเหนียว การผลิตแป้งสำเร็จเป็นการค้าส่วนใหญ่จะมีการเติมสารยั้บยังการเจริญของเชื้อรา เช่น โปรปีโอนิก (propionic) สารเหล่านี้มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในลูกแป้งที่เป็นเชื้อราและยีสต์
2. สมุนไพร เป็นองค์ประกอบที่สำคัญซึ่งแต่ละประเทศจะมีสูตรการผลิตลูกแป้งที่ต่างกันและมักจะเก็บเป็นความลับที่ถ่ายทอดกันในครัวเรือน ตารางที่ 2-1 เป็นตำรับลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งสุรา หรือลูกแป้งเหล้าในประเทศไทยที่ปรากฏเป็นเอกสารและได้มีการผลิตเป็นที่น่าพอใจ เมื่อเปรียบเทียบสมุนไพรที่ที่ใช้จะเห็นว่ามีสมุนไพรที่เป็นองค์-ประกอบพื้นฐานร่วมกัน ได้แก่ กระเทียม พริกไทย ขิง และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข่า ส่วนชะเอมและดีปลีเป็นองค์ประกอบของลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าไทยเกือบทุกสูตร

นอกจากชนิดและปริมาณแล้ว สิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งคือคุณภาพของสมุนไพร กล่าวคือสมุนไพรที่เป็นของแห้ง ต้องแห้งสนิทปราศจากการเจริญของเชื้อรา ส่วนที่เป็นของสดต้องตัดส่วนที่เน่าเสียทิ้งออก สมุนไพรเหล่านี้ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ความเก่าใหม่ของสมุนไพรจึงนับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งเนื่องจากสารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่เป็นสารระเหย การเก็บสมุนไพรไว้เป็นเวลานาน ๆ สารเหล่านี้จะลดปริมาณลง โดยเฉพาะสมุนไพรที่เก็บไว้ในรูปผงละเอียด อัตราการระเหยจะยิ่งเป็นไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการซื้อสมุนไพรเพื่อใช้ในเรื่องนี้จึงควรเลือกชนิดที่ยังไม่ได้บดเมื่อจะใช้จึงนำมาบดเป็นครั้งคราวไป

3. ลูกแป้งเก่าบดเป็นผงสำหรับเป็นกล้าเชื้อ โดยใช้ลูกแป้ง 20 กรัมต่อสูตรแป้งที่ใช้ผสม 1 กิโลกรัม (นภา , 2534)

ตารางที่ 2-1 ลูกแป้งสุรา

| องค์ประกอบ | ปริมาณ (กรัม) |
|---|---|
| กระเทียม | 40 |
| ขิง | 40 |
| ข่า | 20 |
| ชะเอม | 40 |
| พริกไทย | 6 |
| ดีปลี | 6 |
| หัวหอม | 20 |
| ข้าวเจ้า | 2500 |

ที่มา : นภา (2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.3 การเตรียมวัตถุดิบและการปั้นลูกแป้ง

แสดงขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบและการปั้นลูกแป้ง ซึ่งมีรายระเอียดดังต่อไปนี้

1. เตรียมแป้งโดยซาวข้าวให้สะอาด แช่น้ำไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำไปโม่แล้วทับน้ำให้แห้ง หรือทำให้ข้าวสะเด็ดน้ำเสียก่อนแล้วจึงนำไปบดหรือปั่นให้ระเอียดแล้วจึงนำไปร่อน การแช่ข้าวนานเกินไปโดนไม่เปลี่ยนน้ำจะมีผลให้แบคทีเรียแลคติก(lactic acid bacteria) และ *Bacillus* spp. เจริญเติบโตในปริมาณมาก ทำให้ลูกแป้งที่ผลิตได้ด้วยคุณภาพ
2. บดสมุนไพรชนิดแห้งให้ระเอียด สมุนไพรสดอาจนำไปบดพร้อมกับข้าว
3. ผสมแป้ง สมุนไพร และลูกแป้ง(ลูกแป้ง 5 กรัม ต่อลูกแป้ง 1 กิโลกรัม) ที่บดละเอียดให้เข้ากัน เติมน้ำร้อนหรือน้ำต้มชะเอม ในปริมาณที่นวดแป้งแล้วจะปั้นเป็นก้อนได้ ปริมาณน้ำที่ใช้นั้นกำหนดไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับความแห้งของแป้งที่ใช้ ซึ่งต้องอาศัยประสบการของผู้ผลิต
4. เมื่อนวดแป้งจนเหนียวแล้วจึงปั้นเป็นก้อนกลมขนาดต่าง ๆ กันตามชนิดของลูกแป้ง พบว่าการหมักแป้งที่นวดแล้วไว้ประมาณ 6-12 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาปั่นจะได้ลูกแป้งที่มีคุณภาพดีกว่าที่ปั่นโดยไม่หมักแป้ง
5. เรียงลูกแป้งบนกระด้งหรือภาชนะก้นโปร่งอื่น ๆ ให้แต่ละลูกห่างกันเล็กน้อย เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญจะทำให้ลูกแป้งฟูขึ้น ส่วนลูกแป้งที่ติดกับภาชนะจะมีลักษณะแบนราบตามผิวที่สัมผัสกับภาชนะ โดยที่ด้านบนยังคงรูปร่างโค้งเป็นครึ่งวงกลม สำหรับการปั้นแป้งขนาดใหญ่ เมื่อเรียงบนภาชนะแล้วควรกดด้านบนลงเล็กน้อยเพื่อให้ลูกแป้งบางลง จุลินทรีย์ภายในลูกแป้งจะมีโอกาสรับอากาศมากขึ้น
6. เมื่อเรียงลูกแป้งเต็มภาชนะแล้ว โรยผงลูกแป้งที่เตรียมไว้ลงบนผิวของลูกแป้งที่ปั้นใหม่โดยใช้ผงลูกแป้งประมาณ 15 กรัม ต่อสูตรที่ใช้แป้ง 1 กิโลกรัม คลุมภาชนะด้วยผ้าหนา ๆ โดยไม่ให้ผ้าสัมผัสกับผิวลูกแป้ง บ่มประมาณ 48 ชั่วโมงแล้วนำไปตากแดดให้แห้ง เก็บในภาชนะที่ปิดฝาสนิท การที่ลูกแป้งได้รับแสงแดดโดยตรงจะทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ลดลงไปบ้าง ซึ่งเป็นผลจากรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ดังนั้นจึงควรตากลูกแป้งโดยมีกระจกใสกั้นแสงอยู่ด้านบน โดยเว้นระยะระหว่างผิวลูกแป้งและกระจกให้อากาศถ่ายเทได้ นอกจากนั้นการทำให้ลูกแป้งอย่างได้ผลดีอีกวิธีหนึ่งคือการอบด้วยตู้อบ

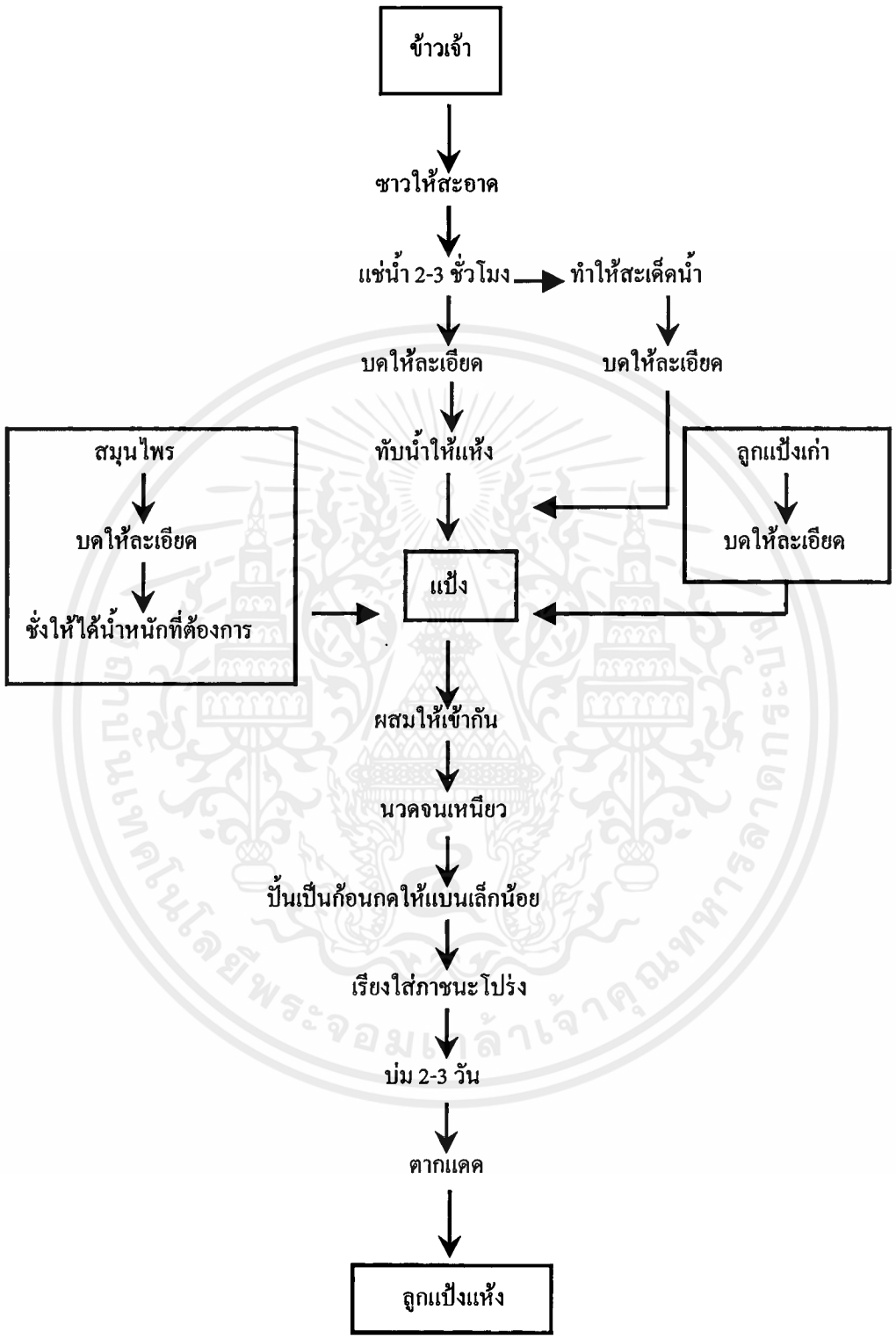
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อควรระวัง

ในการผลิตลูกแป้งพบว่าในสภาวะการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จะไม่สามารถทำให้ปลอดเชื้อได้ เช่นที่วิธีการทางจุลชีววิทยาสมัยใหม่ การลดปริมาณการปนเปื้อนและการป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทีย์ที่ปนเปื้อนจึงอาศัยหลักใหญ่ ๆ 4 ประการได้แก่

1. การเลือกวัตถุดิบดังกล่าวแล้วข้างต้น
2. การรักษาความสะอาดในทุกขั้นตอนการผลิต
3. การควบคุมปริมาณความชื้นของส่วนผสมลูกแป้งให้ต่ำที่สุดที่จุลินทรีย์ในลูกแป้งยังเจริญได้ โดยที่ระดับความชื้นควรต่ำกว่าความชื้นที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อน
4. ใช้สมุนไพรทั้งชนิดและปริมาณที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนโดยไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในลูกแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




ภาพที่ 2-2 แผนภูมิการผลิตลูกแป้ง

ที่มา : นภา (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.4 จุลินทรีย์ในลูกแป้ง

กล่าวได้ว่าลูกแป้งเป็นกล้า "เชื้อผสม" (mixed cultures) ที่มีทั้งเชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรีย ถึงแม้กรรมวิธีการผลิตลูกแป้งจะไม่สามารถควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อได้อย่างสิ้นเชิง แต่หากการผลิตนั้นได้กระทำอย่างระมัดระวังจะมีเพียงจุลินทรีย์เพียงไม่กี่สกุล (genus) เท่านั้นที่สามารถเพิ่มจำนวนจนตรวจนับได้ในปริมาณสูง ส่วนจุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่น ๆ จะพบในปริมาณน้อยมาก

#### 2.1.4.1 เชื้อรา

เชื้อราที่ตรวจพบในลูกแป้งจากทุก ๆ แหล่งที่มีรายงานของการศึกษา ได้แก่ *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus* spp. ปริมาณที่พบมากน้อยนั้นขึ้นกับชนิดของลูกแป้ง เชื้อหลักที่พบในลูกแป้งข้าวหมาก ได้แก่ *A. rouxii* ซึ่งส่วนใหญ่พบประมาณ $10^4$ CFU ต่อกรัม ส่วนลูกแป้งที่ปั้นใหม่ ๆ จะพบประมาณ $1.5 \times 10^5$ ถึง $2.7 \times 10^5$ CFU ต่อกรัม สำหรับลูกแป้งเหล้าจะพบทั้ง *A. rouxii* และ *Rhizopus* spp. เป็นเชื้อหลัก ยกเว้นลูกแป้งสุราจากอินเดียซึ่งเชื้อราส่วนใหญ่เป็น *Mucor* spp. และในลูกแป้งสำหรับผลิตเทมเป้ที่พบ *R. oligosporus* และ *R. oryzae* เชื้อรานี้มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายโปรตีนถั่ว นอกจากเชื้อหลัก ๆ ที่กล่าวมาแล้วยังพบเชื้อราอื่น ๆ ต่าง ๆ ชนิดกัน โดยขึ้นอยู่กับแหล่งผลิตลูกแป้ง ดังรายระเอียดในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 เชื้อราในลูกแป้งจากแหล่งต่าง ๆ

| แหล่งและชนิดของลูกแป้ง | เชื้อรา |
|---|---|
| ลูกแป้งข้าวหมากไทย | *Amylomyces rouxii* |
| | *Rhizopus* spp. |
| | *Mucor* spp. |
| | *Aspergillus niger* |
| | *Aspergillus* spp. |
| | *Penicillium* spp. |
| | *Hyalodendron* spp. |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

| แหล่งและชนิดของลูกแป้ง | เชื้อรา |
|---|---|
| ลูกแป้งอินเดีย | *Mucor fragilis* |
| | *Aspergillus rouxii* |
| | *Rhizopus Fragilis* |
| ลูกแป้งฟิลิปปินส์ | *Rhizopus* spp. |
| | *Mucor* spp. |
| ลูกแป้งจีน | *Rhizopus javanicus* |
| | *Rhizopus chinensis* , |
| | *Rhizopus* spp. |
| | *Aspergillus rouxii* |

ที่มา : นภา (2537)

**2.1.4.2 ยีสต์**

ยีสต์ที่พบในลูกแป้งข้าวหมากส่วนใหญ่ ได้แก่ *Endomycopsis* spp. เช่น *H. malanga* โดยมี *Saccharomyces cerevisiae* ปนมาบ้าง ส่วนลูกแป้งเหล้าจะพบ *S. cerevisiae* ในปริมาณมากกว่า *Endomycopsis* spp. นอกจากนั้นยังมียีสต์อื่นที่พบในลูกแป้งเฉพาะแหล่งได้แก่ *Candida* spp. , *Torulopsis* spp. ดังรายละเอียดดังตารางที่ 2-3

ยีสต์ที่พบในลูกแป้งทั่ว ๆ ไปมีปริมาณสูงถึง $5 \times 10^6$ ถึง $8 \times 10^6$ เซลล์ต่อกรัมของลูกแป้ง

