สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การชักนำการกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อรา เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

นางสาวชนัญญา ทิพย์มงคลศิลป์
นายนัฐวัฒน์ ชินะโยธิน
นายอภิวัฒน์ ถึกคุ้ม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

ปฟ.
ช1ล5ก
2545

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 47320
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2546

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b11308060

Induction of Mutation and Selection Mutants of *Aspergillus sp.* for Enchancing Xylanase Enzyme.

Miss Chananya Tipmongkolsilpa

Mr. Nuttawat Chinayotin

Mr. Apiwat Tuakkum

A Special Project Submitted in Fulfilment of the Requirement

for the degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology, Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การชักนำการกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *Aspergillus sp.* เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

โดย นางสาว ชนัญญา ทิพย์มงคลศิลป์ รหัส 42050148

นาย นัฐวัฒน์ ชินะโยธิน รหัส 42050164

นาย อภิวัฒน์ ถึกคุ้ม รหัส 42050216

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ——

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษแบบนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต กรรมการ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ กรรมการ รศ. [illegible]มาลินี ตันติยาภรณ์	

.....
รองศาสตราจารย์นวลพรรณ ณ ระนอง
(.....)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบข่ายของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	47
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	49
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	55
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงความสามารถในการหมักของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆโดยเกิดผ่าน xylanolytic enzyme system	9
ตารางที่ 2	สมบัติของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ	13
ตารางที่ 3	แสดงตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	16
ตารางที่ 4	แสดงอิทธิพลของตัวลดแรงตรึงผิว และกรดไขมันที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส	35
ตารางที่ 5	แสดงสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆเพื่อสร้างไซลาเนส	37
ตารางที่ 6	การแปรสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมโดยกรรมวิธีต่างๆ	44
ตารางที่ 7	แสดงจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus sp.* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆในระดับความเจือจาง 10^{-2}	49
ตารางที่ 8	ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่ทำการกลายพันธุ์ และเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน	52
ตารางภาคผนวกที่ 1	การคำนวณทางสถิติของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์กลายต่างๆกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ระดับความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซ็นต์	65
ตารางภาคผนวกที่ 2	การคำนวณทางสถิติของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์กลายต่าง ๆ กับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ระดับความน่าเชื่อถือ 99 เปอร์เซ็นต์	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงโครงสร้างของไซแลน	4
รูปที่ 2	แสดงลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน	4
รูปที่ 3	แสดงลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง	5
รูปที่ 4	แสดงโครงสร้างของไซแลนที่ได้จากพืช และแสดงบริเวณที่เข้าจับของเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมใน xylanolytic enzyme system	7
รูปที่ 5	แสดงลักษณะการย่อยสลายไซแลนโดย *Cryptococcus albidus*	8
รูปที่ 6	แสดงโครงสร้างของพืชที่มีส่วนประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน	10
รูปที่ 7	Birchwood ที่นำมาใช้ในการผลิตไซแลน	11
รูปที่ 8	แสดงขั้นตอนโดยรวมของการเกิดมิวเตชั่น	23
รูปที่ 9	แสดงการเกิดไทมีนไดเมอร์	29
รูปที่ 10	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus sp.* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การชักนำการกลายพันธุ์ และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *Aspergillus sp.* เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

โดย นางสาว ชนัญญา ทิพย์มงคลศิลป์ รหัส 42050148

นาย นัฐวัฒน์ ชินะโยธิน รหัส 42050164

นาย อภิวัฒน์ ถึกคุ้ม รหัส 42050216

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ——

ปีการศึกษา 2545

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเกี่ยวกับการชักนำการกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *Aspergillus sp.* เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยวิธีการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้สปอร์ของเชื้อ *Aspergillus sp.* เริ่มต้นประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าที่เวลา 12 นาที มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำสปอร์ที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการเลี้ยงด้วยอาหาร minimal medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลาย จะได้เชื้อสายพันธุ์กลายเป็นจำนวน 36 สายพันธุ์ และเมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากวงใสในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสายพันธุ์กลาย 10 และสายพันธุ์กลาย 3 ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของโคโลนีต่อขนาดของวงใสรอบโคโลนีเท่ากับ 4.5 และ 2.8 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์แท้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Induction of Mutation and Selection Mutants of *Aspergillus sp.* for Enchancing Xylanase Enzyme.		
Names of Students	Miss Chananya	Tipmongkolsilpa	42050148
	Mr. Nuttawat	Chinayotin	42050164
	Mr. Apiwat	Tuakkum	42050216
Special Project Advisor	Assist. Prof. Aree	Littiboon	
Special Project Co-Advisor	—		
Department	Applied Biology		
Academic	2002		

Abstract

From the studies of mutation induction and selection mutants of *Aspergillus sp.* for enchancing xylanase production by UV induction at 254 nm. and using the initial spore suspension is 10^6 spores per ml. Showed that the spores gave 10 % survival when exposed to UV for 12 minutes. When the 10 % survival spores were grown into minimal medium and cultivated at 30 $^{\circ}$C for 24 hours, 36 mutants were obtained. And when xylanase activity was studied by measuring the clear zones produced in media containing xylan as carbon source, mutants numbers 10 and 3 were found the most two effective strains.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จึงทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยการสนับสนุนและการช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีอุปการะคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และกรรมการโครงงานพิเศษ ที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัย ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองและอำนวยความสะดวกในระหว่างการทดลอง ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต และรศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ ที่เป็นประธานกรรมการและกรรมการโครงงานพิเศษ ที่ช่วยให้คำปรึกษาและข้อมูล และช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้การเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทดลอง และช่วยอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ ทำให้โครงงานพิเศษสามารถสำเร็จได้

สุดท้ายนี้ต้องขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และญาติ ๆ ทุกท่าน เพื่อน ๆ ทั้งหลาย และผู้มีส่วนร่วมในโครงงานพิเศษทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนและเป็นส่วนหนึ่งในความสำเร็จนี้

นางสาวชนัญญา ทิพย์มงคลศิลป์
นายนัฐวัฒน์ ชินะโยธิน
นายอภิวัฒน์ ถึกคุ้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

การนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยการนำเอาส่วนที่เหลือจากผลิตผลทางการเกษตรมาประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้สูงขึ้น โดยจะต้องมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำเนื่องจากมีผลทำให้คุณภาพของเยื่อกระดาษต่ำลงเมื่อเทียบกับเอนไซม์ไซลาเนส โดยเอนไซม์ไซลาเนสจะมีผลในการเคลื่อนย้ายส่วนของลิกนินที่ทำหน้าที่ผลิตเม็ดสีซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ต้องการในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษให้หลุดออกมา

ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจากเอนไซม์เซลลูเลสสามารถทำได้โดยการทำการกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในปริมาณสูงขึ้นเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ตามความต้องการ

ในงานวิจัยนี้จึงทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากสภาพธรรมชาติ นำมาทำการกลายพันธุ์โดยการใช้แสงอัลตราไวโอเลต และทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูง และมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1.) หาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus sp.* ในขณะทำการกลายพันธุ์ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

2.) ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้นได้

1.3 ขอบข่ายของโครงงานพิเศษ

1.) ทำการฉายแสงสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus sp.* และหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ

2.) ทำการกลายพันธุ์เชื้อและคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยคัดเลือกจากขนาดของวงใสรอบโคโลนีในอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.) เพื่อให้ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้อย่างมีศักยภาพ

2.) เพื่อนำสายพันธุ์กลายไปใช้ในการผลิตในระดับที่สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

เซลล์พืชเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีมากในธรรมชาติ ประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และ ลิกนิน (lignin) เซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ บีตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glucosidic) ที่เป็นสายโซ่ตรง (linear polymer) มีสูตรทั่วไปคือ (CHO) พบในปริมาณ 30-50% ของน้ำหนักแห้ง เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส และน้ำตาลเฮกโซส ได้แก่ กลูแคน (glucan) แมนแนน (mannan) และไซแลน (xylan) โดยที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลิฟีโนลิก (polyphenolic) เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ มักหุ้มชั้นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเอาไว้ (Wong and Saddler และคณะ.,1988)

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในเซลล์พืช โดยยึดเกาะกับพอลิแซคคาไรด์ชนิดอื่นด้วยพันธะนัน-โควาเลนท์ (non covalent) และยึดเกาะด้วยพันธะไฮโดรเจนกับส่วนของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส พบตามธรรมชาติทั้งในไม้เนื้ออ่อนไม้เนื้อแข็ง พืชล้มลุกในผนังเซลล์ชั้นแรกของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวมทั้งในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว ซังข้าวโพด เปลือกเมล็ดทานตะวัน และในเปลือกเมล็ดธัญพืช ต่างๆเป็นต้น นอกจากนั้นยังสามารถพบได้ในวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการลอกเนื้อไม้เพื่อทำเยื่อกระดาษ(pulping) (Biely,1985) ปริมาณและโครงสร้างจะแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มา เช่น ในไม้เนื้อแข็งพบว่ามีปริมาณไซแลนมากกว่า 30% ของน้ำหนักแห้ง ในไม้เนื้ออ่อนจะมีไซแลนประมาณ 8% ของน้ำหนักแห้ง ในไม้ล้มลุกและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจะมีไซแลนเหลืออยู่ประมาณ 20-40%ของน้ำหนักแห้ง (Wong and Saddler และคณะ.,1988)

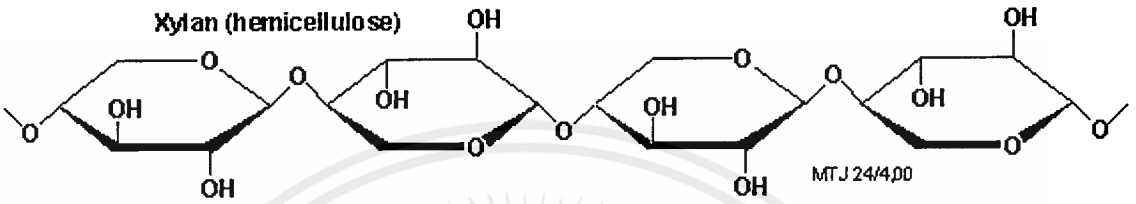
1. ไซแลน

1.1. โครงสร้างและลักษณะของไซแลน

ไซแลนเป็นพอลิแซคคาไรด์ของน้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) ที่เป็นส่วนประกอบทั้งในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลสิดิก (β-1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก (backbone) และมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่น หรือ โอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆมาเชื่อมเป็นสายโซ่กิ่ง ยกเว้นไซแลนในพืชบางชนิด เช่น หญ้าเอสปาโต (esparto gress) หรือลำต้นใบยาสูบ

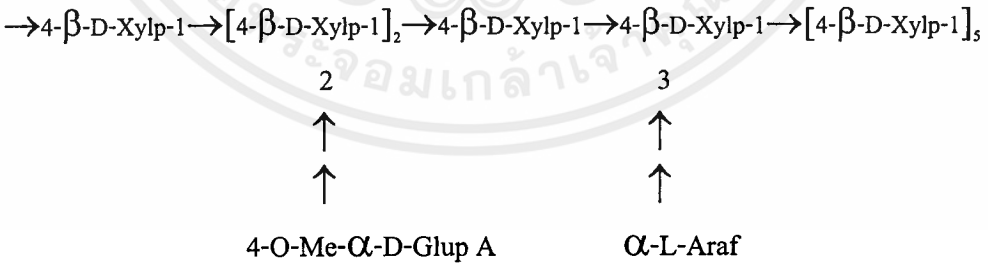
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(tobacco stalk) จะมีโครงสร้างเป็นไซแลนชนิดที่ไม่มีสายโซ่กิ่ง ซึ่งสายโซ่กิ่งของไซแลนอาจประกอบด้วย หมู่อะราบิโนซิล (arabinosyl) กลูคูโรนิล (glucuronyl) หรือ อะซิทิล (acetyl) โครงสร้างของไซแลนแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างของไซแลน
ที่มา : www.biosite.dk/ (2000)

ไซแลนที่พบในส่วนเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้ออ่อนส่วนใหญ่จะเป็นอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (rabinoglucuronoxylan) ซึ่งมีสายหลักเป็นบีตา-1,4-ดี-ไซโลไพราโนซิล (β-1,4-D-xylopyranosyl) ที่มี 4-โอ-เมทธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด (4-O-methyl-α-D-glucuronic acid) เชื่อมต่อที่ O ตำแหน่ง 2 และ มีแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนส (α-L-arabinofuranose) เชื่อมต่อที่ O ตำแหน่ง 3 ดังแสดงในรูปที่ 2 จำนวนหน่วยไซโลสที่มาเชื่อมต่อกัน(degree of polymerization) อยู่ในช่วง 70-130 หน่วย

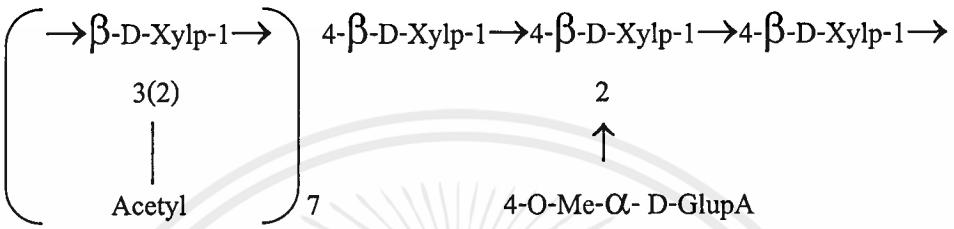


รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน
ที่มา : Biely (1985)

ไซแลนที่พบในส่วนเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้อแข็งส่วนใหญ่มักเป็นกลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan)มีสายหลักที่ประกอบด้วย บีตา-ดี-ไซโลไพราโนส (β-D-xylopyrenose) เชื่อมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลซิดิกและมีหมู่อะเซติล (acetyl) เป็นสายโซ่กิ่งทุกๆ 7-10 หน่วย ของสายหลักที่ตำแหน่ง โอ-2 หรือ โอ-3 ส่วน โอ-4-เมทธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด (4-O-methyl-α-D-glucuronic) เชื่อมต่อด้วยพันธะบีตา-1,2 ประมาณทุกๆ 10 หน่วยของไซแลน ดังแสดงในรูปที่ 3 จำนวนหน่วยที่มาต่อกันอยู่ในช่วง 150-200 หน่วย



รูปที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง
ที่มา : Biely (1985)

เนื่องจากองค์ประกอบหลักของไซแลนคือน้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) เป็นสารให้รสหวาน สามารถเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า wood sugar ที่มีสูตรเคมี CHO มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 150.13 มักไม่ค่อยพบในรูป monomer มีจุดหลอมเหลว 144-145 องศาเซลเซียส น้ำตาลชนิดนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายประการ เช่น ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว ผลิตเชื้อเพลิง เช่น เอธานอล บิวธานอล ผลิตไซลิทอล เป็นต้น (Biely,1985)

1.2. การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถย่อยสลายโดยการใช้สารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน

1. การย่อยสลายไซแลนด้วยสารเคมี สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1.1. การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด

การย่อยไซแลนด้วยกรดเพื่อผลิตน้ำตาลไซโลสเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น เฟอฟูรัล ซึ่งมีผลต่อการนำไปเลี้ยงจุลินทรีย์ และยังต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดและอุณหภูมิสูงได้

1.2. การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง

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

2. การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะกว่าการใช้สารเคมีในการย่อยสลาย เนื่องจากภาวะที่ใช้ขณะทำงานเป็นกลาง นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษและสารเคมีติดค้าง ทำให้สามารถนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปใช้ผลิตสารอื่นๆต่อไป เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการ คือใช้ในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ ลดความหนืดของอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมอาหาร (Wong and Saddler, 1988) ซึ่งเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะบีตา-1,4-ของสายหลักให้ได้น้ำตาลไซโลสมีอยู่ 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ

1. เอนโดไซลาเนส (endo-xylanase) หรือ 1,4-เบตา-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylanxylanohydrolase,EC 3.2.1.8)เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-เบตา-ดี-ไซโลซิดิกแบบสุ่ม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่ากลไกแบบเอนโด (endo-mechanism) ได้ไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

2. เบตาไซโลซิเดส (β-xylosidase) หรือ 1,4-เบตา-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan-xylohydrolase,EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้ย่อยสลายพันธะ 1,4-เบตา-ดี-ไซโลฟิวราโนซิลทีละ 1 หน่วยจากปลายสายด้านนอน-รีดิวซ์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่า กลไกแบบเอคโซ (exo-mechanism) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

นอกจากนี้การย่อยไซแลนให้สมบูรณ์ต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่นๆด้วย เช่น

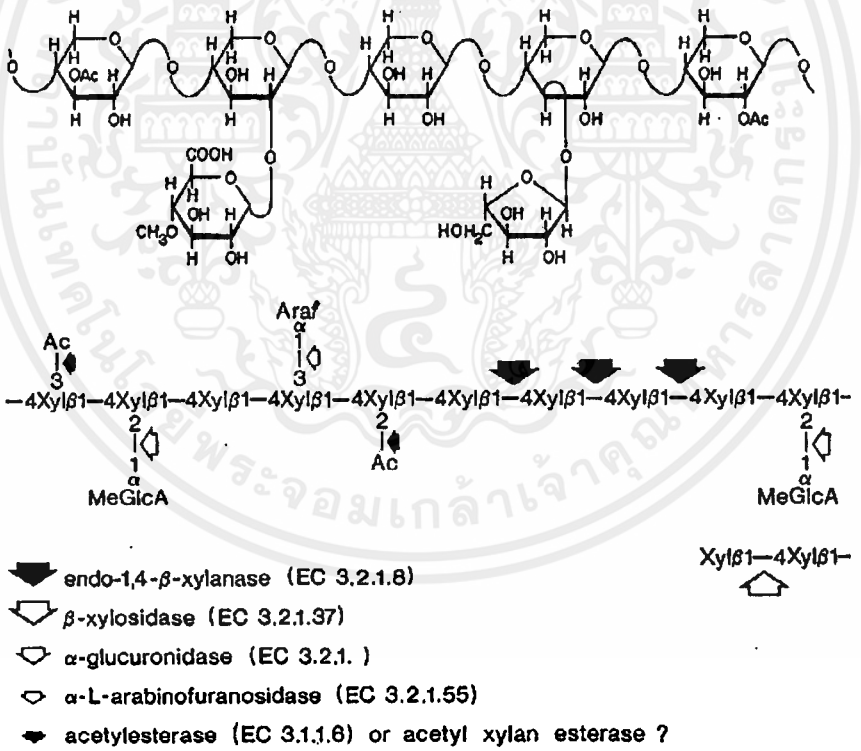
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. เอนไซม์ แอลฟา-แอล-อะราบิโนสิเดส (α-L-arabinosidase ; EC 3.2.1.55) จะย่อยสลายหมู่นอน-รีดิวซ์-แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิล ของแอลฟา-แอล-อะราบิฟิวราโนไซด์ อะราบิแนน และอะราบิโนกาแลคแทน ได้น้ำตาลไซโลสและน้ำตาลที่เป็นพันธะกิ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

2. เอนไซม์ แอลฟา-ดี-กลูคูโรโนสิเดส (α-D-glucuronosidase ; EC 3.2.1) จะย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ใน 4-O-methyl-D-gluculonic acid

3. เอนไซม์ อะเซติล(ไซแลน)เอสเทอเรส (acetyl(xylan)esterase ; EC 3.1.1.6) จะย่อยสลายพันธะเบตา-1,2 และเบตา-1,3 ที่เชื่อมหมู่อะซิติลกับสายหลัก ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดอะซิติก

จากเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว สามารถแสดงแผนภาพรวมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้เพื่อย่อยสลายโครงสร้างของไซแลนได้ดังแสดงในรูปที่ 4

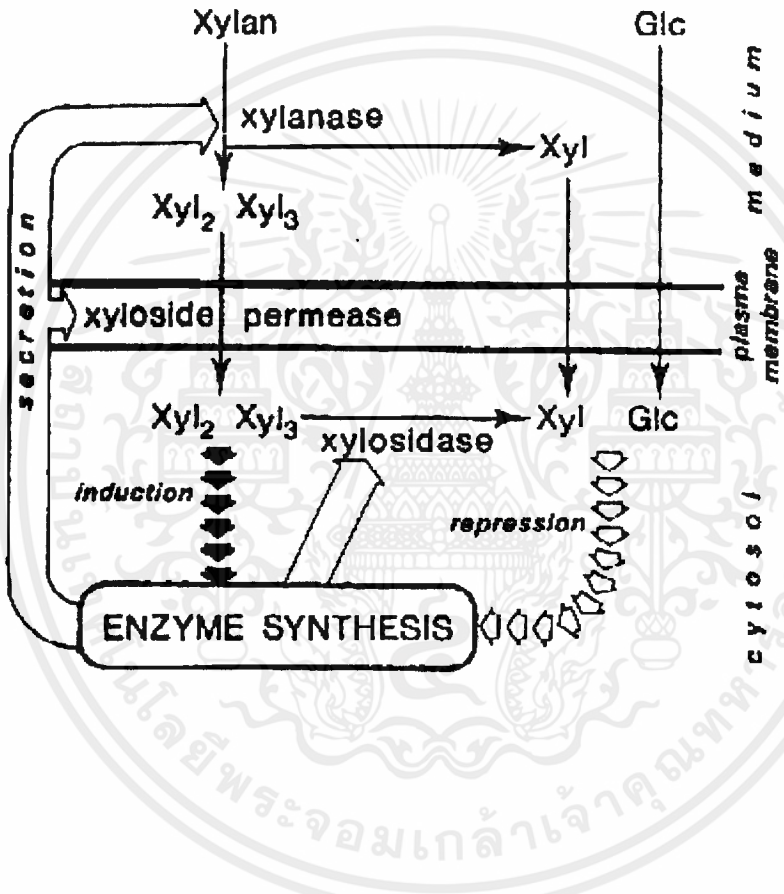


รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของไซแลนที่ได้จากพืชและแสดงบริเวณที่เข้าจับของเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมใน xylanolytic enzyme system โดยจุลินทรีย์

ที่มา : Biely (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Biely และ Petrakova (1989) ศึกษารูปแบบการย่อยสลายไซแลนด้วยไซลาเนสและเบตาไซโลสิเดสของยีสต์ *Cryptococus albidus* พบว่าเชื้อจะปลดปล่อยไซลาเนสออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยไซแลนให้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ จากนั้นนำเอาไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เข้าสู่เซลล์ด้วยระบบ แอคทีฟทรานสปอร์ต (active transport) ต่อจากนั้นเบตาไซโลซิเดสภายในเซลล์จึงทำงานต่อเพื่อย่อยให้เกิดน้ำตาลไซโลส ซึ่งจุลินทรีย์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงลักษณะการย่อยสลายไซแลนโดย *Cryptococcus albidus*
ที่มา : Biely (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการย่อยสลายไซแลนของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นี้ จะเรียกว่า xylanolytic enzyme system เกิดในกระบวนการหมัก โดยเกิดจากการสลายแขนงของหมู่อะซิติลในโครงสร้างของไซแลนโดยใช้เอนไซม์ทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ เอนโด-1,4-เบต้า-ไซลาเนส (endo-1,4-β-xylanase) หรือไซลาเนสที่เข้าจับที่พอลิแซคคาร์ไรด์ และเบต้า-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) ที่ไฮโดรไลซ์ไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (xylooligosaccharide) ไปเป็นดี-ไซโลส (D-xylose)

ตารางที่ 1 แสดงความสามารถในการหมักของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยเกิดผ่าน xylanolytic enzyme system

Table 1. Fermentation abilities of some xylanolytic microorganisms

Microorganisms	*Fermentation ability*	*Refs*
Aureobasidium pullulans	xylose → ethanol[a]	b
Candida shehatae	xylose → ethanol[a]	b
Clostridium thermocellum	xylan → ethanol, acetic acid, lactic acid	10, 41
Clostridium thermohydrosulfuricum	xylan → ethanol	10
Clostridium thermosaccharolyticum	xylan → ethanol	41
Cryptococcus albidus	xylan → triglycerides	42
Fusarium oxysporum	xylose → ethanol[a]	43
Monilia sp.	xylan → ethanol	30
Neurospora crassa	xylan → ethanol	44
Pichia stipitis	xylan → ethanol	b
Thermoanaerobacter ethanolicus	xylan → ethanol, acetic acid, lactic acid	10
Thermoanaerobium brockii	xylan → ethanol, acetic acid, lactic acid	10
Thermoanaerobium, Thermoanaerobacter and *Thermobacteroides* species	xylan → ethanol, acetic acid, lactic acid	45
Thermobacteroides acetoethylicus	xylan → ethanol, acetic acid, lactic acid	10

[a]Direct fermentation of xylan to ethanol has not been demonstrated with these species yet.
[b]H. Lee, P. Biely and H. Schneider, unpublished.