**2.1.4.3 แบคทีเรีย**

สำหรับแบคทีเรียมีการตรวจพบแบคทีเรียแลคติก ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* โดยทั่วไปพบถึงประมาณ $10^4$ ถึง $8 \times 10^7$ เซลล์ต่อกรัม ขึ้นอยู่กับที่มาของลูกแป้ง นอกจาก *P. pentosaceus* แล้ว ในลูกแป้งข้าวหมากและในลูกแป้งเหล้าของไทยจากบางท้องถิ่นยังตรวจพบ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งพบในลูกแป้งอยู่บ่อยครั้ง เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีการปนเปื้อนมามากกับวัตถุดิบ เช่น แป้งและสมุนไพร แต่หากส่วนผสมของสมุนไพรที่ใช้เหมาะสม จะลดปริมาณจุลินทรีย์ได้มาก เช่น พบว่า ขิง ชะเอม อบเชย ดอกจันทน์ และลูกจันทน์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-3 ยีสต์ในลูกแป้งจากแหล่งต่าง ๆ

| แหล่งและชนิดของลูกแป้ง | ยีสต์ |
|---|---|
| ลูกแป้งข้าวหมากไทย | *Endomycopsis fibuligera* |
| | *Endomycopsis* spp. |
| | *Hansennula malanga* |
| | *Candida tropicalis* |
| | *Torulopsis glabrata* |
| ลูกแป้งเหล่าไทย | *Saccharomyces cerevisiae* |
| | *Endomycopsis fibuligera* |
| | *Endomycopsis* spp. |
| ลูกแป้งอินโดนีเซีย | *Torula indica* |
| | *Hansennula malanga* |
| | *Endomycopsis chodati* |
| | *Endomycopsis fibuligera* |
| | *Hansennula malanga* |
| | *Candida guilliermondii* |
| | *Candida humicola* |
| | *Candida japonica* |
| | *Candida pelliculosa* |
| ลูกแป้งอินเดีย | *Hansennula malanga* |
| ลูกแป้งฟิลิปปินส์ | *Endomycopsis* spp. |
| | *Saccharomyces* spp. |
| ลูกแป้งจีน | *Endomycopsis* spp. |

ที่มา : นภา (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

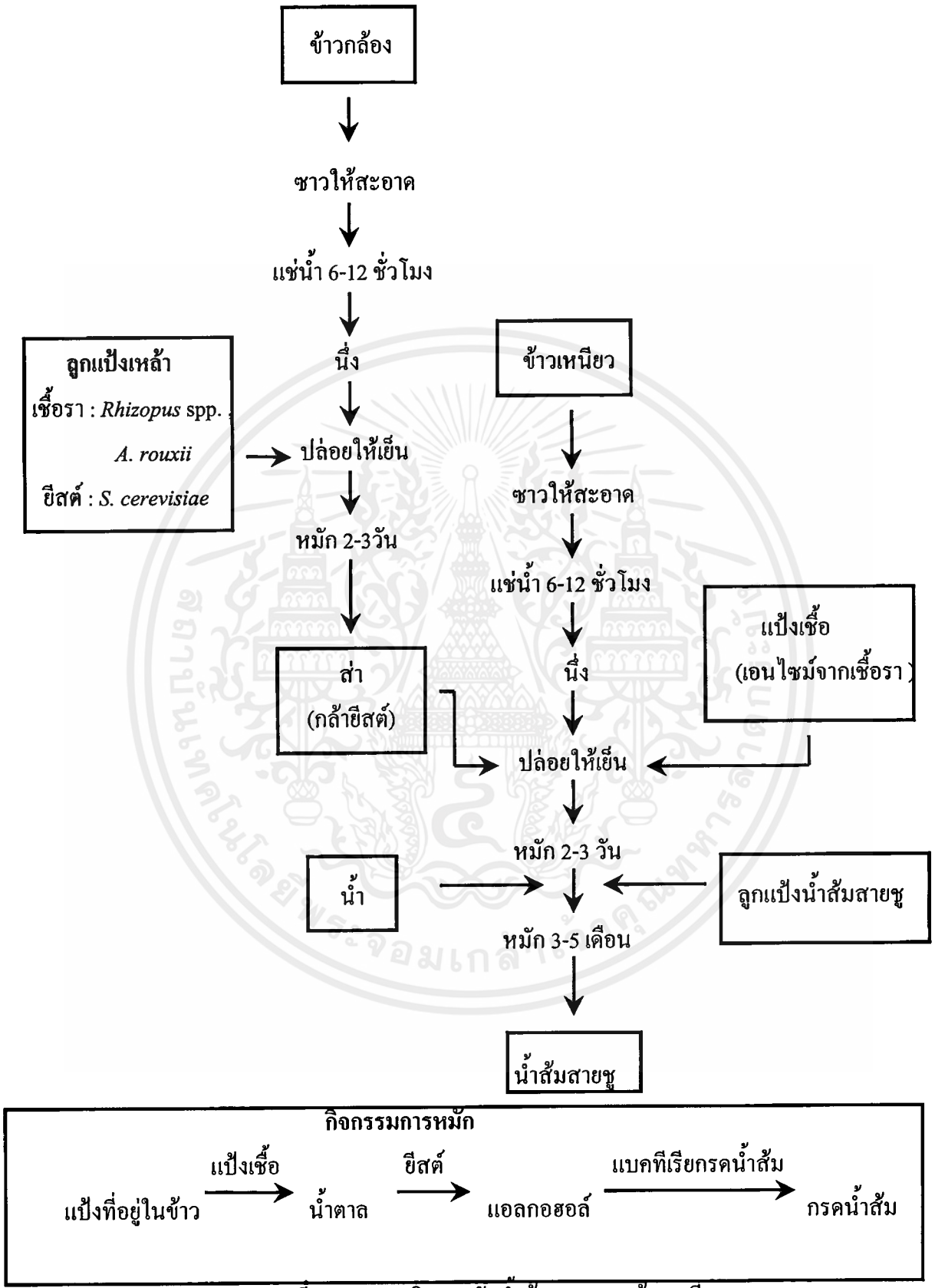
### 2.1.5 บทบาทของจุลินทรีย์ในลูกแป้งต่อกระบวนการหมัก

ถึงแม้ว่าจะพบจุลินทรีย์มากมายหลายชนิดก็ตาม แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีบทบาทเด่นต่อกระบวนการหมัก ลูกแป้งที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักผลิตภัณฑ์หลักสามผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ข้าวหมาก เครื่องดื่มประเภทมึนเมา เช่น กระแช่ สาโทและอุ และน้ำส้มสายชูจากวัตถุดิบประเภทแป้ง เช่นธัญพืชหรือพืชหัว ดังนั้นลูกแป้งข้าวหมากจะพบว่าจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลและพวกที่ผลิตสารให้กลิ่นหอมบางชนิดเท่านั้นที่มีบทบาทสำคัญ ส่วนลูกแป้งเหล้านั้น นอกจากจะต้องมีจุลินทรีย์ที่ย่อยแป้งได้ดีแล้ว จุลินทรีย์ที่มีบทบาทที่แท้จริงต้องสามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นแอลกอฮอล์ได้ นอกจากจุลินทรีย์สองกลุ่มที่กล่าวมาแล้ว ส่าน้ำส้มสายชูยังต้องประกอบด้วยแบคทีเรียน้ำส้มสายชูในปริมาณมากพอที่เปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดน้ำส้มได้สูงกว่าร้อยละ 4 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

การศึกษาจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่แยกได้จากลูกแป้ง เช่น การหมักข้าวหมากด้วยเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก พบว่าเมื่อใช้เฉพาะ *A. rouxii* และ *E. fibuligera* จะได้ข้าวหมากที่มีกลิ่นรสไม่แตกต่างจากข้าวหมากของอินโดนีเซียที่ผลิตโดยลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อ แต่เมื่อใช้ *A. rouxii* ร่วมกับ *E. burtonii* ผลิตภัณฑ์จะมีกลิ่นรสดีกว่าการใช้ *Endomycopsis* spp. ชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ *A. rouxii* ร่วมกับ *E. fibuligera* หรือ *H. anmala* จะหมักได้ข้าวหมากที่มีลักษณะกลิ่นรสไม่แตกต่างจากข้าวหมากไทย ส่วนการหมักกระแช่นั้นพบว่า เมื่อใช้ *A. rouxii* หรือ *Rhizopus* spp. ร่วมกับ *S. cerevisiae* จะให้ผลการหมักไม่แตกต่างจากการหมักกระแช่ด้วยลูกแป้ง และพบว่า *Endomycopsis* spp. ในลูกแป้งเหล้าของไทยไม่มีความสำคัญในการหมักเลย (นภา, 2537)

ทั้ง *A. rouxii* และ *Rhizopus* spp. เป็นเชื้อราที่มีการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ เอนไซม์ที่ผลิตได้มีทั้งแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ดังนั้นในกระบวนการหมักเชื้อราเหล่านี้จึงบทบาทในมีการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล ส่วน *Endomycopsis* spp. เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้เช่นกัน นอกจากนั้นยังสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้ได้แอลกอฮอล์และเอส-เทอร์ ดังนั้นในการหมักข้าวหมาก *A. rouxii* และยีสต์สองสกุลนี้จึงมีบทบาทในการทำให้เกิดความหวานและผลิตสารที่ให้กลิ่นรสของข้าวหมาก ส่วนในลูกแป้งเหล้า คือ *Rhizopus* spp. และ *A. rouxii* จะมีบทบาทเช่นเดียวกันในการหมักข้าวหมาก และยีสต์ที่เป็นตัวเร่งในการหมักกระแช่หรือ สาโท ได้แก่ *S.cerevisiae* ซึ่งมีบทบาทในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทธานอล แสดงในภาพที่ 2-3และภาพที่ 2-4 นอกจากจะใช้ในการหมักเครื่องดื่มประเภทมึนเมาดังกล่าวแล้ว ยังใช้ลูกแป้งเหล่ารวมกับลูกแป้งน้ำส้มสายชูในการหมักน้ำส้มสายชูด้วย (ภาพที่ 2-3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




ภาพที่ 2-3 แผนภูมิการหมักน้ำส้มสายชูจากข้าวเหนียว

ที่มา : นภา (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับแบคทีเรียแลคติกไม่มีบทบาทที่แน่ชัดในการหมักข้าวหมาก แต่การมีแบคทีเรียเหล่านี้จำนวนมากจะมีผลทำให้เป็นที่นิยม ส่วนเครื่องดื่มประเภทกระแช่หรือสาโทนั้น ยีสต์จะเจริญและมีการผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีเมื่อน้ำหมักมีพีเอช (pH) ต่ำ ( 4.2 – 4.5 ) และการมีกรดในน้ำหมักยังมีผลทำให้จุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่น ๆ เจริญได้ช้าลง นอกจากนี้เครื่องดื่มประเภทนี้ยังนิยมให้มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย ดังนั้นแบคทีเรียในลูกแป้งจึงมีบทบาทในเรื่องนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งลูกแป้งที่ใช้หมักเหล้าจากข้าวของอินเดียที่เรียกว่า "ซอนนิ" ซึ่งนิยมให้มีรสเปรี้ยวจัด สำหรับการหมักกระแช่หรือสาโทของไทยโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์จากลูกแป้งได้แก่ *A. rouxii* และ *Rhizopus* spp. ร่วมกับ *S.cerevisiae* ทำให้น้ำหมักมีพีเอช(pH)ประมาณ 4.1 – 4.5 อยู่แล้วโดยไม่ต้องเติมแบคทีเรียพวกแลคติก ทั้งนี้เพราะ *A. rouxii* และ *Rhizopus* spp. ที่แยกได้จากลูกแป้งนั้นเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดได้ ส่วน *Acetobacter* spp. ที่พบในลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้านั้นถึงแม้ว่าจะมีการพบในปริมาณน้อยแต่ก็จะมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพโดยมีกรดน้ำส้มเกิดขึ้น

เนื่องจากลูกแป้งเหล้าส่วนใหญ่มักมีเชื้อน้ำส้มสายชูปนเปื้อน ในบางครั้งจึงมีการใช้ลูกแป้งเหล้าเป็นกล้าเชื้อในการผลิตน้ำส้มสายชู ซึ่งผลที่ได้ในแต่ละครั้งไม่สม่ำเสมอ และได้ปริมาณกรดต่ำกว่าที่กำหนดไว้ในพระราชบัญญัติอาหาร การผลิตน้ำส้มสายชูในระดับโรงงานขนาดย่อม จึงใช้ลูกแป้งน้ำส้มสายชูหรือน้ำส้มโดยเฉพาะ ซึ่งลูกแป้งเหล่านี้จะมีเชื้อน้ำส้มสายชูในปริมาณค่อนข้างมาก (นภา, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.2 เชื้อรา *Aspergillus* sp.**

ลักษณะที่สำคัญของเชื้อ

1. เส้นใยมีผนังกั้น
2. สปอร์ไม่เคลื่อนที่
3. sexual spore สร้างภายใน ascus มีจำนวน 8 ascospore
4. asexual spore ไม่สร้างภายใน ascus
5. ไม่ต้องการความชื้นมากในการเจริญเติบโต

การสืบพันธุ์

1. การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ เกิดขึ้นได้หลายวิธีดังนี้
   - fission
   - budding
   - fragmenttation
   - chlamydospore
   - conidia

   ซึ่งเชื้อราจะสร้างสปอร์แบบใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของราหรือสภาพแวดล้อมขณะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ
2. การสืบพันธุ์แบบมีเพศ

   การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศโดยวิธีนี้มีหลักการโดยที่นิวเคลียสที่อยู่ในเซลล์เดียวกันแต่ยังไม่รวมกัน ทำให้เป็นลักษณะ 1 เซลล์มี 2 นิวเคลียส ที่เรียกว่า dikaryon และนิวเคลียสแบ่งตัวหลายๆ ครั้งได้ dikaryotic cell ใหม่อีกหลายอัน ต่อมานิวเคลียสทั้ง 2 อันในเซลล์มารวมกันในส่วนที่จะเจริญเป็น ascus จากนิวเคลียสซึ่งเป็น dipolid zygote nucleus จะเกิดไมโอซิสและได้นิวเคลียส 4 อัน ต่อมา haploid nucleus ทั้ง 4 นี้ จะแบ่งแบบไมโตซิสอีกครั้งหนึ่งได้ 8 นิวเคลียส ซึ่งจะเจริญไปเป็น ascospore 8 อัน ภายใน ascus

<u>ประโยชน์จากเชื้อรา *Aspergillus* sp.</u>

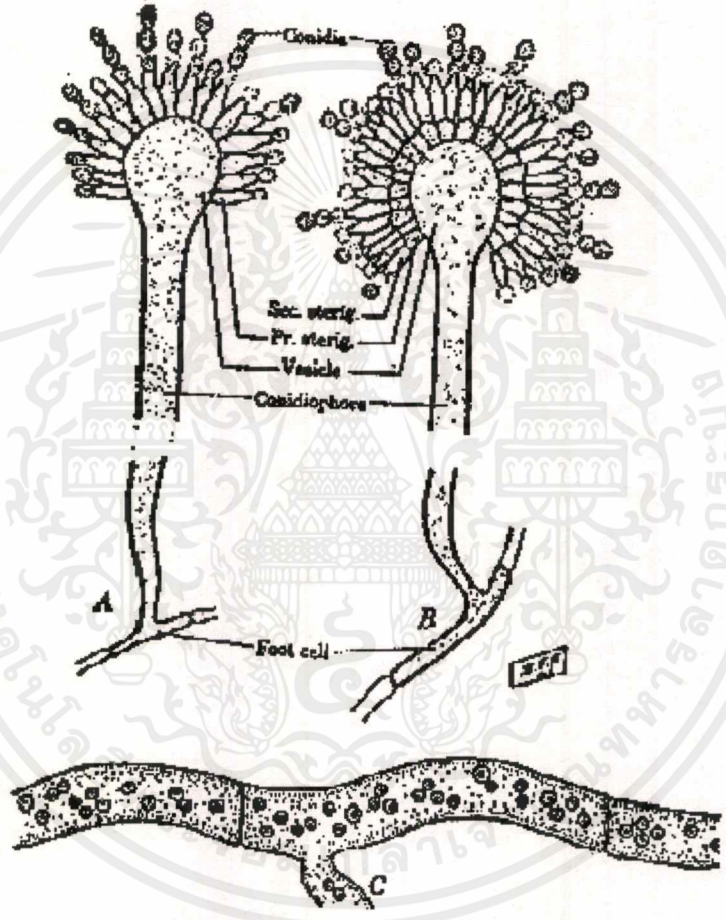
1. ด้านอุตสาหกรรม ได้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น
   - ทำเต้าเจี้ยวใช้ *Aspergillus wendtii*
   - ผลิตกรดซิตริกและกรดกลูโคนิก
   - เหล้าสาเก จากข้าวใช้ *Aspergillus oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ใช้ทดสอบ trace element โดยเฉพาะทองแดงในดิน ใช้ *Aspergillus niger* ซึ่งถ้าขาดทองแดงในดินสีของเชื้อราจะอ่อน ถ้ามีทองแดงสีจะคล้ำ

โทษของเชื้อรา *Aspergillus* sp.