ที่มา : Biely (1985)

3. กลไกการย่อยสลายลิกนิน

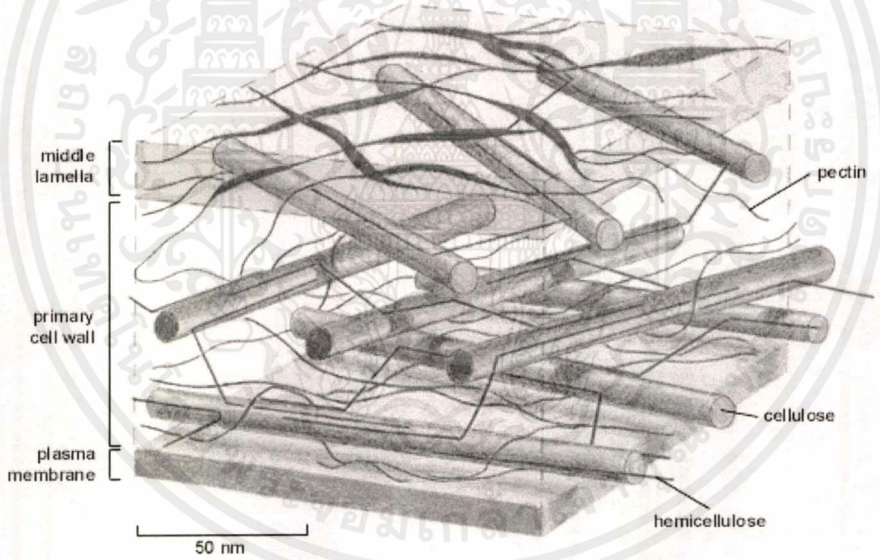
กลไกการย่อยสลายลิกนินคือ เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกันไป แต่โดยหลักแล้วมีวิธีการย่อยคล้ายกัน คือ เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเหมือนกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) เอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินประกอบด้วยส่วน iron porphyrin complex หรือที่เรียกว่า ฮีม (heme) เมื่อออกซิไดซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วเปลี่ยนเป็นสารออกซิไดซิ่ง (oxidizing agent) สามารถดึงเอาอิเลคตรอนออกจาก phenolic ring ของลิกนินทำให้โพลิเมอร์ของลิกนินแตกตัว ซึ่งผลจะปรากฏชัดเมื่อระดับความเป็นกรดเป็นด่างเหมาะสม และมีผลต่อการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ทำให้ปริมาณของเซลลูโลสลดลง เช่นเดียวกับปริมาณลิกนิน

4. แหล่งที่พบไซแลน

พบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิด ซึ่งโครงสร้างของพืชจะประกอบไปด้วย ส่วนประกอบหลัก 3 ส่วน ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน และไซแลนจะเป็นส่วนประกอบหลักในส่วนของเฮมิเซลลูโลส ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของพืชที่มีส่วนประกอบหลักเป็น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน
ที่มา : www.enzymes.co.uk/Basics/cell_wall.gif (2002)

ไซแลนจึงสามารถพบได้ในพืชทุกชนิด แต่ปริมาณไซแลนในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามโครงสร้างของการเจริญและสภาพแวดล้อม โดยส่วนใหญ่ใช้ไซแลนจากพืชไม่กี่ชนิด ได้แก่ ไซแลนจากโอ๊ต และไซแลนจาก birchwood

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 7 Birchwood ที่นำมาใช้ในการผลิตไซแลน

ที่มา : www.trailtree.com/ (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ประโยชน์ของไซแลน

1.) ใช้ในกระบวนการหมักสำหรับผลิตเชื้อเพลิง เช่น เอทานอล (Biely, 1985)

2.) ใช้ในหารผลิตสารเคมี เช่น สารทำละลาย กรดอินทรีย์ (Biely, 1985)

3.) อาหารสำหรับคนและสัตว์ ได้แก่ อาหารเสริมโปรตีนและอาหารเสริมเส้นใย (Biely, 1985)

2. เอนไซม์ไซลาเนส

2.1. คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

1. ผลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์

อุณหภูมิที่เหมะสมในการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสค่อนข้างแปรผัน โดยขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนมากจะสร้างไซลาเนสที่ทำงานได้ดีในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างไซลาเนสส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส เช่น *Cellulomonas uda* สามารถเจริญและผลิตไซลาเนสได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Rapp and Wangner, 1986) แต่ก็มีจุลินทรีย์บางกลุ่มเช่น รา แอคติโนมัยซิส หรือ แบคทีเรีย ที่สามารถเจริญในที่อุณหภูมิสูง และสามารถสร้างไซลาเนสได้ จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส เช่น *Dictyoglomus sp.* B1 และ *Rhodothermus marinus* สามารถเจริญและผลิตไซลาเนสได้ดีที่อุณหภูมิ 68 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Ratto, และคณะ,1994)

Gomes และคณะ (1992) รายงานถึงระดับความเหมาะสมของอุณหภูมิต่อการผลิต Fpase , Xylanase และ beta-glucosidase สูงสุดที่อุณหภูมิ 32, 34 และ 31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2. ผลของความเป็นกรดด่างต่อเอนไซม์

เอนไซม์ไซแลเนสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็นกลางถึงด่าง จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน คือ จุลินทรีย์พวกรามักจะเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ เช่น *Aspergillus* AANTG 19 และ *Thermoascus aurantiacus* เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4 (Smithand Wood,1991 b ; Gomes และคณะ, 1994) แอคติโนมัยซิสจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเป็นกลาง เช่น *Streptomyces* T 7 เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 *Thermomonospora fusca* สามารถผลิตไซลาเนสได้ดีเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9 สมบัติของไซลาเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 สมบัติของไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ (ชวนพิศ, 2536)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิที่แอคติวิตีเสียอย่างสมบูรณ์
Aureobasidium pullulans Y 2311	4.8	4.5	54	70 องศา , 30 นาที
Aureobasidium pullulans	4.0	5.0	45	80
Bacillus subtilis	6.0	3.5-9.0	45	-
Bacillus stearothermophilus	9.0	7.0	65	65 องศา , มากกว่า 6 ชม.
Bacillus stearothermophilus	6.0	5.0-11.0	60	80 องศา , 1 ชม.
Ceratocystics	5.1	5.0-10.0	80	100
Chainia sp.	6.0	5.0-7.0	60	-
Dictyoglomur sp.	6.0-7.0	9.0	90	-
Fusidium sp. BX 1	5.5	4.0-9.0	60	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิที่แอคติวิตีเสียอย่างสมบูรณ์
Humicola lanuginosa	6.0	5.0-8.0	65	80
Phanerochate chrysosporium	5.0	4.0-9.0	50	-
Rhodothermus marinus	7.1	-	65	มากกว่า 80 องศา , 24 ชม.
Streptomyces sp. S 510	6.0	4.0-11.0	60	-
Streptomyces sp. HM 15	5.0-7.0	5.7	50-60	60 องศา , มากกว่า 5 ชม.
Streptomyces sp.	5.5	-	60	-
Streptomyces sp. E-86	5.5-6.2	4.5-10.5	55-60	70
Streptomyces sp. KT23	5.5	4.0-10.0	55	-
Streptomyces sp. No.3137	5.0-6.0	4.0-8.0	50-60	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิที่แอคติวิตีเสียอย่างสมบูรณ์
Streptomyces xylophagus	6.2	5.3-7.3	55-60	70
Thermomonospora fusca BD 25	7.0-8.0	มากกว่า 9	60	-
Thermoascus aurantiscus	5.0	3.0-9.0	80	-
Trichoderma reesei	5.5-6.0	3.0-7.0	-	90

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่มีรายงานไว้

2.2. แหล่งที่พบเอนไซม์ไซลาเนส

จะพบเอนไซม์ไซลาเนสได้ทั่วไปในธรรมชาติ อาจพบในแบคทีเรียที่อยู่ในทะเลและพื้นดิน แบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง สาหร่ายทะเล โปรโตซัว สัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง หอย ทาก แมลง และเมล็ดพืชที่กำลังงอก (Sunna and Antranikian, 1997) นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในจุลินทรีย์จำพวก เชื้อรา ยีสต์ และจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย (Biely, 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ซึ่งได้ทำการรวบรวมไว้ในตารางที่ 3 โดยในขั้นตอนและวิธีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเพื่อผลิตเอนไซม์ของเชื้อแต่ละชนิด

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus fhoenicis	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Aspergillus foetidus	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Aspergillus nidulans	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Aspergillus niger	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Aspergillus awamori	(กาญจนา, 2530; Smith และ Wood, 1991)
Aspergillus fumigatus	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Aspergillus fumigatus 4-45-1F	(Ancharida, 1999)
Aureobasidium pullulans	(กาญจนา, 2530; Myburgh และคณะ, 1991)
Aureobasidium pullulans NRRL Y 2311-1	(Myburgh และคณะ, 1991)
Bacillus cinerea	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Bacillus pumilus	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Bacillus subtilis	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Bacillus sp. No. C-125	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Brevibacterium lactofermentum	(Adham และคณะ, 2001)
Brevibacterium lactofermentum X1	(Adham และคณะ, 2001)
Brevibacterium lactofermentum X2	(Adham และคณะ, 2001)
Brevibacterium lactofermentum R31	(Adham และคณะ, 2001)
Brevibacterium lactofermentum 13869	(Adham และคณะ, 2001)
Cellulomonas uda	(กาญจนา, ๒๕๓๐)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Chaetomium cellulolyticum	(Dubeau และคณะ, 1987)
Chaetomium cellulolyticum ATCC 32319	(Dubeau และคณะ, 1987)
Chaetomium trilaterale	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Chainia (NCL 82-5-1)	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Clostridium acetobutyricum	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Clostridium thermocellum	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Cryptococcus flavus	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Fusarium avenaceum	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Fusarium culmarum	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Fusarium roseum	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Fusarium oxysporum	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Fusarium oxysporum NTG-19	(Singh และคณะ, 1995; 1998)
Fusarium oxysporum DSM 841	(Singh และคณะ, 1991; 1995; 1998)
Fusarium oxysporum 2018	(Singh และคณะ, 1991)
Fusarium oxysporum 62287	(Singh และคณะ, 1991)
Fusarium oxysporum 62291	(Singh และคณะ, 1991)
Gliocladium virens	(Singh และคณะ, 1991)
Humicola lanuginosa	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Monilia brunnea	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Monilia brunnea 1362	(Singh และคณะ, 1991)
Myrothecium roridum	(Singh ลและคณะ, 1991)
Neocallimastix frontalis	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Neocallimastix patriciarum	(Anaerobic Fungi, Biology, 1994)
Neurospora crassa	(Anaerobic Fungi, Biology, 1994)
Orpinomyces sp.	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Paecilomyces sp.	(Anaerobic Fungi, Biology, 1994)

47320

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Penicillium funiculosum	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Penicillium funiculosum BU-36	(กาญจนา, ๒๕๓๐; Deshpande, 1987)
Penicillium funiculosum N-4	(Deshpande, 1987)
Piromonas communis	(Deshpande, 1987)
Piromyces sp.	(Anaerobic Fungi, Biology, 1994)
Saccharomonospora viridis	(Anaerobic Fungi, Biology, 1994)
Schizophyllum commune	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Sporotrichum thermophile	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Streptomyces albogriseolus	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Streptomyces exfoliatus MC_1	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Streptomyces flavogriseus	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Streptomyces fradiae SCF-5	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Streptomyces lividans	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Streptomyces mitakaensis	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Streptomyces olivochromogenes	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Streptomyces vridochromogenes	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Streptomyces sp. No. 3137	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Streptomyces sp. KT-23	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Streptomyces xylophagus	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Termitomyces clypeatus	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Thermonospora sp.	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Trichoderma cutaneum	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Trichoderma harzianum E 58	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma koningii IMI 73022	(Wong และ Saddler, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Trichoderma koningii G-39	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma lignorum	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma lingibrachiatum	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma pseudokoningii C-3	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma reesei	(กาญจนา, ๒๕๓๐)
Trichoderma reesei Rut C 30	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma reesei QM 9414	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma reesei VTT-D-80133	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma viride Onozuka	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma viride K-10-34	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma viride Bioixylanase	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma viride Cellulysin	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma viride ATCC 52438	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma viride Sigma V	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma viride Maxazyme CL	(Wong และ Saddler, 1992)
Trichoderma viride Meicellase	(Wong และ Saddler, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3. ประโยชน์ของไซลาเนส

1.) ใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกกระดาษ (Wong และ Saddler, 1992; Singh และคณะ, 1995) ในขั้นตอนการฟอกและย่อยเยื่อไม้

2.) การปรับปรุงเส้นใย เพื่อให้เส้นใยมีคุณภาพดีขึ้น (Singh, 1998)

3.) การสกัดกาแฟ โดยใช้ในขั้นตอนการย่อยเปลือกกาแฟ (Wong และ Saddler, 1992; Singh, 1998)

4.) ใช้ในการผลิตน้ำมันพืชและการทำแป้ง (Wong และ Saddler, 1992; Singh, 1998)

5.) ใช้ในการปรับปรุงที่ดินสำหรับทำการเกษตรและการปลูกข้าว โดยเอนไซม์ไซลาเนสจะไปช่วยเพิ่มแร่ธาตุ ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์เหมาะแก่การเพาะปลูก (Wong และ Saddler, 1992; Singh, 1998)

6.) การกำจัดส่วนที่เหลือจากการเกษตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบแข็ง (Biely, 1985; Smith และ Wood, 1991; Myburgh และคณะ,1991; Ancharida, 1999)

7.) การทำให้น้ำผักและผลไม้ใส โดยเอนไซม์ไซลาเนสจะไปทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์ของผักและผลไม้ทำให้ ผนังเซลล์แยกตัวออกมา เรียกวิธีการนี้ว่า Clarification (Biely, 1985; Wong และ Saddler, 1992)

8.) การผลิตอาหารที่เพิ่มไฟเบอร์ หรือคล้ายเนื้อสัตว์ในอาหารเสริมสุขภาพและอาหารเพิ่มโปรตีนและอาหารสัตว์ (Kuhad และคณะ, 1997; Adham, 2001)

9.) การผลิตเชื้อเพลิงทางเคมี ไซลิทอล เอทานอล สารทำละลายและกรดอินทรีย์ (Biely, 1985; Singh, 1995)

10.) ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Dubeau, 1987; Singh, 1995; Kuhad, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เชื้อ *Aspergillus sp.*

3.1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

From-genus *Aspergillus*

เป็นเชื้อที่มีถิ่นที่อยู่กว้างขวางทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อน ในอากาศทุกหนทุกแห่งมีโคนีเดียของเชื้อราชนิดนี้ปะปนอยู่ นอกจากนี้ยังพบมากในดิน เจริญได้ในอินทรีย์วัตถุแทบทุกชนิด ซึ่งก่อให้เกิดทั้งผลดีและผลเสียโดยเฉพาะในเขตร้อน เชื้อ *Aspergillus* ทำให้เครื่องหนัง เช่น กระเป๋า รองเท้า ตลอดจนเสื้อผ้าเสียหาย *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* และสปีชีร์อื่น ๆ ทำให้เกิดโรค Aspergillosis ซึ่งมีอาการคล้ายวัณโรค บางชนิดทำให้หูอักเสบได้

เนื่องจากเชื้อนี้สร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด จึงมีประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมผลิตกรดต่างๆ อุตสาหกรรมทำเบียร์ และการผลิตยาปฏิชีวนะ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อนี้ คือไมซีเลียมของเชื้อนี้ประกอบด้วยเส้นใยที่แตกแขนงมากมาย เส้นใยมีผนังกั้นและไม่มีสี แต่ละเซกเม้นท์มีนิวเคลียสหลายอัน

3.2. ลักษณะการสืบพันธุ์

มีทั้งการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ คือในราพวก *Aspergillus* จะมีส่วนของเส้นใยที่ทำหน้าที่สร้างโคนิดิโอฟอร์เรียกว่า foot-cell โคนิดิโอฟอร์มีลักษณะยาวและตรง ส่วนปลายจะโป่งออกเรียกว่า visicle รอบๆ visicle จะมีโครงสร้างที่ยื่นออกมามีลักษณะคล้ายขวดเรียกว่าสเตอริกมาตา (sterigmata) โดยจะมีหนึ่งชั้นหรือสองชั้นก็ได้ ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของเชื้อ เชื้อสร้างโคนิเดียในสเตอริกมาตา โดยโปรโตปลาสซึมที่ส่วนปลายสเตอริกมาตาจะมีผนังกั้นและเปลี่ยนแปลงรูปร่างจนมีลักษณะค่อนข้างกลม จากนั้นสร้างผนังล้อมรอบเจริญเป็นโคนิเดีย โคนิเดียที่ถูกสร้างทีหลังจะอยู่ลึกเข้าไปภายในสเตอริกมาตาและดันโคนิเดียอันแรกให้โผล่พ้นสเตอริกมาตาออกมา และถูกดันกันต่อมาเรื่อยๆ โดยที่โคนิเดียแต่ละอันยังไม่หลุดขาดจากกัน ทำให้ได้เป็นสายโซ่ของ โคนิเดีย ดังนั้นโคนิเดียที่มีอายุน้อยๆจึงอยู่ติดกับส่วนของสเตอริกมาตา

โคนิเดียของ *Aspergillus* มีสีต่างๆกัน เช่น สีดำ น้ำตาล เหลือง เขียว ฯ สีของโคนิเดียขึ้นอยู่กับธาตุอาหารบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่น *A. niger* จะสร้างโคนิเดียสีดำ ถ้าอาหารนั้นมีธาตุทองแดงอยู่ไม่น้อยกว่า 2.5×10^{-6} กรัม ถ้ามีทองแดงต่ำกว่านี้สีของโคนิเดียจะอ่อนลง และถ้าไม่มีธาตุทองแดงอยู่ในอาหารเลย สีของโคนิเดียที่เคยเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือดำจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและการสืบพันธุ์แบบมีเพศ ยังศึกษาไม่พบการสืบพันธุ์แบบมีเพศในเชื้อ *Aspergillus* หลายสปีชีส์ และเชื่อกันว่าสปีชีส์เหล่านั้นสูญเสียความสามารถในการสืบพันธุ์แบบมีเพศไปแล้ว แม้แต่ในสปีชีส์ที่สร้างแอสคัสก็ยังพบแนวโน้มว่าการสืบพันธุ์แบบมีเพศกำลังจะเสื่อมไป จากการศึกษาพบว่ามี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะพลาสโมแกมมี่เกิดขึ้นจากการผสมของแกมมีแทนเจียม 2 เพศไปจนถึงบางชนิดที่ไม่สร้างแอนเธอริเดียม และบางชนิดสร้างแอสคัสจากแอสโคโกเนียมเพียงอย่างเดียวโดยไม่ต้องมีแอนเธอริเดียม

4. การทำการกลายพันธุ์

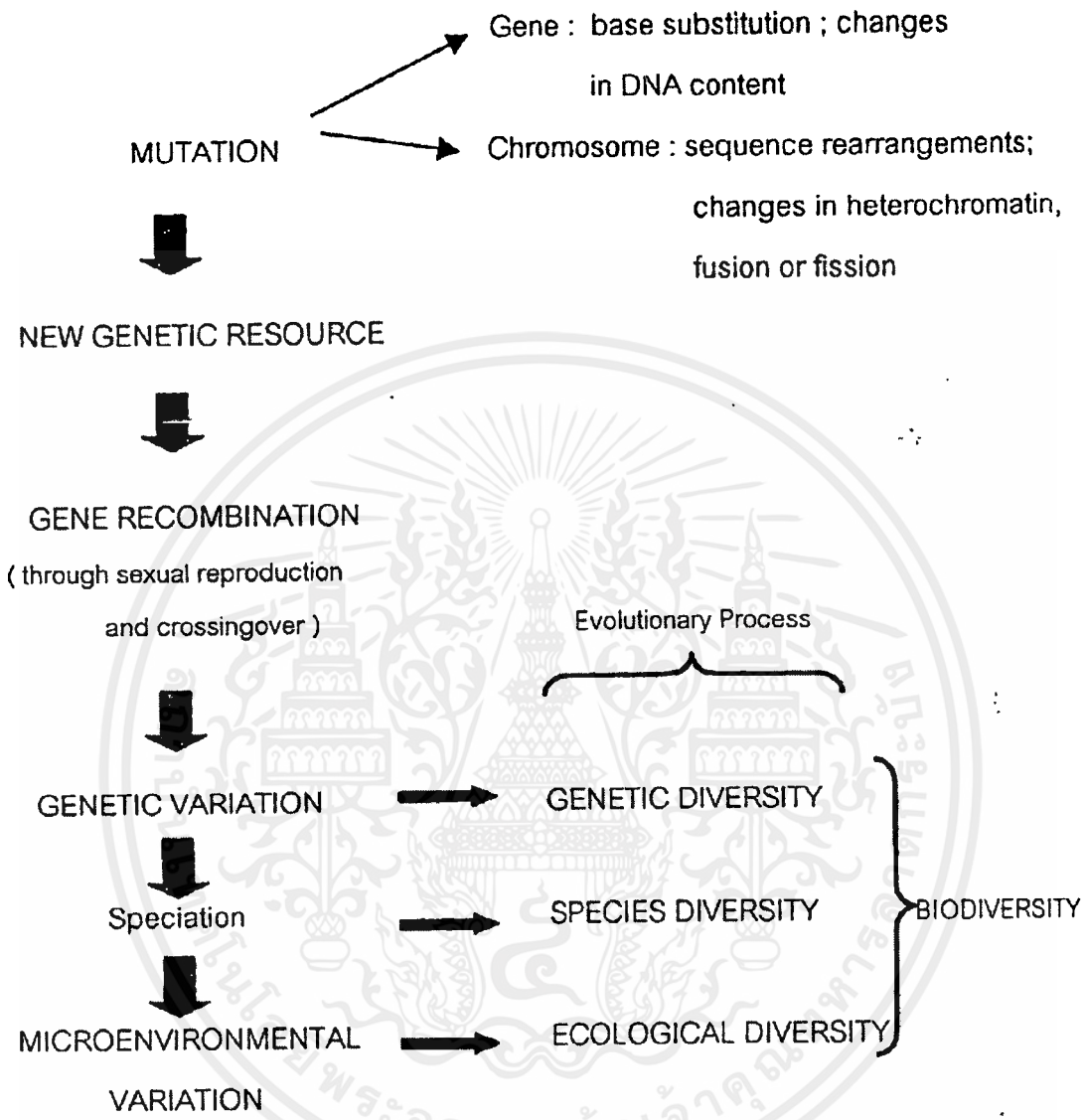
4.1. ประวัติของการศึกษาเกี่ยวกับมิวเตชั่น

มีความเชื่อว่าความแปรปรวนทั้งหลายที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตจนถึงกับได้พวกใหม่หรือพันธุ์ใหม่อันเรียกว่า sports นั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทีละเล็กละน้อยแบบค่อยเป็นค่อยไปจนกระทั่งถึงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 Hugo De Vries นักพฤกษศาสตร์ชาวเนเธอร์แลนด์ได้พบความจริงซึ่งแตกต่างจากข้อเสนอของ Darwin ทั้งนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงในสิ่งมีชีวิตอาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลันทันทีและพืชหรือสัตว์สามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ เรียกการเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้ว่า มิวเตชั่น ซึ่งมีขั้นตอนโดยรวมดังรูปที่ 8 คือการแสดงขั้นตอนโดยรวมของการเกิดมิวเตชั่น

มิวเตชั่นคืออะไร

มิวเตชั่น หมายถึง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับหน่วยควบคุมลักษณะ เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ฉับพลันและพืชหรือสัตว์สามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงอันนี้จะรวมไปถึงการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม แต่คำว่ามิวเตชั่นในปัจจุบันมักจะหมายความถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปยังอีกสภาพหนึ่ง ดังนั้นอาจเรียกการเปลี่ยนแปลงอันนี้ว่า “gene หรือ point mutation” ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของดีเอ็นเอ คือ นิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งเข้าไปแทนที่นิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอาจเกี่ยวข้องกับลักษณะรูปร่างทั่วไปหรือเกี่ยวกับลักษณะทางสรีระหรือทางชีวเคมีหรือลักษณะทางพฤติกรรมของสปีชีส์ มิวเตชั่นเป็นสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิตและเป็นกลไกสำคัญอันดับแรกที่ทำให้เกิดความแตกต่างแปรผันในองค์ประกอบทางพันธุกรรม (genetic variation) อันเป็นพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับกระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 แสดงขั้นตอนโดยรวมของการเกิดมิวเตชั่น

ที่มา : Gerald (1973)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2. ชนิดของมิวเตชั่น

ชนิดของมิวเตชั่นที่ศึกษากันมักเป็นพวกที่แสดงออกมาให้เห็นในรูปของลักษณะอย่างชัดเจน ตัวอย่างของมิวเตชั่น ได้แก่ ลักษณะตาสีขาว ปีกสั้น ปีกกุด ฯลฯ ของแมลงหวี่ ดังนั้นเราจึงเรียกมิวเตชั่นดังกล่าวว่าเป็นพวก "สังเกตได้ (visible)" ซึ่งมีอยู่ราว 1 เปอร์เซ็นต์ของมิวเตชั่นทั้งหมด และไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่สิ่งมีชีวิตมากนัก แต่มิวเตชั่นส่วนใหญ่คือราว 80 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่พวก "แสดงผลในทางเสื่อม (detrimental)" ซึ่งไม่อาจตรวจผลได้แน่ชัด แต่เข้าใจว่ากระทบกระเทือนต่อการเจริญเติบโตของพืชหรือสัตว์ได้อย่างมาก ในมิวเตชั่นชนิดนี้ยีนที่เปลี่ยนไปแต่ละยีนก่อผลเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อรวมผลของทุกยีนก็จะรุนแรงขึ้น มิวเตชั่นอีกพวกหนึ่งคือพวก "ก่อผลถึงตาย (lethal)" ซึ่งมีอยู่ประมาณ 19 เปอร์เซ็นต์ ถ้าอยู่ในสภาพ homozygous มิวเตชั่นชนิดนี้จะกระทบกระเทือนต่อขบวนการทางสรีระจนพืชหรือสัตว์ไม่อาจมีชีวิตอยู่ได้

ในสิ่งมีชีวิตพวก haploid เช่น เชื้อราที่เป็น recessive lethal จะก่อผลถึงตาย ในสิ่งมีชีวิตพวกนี้มียีนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอีกประเภทหนึ่งซึ่งไม่ก่อผลถึงตาย เราเรียกยีนนี้ว่า conditional lethal ตัวอย่างเช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิดของเชื้อรา *Neurospora* อาจเปลี่ยนไปจากเดิม เราเรียกยีนที่เปลี่ยนไปนี้ว่า conditional lethal ทั้งนี้เชื้อราที่มียีนนี้จะไม่เจริญหรือขยายพันธุ์ใน minimal medium แต่กลับเจริญตามปกติเมื่อเสริมกรดอะมิโนบางชนิดลงไปใน selective medium