ทำให้อาหารเป็นพิษ เชื้อ *Aspergillus* spp. หลายชนิดโดยเฉพาะ *Aspergillus flavus* เมื่อเจริญในอาหารพวกถั่วต่างๆ จะสร้างสารพิษที่เรียกว่า aflatoxion ทำให้เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ได้ ทำให้เกิดโรค และทำลายอาหารและผลผลิตต่างๆ ทางเกษตรกรรม เช่น *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ทำลายอาหารพวกเนื้อสัตว์และไขมันได้ดี(ปราบสยบ และคณะ,2543)




ภาพที่ 2-4 ลักษณะเส้นใยและโคนิดิโอฟอร์ ของ *Aspergillus*

A : conidiophore ที่เรียงอยู่บน sterigmata แบบแถวเดียว

B : conidiophore ที่เรียงอยู่บน sterigmata แบบสองแถว

C : แสดงจำนวนนิวเคลียสหลายอันในเส้นใย

ที่มา : Alexopoius (1961)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง


**2.3 เทคนิค PCR**

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยเอมไซม์ที่ทนความร้อน เทคนิคนี้ถูกคิดค้นเมื่อปี ค.ศ. 1985 ปัจจุบันมีงานวิจัยต่างๆ ที่ใช้เทคนิค PCR ในการศึกษา ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต

วิธีการมาตรฐานในการทำ PCR กำหนดให้มีส่วนผสมต่างๆ รวมอยู่ในปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร แล้วปิดทับส่วนบนของส่วนผสมด้วย mineral oil 75 ไมโครลิตร หรือใส่ Ampliwax gem 1 เม็ด เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ ส่วนประกอบของปฏิกิริยามีดังนี้

- ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) $10^5$-$10^6$ โมเลกุล
- 20 พิโกโมล (pmol) ของแต่ละไพรเมอร์
- Tris-HCl 20 มิลลิโมล พีเอช 8.3
- KCl 1.5 มิลลิโมล
- Tween 20 ร้อยละ 0.05 (v/v)
- autoclaved gelatin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ nuclease-free bovine serum albumin
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 50 ไมโครโมล
- *Taq* DNA polymerase 2 units

ปฏิกิริยาการเพิ่มขยาย (amplification) เกิดขึ้นโดยขบวนการหลัก 3 ขั้นตอน ซึ่งควบคุมอุณหภูมิและเวลาตามกำหนดโดยอาศัยเครื่องอัตโนมัติ Programmable DNA Thermal Cycle ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Denaturration | 90-95 องศาเซลเซียส | 30-60 วินาที |
| Primer annealing | 40-60 องศาเซลเซียส | 30-60 วินาที |
| Primer extension | 72 องศาเซลเซียส | 1-2 วินาที |

ทำซ้ำจำนวน 25-30 รอบ

รอบสุดท้ายทำ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส และหรือเติมอีดีทีเอ 10 มิลลิโมล

วิธีการมาตรฐานดังกล่าวสามารถเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่มีขนาดความยาว 150-2951 คู่เบส ได้ผลดีและมีความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามสำหรับบางดีเอ็นเอแม่พิมพ์อาจใช้วิธีไม่ดี กรณีเช่นนี้จะต้องทดลองศึกษาหาสภาวะเหมาะสมโดยการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบและสภาวะต่างๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

47300

2.3.1 การคัดเลือกและการออกแบบไพรเมอร์

ข้อแนะนำในการคัดเลือกหรือการออกแบบไพรเมอร์ ที่สำคัญควรพิจารณา คือ

- ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี random base distribution และมีปริมาณ GC ใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอ ที่ต้องการเพิ่มขยาย ควรหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มีลำดับการเรียงตัวที่ไม่ปรกติ (unusal sequence) และควรมีปริมาณ GC อยู่ระหว่างร้อยละ 50-60
- หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มี secondary structure โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ปลาย 3′ (3′-end) ของไพรเมอร์ การตรวจสอบโครงสร้างของลำดับเบสทำได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เช่น Squiggles หรือ Circles ซึ่งพัฒนาขึ้นที่ University of Wiscosin ถ้ายังคงมี secondary structure ควรแทนที่ dGTP ด้วย 7-deaza-2-dGTP(2)
- ตรวจสอบการเรียงลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์ ไม่ให้มีความเป็นคู่สมกัน (complementarity) โดยเฉพาะต้องไม่มี 3′-overlap ในคู่ไพร-เมอร์ ซึ่งช่วยลดอัตราการเกิด primer dimer
- ตามหลักเกณฑ์ควรกำหนดให้มีความยาวระหว่าง 18-28 นิวคลีโอ-ไทด์ และมีการเรียงเป็นคู่สมกับ 3′-end ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์
- มี Tm (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 55-80 องศาเซลเซียส การคำนวณหาค่า Tm ใช้กฎ the rule of thumb calculation โดยคิด 2 องศาเซลเซียส สำหรับA หรือ T และ 4 องศาเซลเซียส สำหรับ G หรือ C
- ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ที่พอเหมาะควรอยู่ระหว่าง 0.1-0.5 โมล ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปส่งเสริมให้เกิดการจับคู่ผิดพลาด และมีการสะสมของผลผลิตที่ไม่จำเพาะมากขึ้นและอาจช่วยเพิ่มโอกาสการเกิด primer dimer ซึ่งเป็น temperature-independent artifact ทั้งผลผลิตจำเพาะและไม่จำเพาะ และ primer dimer ต่างก็แย่งใช้เอนไซม์ dNTPs และ ไพรเมอร์ ทำให้ได้ผลผลิตที่ต้องการปริมาณลดลง

2.3.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA POLYMERASE

เอนไซม์ *Taq* DNA POLYMERASE เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่ซื้อได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากหลายบริษัทผู้ผลิต ซึ่งอาจมีความแตกต่างกันในเรื่องของสภาวะที่เหมาะสม ดังนั้นเมื่อเริ่มต้นใช้ควรจะทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ในช่วงตั้งแต่ 0.5-5หน่วยต่อ 100 ไมโครลิตร และตรวจสอบผลโดยวิธีเจลอิเลคโทรโฟรีซิส

2.3.3 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน

ผลของปฏิกิริยา PCR จะขึ้นกับความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน ถ้ามีความเข้มข้นมากเกินไป ทำให้มีการเพิ่มขยายผลผลิตที่ไม่จำเป็นเกิดการสะสมมาก ถ้ามีความเข้มข้นน้อยเกินไปจะไปลดปริมาณผลผลิตที่ต้องการ

2.3.4 ความเข้มข้นของ deoxynucleotide triphophates

deoxynucleotide triphophates (dNTP) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ปรกติมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 50-200 ไมโครโมล โดยต้องปรับให้เป็นกลาง ที่พีเอช 7.0

2.3.5 ความสำคัญและองค์ประกอบอื่นๆ ในปฏิกิริยา

บัฟเฟอร์ที่ควรใช้สำหรับ PCR คือ Tris-HCl ความเข้มข้น10-15 ไมโคร-โมล พีเอช 8.3-8.8 ที่ 20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme หรือ Restriction edonuclease) เป็นกลุ่มของเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสที่สามารถจดจำลำดับที่จำเพาะของนิวคลีโอไทด์และตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ตรงตำแหน่งที่จำเพาะของดีเอ็นเอสายคู่ เอนไซม์เหล่านี้พบในแบคทีเรียซึ่งแบคทีเรียจะใช้เอนไซม์เหล่านี้ในการป้องกันและกำจัดดีเอ็นเอที่แปลกแปลมเข้ามาคล้ายกับการป้องกันตนเองจากการถูกบุกรุกจากนอก ซึ่งเหมือนกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีระบบภูมิคุ้มกันตนเอง จากคุณสมบัติของเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้เป็นประโยชน์ในการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอ การวิเคราะห์โครโมโซม การแยกยีน และการสร้างดีเอ็นเอสายผสม

แบคทีเรียจำนวนมากมีระบบป้องกันตนเองจากการบุกรุกของดีเอ็นเอแปลกปลอม โดยจะตัดดีเอ็นเอที่แปลกปลอมออกเป็นชิ้น ๆ ด้วยเอนไซม์จำเพาะ ในขณะที่ดีเอ็นเอของตัวของตัวเซลล์เองจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมทิล (modification methylase) ที่เบสจำเพาะนั้นก่อน จึงไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ ระบบดังกล่าวนี้เรียกว่า restriction modification ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ควบคู่กัน เอนไซม์ในระบบนี้แบ่งเป็น 3 แบบตามลักษณะการทำงาน องค์ประกอบย่อยของเอนไซม์ องค์ประกอบร่วม (cofactor) ที่ใช้ และวิธีการตัดดีเอ็นเอ (สุรินทร์ ,2539)

แบบที่ 1 (type I) ค้นพบโดย Linnและ Arber (ค.ศ. 1968) พบใน *E. coli* เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกลุซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 3 ชนิด สามารถตัดดีเอ็นเอ และเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมธิลเข้าไปที่เบสบางเบสได้ในขณะที่เบสบางเบสได้ในขณะเดียวกัน เอนไซม์กลุ่มนี้จะจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำ (recognition site) ที่จำเพาะแต่ละสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไม่เจาะจงห่างออกไป 400 –700 คู่เบส การตัดดีเอ็นเอต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน ($Mg^{2+}$ ) ATP และ S-adenosylmethionine (sam) ขณะที่เกิดการตัดสายดีเอ็นเอให้ขาดจะมีการสลาย ATP ควบคู่ไปด้วย หลังจากนั้นเอนไซม์จะหมดคุณสมบัติที่ตัดดีเอ็นเอ แต่ยังคงมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่สลาย ATP (ATPase) ต่อไปได้อีก นอกจากนี้เอนไซม์ในแบบที่ 1 นี้ จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำด้วย เช่น เอนไซม์ที่พบใน *E. coli* K 12 จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งที่ 6 ของเบส A ที่บริเวณจดจำดังนี้

5′ -A Ã C N N N N N N G T G C-3′

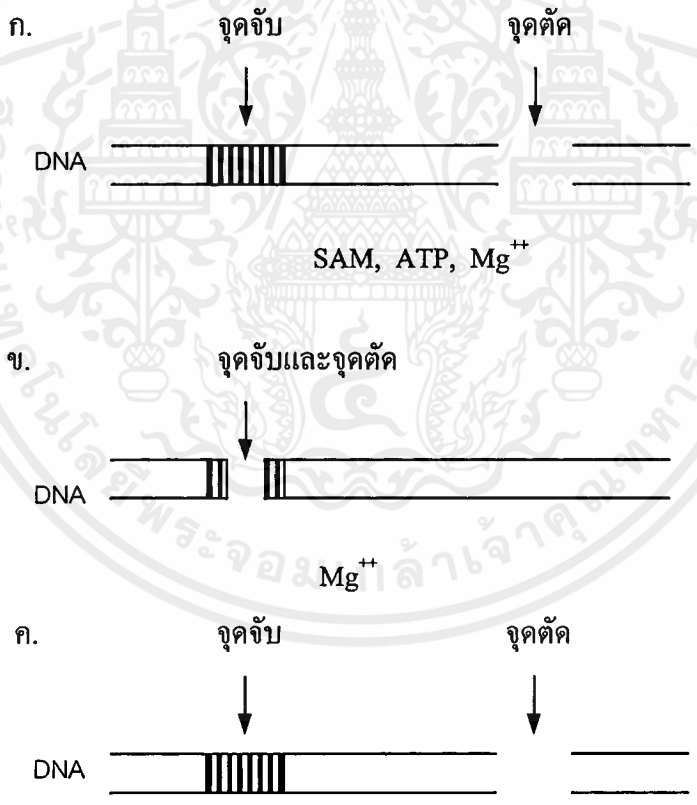
5′ -T T G N N N N N N C Ã C G-3′

N คือเบสใด ๆ แต่เป็นคู่กันในสองสาย Ã คือ ตำแหน่งที่มีการเติมหมู่เมธิล เอนไซม์นี้จะตัดดีเอ็นเอเมื่อไม่มีหมู่เมธิลที่ A ทั้งสองสายของบริเวณจดจำเท่านั้น ถ้ามีหมู่เมธิลเพียงสายเดียว เอนไซม์ก็จะไม่ตัดดีเอ็นเอนั้น แต่จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ A ของอีกสายหนึ่งที่ว่างอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในแบคทีเรียพวกที่อยู่ในทางเดินอาหาร เช่น *E. coli* โพลีเปปไทด์ทั้ง 3 ชนิดนี้เกิดจากยีนที่อยู่ใกล้กันบนโครโมโซมคือ hsd R , shd M , และ hsd S การสร้าง mRNA นั้น shd M และ hsd S จะสร้างรวมกัน ( dicitronic mRNA ) และให้โพลีเปปไทด์ทั้ง 2 ชนิดที่มีหน้าที่เติมหมู่เมธิลใหแก่เบส ส่วน shd R ให้โพลีเปปไทด์ที่มีหน้าที่ตัดดีเอ็นเอ

แบบที่ 2 (type II) เป็นเอนไซม์อย่างมากที่ใช้ในการตัดต่อยีน มีโมเลกลุไม่ซับซ้อน เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างง่ายๆ เป็น dimer หรือ tetramer ของโพลีเปปไทด์เพียงสายเดียว การตัดดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นที่ตำแหล่งจำเพาะในบริเวณจดจำหรือที่จุดใกล้บริเวณจดจำ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดที่แน่น ในปฏิกิริยาต้องการเฉพาะแมกนีเซียมไอออนเท่านั้น พบเอนไซม์ชนิดนี้เป็นครั้งแรกโดย Smith และคณะ(1970) จาก *Haemophilus influenzae* ต่อมามีการแยกเอนไซม์ตัวอื่น ๆ ออกมา ในปัจจุบันพบว่ามีเอนไซม์กลุ่มนี้มีมากถึง 300 ชนิด เช่น *Eco*R I , *Pst* I , *HI* เป็นต้น




ภาพที่ 2-5 ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความแตกต่างที่จุดจับ จุดตัด และสับสเตรท

ก. Type I

ข. Type II

ค. Type III

ที่มา : นิตย์ศรี (2536)