1. มิวเตชั่นที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

มิวเตชั่นชนิดนี้เป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาทัวโทเมอริกชิฟท์ (tautomeric shift) หรือการก่อให้เกิดไอออน (ionization) ในโมเลกุลของเบสดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (ประดิษฐ์, 2543) มิวเตชั่นที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีอัตราต่ำมาก อัตราโดยเฉลี่ยประมาณ 10^{-5}-10^{-6} จำนวนเซลล์ต่อรุ่นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมโดยแตกต่างกันออกไปตามแต่ตำแหน่งและชนิดของยีนและอาจแล้วแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต (ประเสริฐ, 2536) (ตารางที่ 2) ยีนมิวเตชั่นอาจเกิดในทางไปข้างหน้า (forward mutation : A→a) คือลักษณะปกติเปลี่ยนไปเป็นลักษณะกลาย หรืออาจเกิดขึ้นในทางกลับกัน (back mutation หรือ reverse mutation : a→A) คือจากมิวแตนต์ยีนเปลี่ยนกลับไปเป็นยีนปกติตามเดิม (วิสุทธ์, 2533) อย่างไรก็ดีนับว่าเป็นมิวเตชั่นที่มีความสำคัญและก่อให้เกิดวิวัฒนาการขึ้นในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ายีนแทบทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆเคยผ่านการเปลี่ยนแปลงโดยมิวเตชั่นมาแล้วในอดีต จากการคัดเลือกอันเข้มงวดในธรรมชาติยีนซึ่งก่อผลในทางเสื่อมก็

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่อยๆหายไปจากหมู่ประชากรของพืชและสัตว์ เมื่อปราศจากมิวเตชั่นในธรรมชาติแล้วก็แทบจะกล่าวได้ว่าสิ่งมีชีวิตไม่อาจดำรงเผ่าพันธุ์หรือมีวิวัฒนาการมาจนถึงทุกวันนี้

จากการศึกษาอัตราของมิวเตชั่นของยีนต่างๆของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนไปยังสภาพอื่นและการเปลี่ยนแปลงกลับสู่สภาพเดิมมีอัตราการเกิดไม่เท่ากัน นอกจากนั้นยีนของพืชและสัตว์ชั้นสูงมีอัตรามิวเตชั่นสูงกว่ายีนของแบคทีเรียและไวรัส

2. มิวเตชั่นที่เกิดจากการกระตุ้น (induced mutation)

นอกจากจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแล้ว มิวเตชั่นก็อาจจะถูกทำให้เกิดได้โดยใช้วิธีการกระตุ้น โดยได้เริ่มใช้รังสีเอกซ์ (X-rays) เพื่อกระตุ้นให้เกิดมิวเตชั่นในแมลงหวี่ พบว่าอัตราของมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นจะสูงกว่าพวกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติถึงราว 150 เท่า ต่อมาได้พบว่ารังสีเอกซ์นี้ได้ก่อให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) โดยการใช้รังสีเอกซ์มักจะก่อผลในทางเสื่อม และมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นก็คงมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม บางยีนอาจถูกทำลายก็ได้หรือบางส่วนของโครโมโซมอาจขาดหายไป

4.3. สิ่งที่ทำให้เกิดมิวเตชั่น (mutagens)

1. สิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ อุณหภูมิ รังสีต่างๆ

อุณหภูมิ จากการทดลองเลี้ยงแมลงหวี่ในอุณหภูมิต่างๆกัน พบว่ายีนด้อยที่ทำให้การตายบนโครโมโซม X (sex linked recessive lethal gene) ในอัตราที่แตกต่างกัน ดังนี้

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

รังสีและแสง เป็นสิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ สามารถแบ่งแสงและรังสีตามช่วงความยาวคลื่นออกเป็นพวกๆดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลื่นวิทยุ แสงและรังสี คือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีช่วงคลื่นขนาดต่างๆกัน คลื่นวิทยุมีช่วงคลื่นที่ยาวมาก คือมีความยาวระหว่าง 10-10 ซม. แสงที่เรามองเห็นมีช่วงคลื่น 10 เซนติไมครอน คลื่นที่มีช่วงสั้นกว่านี้ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต รังสีเอกซ์ จัดว่าเป็นคลื่นที่มีพลังงานสูง เหตุนี้เมื่อช่วงคลื่นยิ่งสั้นลงพลังงานก็ยิ่งสูงขึ้น การที่แสงบางอย่างและรังสีมีพลังงานสูงนี่เองทำให้สามารถแทรกซึมวัตถุและก่อผลให้เกิดมิวเตชั่นในสิ่งมีชีวิต เราอาจแยกคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและพลังงานในรูปมวล (จากสารที่อาจแผ่รังสี(radioactive isotope)) ออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ

รังสี (ionizing radiation) คือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหรือพลังงานในรูปมวลที่มีพลังงานสูง เมื่อกระทบเป้าแล้วจะทำให้มีการผลิตอิออน (ions) และรังสีนี้จัดเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมสูง

แสง (nonionizing radiation) คือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีพลังงานไม่สูงพอที่จะทำให้มีการผลิตอิออนและเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมต่ำ

2. รังสี (ionizing radiation)

รังสีมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน แต่ละชนิดอาจมีแหล่งที่เกิดและแรงแทรกซึมแตกต่างกัน รังสีเหล่านี้ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีคอสมิค รังสีแอลฟา รังสีเบตาและนิวตรอน รังสีบางชนิดในจำนวนนี้ได้จากการแผ่รังสีของธาตุที่อาจแผ่รังสีได้ (radioactive elements) เช่นรังสีแอลฟาซึ่งประกอบด้วยโปรตอนและนิวตรอน และรังสีเบตาซึ่งประกอบด้วยอิเลกตรอนเป็นต้น

รังสีทำให้เกิดมิวเตชั่นโดยวิธีการที่ทำให้เกิดอิออน ทั้งนี้เมื่อรังสีวิ่งไปกระทบกับอะตอมของวัตถุก็จะทำให้อะตอมนั้นยิงอิเลกตรอนออกไป หลังจากสูญเสียอิเลกตรอนไปแล้ว ทั้งนี้เพราะมีโปรตอนมีอิเลกตรอนอยู่ 1 หน่วยนั่นเอง ดังนั้นอิเลกตรอนที่ถูกยิงออกไปจะถูกจับไว้โดยอะตอมข้างเคียง จึงทำให้อะตอมนั้นกลายเป็นอิออนที่มีประจุลบ โดยเหตุนี้เองอิออนจึงเกิดเป็นคู่ๆเสมอ รังสีอาจก่อให้เกิดมิวเตชั่นได้หลายวิธี เช่น เมื่ออิออนนั้นอยู่ในส่วนของยีน การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดกับอิออนนั้นก็จะทำให้ยีนเปลี่ยนสภาพไป ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือรังสีอาจทำให้น้ำที่อยู่ภายในเซลล์ผลิตอิออนของไฮโดรเจน (H) และกลุ่มไฮดรอกซิล (OH) แล้ว H จะรวมตัวกับออกซิเจนได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาคืออาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ โปรตีน หรือโครโมโซมก็ได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับโครโมโซมก็จะทำให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซมหรือเกิดมิวเตชั่นของยีนได้

$$H_2O \rightarrow H + OH$$

ในที่ที่มีออกซิเจน ไฮโดรเจนอะตอมที่เกิดจากโมเลกุลของน้ำจะเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ง่าย ดังปฏิกิริยา

$$H + O_2 \rightarrow H_2O$$

$$H_2O + H \rightarrow H_2O_2$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$2H_2O \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

3. แสง (nonionizing radiation)

คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าช่วงยาวๆไม่ทำให้มีการผลิตอิออน ทั้งนี้เพราะพลังงานที่มีอยู่นั้นค่อนข้างต่ำ ดังนั้นเราเรียกคลื่นพวกนี้ว่าแสง แสงที่อาจเกิดมิวเตชั่นได้แก่ แสงอัลตราไวโอเลต (UV) แสงชนิดนี้มีช่วงคลื่นยาวกว่ารังสีเอกซ์ และเนื่องจากมีพลังงานต่ำนี่เอง แสงอัลตราไวโอเลตจึงมีแรงแทรกซึมน้อย และไม่อาจแทรกซึมผ่านส่วนของร่างกายที่มีความหนาแน่นสูงๆ ดังนั้นจึงมักใช้กับส่วนเล็กๆของพืช เช่น อาจใช้กับอับละอองเกสร เป็นต้น หรือใช้กับบางส่วนของไข่แมลงหวี่และมักใช้ได้ผลดีกับเชื้อรา แบคทีเรียและไวรัส แสงอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในส่วนของโพลาร์แคป (polar cap) ของไข่แมลงหวี่ รังสีอัลตราไวโอเลตอาจจะทำให้โครโมโซมผิดปกติ แต่ประสิทธิภาพน้อยกว่ารังสีเอกซ์ (ประดิษฐ์, 2543)

เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตไม่ทำให้มีการผลิตอิออน ดังนั้นมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นก็เนื่องมาจากการที่เซลล์ดูดแสงเข้าไปโดยตรง ส่วนของเซลล์ที่ดูดแสงได้ดีคือ กรดนิวคลีอิกหรืออาจกล่าวลงไปให้แน่ชัดได้อีกว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเบส โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ไพริมิดีนนั่นเอง เมื่อเบสกระทบกับแสงอัลตราไวโอเลตก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับเกาะของพันธะ (bond) เปลี่ยนไปคือทำให้มีการจับเกาะระหว่างเบสชนิดเดียวกัน เบสที่จับเกาะกันนี้เรียกว่าเป็นไดเมอร์ (dimer) การจับเกาะที่เกิดขึ้นง่ายที่สุดคือการจับเกาะระหว่างไทมีน (thymine) ซึ่งทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) (รูปที่ 9) ถ้ามีการขับเกาะระหว่างไทมีนในเส้นนิวคลีโอไทด์เส้นเดียวกัน ก็จะมีการขัดขวางไม่ให้ดีเอ็นเอแบ่งตัว ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนของเส้นตรงกันข้ามก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับจับคู่ของไทมีนกับอะดีนีน (thymine กับ adenine : T-A) เปลี่ยนไป ดังนั้นทำให้ไทมีนไปจับกับกัวนีนซึ่งจะยังผลให้ T-A เปลี่ยนไปเป็น C-G ซึ่งจัดเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบทรานซิชั่น (transition) ส่วนไดเมอร์ชนิดอื่นที่พบคือ ไซโตซีนไดเมอร์ (cytosine dimer : C-C) เกิดขึ้นน้อยกว่าพวกแรก ไดเมอร์ชนิดนี้ก่อให้เกิดมิวเตชั่นโดยการที่ NH_2 ถูกขับออกไปจึงทำให้ได้ยูราซิลไดเมอร์ (uracil dimer : U-U) แต่ยูราซิลจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับไทมีน ดังนั้นจึงทำให้ C-G เปลี่ยนเป็น A-T

ผลของแสงอัลตราไวโอเลตที่มีต่อสิ่งมีชีวิตก็คือ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครโมโซมและยีน (gene mutation) เช่นเดียวกับการใช้รังสีเอ็กซ์ แต่มีรายงานว่าในขนาดการใช้ที่อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนได้เท่ากันนั้น รังสีเอ็กซ์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมได้มากกว่า คุณสมบัติอีกประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลตก็คือ แสงที่มีช่วงคลื่นต่างกันจะมีผลทางมิวเตชั่นไม่เท่ากัน ช่วงคลื่นที่มีผลในทางมิวเตชั่นดี คือ พวกที่ DNA สามารถดูดซับเอาไว้ได้มาก แสงอัลตราไวโอเลตไม่สามารถผ่านแก้วได้แต่สามารถทำลายสายตาได้(Gerald, 1973)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

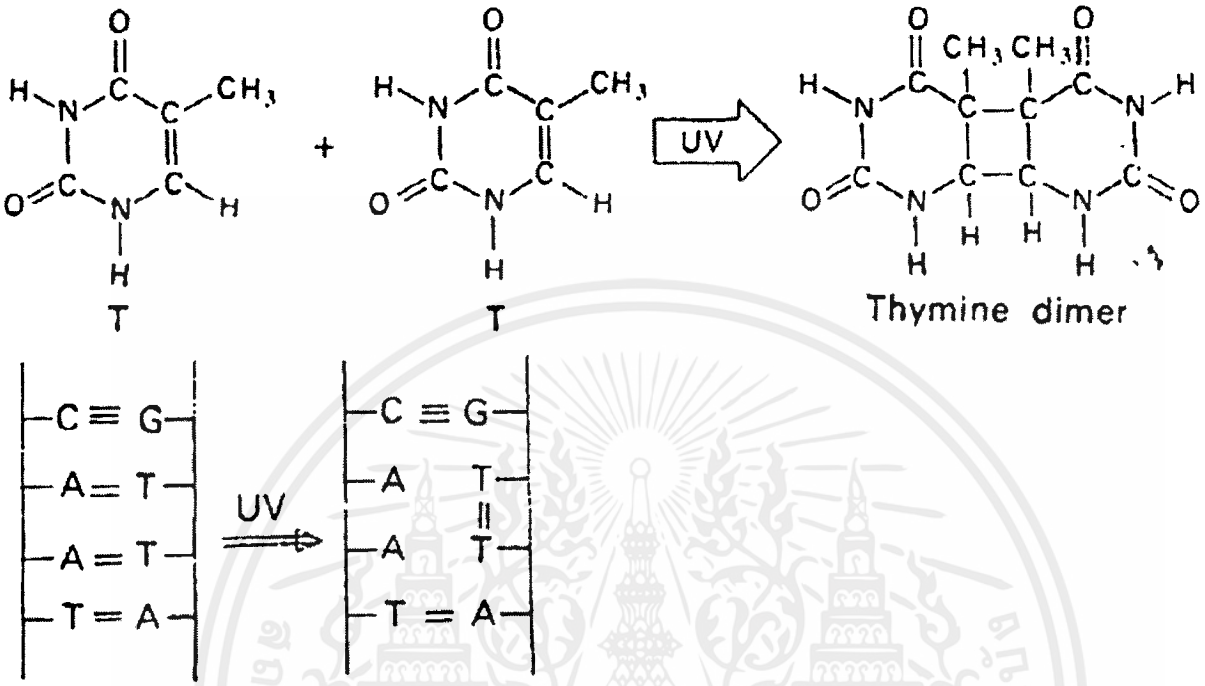
ผลของมิวเตชั่นจากการให้แสงอัลตราไวโอเลตจะไม่สอดคล้องกับทฤษฎีการกระทบเป้า (target theory) ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ (dosage) และอัตรามิวเตชั่นจะไม่เป็นแบบเส้นตรง แต่จากการทดลองกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ปรากฏว่าได้กราฟเส้นโค้งหลาย ๆ แบบ เช่นนี้แล้วก็แสดงว่ามิวเตชั่นย่อมเกิดจากการกระทบกับเป้าหมายหลาย ๆ ครั้ง ซึ่งการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นวิธีการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กับเชื้อรา (ชวนพิศ, 2536) ซึ่งความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์จะใกล้เคียงกับการแผ่รังสีอัลตราไวโอเลต ความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถคำนวณได้จากอัตราการอยู่รอดของจำนวนโคโลนีภายหลังการฉายแสง ถ้าให้แสงอัลตราไวโอเลตสูงขึ้นจะทำให้อัตราการกลายและอัตราการตายเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงให้อัตราการกลายพันธุ์สัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของจุลินทรีย์ภายหลังได้รับแสงอัลตราไวโอเลต (Gerald, 1973)

ผลอันน่าสนใจประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลตก็คือ การเกิด photoreactivation คือ ผลของการใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะบรรเทาลงหรือหมดไป เมื่อให้เซลล์ถูกกับแสง (visible light) และได้มีการค้นพบถึงรวามผิดปกติที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายของแสงอัลตราไวโอเลต กล่าวคือแสงอัลตราไวโอเลตที่มองเห็นด้วยตาเปล่าสามารถทำให้เซลล์ถูกเปลี่ยนไปจากสภาพเดิมได้ (Gerald, 1973) ปรากฏการณ์เช่นนี้ได้มีการพบในแบคทีเรียและไวรัส ทั้งนี้เกิดจากการที่มีเอนไซม์บางชนิดเข้าไปตัดให้ไทมีนในไทมีนไดเมอร์แยกจากกัน และทำให้ DNA กลับคืนสู่สภาพเดิม การซ่อม DNA หรือการทำให้มิวเตชั่นเปลี่ยนกลับโดยขบวนการที่กล่าวมานี้จะเกิดได้ดีในแสงสีน้ำเงิน อย่างไรก็ดียังมีการพบว่าใน E. coli นั้นอาจมีการขจัดไดเมอร์โดยวิธี dark reactivation ซึ่งหมายถึงว่าปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นโดยไม่ต้องการแสง (visible light) การขจัดแบบนี้พบว่าเกิดจากการที่มีเอนไซม์บางอย่างตัดไดเมอร์จาก DNA ทิ้งแล้วจะมีนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าไปแทนที่ในส่วนนั้น

การแสดงออกของยีนที่เกิดความล่าช้า เนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ หลายปัจจัยมีดังต่อไปนี้

1.) การกลายพันธุ์ของยีนไม่สามารถเกิดได้ทันทีหลังจากได้รับแสงอัลตราไวโอเลต
2.) ยีนที่จะกลายพันธุ์ต้องใช้เวลามากกว่าปกติเพื่อให้เกิด metabolic activity ก่อนที่จะเกิดการกลายพันธุ์ต่อไป
3.) การแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์จะเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 แสดงการเกิดไทมีนไดเมอร์

ที่มา : Gerald (1973)

2. สิ่งก่อการกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen)

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

อย่างไรก็ตามสารเคมีบางชนิดอาจจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งแต่จะไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง สารเคมีบางชนิดอาจจะมีผลในช่วงที่มีการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตหรือมีผลเฉพาะในเพศใดเพศหนึ่งเท่านั้น เช่น สารฟอร์มัลดีไฮด์จะก่อเกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ตัวผู้ระยะที่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวหนอน แต่จะไม่มีผลต่อตัวเมียระยะที่เป็นตัวหนอน นอกจากนี้สารเคมีแต่ละชนิดก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีนแต่ละตำแหน่งด้วยความถี่ที่แตกต่างกัน

มีรายงานว่าสารแมงกานีสคลอไรด์ (manganese chloride) สามารถชักนำให้แบคทีเรียที่ต้องการสารอาร์จีนีน (arginine-requiring mutant) เปลี่ยนแปลงเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์แท้ได้ด้วยความถี่ 1720 x 10^{-8} และชักนำให้แบคทีเรียที่ต้องสารฟีนิลอะลานีน (phenylalanine-requiring mutant) เปลี่ยนแปลงเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์แท้ได้ด้วยความถี่ 1.1 x 10^{-7}

4.4. การนำไปใช้งาน

นอกจากมิวเตชั่นจะเป็นกลไกสำคัญทำให้เกิดความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมและเป็นรากฐานสำคัญของกระบวนการวิวัฒนาการแล้ว มิวเตชั่นยังเป็นปัจจัยสำคัญในการศึกษาพันธุศาสตร์และการผสมพันธุ์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สัตว์และพันธุ์พืชที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ทั้งพวกพืชสวน พืชไร่ และพวกไม้ประดับต่าง ๆ ซึ่งเป็นที่นิยมกันอยู่โดยทั่วไปในปัจจุบัน การชักนำให้เกิดยีนมิวเตชั่นในสัตว์โดยเฉพาะแมลงที่เป็นพาหะนำโรคหรือแมลงศัตรูพืชนับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากในการคัดเลือกพันธุ์แมลงเพื่อผลประโยชน์ทางการควบคุมหรือการกำจัดแมลงพาหะหรือแมลงศัตรูพืชนั้น ๆ โดยวิธีการทางพันธุศาสตร์

การศึกษามิวเตชั่นควบคู่กับการคัดเลือกพันธุ์ในพวกจุลินทรีย์มีประโยชน์อย่างยิ่งในทางอุตสาหกรรมบางประเภทที่เกี่ยวของกับผลผลิตของพวกจุลินทรีย์ อันได้แก่การผลิตยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลลิน สเตรปโตรมัยซิน การคัดเลือกพันธุ์ไรโซเบียมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน เหล่านี้เป็นต้น จากรายงานของ Anwar และคณะ (1996) พบว่าจากการใช้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อก่อให้เกิดการกลายกับ *Penicillium purpurogenum* สามารถต้านการข่มของคะตะบอไลต์ในกระบวนการผลิตได้ และรายงานของ Anwar และคณะ (1996) พบว่าสายพันธุ์กลายของ *Penicillium camebertii* สามารถผลิตกรดไซโคลเปียโซนิก (cyclopiazonic acid : CA) ได้ปริมาณมากขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์แท้ และเส้นใยของเชื้อชนิดสามารถนำมาผลิตไวท์ชีท (white cheese) ได้

Singh และคณะ (1991) ได้ทำการทดลองกลายพันธุ์สายพันธุ์ *Fusarium oxysporum* เป็นสายพันธุ์กลายสายพันธุ์ใหม่ 4 สายพันธุ์โดยเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์ *Monilia brunnea* 1362 โดยใช้ไซแลนจากผิวของมันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ 28.5 อินเตอร์เนชันแนลยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลามากกว่า 72 ชั่วโมงของการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเจริญก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพเพื่ออำนวยความสะดวกสบายในรูปแบบต่าง ๆ แก่มนุษย์โดยไม่ใช้ความระมัดระวังให้ดีแล้วจะส่งผลกระทบย้อนกลับมาให้โทษแก่มนุษย์อย่างไม่มีทางหลีกเลี่ยง ดังจะเห็นว่าโครงการปฏิรูปปรมาณู รังสีเอ็กซ์ และแสงอัลตราไวโอเลตที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมและการแพทย์ เครื่องรับโทรทัศน์สี สารกัมมันตรังสี
รวมทั้งพวกสารเคมีกันบูดในอาหาร สีย้อมผ้า ใยพลาสติก เป็นต้น ซึ่งล้วนแล้วแต่ให้คุณอนันต์แต่อาจเป็นโทษมหันต์ได้ถ้าหากใช้ไม่ถูกต้องตามหลักวิชาการ

ดังนั้นปัจจัยที่มีฤทธิ์ชักนำให้เกิดมิวเตชั่นในสิ่งมีชีวิตทั่วไปรวมทั้งในคนจึงมีบทบาทอย่างยิ่งต่อสังคมมนุษย์ทั้งในปัจจุบันและอนาคต เพราะมิวแตนต์ยีนที่เกิดขึ้นส่วนมากเป็นยีนไม่ดีและบางกรณีอาจเป็นอันตรายต่อชีวิตไม่ว่ายีนนั้นมีสมบัติเด่นหรือด้อยก็ตาม หรืออาจเป็นยีนที่เป็นต้นเหตุของโรคทางกรรมพันธุ์ต่าง ๆ ที่สามารถถ่ายทอดกระจายไปในกลุ่มยีนของมนุษย์ต่อไปอย่างไม่หยุดยั้ง อันจะเป็นภาระต่อเศรษฐกิจและสังคมของมนุษยชาติที่มีราคาแพงและหลีกเลี่ยงไม่พ้น ยิ่งไปกว่านั้นนักวิทยาศาสตร์ยังพบข้อมูลที่แสดงว่าปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวนอกจากจะสามารถชักนำให้เกิดมิวเตชั่นได้แล้วก็ยังอาจเป็นต้นเหตุของโรคมะเร็งอีกด้วย กระนั้นก็ตามโทษที่อาจเกิดจากปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ถ้ารุนแรงขนาดถึงแก่ชีวิตก็ยังคงไม่โหดร้ายไปกว่าตัวการที่ทำให้เกิดมิวแตนท์ยีนเลว ซึ่งอาจถ่ายทอดต่อไปในกลุ่มประชากรและสร้างปัญหาให้แก่สังคมมนุษย์ในระยะยาว

5. การผลิตเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์

5.1. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์

1. แหล่งคาร์บอน

Chachal (1985) เลี้ยงเชื้อ *Trichodema reesei* QMYI ในอาหารเหลว โดยใช้ความเข้มข้นของฟางข้าวสาลี ต่างกันคือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (เซลลูโลส 0.4 %) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (เซลลูโลส 2.0 %) พบว่ากิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดในฟางข้าวสาลี 1.0 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1.65 ยูนิต / มิลลิลิตร ได้ผลผลิตของเซลลูเลส เท่ากับ 412 ยูนิต / กรัมเซลลูโลส และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟางข้าว เป็น 5.0 เปอร์เซ็นต์ เวลาในการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 7 เป็น 11 วัน กิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเป็น 6.0 ยูนิต / มิลลิลิตร แต่ผลผลิตของเซลลูเลสลดลงเป็น 300 ยูนิต / กรัม ซึ่งการลดลงของผลผลิตอาจเนื่องจาก การถ่ายเทมวลสารเกิดขึ้นน้อยในสารละลายที่เข้มข้นมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Debeau และคณะ (1987) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Chaetomium cellulolyticum* เพื่อทำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยใช้ไซแลน ร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 15.6 อินเตอร์เนชันแนลยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายหลังเวลา 30 ชั่วโมงของการหมัก

ส่วนการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ชักนำการสร้างเบตาไซโลซิเดสที่มีผู้ศึกษาไว้ เช่น Ghosh และ Kunda (1980) พบว่า Tamarind (Tamarindus indica) Kernel Polysaccharide (TKP) สามารถชักนำการสร้างไซโลซิเดสของ *Aspergillus terreus* เป็นอย่างดี โดยการใช้ TKP 2.5% ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งจะให้แอคติวิตีเท่ากับ 2.32 หน่วยต่อมล. ในขณะที่เมื่อไซแลน 1% เป็นแหล่งคาร์บอนให้แอคติวิตีเพียง 0.85 หน่วยต่อมล.

นอกจากนี้ Smith และ Wood (1991) พบว่าสามารถใช้ ball-milled oat straw เพื่อเลี้ยง *Aspergillus awamori* AANTG43 ซึ่งให้แอคติวิตีของเบตาไซโลซิเสได้เท่ากับ 3.0 หน่วยต่อมล.