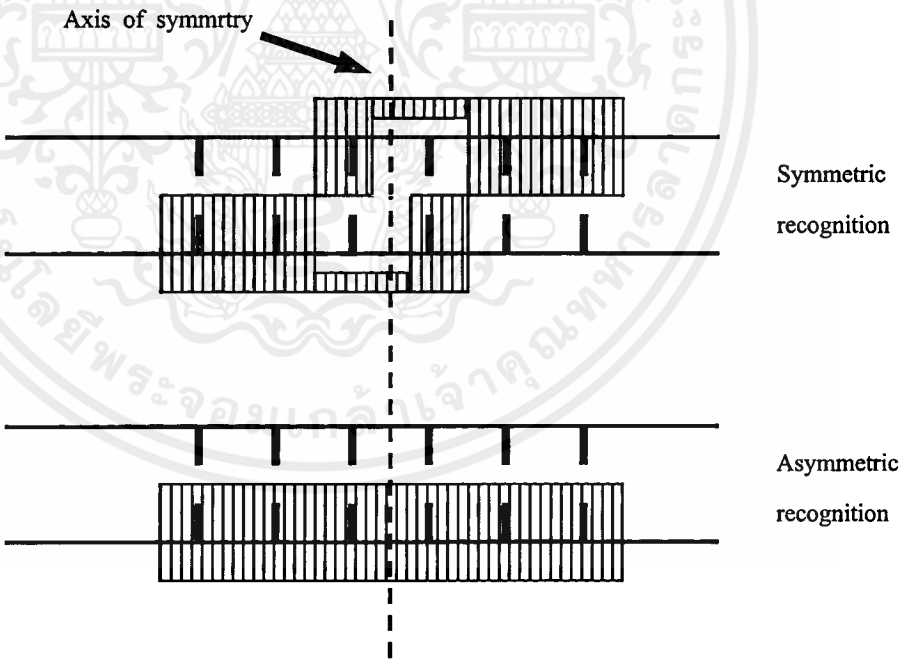
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบที่ 3 (type III) ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 2 ชนิด มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะและเติมหมู่เมธิล ขณะเดียวกันการตัดดีเอ็นเอจะห่างจากบริเวณจดจำประมาณ 25 ถึง 27 คู่เบส ในปฏิกิริยาต้องมีแมกนีเซียมไอออนและ ATP โดยไม่จำเป็นต้องมี S-adeasylmethionine แต่ถ้ามีจะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และเอนไซม์จะสามารถเติมหมูเมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะได้ พบว่ายีนที่กำหนดการสร้างโพลีเปปไทด์ทั้ง 2 ชนิด ชนิดของเอนไซม์นี้มีตำแหน่งอยู่ใกล้ ๆ กัน เอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์จาก *Haemophilus influenzae* Rf และ Re เป็นต้น

แบบของการจดจำลำดับเบสที่จำเพาะมี 2 ประเภทคือ

Symmetric recognition เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอทั้งสองสายเป็น bilateral Symmetric

Asymmetric recognition เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวสายคู่เป็น nonsymmetric contacts ทั้งสิ้น



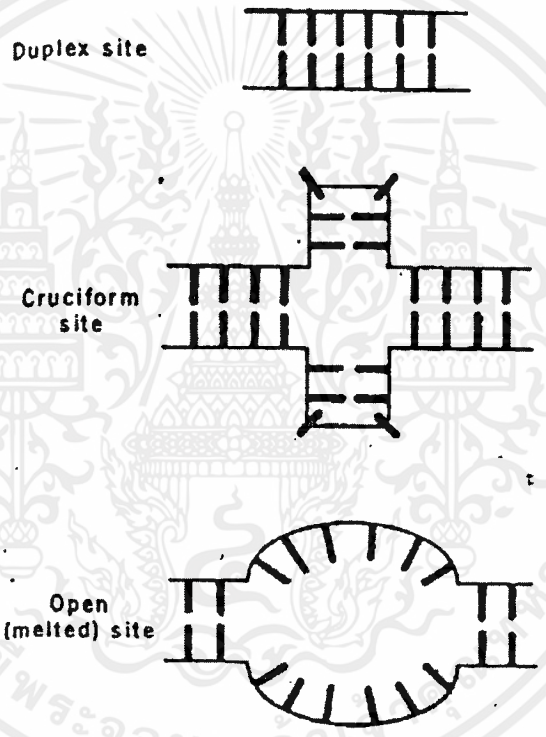

ภาพที่ 2-6 แบบของการจดจำลำดับเบสที่จำเพาะ

ที่มา : Smith (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเท่านั้นที่มีกลไกแบบ asymmetric ได้ ดังนั้นเอนไซม์ในระบบ restriction-modification สามารถจับและตัดบนดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ สำหรับตำแหน่งที่จดจำลำดับเบสจำเพาะนั้น มีโครงสร้าง 3 แบบ ดังนี้

- Duplex site
- Cruciform site
- Open (melted) site




ภาพที่ 2- 7 รูปร่างทั้ง 3 แบบที่มีการจดจำลำดับเบสที่จำเพาะ
ที่มา : นิตย์ศรี (2536)

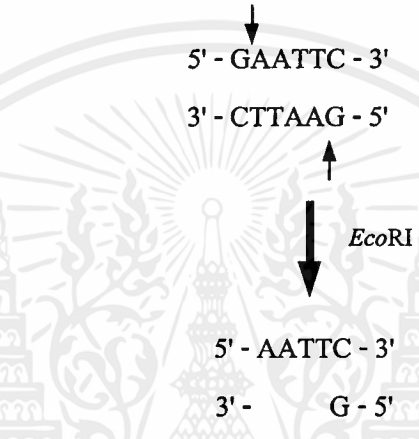
เอนไซม์ตัดจำเพาะส่วนมากจะต้องการตำแหน่งที่จับดีเอ็นเอทั้งสองสาย เช่น *Hin*dIII มีเพียงบางชนิดที่สามารถจับบนสายเดี่ยวของดีเอ็นเอได้อย่างช้าๆ เช่น *Hae*III *Hha*I *Sfa*I *Mbo*I และ *Hin*fI เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

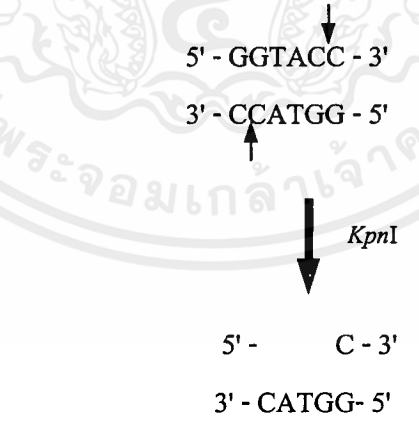
**2.4.1 ลักษณะการตัดลำดับเบสในสายดีเอ็นเอ**

เกิดได้ 3 แบบ ดังนี้

1. ตัดจากปลาย 5' ทำให้ได้ปลายเหนียว (sticky end) ทางปลาย 5' เช่น *Eco*RI *Hin*dIII และ *Mbo*I เป็นต้น

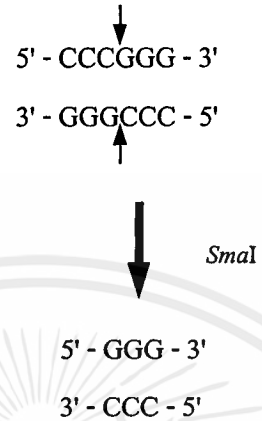



2. ตัดจากปลาย 3' ทำให้ได้ปลายเหนียวทางปลาย 3' เช่น *Pst*I *Hha*I และ *Kpn*I เป็นต้น

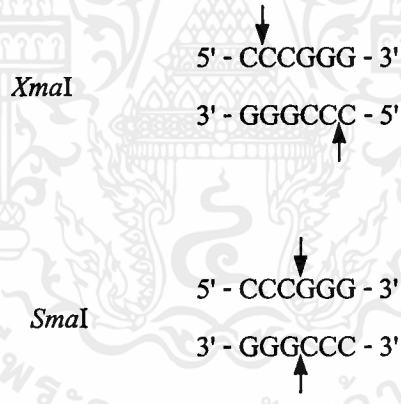



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ตัดแล้วได้ปลายทู่ (blunt end) เช่น *Hae*III และ *Sma*I เป็นต้น




นอกจากนี้ Isoschizomer เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ที่มีบริเวณจดจำเหมือนกันแต่ไม่จำเป็นต้องตัดดีเอ็นที่ตำแหน่งเดียวกัน เช่น *Xma*I และ *Sma*I เป็น Isoschizomer แต่ตัดดีเอ็นเอได้ต่างกัน




เอนไซม์บางชนิดเมื่อตัดดีเอ็นเอแล้วได้ปลายเหนียวที่จับคู่กับปลายของดีเอ็นเอที่ตัดโดยเอนไซม์อื่นได้ เช่น *Mbo*I และ *Sau*3A มีบริเวณจดจำ 4 คู่เบสส่วน *Bam*HI มีบริเวณจดจำ 6 คู่เบส แต่เมื่อตัดดีเอ็นเอแล้วจะให้ปลายที่มีเบสเป็นคู่สมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-4 จุลินทรีย์ เอนไซม์ที่ผลิต และจุดตัดของเอนไซม์

| จุลินทรีย์ | ชื่อย่อ | ลำดับเบสที่จดจำและตัด |
|---|---|---|
| *Bacillus amyloliquefaciens* | *Bam*HI | G↓GATCC |
| *Escherichia coli* RY 13 | *Eco*RI | G↓AA*TTC |
| *Haemophilus influenzae* Rd | *Hin*dIII | A*↓AGCTT |
| *Haemophilus parainfluenzae* | *Hpa*I | GTT↓AAC |
| *Serratia marcescens* | *Sma*I | CCC↓GGG |
| *Streptomyces albus* G | *Sal*I | G↓TCGAC |
| *Xanthomonas malvacearum* | *Xma*I | C↓CCGGG |
| *Haemophilus aeqypticus* | *Hae*I | (A/T)GG↓CC(T/A) |
| *Haemophilus aegypticus* | *Hae*II | Pu GCGC↓Py |
| *Escherichia coli* RY 245 | *Eco*RII | ↓CC*(A/T)GG |
| *Moraxella bovis* | *Mbo*II | GAAGANNNNNNN(3') |
| | | CTT CTNNNNNNN(5') |
| *Haemophilus aeqypticus* | *Hae*III | GG C*↓C |
| *Moraxella bovis* | *Mbo*I | ↓GATTC |
| *Enterobacter cloacae* | *Eca*I | GGINACC |

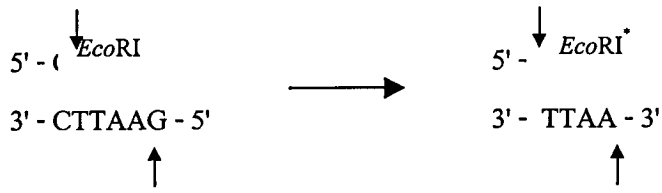
A* = $N^6$-methyladenine

N* = 5-methylcytosine

ที่มา : นิตย์ศรี (2536)

ปฏิกิริยาตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยทั่วไปมีทริสบัฟเฟอร์ (Tris-buffer) แมกนีเซียมไอออน ($Mg^{++}$) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ 2-mercaptoethanol พีเอชอยู่ในช่วง 7.2-7.6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ก็มีบางเอนไซม์ที่ใช้อุณหภูมิหรือสภาพที่ต่างออกไป ซึ่งมักจะบอกโดยบริษัทผู้ผลิต ในการทดลองจึงควรปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ถ้าไม่ปฏิบัติตามอาจเกิดปัญหาได้ เช่น *Eco*RI อาจมีบริเวณจดจำที่เปลี่ยนไป ถ้าลดความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ใช้พีเอชสูง ใช้แมงกานีสไอออนแทนแมกนีเซียมไอออน มีสารพวกกลีเซอรอลความเข้มข้นสูงหรือความเข้มข้นเอนไซม์สูง เรียกว่าเกิด star activity บริเวณจดจำเปลี่ยนไปเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

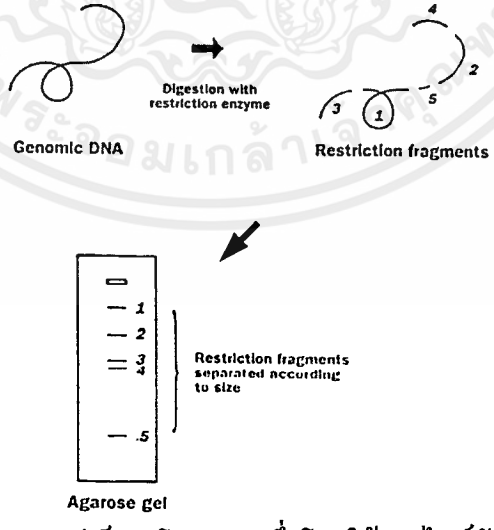



ทำให้เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอได้มากกว่าที่ควรจะเป็น ถึงแม้ว่าภายใต้สภาวะแบบ star เอนไซม์ก็ยังเลือกตัดบริเวณจดจำเดิมก่อน และบริเวณจดจำใหม่อาจตัดได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้ได้ขนาดดีเอ็นเอที่ไม่สม่ำเสมอ เมื่อทำซ้ำเป็นปัญหามาก เอนไซม์อื่นๆ ก็พบเหตุการณ์ทำนองเดียวกันได้เช่นกัน เช่น *Hin*dIII *Hha*I *Bsu*I *Xba*I *Sal*I *Pst*I *Bam*HI และ *Sst*I แต่ยังไม่ทราบสภาพที่ทำให้เกิด star activity ได้ดีเท่า *Eco*RI ในการปฏิบัติจึงควรปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทโดยเคร่งครัด หลีกเลี่ยงการใช้เอนไซม์ปริมาณมากๆ เพราะเอนไซม์มักละลายอยู่ในสารละลายกลีเซอร์รอล เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาไม่ควรทิ้งไว้นานเกินไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 Restriction Fragment Length Polymorphism

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและการทำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ เริ่มพัฒนาขึ้นตั้งแต่เมนเดลค้นพบกลไกควบคุมการถ่ายทอดลักษณะที่เรียกว่ายีน (gene) ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมโครงสร้าง ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตถูกเก็บไว้ในนิวเคลียสและส่วนประกอบอื่นบางชนิด โมเลกุลของดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนี้มีความสามารถในการจำลองตัวเองได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปยังเซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป ทำให้สิ่งมีชีวิตมีโครงสร้างและองค์ประกอบที่สอดคล้องกับพ่อแม่ แต่ในบางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้เนื่องจากสิ่งแวดล้อมหรือการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์เอง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ได้มีเพียงการเปลี่ยนแปลงในเบสแต่ละตัวเท่านั้น อาจมีการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซม เช่นมีชิ้นส่วนหายไป (deletion) มีบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (duplication) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนของดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangment) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วน ภายในโครโมโซมหรือต่างโครโมโซม (transposition) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจนสามารถกล่าวได้ว่า ไม่มีสิ่งมีชีวิตคู่ใดมีลำดับเบสของดีเอ็นเอเหมือนกัน ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) หรือพืชที่เกิดการการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ความหลากหลายดังกล่าวสามารถตรวจพบได้โดยลำดับเบสของดีเอ็นเอแล้วนำมาเปรียบเทียบกัน แต่เป็นวิธีที่ทำได้ยากและใช้เวลามากวิธีที่ง่ายกว่านั้นคือการนำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดชนิดแล้วนำมาเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น ( สุรินทร์ , 2539 )

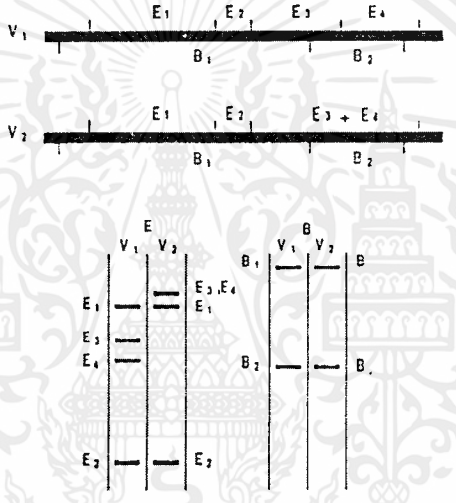



ภาพที่ 2-8 การตัดดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่งโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ที่มา : สุรินทร์, 2539

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียและจะตัดดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบสแบบจำเพาะเรียกว่า ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลเป้าหมายโมเลกุลหนึ่ง จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอดังภาพที่ 2-8 ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากแหล่งต่างกัน และมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป หรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่ง ดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่าเกิดโพลิมอร์ฟีซึม หรือมี RFLP ดังภาพที่ 2-9 เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ E ทำให้เกิดโพลิมอร์ฟีซึม




ภาพที่ 2-9 โพลิมอร์ฟีซึมที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอ V1 และ V2
A เอนไซม์ E ทำให้เกิดโพลิมอร์ฟีซึม
B เอนไซม์ B ไม่ทำให้เกิดโพลิมอร์ฟีซึม
ที่มา : สุรินทร์ (2539)

ในปัจจุบันมีเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิดและในแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อลำดับเบสของดีเอ็นเอของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เทคนิคดังกล่าวจึงได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในหลายรูปแบบได้แก่การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ ตลอดจนการจำแนกจีโนไทด์ของเชื้อไวรัสและแบคทีเรียบางชนิด นอกจากนั้น RFLP ยังสามารถใช้ในการตรวจหา point mutation ของยีนต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งหรือโรคที่มีความผิดปกติทางด้านพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.5.1 หลักการทำ RFLP

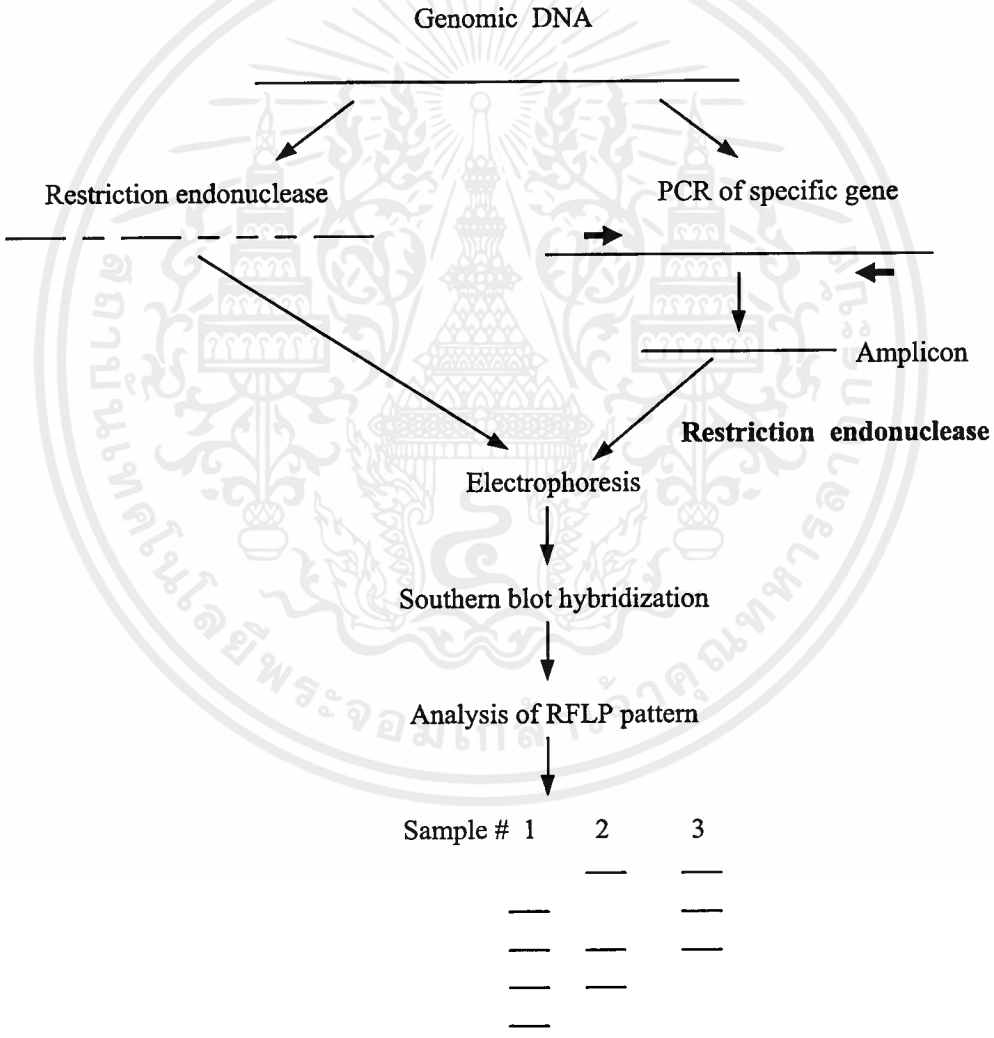
การทำ RFLP ประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้ ดังภาพที่ 2- 10

2.5.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

2.5.1.2 การตัดดีเอ็นเอออกเป็นชิ้นส่วนย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.5.1.3 การแยกและการตรวจหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

2.5.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูล




ภาพที่ 2-10 ขั้นตอนการทำ RFLP

ที่มา : ปราณี (2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบอาจเป็นจีโนมมิค ดีเอ็นเอ (genomic DNA) ที่ได้จากการแยกสกัดจากเซลล์ของเชื้อต่างๆ โดยวิธีมาตรฐาน (phenol chloroform extraction) หรือใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เหมาะสมที่มีจำหน่ายอยู่หลายชนิดในปัจจุบัน ซึ่งวิธีนี้จะใช้ปริมาณดีเอ็นเอจำนวนมาก วิธีที่ 2 สามารถใช้วิธีการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR ก่อนเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอในปริมาณที่มากพอสำหรับการทำปฏิกิริยาขั้นต่อไป ซึ่งวิธีหลังนี้ผู้ทำการทดลองสามารถที่จะเลือกศึกษาเฉพาะยีนที่สนใจได้โดยทำการขยายปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะยีนนั้นๆ โดยตรง ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับ genomic DNA นอกจากนั้นยังมีข้อดีที่ใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อย และดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กลงนี้ทำให้ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยลงง่ายต่อการวิเคราะห์ข้อมูลนั้นๆ

2.5.1.2 การตัดดีเอ็นออกเป็นชิ้นส่วนย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ขั้นตอนนี้นับเป็นขั้นตอนที่สำคัญของการทำ RFLP เนื่องจากผู้ทำการทดลองจะต้องเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะให้เหมาะสมกับชนิดของดีเอ็นเอ และวัตถุประสงค์ของการศึกษานั้นๆ การเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดนั้นสามารถกระทำได้หลายวิธีโดยค้นคว้าจากข้อมูลที่ได้มีผู้ทำการทดลองและรายงานไว้แล้ว หรือถ้าเป็นงานที่ไม่มีผู้ใดรายงานไว้ก่อน อาจจำเป็นต้องออกแบบคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะเอง ผู้ทำการทดลองจำเป็นต้องทราบลำดับเบสที่แน่นอนของดีเอ็นเอหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษานั้นเป็นลำดับแรก ซึ่งสามารถสืบค้นข้อมูลดังกล่าวได้จาก Genbank ซึ่งเป็นหน่วยงานที่รวบรวมเกี่ยวกับลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ตลอดจนยีนของคนเท่าที่ได้มีผู้ทำการศึกษาและนำข้อมูลมาเก็บรวมรวมเพื่อเป็นแหล่งสามารถสืบค้นและนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

2.5.1.2 การแยกและการตรวจหาชิ้นส่วนดีเอ็น

ภายหลังจากการตัดดีเอ็นเอออกเป็นชิ้นส่วนย่อยโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ชิ้นส่วนย่อยดังกล่าวจะถูกนำมาแยกโดยวิธี เจลอิเลคโทรโฟริซิส (gel electrophoresis) ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ กัน เมื่อนำมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และส่องด้วยแสง UV บนเครื่อง UV transilluminator หรือ Fiuorlmager จะพบแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดแตกต่างกับเป็นรูปแบบที่เฉพาะของดีเอ็นเอนั้นๆ หรืออาจทำการตรวจหาแถบดีเอ็นเอดังกล่าวโดยการทำ Southern blot hybridization

2.5.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

เนื่องจากเอนไซม์ตัดจำเพาะมี restriction site ที่จำเพาะบนดีเอ็นเอ ดังนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอต่างชนิดกันจะมี RFLP pattern ที่แตกต่างกันหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน ฉะนั้นการวิเคราะห์ข้อมูลของ RFLP จึงต้องอาศัยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง RFLP pattern ของดีเอ็นเอที่ตรวจสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบ

### 2.5.2 การประยุกต์ใช้ RFLP

2.5.2.1 การจำแนกจีโนไทด์

การจำแนกจีโนไทด์ของเชื้อส่วนใหญ่อาศัยวิธีการทาง serology โดยใช้ type specific monoclonal antibody ในเทคนิคที่ต่างกันหลายรูปแบบ อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดในเชื้อบางชนิดที่ไม่สามารถจำแนกจีโนไทด์โดยวิธีดังกล่าวได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อไวรัสและแบคทีเรียบางชนิดที่เพาะเลี้ยงได้ยากหรือไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้เลย ในปัจจุบันจึงมีผู้นิยมทำการจำแนกจีโนไทด์ของเชื้อเหล่านี้ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา โดยอาศัยหลักการของความแตกต่างของลำดับเบสในยีนต่างๆ ของเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนที่เกี่ยวกับการสร้าง type specific antigens หรือยีนที่สร้างโปรตีนโครงสร้างของเชื้อไวรัส เนื่องจากยีนเหล่านี้จะพบความแตกต่างและการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสได้ง่ายกว่ายีนอื่นๆ

2.5.2.2 การตรวจหา point mutation

การตรวจหา point mutation โดยเทคนิค RFLP นั้น ต่างจากการจำแนกจีโนไทด์ของเชื้อต่างๆ อย่างไรก็ตามการตรวจหา point mutation โดยวิธีดังกล่าวขึ้นอยู่กับข้อมูลที่สำคัญ 2 ประการคือ

1) ต้องทราบลำดับเบสของตำแหน่งที่เกิดมิวเตชัน เพื่อทำการคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม
2) ตำแหน่งที่เกิดมิวเตชันจะต้องอยู่ในตำแหน่งที่ถูกตัดโดยเอนไซม์นั้นๆ

ซึ่งทั้งสองสิ่งนี้เป็นข้อจำกัดของเทคนิค RFLP ในการตรวจหา point mutation เมื่อเทียบกับเทคนิค CFLP

### 2.5.3 ประโยชน์ของการศึกษา RFLP

1. หาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตจาก RFLP ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ไมโตคอนเดรีย และในนิวเคลียส
2. รวมแผนที่ยีนที่ได้จากวิธีเดิมเข้ากับแผนที่ที่ได้จากการวิเคราะห์RFLP marker

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น ใช้ติดตามการถ่ายทอดยีนจากพันธุ์พ่อแม่ วิเคราะห์ลักษณะปริมาณ และวิเคราะห์ลักษณะประจำพันธุ์ เป็นต้น
4. โคลนยีนโดยหา RFLP marker ที่ถ่ายทอดไปพร้อมกับลักษณะที่ต้องการ (co-segregate) แล้วจึงโคลนยีนที่ควบคุมลักษณะนั้น โดยใช้เทคนิค chromosome walking
5. ติดตามลักษณะบางอย่างโดยใช้ RFLP marker ที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นมากๆ เช่น การวินิจฉัยโรคบางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

### 3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องชั่งสาร 2 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO รุ่น PG 5002 ,ประเทศไทย จำกัด)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO รุ่นAG 204 Mettler Toledo Ltd.,ประเทศไทย)
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) (Schott บริษัท ไซแอนติฟิคโปรโมชั่น จำกัด)
- เครื่องเขย่า (Orbital shaker) ( GALLENKAMP , ประเทศอังกฤษ)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ(centrifuge) (HERMLE-LABORTECH รุ่น Z383K , ประเทศเยอรมัน)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (BINDER บริษัทไซแอนติฟิคโปรโมชั่นจำกัด)
- กล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพ (Nikon รุ่น AFX , Nikon รุ่น SMZ-U Zoom 1:10 , Panasonic รุ่น wv-Gp410 , ประเทศญี่ปุ่น)
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (OLYMPUS รุ่น CH-B145-2 , ประเทศญี่ปุ่น)
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) (Astell , ประเทศอังกฤษ)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Dwyer รุ่น MARK II , ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) (Delta laboratory , ประเทศไทยจำกัด)
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (SHIMADZU รุ่น UV-1201V)
- เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR (PCR machine) (Perkin Elmer รุ่น perikin elmer 480 ,โตเกียว ญี่ปุ่น)
- เครื่องส่องเจล SYNGENE
- เครื่อง THEPMO-BLOCK (รุ่น TDB-120 ของบริษัท ห.จ.ก.หริกุล กรุงเทพฯ)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า(Power supply) (MODEL 1000/500 BIO-RAD)
- เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ ( PYREX , ปะเทศสหรัฐอเมริกา)
- Micro tip

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ไมโครปิเปตต์(Micropipette) (บริษัทกิบไทย , ประเทศไทยจำกัด)
- โกร่ง

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- โซเดียมอะซีเตต พีเอช 5.2(Sodium acetate pH 5.2)
- โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต(Sodium dodecyl sulfate)
- อีดีทีเอ(EDTA )
- โซเดียมคลอไรด์(sodium chloride)
- ทริสบัฟเฟอร์(Tris buffer)
- เอธิเดียมโบรไมด์(Ethidium bromide)
- ทีบีอี บัฟเฟอร์(TBE buffer)
- Extraction buffer
- 5X buffer
- ไอโซโพพานอล(Isopopanal)
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ

  Restoration endonuclease *Hin*dIII (Amersham pharmacia biotech , ประเทศอเมริกา)

  Restoration endonuclease *Hae*III (Amersham pharmacia biotech , ประเทศอเมริกา)

  Restoration endonuclease *Hin*fI ( New England Biolabs Inc. , ประเทศอเมริกา)
- dNTPs (Amersham pharmacia biotech , ประเทศอเมริกา)
- *Taq* DNA polymerase (Promega Coorprotion Co.Ltd., ประเทศไทยจำกัด)
- EZ Load$^{m}$ 100bp Molecular Ruler (Proega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย)
- Ethidium bromide (Life Technologes Inc., ประเทศอเมริกา)
- Agarose (USB , ประเทศอเมริกา)
- น้ำ DI
- ไอโอดีน
- เฟอร์ริกคลอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.2 วิธีวิจัย**

3.2.1 เชื้อรา *Aspergillus* ที่มีสปอร์สีเขียวที่แยกจากลูกแป้งเหล้าจากจังหวัด อำนาจเจริญ บุรีรัมย์ นครพนม ร้อยเอ็ด สุรินทร์ อุบลราชธานี อุดรธานี และยโสธร จำนวนทั้งหมด 20 ไอโซเลตซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากคุณคึกฤทธิ์ ศิลาลัย นักศึกษาปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ชั้นปีที่ 4 มีการนำเชื้อราที่ได้ในทุกไอโซเลตมาเก็บบนอาหารวุ้นแข็ง PDA(ภาคผนวก ก-1) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีการถ่ายเชื้อทุก 4 เดือน

3.2.2 ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อรา ด้วยเทคนิค RFLP

3.2.2.1 การเลี้ยงเชื้อรา นำสปอร์เริ่มต้นของราแต่ละไอโซเลตโดยมีปริมาณสปอร์เริ่มต้นเป็น $10^6$ ถึง $10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรโดยทำการเลี้ยงในอาหาร GYEP (ภาคผนวก ก-2)ในขวดเพาะเลี้ยงรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเส้นใยที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ล้างเซลล์จนสะอาดด้วยน้ำกลั่น และทำการบีบเอาน้ำออกให้มากที่สุด นำเส้นใยที่ได้มาทำการสกัดดีเอ็นเอ( Yuko และ Tsutome ,1996)

3.2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ นำเส้นใยที่ได้จากข้อ 3.2.2.1 มาสกัดดีเอ็นเอ โดยชั่งเส้นใยให้มีน้ำหนัก 0.5 กรัม(น้ำหนักเปียก)จากนั้นนำเส้นใยใส่โกร่งที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วถูกแช่เย็นจนเย็นจัดทำการเทไนโตรเจนเหลวใส่ให้ท่วมเส้นใย บดให้ละเอียดอย่างรวดเร็วให้มีลักษณะคล้ายแป้ง ถ่ายลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม 3M Sodium acetate 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่แล้วเติมไอโซโพพานอล ลงในหลอดในปริมาตรที่เท่ากับสารละลายส่วนใสเพื่อเป็นการตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ต่อจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งจะเหลือดีเอ็นเออยู่ก้นหลอด ล้างดีเอ็นเอด้วยเอทธานอลร้อยละ 70 ที่เย็นจัดแล้วคว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูประมาณ 20 นาที ให้ดีเอ็นเอที่ได้แห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบหาปริมาณด้วยวิธีเจลอิเลคโทรโฟรีซีส (ภาคผนวก ค-1) (Luis และคณะ ,1997)