ส่วนในประเทศไทยมีรายงานครั้งล่าสุดโดย อัญชลิดา (1999) ได้ทำการทดลองใช้ส่วนที่เหลือจากผลิตผลทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้ฟางข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีความสัมพันธ์ของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดถึงประมาณร้อยละ 100

จากรายงานที่มีผู้ได้ทำการทดลองมาก่อนเหล่านี้ทำให้ทราบว่า แหล่งคาร์บอนสามารถได้จากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ และทราบว่าในช่วงหลังการทดสอบแหล่งคาร์บอนนิยมใช้ส่วนที่เหลือจากผลิตผลทางการเกษตรซึ่งให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณค่อนข้างสูง อีกทั้งยังลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสอีกด้วย

2. แหล่งไนโตรเจน

Joglkar และ Karanth (1984) เลี้ยง *Aspergillus funiculosum* UV-49 ในอาหารเหลว พบว่ายูเรียและ $NaNO_3$ (ไนโตรเจน 0.5 กรัม / ลิตร) ดีกว่า $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4NO_3 และดีกว่าเคซีน และเปลือกถั่วลิสง หากเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนมากกว่า 0.5 กรัม / ลิตร พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้น เมื่อใช้ไนโตรเจนอนินทรีย์ ส่วนการใช้ไนโตรเจนอินทรีย์กิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 1-1.2 กรัม / ลิตร อย่างไรก็ตามการเพิ่มไนโตรเจนเป็นการเพิ่มต้นทุนและไนโตรเจนมากกว่า 2 กรัม/ลิตร จะเพิ่มปัญหาคือทำให้คือ pH ของอาหารเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูง ซึ่งไม่เหมาะในการผลิตเอนไซม์

Gomes และคณะ (1989) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อ *Gliocoadium virens* พบว่าแหลงไนโตรเจนอินทรีย์ที่ดีที่สุดคือ Bactopeptone เข้มข้นร้อยละ 0.2 อาจเนื่องมาจากมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญและการผลิตเซลลูเลสของเชื้อและถ้าความเข้มข้นมากกกว่า 0.4 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการเจริญการผลิตเอนไซม์

3. เกลือแร่

Desrochers และคณะ (1981) ทดสอบผลของความเข้มข้นของ KH_2PO_4 0.13 0.20 และ 0.27 เปอร์เซ็นต์ต่อการผลิตเบตา-กลูโคซิเดส ของเชื้อ *Schizophyllum commune* พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 0.20

Gomes และคณะ (1989) พบว่าความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ที่เพิ่มการผลิตเซลลูเลสของเชื้อ *Gliocoadium virens* คือ ร้อยละ 1.0

4. พีเอช

พีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การหมักในระยะแรกพีเอชของการเลี้ยงเชื้อเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชเปลี่ยนแปลง อาจเกิดการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนีย หรือสารประกอบที่เป็นด่างอื่นๆออกมา หรือมีการย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์ขึ้น เป็นผลให้พีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหาร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพีเอชอย่างช้าๆ บัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา

5. อุณหภูมิ

ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ แต่ละชนิดแตกต่างกัน ในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทลงสู่อาหาร ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งที่จุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ ดังนั้นในกระบวนการหมักต่างๆจึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างไซลาเนสส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส แต่ก็มีจุลินทรีย์บางกลุ่ม เช่น รา แอคติโนมัยซิส หรือแบคทีเรีย ที่สามารถเจริญในที่อุณหภูมิสูงและสามารถสร้างไซลาเนสได้ จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยการเลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจะช่วยให้ได้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ต้องการและยังลดปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่อาจต้องสูญเสียไปอย่างไม่จำเป็น

Dubeau และคณะ (1987) ได้ทำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Chaetomium cellulolyticum* โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Smith และ Wood (1991) ได้ทำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus awamori* โดยทดลองใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นตั้งแต่ 10^4 ถึง 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่า การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากกว่า 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณน้อย ส่วนการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณสูงและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

Singh และคณะ (1995) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์กลายของ *Fusarium oxysporum* เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในปริมาณมากโดยในการทดลองใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 ถึง 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณที่สูงพอสมควร

อัญชลิดา (1999) ทำการศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้ส่วนที่เหลือจากผลิตผลทางการเษตรด้วยกระบวนการหมักแบบแข็ง โดยเลือกปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ $1.2x10^5$ สปอร์ต่อกรัมฟางข้าวเจ้า พบว่าจะให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนส $16.8x10^4$ ยูนิตต่อกรัมฟางข้าวเจ้า ภายหลังทำการบ่ม 6 วัน

7. ตัวลดแรงตรึงผิวและกรดไขมัน

ตัวลดแรงตรึงผิวและกรดไขมันนิยมถูกเติมลงไปด้วย โดยตัวลดแรงตรึงผิวและกรดไขมันเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากทั้งตัวลดแรงตรึงผิวและกรดไขมันสามารถช่วยเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ไซลาเนสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา ส่วนใหญ่ผู้ที่ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสก็จะมีการเติมสารปรุงแต่งทั้ง 2 ชนิด

Dubeau และคณะ (1987) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Chaetomium cellulolyticum* ได้มีการเติม Tween-80 ร้อยละ 0.05 ซึ่งเป็นตัวลดแรงตรึงผิวลงในอาหารสำหรับลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนส 15.6 อินเตอร์เนชันแนลยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิม 1.6 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Deshpande และคณะ (1987) ได้ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของกรดไขมันที่มีต่อ *Penicilium funiculosum* และสายพันธุ์กลาย โดยทำการทดสอบเติมกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังทำการเติม Tween-80 ร้อยละ 0.1 จะช่วยเพิ่มปริมาณเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ถึง 1.5 ถึง 2.0 เท่า

Singh และคณะ (1995) ได้ทำการเติมตัวลดแรงตรึงผิวและกรดไขมันลงในอาหารสำหรับการเจริญของ *Fusarium oxysporum* NTG-19 โดยมีการทดลองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าการเติมน้ำมันมะกอก ร้อยละ 0.2 จะช่วยให้มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงถึง 53 อินเตอร์เนชันแนลยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4

8. การให้อากาศ

การเจริญของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนวัตถุดิบหรือสารอาหารใดๆไปเป็นผลิตภัณฑ์ อาจเกิดขึ้นได้ในสภาพที่มีอากาศหรือไร้อากาศขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการหมักและชนิดของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลเนสเป็นกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศ วิธีที่จะทำให้จุลินทรีย์ได้รับอากาศเพียงพอ ทำได้โดยการให้อากาศระหว่างการหมักซึ่งต้องควบคุมให้พอเหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์จะมากน้อยเพียงใด ขึ้นกับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ จำนวนรอบของการเขย่าหรือการกวน และปริมาตรของสารอาหารต่อปริมาตรของถังหมัก

ตารางที่ 4 แสดงอิทธิพลของตัวลดแรงตรึงผิวและกรดไขมันที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส

Addition	Concentration (%)	Xylanase (IU ml^{-1})	β-Xylosidase (IU ml^{-1})
None	—	38.8	9.3
Tween-80	0.1	40.8	10.8
	0.2	44.2	11.5
	0.3	43.5	11.8
Olive oil	0.1	44.7	11.9
	0.2	53.0	13.4
	0.3	53.0	13.9

[a]Incubation time, 120 h. Values are the means of three replicate experiments

ที่มา : Singh และคณะ (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างเอนไซม์ไซลาเนสนั้น พบว่าจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียจะใช้เวลาในการเจริญและสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดที่เวลาประมาณ 2-3 วัน แต่เชื้อราต้องใช้เวลาในการเจริญและสร้างเอนไซม์สูงสุดที่เวลาประมาณ 4-10 วัน

Joglekar และคณะ (1984) เลี้ยง *Penicillium funiculsum* ในถังหมัก พบว่าการเจริญจะเกิดขึ้นรวดเร็วในถังหมักและมีผลให้เกิดมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นหนาแน่นภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งความหนืดของน้ำเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามเวลาและมีค่าสูงสุดที่ 72-96 ชั่วโมง จากนั้นลดลง การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มเร็วมากในช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมงโดยจะให้ค่า exo-beta-D-glucose และ beta-glucosidase ภายใน 72 ชั่วโมง เป็น 3, 26 และ 9 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Gomes และคณะ(1989) เลี้ยง *Gliocodium virens* ในฟลาส์กเพื่อการผลิตเซลลูเลสและไซลาเนสในฟางข้าวสาลีที่ผ่านการแปรสภาพด้วยไอน้ำ พบว่าเริ่มมีการสังเคราะห์เอนไซม์ภายใน 24 ชั่วโมงของการบ่ม การเปลี่ยนแปลงพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังการบ่ม 1 วัน และลดลงในวันที่ 2 และ 3 ไมซีเลียมจะเกิดการสลายตัวเอง (Autolysis) ปลดปล่อยเอนไซม์ลงสู่อาหาร พีเอชเพิ่มขึ้น ระยะเวลาการปรับตัว (lag phase) ของเชื้อลดลง การใช้แอมโมเนียและการลดลงของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (ลิกโนเซลลูโลสกับไมซีเลียม) ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมักและลดลงช้ามากหรือหยุดในช่วงที่มีการเจริญคงที่ และการใช้ลิกโนเซลลูโลสก็ช้าด้วย ซึ่งอาจเนื่องมาจากการมีน้ำตาลอิสระ ทำให้เกิดการยับยั้งหรือเนื่องมากการขาดสารอาหารในการเลี้ยงเป็นผลให้การเจริญของเชื้อราช้าและลดการใช้เซลลูโลส จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้ค่า Fpase beta-glucosidase และ Xylanase 0.33, 1.52, 30.45 ยูนิต ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงในถังหมักได้ Fpase beta-glucosidase และ Xylanase เป็น 0.25, 0.77 และ 24.04 ยูนิต ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆเพื่อสร้างไซแลเนส

สายพันธ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (°C)	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus sp. AANG19	4	35	4-7	Smith and Wood,1991b
Aspergillus fumigatus	-	40	5	Kitpreechavanich et al.,1986
Aspergillus niger	5.5	30	3	John et al., 1979
Aspergillus ochraces	6.5	30	6-14	Biswas et al., 1987
Aspergillus terreus	4.8-4.9	30	7	Ghosh and Kunda , 1980
Bacillus circulan	8.0-8.5	30	2-3	Ratto et al., 1992
Butyrivibrio fibrisolven	6.8-7.0	37	2	Sewell et al., 1988
Dictyoglomus sp. B 1	7.0	68	3	Ratto et al., 1994
Cellulomonas uda	7.0	30	5	Rapp and Wagner,1986
Penicillium wortmanni	5.4	30	5	Matsuo et al., 1987
Rhodobacter marinus	7.1	65	2	Dahlberg et al., 1993
Rhoderthesmus marinus	7.1	65	1	Dahlberg et al., 1993
Streptomyces sp. T 7	7.0	50	3	Ross et al ., 1992
Thermoascus aurantiacus	5.0-5.5	45	8	Gomes et al., 1994
Thermoascus aurantiacus	4.0	50	-	Gomes et al., 1994
Thermomonospora fusca	8.0	50	3	Bechmann and McCarthy,1989
Thermomonospora fusca BD 25	7.0	50-55	2-4	Trigo and Ball,1994
Thermomonospora strain LL	7.6	55	2	Ristroph and Humphreyt,1985
Thermomyces lanufinosa	-	50	5-6	Gomes et al., 1993

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การนำเอนไซม์ไซลาเนสไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม

6.1. การผลิตกระดาษ

การผลิตกระดาษมีหลายวิธี การที่จะใช้วิธีใดนั้นขึ้นกับว่าเยื่อกระดาษที่ได้จะนำไปทำกระดาษชนิดใด นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ กรรมวิธีที่ใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษ แบ่งตามกรรมวิธีใหญ่ๆดังนี้

1. กรรมวิธีใช้กำลังกล (mechanical process) วิธีใช้แรงอัด อัดท่อนไม้ที่ปลอกเปลือกแล้วให้สัมผัสหินบด(grinding stone) ซึ่งผิวหน้าของหินบดมีลักษณะมีคม เช่นเดียวกับหินลับมีด ไม้จะถูกับดอกมาเป็นชิ้นเล็กๆ เครื่องจักรที่ใช้ผลิตเยื่อชนิดนี้ เรียกว่า เครื่องบด(grinder) เนื่องจากขณะที่ไม้ถูกฝนอยู่นั้นจะมีความร้อนจากการเสียดสีเกิดขึ้น อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส จึงจำเป็นต้องพ่นน้ำให้เป็นละอองอยู่ตลอดเวลา และส่วนหนึ่งของหินบดจะหล่ออยู่ในอ่างน้ำ เยื่อที่ถูกบดออกมาจะอยู่ในอ่างนี้ และจะถูกระบายออกจากอ่างน้ำตลอดเวลา การผลิตโดยวิธีนี้ให้ผลผลิตสูงมากถึง 90-95 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักไม้ที่เป็นวัตถุดิบ แต่คุณสมบัติของกระดาษที่ได้จากการผลิตเยื่อกระดาษวิธีนี้มีคุณภาพต่ำ จึงใช้เป็นส่วนผสมในการทำกระดาษบางประเภท จะให้คุณสมบัติด้านทึบแสง เส้นใยเดี่ยวซึ่งไม่ค่อยสมบูรณ์อาจมีการฉีกขาดและยังคงมีลิกนินตกค้างอยู่มาก ทำให้พันธะระหว่างเส้นใยต่ำไม่เหมาะที่จะนำไปทำกระดาษที่ต้องรับแรงดึงสูงแต่มีราคาถูก เช่น กระดาษห่อของกล่องใส่ของ ซึ่งไม่มีความจำเป็นต้องเก็บไว้นานๆ