3.2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR นำดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณความเข้มข้นโดยในการทดลองจะใช้ความเข้มข้นที่ 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากข้อ 3.2.2.2 มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยดูดดีเอ็นเอมา 5 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร จากนั้นเติม 10X buffer 5ไมโครลิตร dNTPs 1 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 5ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 2.5 ไมโครลิตร และน้ำ DI 29 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตรต่อหลอด จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR ภายใต้สภาวะดังนี้คือ Intail Denature อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 นาที Annealing อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ทั้ง 3 สภาวะใช้จำนวน 30 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบนำผลผลิต PCR นี้ไปตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเลคโทรโฟรีซีสแต่เพิ่มปริมาณการโรสเจลเป็นร้อยละ 1.5 ถึง 2.0 (Yuko และ Tsutome , 1996)

3.2.2.4 การตัด PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ นำผลผลิต PCR ที่ทราบปริมาณความเข้มข้น(50-500 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)จากข้อ 3.2.2.3 มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะโดยดูดผลผลิต PCR จำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลาย 10X buffer 2.0 ไมโครลิตร ดูดเอนไซม์ตัดจำเพาะ 0.5 ไมโครลิตรและดูดน้ำ DI 12.5 ไมโครลิตร ปริมาตรสุดท้ายที่ได้เป็น 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสหรือตามสภาวะของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนั้น ๆ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง นำไปตรวจสอบผลของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซีส แต่เพิ่มปริมาณการโรสเจล เป็นร้อยละ1.5 ถึง 2.0

ในการทดลองครั้งนี้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะคือ *Hae*III *Hin*fI *Hind*III และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะผสมคือ *Hae*III กับ *Hind*III , *Hin*fI กับ *Hind*III และ *Hae*III กับ *Hin*fI ตามลำดับ

3.2.3 ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกรดโคจิกในอาหารแข็ง

3.2.3.1 การผลิตเอนไซม์อะไมเลส นำเชื้อราจากข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใช้ที่ตัดจุกก๊อกตัดปลายเส้นใย นำมาวางลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง Czapek ดัดแปลง(ภาคผนวก ก-4)โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือแป้งมันสำปะหลัง ทำการทดสอบตัวอย่างละ 5 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมาทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสด้วยการเทสารละลายไอโอดีน(ภาคผนวก ข-1)ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ท่วม สังเกตบริเวณส่วนใสที่เกิดขึ้น ถ้าเชื้อใดผลิตเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งก็จะเกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยโคโลนีและบริเวณส่วนใสที่ได้ หลังจากนั้นนำมาหาอัตราส่วนระหว่างส่วนใสต่อขนาดเส้นใยโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และนำเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังได้สูงสุดไปทดสอบหาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว

3.2.3.2 ทดสอบการผลิตกรดโคจิก นำเชื้อราจากข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใช้ที่ตัดจุกก๊อกตัดปลายเส้นใย นำมาวางลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง Glucose-peptone agar(ภาคผนวก ก-3) ทำการทดลองตัวอย่างละ 5 ซ้ำ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมาทดสอบการผลิตกรดโคจิกด้วยการเทสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์(ภาคผนวก ข-11)ลงในจานเพาะเลี้ยงให้ท่วม ถ้าเชื้อรามีการผลิตกรดโคจิกจะเกิดโซนสีแดงบริเวณรอบโคโลนี

3.2.4 การศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว

3.2.4.1 นำเชื้อราที่ให้สัดส่วนของโซนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่มากที่สุดจากข้อ 3.2.3.2 มาศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว Czapek ดัดแปลง โดยใช้ปริมาณของแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 2 5 และ 10(กรัมต่อปริมาตร) เตรียมกล้าสปอร์จากเชื้อราอายุ 3 วัน ที่เจริญบนอาหาร PDA ตรวจนับจำนวนสปอร์ที่ได้ด้วยแผ่นนับเม็ดเลือด เติมกล้าลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปรับสปอร์เริ่มต้นของแต่ละขวดให้ได้ประมาณ $10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน โดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 25 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 5 วัน ตัวอย่างที่เก็บนำไปแยกเอาเซลล์ออก นำส่วนใสที่ได้ไปหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสตามวิธีของ นวลพรรณ (2540)

3.2.5 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

นำเชื้อราที่ให้ผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกรดโคจิกได้สูงมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน ทำการตรวจดูลักษณะของสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์และทำการถ่ายภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

## 4.1 ผลการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของ *Aspergillus*

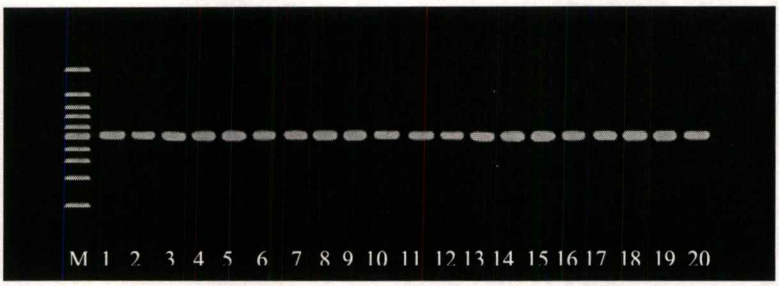
เชื้อราที่ใช้ในการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรม คือเชื้อราสกุล *Aspergilus* สปอร์สีเขียว จากลูกแป้งเหล้า 8 จังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 20 ไอโซเลต ดังตาราง 4-1 ดังนี้

ตารางที่ 4-1 เชื้อราที่คัดแยกได้จากลูกแป้งเหล้าทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

| รหัส | แหล่งที่มา |
|---|---|
| AJ1,AJ2 | อำนาจเจริญ |
| BR1,BR2,BR3 | บุรีรัมย์ |
| NP1,NP2,NP3 | นครพนม |
| RE1,RE2,RE3 | ร้อยเอ็ด |
| SR1,SR2 | สุรินทร์ |
| UB1,UB2 | อุบลราชธานี |
| UD1,UD2 | อุดรธานี |
| YT1,YT2,YT3 | ยโสธร |

จากเชื้อราสกุล *Aspergillus* สปอร์สีเขียว จำนวน 20 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้นำมาสกัดไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) ทำการเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (5´-TCCGTAGGTGAACC TGCGG-3´) และ ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) โดยเทคนิค PCR พบแถบของ PCR ปรากฏที่ตำแหน่ง 500 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องกับ Kumeda และ Asao (1996) ที่ทำการจำแนก *Aspergillus* sp. ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 จากนั้นนำมาศึกษาด้วยวิธีเจลอิเลคโทรโฟริซิส พบว่ายีนที่บริเวณดังกล่าวมีขนาด 500 คู่เบส นอกจากนี้ Kurtzman และคณะ (1986) พบว่าขนาดของ จีโนมของ *Aspergillus flavus* *Aspergillus parasiticus* และ *Aspergillus orzae*ใกล้เคียงกัน โดยที่ *Aspergillus flavus* และ*Aspergillus oryzae* มีตำแหน่งที่เหมือนกันเกือบร้อยละ 100 เลยทีเดียว (ภาพที่ 4-1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

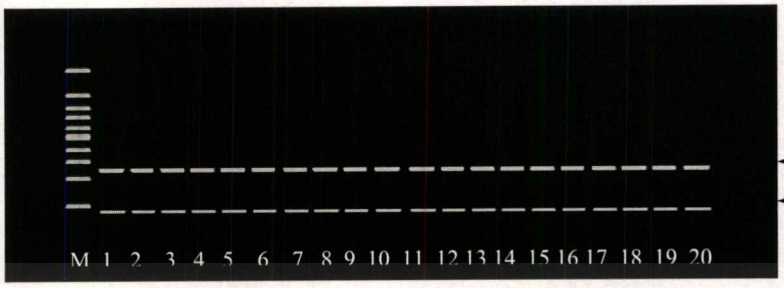



ภาพที่ 4-1 การเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR

| | | |
|---|---|---|
| 1 = สายพันธุ์ AJ1 | 8 = สายพันธุ์ NP3 | 15 = สายพันธุ์ UB2 |
| 2 = สายพันธุ์ AJ2 | 9 = สายพันธุ์ RE1 | 16 = สายพันธุ์ UD1 |
| 3 = สายพันธุ์ BR1 | 10 = สายพันธุ์ RE2 | 17 = สายพันธุ์ UD2 |
| 4= สายพันธุ์ BR2 | 11 = สายพันธุ์ RE3 | 18 = สายพันธุ์ YT1 |
| 5 = สายพันธุ์ BR3 | 12 = สายพันธุ์ SR1 | 19 = สายพันธุ์ YT2 |
| 6= สายพันธุ์ NP1 | 13 = สายพันธุ์ SR2 | 20 = สายพันธุ์ YT3 |
| 7 = สายพันธุ์ NP2 | 14 = สายพันธุ์ UB1 | M = Marker ขนาด 100 คู่เบส |

เมื่อนำเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลตมาศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RFLP โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Hin*dIII *Hae*III และ *Hin*fI ซึ่งใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทีละชนิด ได้ผลดังภาพ 4-2 ถึง 4-4 จากการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด พบว่าเอนไซม์ *Hin*dIII พบแถบปรากฏที่ตำแหน่ง 240 คู่เบส และ 76 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III พบแถบปรากฏ 2 แถบที่ตำแหน่ง 275 คู่เบส และที่ตำแหน่ง83 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *Hin*fI พบแถบปรากฏที่ตำแหน่ง 240 คู่เบส จากภาพเห็นเพียง 1 แถบอาจเป็นไปได้ว่าเกิดการซ้อนทับกันของแถบทั้งสองที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาก จนไม่สามารถแยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



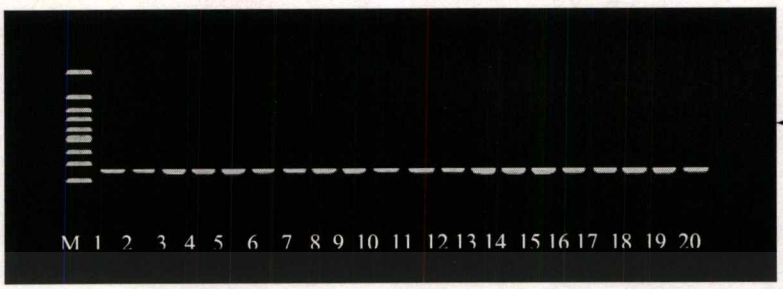

ภาพที่ 4-2 ผลการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Hae*III

| | | |
|---|---|---|
| 1 = สายพันธุ์ AJ1 | 8 = สายพันธุ์ NP3 | 15 = สายพันธุ์ UB2 |
| 2 = สายพันธุ์ AJ2 | 9 = สายพันธุ์ RE1 | 16 = สายพันธุ์ UD1 |
| 3 = สายพันธุ์ BR1 | 10 = สายพันธุ์ RE2 | 17 = สายพันธุ์ UD2 |
| 4= สายพันธุ์ BR2 | 11 = สายพันธุ์ RE3 | 18 = สายพันธุ์ YT1 |
| 5 = สายพันธุ์ BR3 | 12 = สายพันธุ์ SR1 | 19 = สายพันธุ์ YT2 |
| 6= สายพันธุ์ NP1 | 13 = สายพันธุ์ SR2 | 20 = สายพันธุ์ YT3 |
| 7 = สายพันธุ์ NP2 | 14 = สายพันธุ์ UB1 | M = Marker ขนาด 100 คู่เบส |

ภาพที่ 4-3 ผลการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII

| | | |
|---|---|---|
| 1 = สายพันธุ์ AJ1 | 8 = สายพันธุ์ NP3 | 15 = สายพันธุ์ UB2 |
| 2 = สายพันธุ์ AJ2 | 9 = สายพันธุ์ RE1 | 16 = สายพันธุ์ UD1 |
| 3 = สายพันธุ์ BR1 | 10 = สายพันธุ์ RE2 | 17 = สายพันธุ์ UD2 |
| 4= สายพันธุ์ BR2 | 11 = สายพันธุ์ RE3 | 18 = สายพันธุ์ YT1 |
| 5 = สายพันธุ์ BR3 | 12 = สายพันธุ์ SR1 | 19 = สายพันธุ์ YT2 |
| 6= สายพันธุ์ NP1 | 13 = สายพันธุ์ SR2 | 20 = สายพันธุ์ YT3 |
| 7 = สายพันธุ์ NP2 | 14 = สายพันธุ์ UB1 | M = Marker ขนาด 100 คู่เบส |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



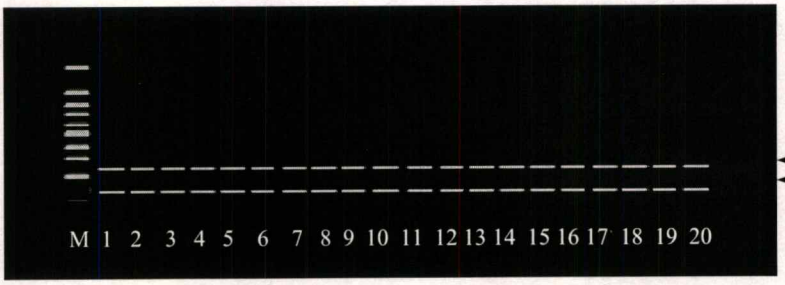

ภาพที่ 4-4 ผลการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Hin*fI

| | | |
|---|---|---|
| 1 = สายพันธุ์ AJ1 | 8 = สายพันธุ์ NP3 | 15 = สายพันธุ์ UB2 |
| 2 = สายพันธุ์ AJ2 | 9 = สายพันธุ์ RE1 | 16 = สายพันธุ์ UD1 |
| 3 = สายพันธุ์ BR1 | 10 = สายพันธุ์ RE2 | 17 = สายพันธุ์ UD2 |
| 4= สายพันธุ์ BR2 | 11 = สายพันธุ์ RE3 | 18 = สายพันธุ์ YT1 |
| 5 = สายพันธุ์ BR3 | 12 = สายพันธุ์ SR1 | 19 = สายพันธุ์ YT2 |
| 6= สายพันธุ์ NP1 | 13 = สายพันธุ์ SR2 | 20 = สายพันธุ์ YT3 |
| 7 = สายพันธุ์ NP2 | 14 = สายพันธุ์ UB1 | M = Marker ขนาด 100 คู่เบส |

ภาพที่ 4-5 ผลการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII กับ *Hae*III

| | | |
|---|---|---|
| 1 = สายพันธุ์ AJ1 | 8 = สายพันธุ์ NP3 | 15 = สายพันธุ์ UB2 |
| 2 = สายพันธุ์ AJ2 | 9 = สายพันธุ์ RE1 | 16 = สายพันธุ์ UD1 |
| 3 = สายพันธุ์ BR1 | 10 = สายพันธุ์ RE2 | 17 = สายพันธุ์ UD2 |
| 4= สายพันธุ์ BR2 | 11 = สายพันธุ์ RE3 | 18 = สายพันธุ์ YT1 |
| 5 = สายพันธุ์ BR3 | 12 = สายพันธุ์ SR1 | 19 = สายพันธุ์ YT2 |
| 6= สายพันธุ์ NP1 | 13 = สายพันธุ์ SR2 | 20 = สายพันธุ์ YT3 |
| 7 = สายพันธุ์ NP2 | 14 = สายพันธุ์ UB1 | M = Marker ขนาด 100 คู่เบส |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




ภาพที่ 4-6 ผลการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Hin*fI กับ *Hae*III

| | | |
|---|---|---|
| 1 = สายพันธุ์ AJ1 | 8 = สายพันธุ์ NP3 | 15 = สายพันธุ์ UB2 |
| 2 = สายพันธุ์ AJ2 | 9 = สายพันธุ์ RE1 | 16 = สายพันธุ์ UD1 |
| 3 = สายพันธุ์ BR1 | 10 = สายพันธุ์ RE2 | 17 = สายพันธุ์ UD2 |
| 4= สายพันธุ์ BR2 | 11 = สายพันธุ์ RE3 | 18 = สายพันธุ์ YT1 |
| 5 = สายพันธุ์ BR3 | 12 = สายพันธุ์ SR1 | 19 = สายพันธุ์ YT2 |
| 6= สายพันธุ์ NP1 | 13 = สายพันธุ์ SR2 | 20 = สายพันธุ์ YT3 |
| 7 = สายพันธุ์ NP2 | 14 = สายพันธุ์ UB1 | M = Marker ขนาด 100 คู่เบส |

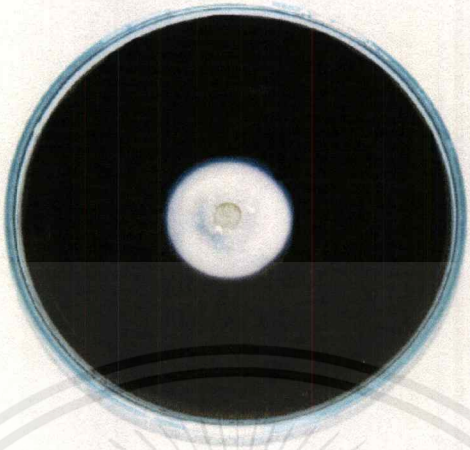
เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ผสม *Hin*dIII กับ *Hae*III พบแถบที่ปรากฏ 2 แถบคือที่ตำแหน่ง 240 คู่เบส และที่ตำแหน่ง 174 คู่เบส (ภาพที่ 4-5) ส่วนเอนไซม์ผสม *Hin*fI กับ *Hae*III และพบแถบ 2 แถบที่ตำแหน่ง 275 คู่เบสและที่ตำแหน่ง 132 คู่เบส (ภาพที่ 4-6) ซึ่งจากแถบที่ปรากฏดังกล่าวเมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วพบว่าไม่พบความแปรผันทางด้านพันธุ-กรรมในยีนบริเวน ITS ของลูกแป้งเหล้าทั้ง 20 ไอโซเลต ซึ่งสอดคล้องกับ Feibelman และคณะ (1998) ได้ศึกษาการจำแนกเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus flavus* ด้วยเทคนิค RFLP ที่ตำแหน่งยีน $\beta$-*tubulin* ยีน *nitrate reductase* ยีน *Taka-amylase A* และ ยีน *calmodulin A* พบว่า *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus flavus* มีความคล้ายคลึงกันมากกว่าร้อยละ 83 ร้อยละ 94 ร้อยละ 99 และร้อยละ 90 ที่ตำแหน่งยีนดังกล่าวตามลำดับ และเมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาเขียนแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างเชื้อทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีความคล้ายคลึงกันถึงร้อยละ 100 นอกจากนี้ Yuan และคณะ (1995) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus flavus* ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าเชื้อราทั้ง 2 ชนิด มีความสัมพันธ์กันถึงร้อยละ 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็ง

เมื่อนำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหาร Czapek ดัดแปลง และการผลิตกรดโคจิกในอาหาร glucose - peptone agar พบว่าเชื้อราจำนวน 20 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ นั่นคือสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ โดยพบว่าเกิดบริเวณโซนใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อราเมื่อทำการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน (ภาพที่ 4-7 และตารางที่ 4-2) และเชื้อรา *Aspergillus* รหัส BR1 BR2 BR3 NP1 NP2 NP3 RE1 RE2 RE3 UB1 UB2 UD1 และ UD 2 สามารถผลิตกรดโคจิกได้ โดยพบว่าเกิดบริเวณสีแดงรอบๆ โคโลนีของเชื้อเมื่อทำการทดสอบด้วยสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (ภาพที่ 4-8 และตารางที่ 4-2) ซึ่งสอดคล้องกับ การศึกษาของ Rosfarizan และ Ariff (2000) พบว่า เชื้อรา *Aspergillus flavus* สามารถผลิตกรดโคจิได้สูงสุด 39.90 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักในอาหารเหลวที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 100 กรัมต่อลิตร และมียีสต์สกัด (yeast extract) 5 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่า เชื้อรา *Aspergillus* รหัส RE3 UD1 และ RE1 มีการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยมีสัดส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเป็น 2.47 2.13 และ 2.04 เซนติเมตร ตามลำดับ หลังจากนั้นคัดเลือกเชื้อราที่มี การย่อยแป้งมันสำปะหลังได้สูงที่สุด คือ RE3 มาศึกษาในตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4-7 การย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อ *Aspergillus* sp. ในอาหาร Czapek ดัดแปลง

(ก) (ข)

ภาพที่ 4-8 การผลิตกรดโคจิกในอาหาร glucose-peptone agar
(ก) เชื้อ *Aspergillus* sp. ที่ไม่สามารถผลิตกรดโคจิกได้
(ข) เชื้อ *Aspergillus* sp. ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-2 ผลการย่อยแป้งมันสำปะหลังและการผลิตกรดโคจิก

| รหัส | ผลการย่อยแป้งมันสำปะหลัง | | | การผลิตกรดโคจิก |
|---|---|---|---|---|
| | เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (เซนติเมตร) | เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) | สัดส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) | |
| AJ1 | 4.20 | 3.50 | 0.70 | - |
| AJ2 | 3.20 | 3.18 | 0.96 | - |
| BR1 | 4.51 | 4.42 | 0.09 | + |
| BR2 | 3.34 | 3.29 | 0.05 | + |
| BR | 3.9 | 3.86 | 0.04 | + |
| NP1 | 5.67 | 4.30 | 1.36 | + |
| NP2 | 5.82 | 4.62 | 1.20 | + |
| NP3 | 4.87 | 3.85 | 1.02 | + |
| RE1 | 3.46 | 1.42 | 2.04 | + |
| RE2 | 5.01 | 4.48 | 0.53 | + |
| **RE3** | **3.55** | **1.08** | **2.47** | + |
| SR1 | 4.07 | 3.02 | 1.05 | - |
| SR2 | 4.38 | 2.84 | 1.53 | - |
| UB1 | 4.33 | 3.43 | 0.90 | + |
| UB2 | 4.03 | 3.18 | 0.85 | + |
| UD1 | 2.95 | 0.83 | 2.13 | + |
| UD2 | 4.02 | 3.96 | 0.06 | + |
| YT1 | 4.13 | 3.13 | 0.99 | - |
| YT2 | 4.56 | 3.51 | 1.05 | - |
| YT3 | 4.48 | 3.31 | 1.08 | - |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการย่อยแป้งมันสำปะหลัง และการผลิตกรดโคจิกทำให้สามารถแยกเชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส และสามารถผลิตกรดโคจิกได้ คือ BR1 BR2 BR3 NP1 NP2 NP3 RE1 RE2 RE3 UB1 UB2 UD1 และ UD2 และกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้เพียงอย่างเดียว คือ AJ1 AJ2 SR1 SR2 YT1 YT2 และ YT3 ดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 การจำแนกเชื้อ *Aspergillus* sp. จากการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการผลิตกรดโคจิก

| รหัสเชื้อ | การผลิตเอนไซม์อะไมเลส | การผลิตกรดโคจิก |
|---|---|---|
| BR1 BR2 BR3 NP1 NP2 NP3 RE1 RE2 RE3 UB1 UB2 UD1 UD2 | + | + |
| AJ1 AJ2 SR1 SR2 YT1 YT2 YT3 | + | - |

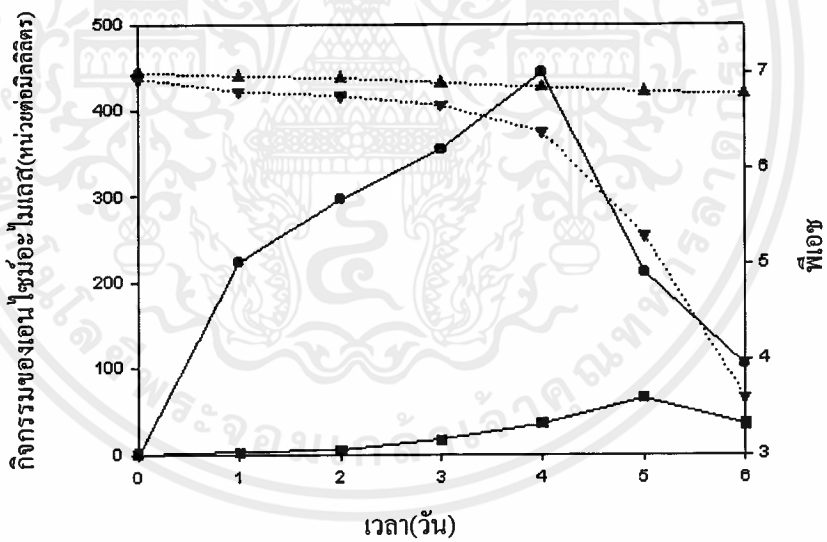
## 4.3 ผลการศึกษาการหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ในอาหารเหลว

เมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* รหัส RE3 ที่มีผลการย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีที่สุดจากข้อ 4.2 มาทำการเลี้ยงในอาหาร Czapek ดัดแปลง ที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ ร้อยละ 2 5 และ 10 ตามลำดับ ผลการศึกษาแป้งมันสำปะหลังที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส แสดงในภาพที่ 4-9 ถึง 4-11 จากผลการศึกษาพบว่า เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุกร้อยละ 10 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 1203 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเชื้อ แต่เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบให้กิจกรรมเอนไซม์เพียง 51.3 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันที่ 6 (ภาพที่ 4-11) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังสุกร้อยละ 5 ให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 748 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 52.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร(ภาพที่ 4-10) เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุกในอาหารเหลวสุกร้อยละ 2 จะให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสต่ำที่สุด คือ 444 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และ 65 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 4-9) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้แป้งมันสำปะหลังสุกร้อยละ 2 5 และ 10 จะคล้ายกันคือ ในช่วง 4 วัน แรกของการหมัก พีเอชจะอยู่ระหว่าง 6.8-6.3 หลังจากนั้นพีเอชลดต่ำลงถึง 4.00 ในวันสุดท้ายของการหมัก การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเหลวที่ใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ จะมีค่าอยู่ระหว่าง 6.9-6.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-4 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและพีเอชที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2

| วันที่ | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | | พีเอช | |
|---|---|---|---|---|
| | แป้งมันสำปะหลังสุก | แป้งมันสำปะหลังดิบ | แป้งมันสำปะหลังสุก | แป้งมันสำปะหลังดิบ |
| 0 | 0.00 | 0.00 | 7.00 | 7.00 |
| 1 | 223.20 | 2.30 | 6.88 | 6.96 |
| 2 | 296.00 | 4.00 | 6.84 | 6.94 |
| 3 | 354.00 | 16.20 | 6.75 | 6.89 |
| 4 | 444.00 | 35.40 | 6.50 | 6.84 |
| 5 | 211.00 | 65.00 | 5.54 | 6.80 |
| 6 | 105.00 | 34.90 | 4.02 | 6.77 |




ภาพที่ 4-9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและพีเอช ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2

● คือ กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในแป้งมันสำปะหลังสุก

■ คือ กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในแป้งมันสำปะหลังดิบ

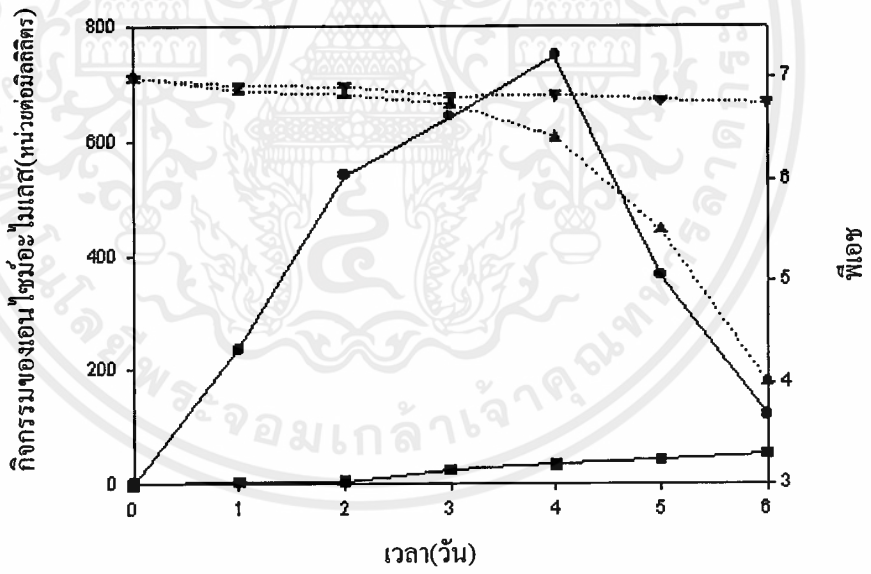
▼ คือ พีเอชของน้ำหมักในแป้งมันสำปะหลังสุก

▲ คือ พีเอชของน้ำหมักในแป้งมันสำปะหลังดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-5 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและพีเอชที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 5

| วันที่ | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | | พีเอช | |
|---|---|---|---|---|
| | แป้งมันสำปะหลังสุก | แป้งมันสำปะหลังดิบ | แป้งมันสำปะหลังสุก | แป้งมันสำปะหลังดิบ |
| 0 | 0 | 0 | 7.00 | 7.00 |
| 1 | 237 | 3.7 | 6.87 | 6.92 |
| 2 | 541 | 4.7 | 6.83 | 6.91 |
| 3 | 643 | 24.9 | 6.74 | 6.81 |
| 4 | 748 | 34.8 | 6.41 | 6.83 |
| 5 | 364 | 42.5 | 5.50 | 6.78 |
| 6 | 120 | 52.9 | 4.00 | 6.75 |




ภาพที่ 4-10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและพีเอชในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 5

● คือ กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในแป้งมันสำปะหลังสุก

■ คือ กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในแป้งมันสำปะหลังดิบ

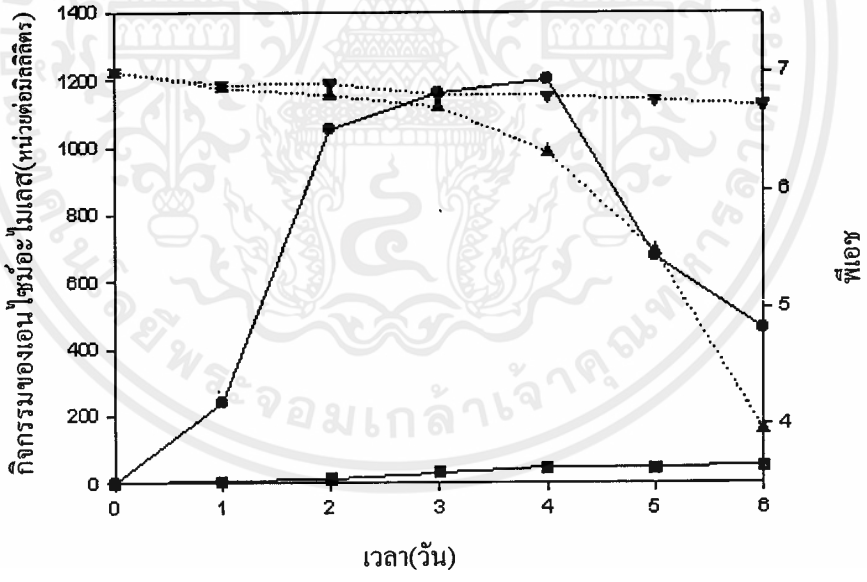
▼ คือ พีเอชของน้ำหมักในแป้งมันสำปะหลังสุก

▲ คือ พีเอชของน้ำหมักในแป้งมันสำปะหลังดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-6 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและพีเอชที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 10

| วันที่ | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | | พีเอช | |
|---|---|---|---|---|
| | แป้งมันสำปะหลังสุก | แป้งมันสำปะหลังดิบ | แป้งมันสำปะหลังสุก | แป้งมันสำปะหลังดิบ |
| 0 | 0 | 0 | 7.00 | 7.00 |
| 1 | 240.8 | 5.0 | 6.86 | 6.89 |
| 2 | 1053.3 | 13.4 | 6.80 | 6.90 |
| 3 | 1163.8 | 32.5 | 6.70 | 6.80 |
| 4 | 1203 | 46.1 | 6.32 | 6.80 |
| 5 | 677 | 46.6 | 5.48 | 6.76 |
| 6 | 460 | 51.3 | 3.95 | 6.72 |




ภาพที่ 4-11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและพีเอชในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 10

● คือ กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในแป้งมันสำปะหลังสุก

■ คือ กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในแป้งมันสำปะหลังดิบ

▼ คือ พีเอชของน้ำหมักในแป้งมันสำปะหลังสุก

▲ คือ พีเอชของน้ำหมักในแป้งมันสำปะหลังดิบ

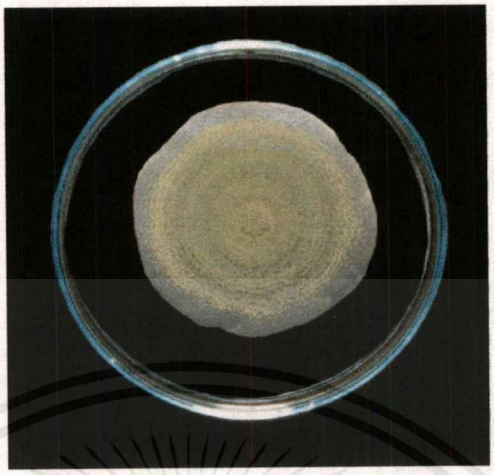
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาพบว่าปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 10ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด โดยพบว่า *Aspergillus oryzae* ผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อมีคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมเป็นตัวชักนำให้ผลิตเอนไซม์ สำหรับสารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเอนไซม์อะไมเลส คือ มอลโตส และ แป้ง (Tada และคณะ ,1991) ผลการทดลองดังกล่าวต่างจากการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Aspergillus* TISTR 3068 พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 1,665 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน (ปราบสยม และคณะ ,2543)

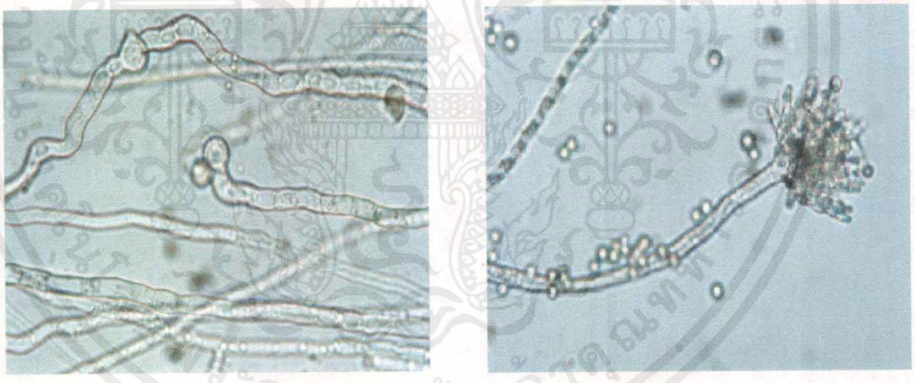
**4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ**

เมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* spp. มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็งมีโคโลนีสีเขียว เส้นใยแผ่กระจายเป็นวงกลม (ภาพที่ 4-12) และเมื่อนำมาส่องดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ปรากฏผลดังภาพที่ 4-13 คือก้านชูสปอร์ไม่มีสี เส้นใยมีผนังกั้น สปอร์มีลักษณะค่อนข้างกลม ซึ่งสอดคล้องกับ Feibelman และคณะ (1998) พบว่าโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร Czapek มีสีเขียวมะกอก www.doctorfungus.org (2003) กล่าวว่า *Aspergillus flavus* สปอร์มีสีเขียว-เหลือง ก้านชูสปอร์ (conidiophore) ไม่มีสี เส้นใยมีผนังกั้น vesicle กลมเป็นรัศมีแผ่ออกจากศูนย์กลาง http:\\www.cbs.knaw.nl.htm (2003) กล่าวว่าก้านชู สปอร์มีความยาวประมาณ 450-1000 ไมโครเมตร ไม่มีสี vesicle มีความกว้างประมาณ 30-35 ไมโครเมตร ไม่มีสีรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลมคล้ายลูกแพร์ (pyriform) โคนิเดียมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.8-5 ไมโครเมตร รูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม ผิวไม่เรียบจะสังเกตเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4-12 ลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็ง



ภาพที่ 4-13 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Aspergillus* sp. ที่คัดแยกได้จากลูกแป้งเหล้า จำนวน 20 ไอโซเลต ไม่พบความแปรผันทางพันธุกรรมเมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค RFLP และเมื่อนำมาศึกษาถึงผลการย่อยแป้งมันสำปะหลัง พบว่าเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ และสามารถผลิตกรดโคจิกได้ 13 ไอโซเลต ทำให้เราสามารถจำแนกเชื้อราได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส (ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน) และสามารถผลิตกรดโคจิกได้ และกลุ่มที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส แต่ไม่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ เชื้อรา RE3 มีการย่อยแป้งมันสำปะหลังในอาหารแข็ง โดยมีสัดส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 2.47 เซนติเมตร จากการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลวพบว่าสูตรที่เหมาะสมประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังสุก 100 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) 3 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอตเฟต ($K_2HPO_4$) 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_47H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.5 กรัมต่อลิตร เฟอร์ริกซัลเฟต ($FeSO_4$) 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 โดยผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1203 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบเป็นแหล่งคาร์บอน (52.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ประมาณ 22.6 เท่า

**ข้อเสนอแนะ**

1. ในการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมในครั้งนี้ได้มีการศึกษายีนบริเวณ ITS เพียงตำแหน่งเดียว ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปอาจทำการเปลี่ยนบริเวณในการศึกษาหรือเพิ่มบริเวณศึกษาให้มากขึ้น

2. เพื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. ที่คัดเลือกได้มาปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อนำมาผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2536. **พันธุวิศวกรรม**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ:หน้า 4-1 ถึง 4-26

นภา โล่ห์ทอง. 2534. **กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต**. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ:หน้า 5-34

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. **ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา**. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ: หน้า 11-16

ดุษฎี ธนะบริพัฒน์. 2537. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ: หน้า 6-1

ปราบสยม ภูมิพาณิชย์ สุพีร์ สาณะเสน และอนุวัฒน์ วัดวงศ์. 2543. **การผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* ISTR 3068**. โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. **จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, . กรุงเทพฯ: หน้า 32-41

สุรินทร์ ปียะโชคคณากุล. 2539. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ: หน้า 49-59

อรวรรณ นวีภาพ. 2531. **เชื้อราก่อให้เกิดโรคในสัตว์**. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ: หน้า 1-33

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M. 1996. **Introductory Mycology**.Jonn Wiley&Sons,Inc, U.S.A. :71-74

Carlsen, M., Nielsen J. and Villadsen J. 1996. Growth and α-amylase production by *Aspergillus oryzae* during continuous cultivation. **Journal of Biotechnology**. 45: 81-93

Feibelman, P. T., Cotty, J. P., Doster, M.A. and Michailides, T.J. 1998. Amorphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*. **Mycologia**. 90 (40) : 618-623

Fields, M.L. 1978. **Fundamentals of food microbiology**. AVI Publishing com,Inc. Westport, U.S.A. : 1-15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hiram, P., Heldt-Hansen, H.P. and Diderchsen, B. 1992. Mini-review-on the safety of *Aspergillus oryzae.* **Applied Microbiology and Biotecnology**. 36 : 569-572

Kurtzman, C.P., Smiley, M.J., Robnett, C.J. and Wicklow, D.T. 1986. DNA Relatedness among wild and Domesticated species in the *Aspergillus flavus* Group. **Mycologia**.78 (6) : 955-959

Luis, A., Urmanm, U., Minol, Wirsel, S. and Ruttkowski, E., 1997. Regulation of α-amylase formation in *Aspergillus oryae* and *Aspergillus nidulans* transformation **. Current Microbiology.** 26 : 47-51

Rosfarizan, M. and Ariff, A.B. 2000. Fermentation kinetics of kojic acid by *Aspergillus flavus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 25: 20-24

Smith, F.W. 1997. Starch hydrolysis products; an introduction and history, pp.1-22 In : (Schenck FW and Hebeda RE :eds.), **Starch hydrolysis products**; Worldwide technology, production, and application, VCH Publishers, New York. : 1-22

Tada,S., Gomi, K., Kitamoto, K., Takahashi, K., Tamura, G. and Hara, S. 1991. Construction of a fusion gene comprising the Taka- amlase Apromoter and the *Escherichia coli* β-glucuronidase gene and analysis of its expression in *Aspergillus oryzae*. **Molecular Genetic**. 229 : 301-306

Yuan,G., Liu, C. and Chen, C. 1995. Differentiation of *Aspergillus parasiticus from* Aspergillus sojae by random Amplification of Polymorphic DNA. **Applied and Environmental Microbiology** . 2384-2387

Yuko, K. and Tsutomu, A.1996. Single-strand Confomation Polymophism Analysis of PCR-Amplifled Ribosomal DNA Intrenal Transcribed spacer to Diffeeentiale Specles of *Aspergillus* Section *flavi*. **Applied and Environmental Microbiology**. 162 (8) : 2947-2957

http://afmb.cnrs-mrs.fr

http://www.biology.lsu.edu

http://www.botany.hawii.edu

http://www.doctorfungus.org

http://www.epicentre.com

http://www.neb.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก
# การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร PDA ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| Potato | 200 | กรัม |
| Dextrose | 20 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |

หั่นมันฝรั่งเป็นก้อนขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร หนัก 200 กรัม ต้มให้เดือดจนก้อนมันฝรั่งเริ่มนิ่ม กรองเอาแต่น้ำแล้วเติมน้ำตาล Dextrose วุ้น และน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที

2. สูตรอาหาร GYEP(Glucose yeast extract peptone) ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| glucose | 20 | กรัม |
| yeast extract | 3 | กรัม |
| peptone | 10 | กรัม |
| น้ำ | 1 | ลิตร |

ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที (Bernier และคณะ 1990)

3. สูตรอาหาร Glucose – peptone Agar

| | | |
|---|---|---|
| glucose | 100 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 2 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 1 | กรัม |
| Peptone | 0.5 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |

ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 3.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื่อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สูตรอาหาร Czapek ดัดแปลง

| | | |
|---|---|---|
| $NaNO_3$ | 3 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | 1 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.5 | กรัม |
| KCl | 0.5 | กรัม |
| $FeSO_4$ | 0.1 | กรัม |
| แป้งมันสำปะหลัง | 20 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |

ละลายให้เข้ากันแล้วปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข
## สารเคมี

1. สารละลายไอโอดีน

ละลาย โปรแตสเซียมไอโอไดด์(KI) 0.6 กรัม และ ไอโอดีน(I) 0.6 กรัม ในน้ำกลั่น 182 มิลลิลิตร

2. 0.5 M EDTA

ละลาย disodium ethylene diamine tetra-acetate ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer เพื่อช่วยในการละลาย ปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH เข้มข้น(ชนิดเม็ด) และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอด์นต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. 0.5 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS 0.5 กรัมในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.2 ด้วย 1 N HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

3. 1.0% Ethidium bromide

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กวนจนกว่าจะละลาย เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

4. 1 N HCl

เติม HCl เข้มข้น (conc buffer) 86.2 มิลลิลิตรลงในขวดน้ำกลั่น 913.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. 1 M Tris-HCl

ละลาย Tris-base 121.1 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วย 1 M HCl ในปริมาตรดังนี้

| pH | 7.4 | 7.6 | 8.0 |
|---|---|---|---|
| HCl (มิลลิลิตร) | 7.0 | 6.0 | 4.2 |

ขณะที่ปรับพีเอชควรให้อุณหภูมิของสารละลายเท่ากันกับอุณหภูมิห้อง เนื่องจากพีเอชของ Tris-HCl จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส พีเอชของสารละลายจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลดลง 0.03 หน่วย ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอด์นต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. tracking dye

นำ 1 M Tris- HCl พีเอช 7.6 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 0.5 M EDTA พีเอช 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผง bromophenol blue 0.5 กรัม และซูโคส 40 กรัม มาผสมในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer ช่วยในการละลาย แล้วทำการปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

7. Tris-borate-EDTA (TBE buffer)

ละลาย Tris-base 54 กรัม boricacid 27.5 กรัม และ 0.5 M EDTA (พีเอช 8.0) 20 มิลลิลิตร แล้วปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

8. TE-EDTA buffer (TE buffer)

นำ 1 M Tris- HCl พีเอช 8.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับ 0.5 M EDTA พีเอช 8.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100มิลลิลิตร

9. Extraction buffer

นำ 1 M Tric-HCl พีเอช 8.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับ 1 mM EDTA แล้วปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

10. 3 M Sodium acetate

ละลาย $CH_3COONa.3H_2O$ 408.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.2 ด้วย glacial acetic acid ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอด์นต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. เฟอร์ริกคลอไรด์

ชั่ง $FeCl_3.6H_2O$ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค
# วิธีการวิเคราะห์

1. การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโทรโฟเรซีส

เตรียมถาดที่ใช้สำหรับเทเจลและเสียบหวีให้เรียบร้อยทำการชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม เติมทีบีอี บัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตรแล้วละลายอะกาโรสเจลจนละลายหมด ตั้งทิ้งไว้จนอุ่นจนพอจะสัมผัสได้ เทลงในถาดที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว ค่อย ๆดึงหวีออก นำเจลไปใส่ในเครื่องอิเลคโทรโฟรีซีส เททีบีอีบัฟเฟอร์ ให้ท่วมเจล ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หยอดลงในช่องเจล ให้ช่องที่ 1 เป็นช่องที่หยด marker ต่อกระแสไฟฟ้าเข้าเครื่องอิเล็กโทรโพเรซีส ใช้กระแสไฟฟ้า 60โวลล์ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ปิดเครื่อง นำเจลมาย้อมด้วยด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตถ่ายภาพทำการบันทึกแถบโพลิมอฟิซึม

2. การวิเคราะห์ข้อมูลของ RFLP

พิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (evoluation relatness) จากสูตร

$$Sxy = 2nxy/(nx + ny)$$

เมื่อ

Nxy คือ จำนวนแถบที่พบในอิเลคโทรโฟรีติคไทป์ทั้งคู่

Nx และ ny คือ จำนวนแถบที่พบในอิเลคโทรโฟรีติคไทป์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งศึกษา

ความแตกต่างของ FRLPs ที่เกิดขึ้นด้วย UPGMA (Nei และ Li , 1979)

3. การหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

ใส่สารละลายเอนไซม์อะไมเลส(ที่มีความเจือจางเหมาะสม) 1.0 มิลลิลิตร และเติมน้ำแป้งร้อยละ 1 ที่อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที นำไปบ่มในอ่างน้ำอุ่นที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีนำสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีนำไปวัดค่า OD (optical density) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน ทำหลอดควบคุม(control)โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำหมักทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรทำการวิเคราะห์ตามวิธีข้างต้น เขียนกราฟระหว่างค่า OD และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

$$\text{กิจกรรมของอะไมเลส} = \frac{\text{OD} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{สโลปของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลา}}$$

= หน่วย (unit) ต่อ มิลลิลิตร

1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 1 ให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้