2. กรรมวิธีทางเคมี (chemical process) วิธีนี้ใช้สารเคมีบางชนิดละลายลิกนินที่ทำหน้าที่เป็นกาวเชื่อมเซลของไม้เข้าด้วยกัน ทำให้แต่ละเซลของไม้แยกหลุดออกจากกัน กรรมวิธีทางเคมีนี้แบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆดังนี้

2.1 กรรมวิธีซัลไฟต์ (sulphite process) กรรมวิธีนี้เกิดขึ้นครั้งแรกในยุโรป เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้ เรียกว่า เยื่อกระดาษซัลไฟต์ (sulphite pulp) สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำยา ได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ นำมาละลายในน้ำที่มีด่างบางตัวละลายอยู่ เบสที่ใช้ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม แอมโมเนียม หรือโซเดียม ซึ่งซัลเฟอร์ไดออกไซด์ละลายอยู่ในน้ำในสภาพกรดซัลฟูรัส การใช้ด่างแต่ละตัวค่าพีเอชของน้ำยาที่ได้จะแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้พีเอชของน้ำยาที่ต้องการจึงจำเป็นต้องเลือกด่างที่เหมาะสม ในการย่อยกระดาษนั้นชิ้นไม้จะถูกลำเลียงลงสู่ถังย่อยพร้อมด้วยน้ำยาสำหรับย่อย จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง แล้วแต่ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ วิธีการต้มและชนิดของถังย่อย ลิกนินในไม้จะรวมกับไฮโดรเจนซัลไฟต์เกิดเป็นลิกโนซัลเฟอร์เนท ซึ่งละลายน้ำได้จึงทำให้ไฟเบอร์ของไม้แยกหลุดออกจากกันเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชิ้นไม้ เมื่อถูกย่อยดีแล้วน้ำยาจะถูกระบายออกจากถังย่อย และบางครั้งยังสามารถนำกลับไปใช้ได้อีก สำหรับชิ้นไม้จะถูกระบายออกจากถังย่อย

การร่อนเยื่อ(screening) ชิ้นไม้ที่ย่อยแล้วจะถูกล้างด้วยน้ำเพื่อเอาน้ำยาออกและกรองด้วยตะแกรงแบบต่างๆ เพื่อเอาส่วนที่เป็นตาไม้ซึ่งไม่ถูกย่อย หรือสิ่งสกปรกต่างๆออก การกรองทำหลายขั้นตอนด้วยกัน เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสิ่งสกปรกเจือปนอยู่ เยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีซัลไฟต์มีสีค่อนข้างจางเกือบเป็นสีขาว สามารถนำไปทำเป็นกระดาษบางประเภทได้เลย เช่น กระดาษหนังสือพิมพ์รายวัน รายปักษ์ โดยเฉพาะเยื่อกระดาษที่ทำจากไม้ที่มียาง ได้แก่ ไม้สน สำหรับคุณสมบัติของเยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีอื่นก็คือ เมื่อนำไปทำกระดาษแล้วให้ความแข็งแรงกว่าเยื่อกระดาษที่ได้จากวิธีกล แต่ผลผลิตที่ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักไม้ที่ใช้

2.2 กรรมวิธีซัลเฟต (sulphate process) หรือเรียกอีกอย่างว่า กรรมวิธีคราฟท์ (kraft process) การที่เรียกอย่างนี้เพราะว่าในการที่เอาโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำยาที่ใช้แล้วกลับมาใช้อีกจะต้องเติม โซเดียมซัลเฟตลงไป จึงเรียกกรรมวิธีนี้ว่า กรรมวิธีซัลเฟต หรือเนื่องจากว่าเยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีนี้มีลักษณะเหนียวแข็งแรง สารเคมีที่ใช้กับกรรมวิธีนี้คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์กับโซเดียมซัลเฟต์เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้อาจมีโซเดียมคาร์บอเนตและโซเดียมซัลเฟตบ้างเล็กน้อย การย่อยเยื่อกระดาษทำในถังย่อยเช่นเดียวกับวิธีซัลไฟต์ อุณหภูมิที่ใช้ 170 องศาเซลเซียส เวลา 3-4 ชั่วโมง กรรมวิธีนี้ใช้ได้กับเยื่อไม้ทุกชนิดทั้งไม้สนและไม้เนื้อแข็ง เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้จะมีลักษณะสีคล้ำ แต่เหนียว สามารถนำไปใช้ทำกระดาษที่ต้องการความแข็งแรงมากๆได้ดี เช่น ถุงกระดาษใส่ซีเมนต์ ปุ๋ย ถุงใส่ของ กล่องกระดาษ ส่วนสีสามารถทำให้ขาวได้โดยการฟอกสี

2.3 กรรมวิธีโซดา (soda process) เป็นกรรมวิธีทางเคมีวิธีแรกที่ค้นพบและนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมโดยชาวอังกฤษ กรรมวิธีนี้ใช้สารเคมีที่สำคัญ คือโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรรมวิธีนี้ย่อยไม้เนื้อแข็งได้ดีกว่าไม้เนื้ออ่อน เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้ให้ผลผลิตน้อย คือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักของไม้ และความแข็งแรงของเยื่อเมื่อนำมาทำกระดาษค่อนข้างต่ำ ต่ำกว่าเยื่อที่ได้โดยวิธีซัลเฟต และมีสีน้ำตาลคล้ำ ต่อาจทำให้ขาวได้โดยการฟอกสี การย่อยเยื่อกระดาษจะย่อยในถัง ปริมาณสารเคมีที่ใช้คือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15-20 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งของไม้ อุณหภูมิที่ใช้ 160-170 องศาเซลเซียส เป็บเวลา 4-6 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้และผลผลิตที่ต้องการ

<u>กระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ</u>

สำหรับขั้นตอนการฟอกเยื่อมีจุดประสงค์เพื่อกำจัดลิกนินออกไป ซึ่งทำให้เยื่อมีความขาวสว่างมากขึ้นโดยใช้สารเคมีทำปฏิกิริยากับลิกนินในเนื้อไม้ การฟอกเยื่อประกอบด้วยหลายขั้นตอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีชื่อเรียกตามสารเคมีที่ใช้ในการฟอกและเรียงตามลำดับตัวอักษรตัวแรกของแต่ละขั้นตอนโดยสารเคมี สัญลักษณ์ และชื่อขั้นตอนการฟอกต่างๆมีดังนี้

สารเคมี	สัญลักษณ์	ชื่อเรียกขั้นตอนการฟอก
คลอรีน	C	ขั้นตอนคลอริเนชั่น(chorination stage)
โซเดียมไฮดรอกไซด์	E	ขั้นแอกแทรกชั่น (extraction stage)
แคลเซียมไฮโปคลอไรด์	H	ขั้นไฮดปคลอไรด์(hypochlorite stage)
คลอรีนไดออกไซด์	D	ขั้นคลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide stage)
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	P	ขั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide stage)
ออกซิเจน	O	ขั้นออกซิเจน(oxygen stage)
โอโซน	Z	ขั้นโอโซน(ozone stage)

ตัวอย่างของขั้นตอนการฟอก เช่น CEH, CEDED, CEDEP, CEOP ซึ่งทางโรงงานจะเลือกวิธีการฟอก โดยพิจารณาจากชนิดของกระดาษที่ต้องการผลิต มีความจำเป็นอย่างมากในการเลือกวิธีการฟอกให้เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อคุณภาพของเยื่อและลดต้นทุนการผลิตให้น้อยที่สุด

เยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ฟอกจะมีสีคล้ำ โดยฉพาะเยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีซัลเฟตและโซดา การนำไปใช้จำเป็นต้องฟอกสีก่อน เว้นแต่ในกระดาษบางชนิดที่ถือว่าสีมีความสำคัญเป็นอันดับรองๆลงมาจึงไม่จำเป็นต้องฟอกสีก่อน เว้นแต่ในกระดาษบางชนิดที่ถือว่าสีมีความสำคัญเป็นอันดับรองๆลงมาจึงไม่จำเป็นต้องฟอกสีก่อน เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีซัลไฟต์ปกติสีจะจางค่อนข้างขาว และที่ได้โดยวิธีกลเหมือนสีของไม้ที่ใช้ แต่เนื่องจากว่ามีสารที่ให้สีต่างๆปนอยู่ เช่น แทนนิน ลิกนิน เรซิน ดังนั้นเมื่อทำเป็นกระดาษแล้วเมื่อเก็บไว้นานๆ หรือถูกแสงแดดสีจะเปลี่ยนไป ซึ่งเยื่อกระดาษชนิดนี้เหมาะสำหรับใช้ทำกระดาษพิมพ์ หนังสือคุณภาพต่ำหรือกระดาษห่อของ การฟอกสีเยื่อกระดาษมีหลักในการพิจารณาขั้นตอนใหญ่ๆ คือ ถ้าการฟอกนั้นต้องเอาลิกนินและสารให้สีต่างๆออกจากเยื่อกระดาษ ในกรณีนี้จะฟอกเยื่อกระดาษที่มีลิกนินปนอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ถ้าเยื่อกระดาษที่มีลิกนินเหลืออยู่มากก็ไม่เป็นการประหยัด การเอาลิกนินออกจากไม้ทำได้โดยใช้เทคนิคในการต้ม(cook) ไม้ดีกว่าการฟอก

การใช้ไซแลนย่อยเฮมิเซลลูโลสในการฟอกกระดาษ จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้สารเคมีในขั้นตอนการกำจัดลิกนินออกจากเยื่อกระดาษ (Viikari และคณะ., 1986) วิธีการที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์นี้จะทำให้ได้กระดาษที่มีค่าความขาวสว่างสูงมากขึ้น หรือลดการใช้สารเคมีในการฟอกสี และลดสารพิษที่จะตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะสามารถลดปริมาณการใช้ก๊าซคลอรีนซึ่งเป็นสาเหตุในการทำให้เกิดสารพิษจำพวกสารประกอบคลอรีน

Wong และคณะ (1997a) ทดสอบผลของไซแลนเนสในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เอนไซม์เข้าช่วยในเยื่อกระดาษจากต้นไม้ 3 ชนิดคือ Douglas-fir Westernhemlock และ Trembling Aspen โดยเพิ่มกระบวนการฟอกด้วยไซแลนเนสก่อนหรือหลังการฟอกเยื่อด้วยเปอร์ออกไซด์ พบว่าเยื่อทุกชนิดมีค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น การใช้ไซแลนเนสทั้งก่อนและหลังการฟอกด้วยเปอร์ออกไซด์จะได้เยื่อระดาษที่มีค่าความขาวสว่างสูงสุด คาดว่าการใช้เอนไซม์จะมีผลส่งเสริมการฟอกเยื่อด้วยเปอร์ออกไซด์ให้ได้ผลดียิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไซแลนเนสหลังเปอร์ออกไซด์ มีลิกนินและโครโมฟอร์ละลายออกจากเยื่อน้อยกว่า แต่ก็ยังได้ค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษเท่ากันหรือมากกว่าการใช้ไซแลนเนสก่อนเปอร์ออกไซด์เมื่อเทียบกับเยื่อที่ยังไม่ฟอก

Christov และ Prior (1994) ทดสอบโดยใช้เอนไซม์หยาบ (crude enzyme) จาก *Aureobasidium pullusans* ในการกำจัดเพนโตซานจากเยื่อซัลไฟต์ที่ไม่ผ่านการฟอก พบว่าเมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการฟอกจะทำให้ปริมาณเพนโตซานและ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในเยื่อลดลงแสดงว่าปริมาณเฮมิเซลลูโลสในเยื่อกระดาษลดน้อยลงด้วย ในการทดสอบการใช้เอนไซม์ร่วมกับด่างในการฟอกเยื่อจะช่วยกำจัดเพนโตซานออกจากเยื่อได้มากกว่าการใช้เอนไซม์เพียงอย่างเดียวโดยการใช้เอนไซม์ 450 ยูนิต ต่อเยื่อ 1 กรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อฟอกเยื่อต่อด้วยด่าง ทำให้ประมาณเพนโตซานลดลง 35 เปอร์เซ็นต์ ค่าคัปปานัมเบอร์ ลดลง 30 เปอร์เซ็นต์ การย่อยด้วยเอนไซม์จะได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นไซโลส ขณะที่กระบวนการสกัดด้วยด่างจะได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นไซโลไบโอส

การใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ มีจุดมุ่งหมายเพื่อลดการใช้พลังงานในการผลิตเยื่อกระดาษ ปรับปรุงสมบัติการให้น้ำไหลผ่านในการทำกระดาษรีไซเคิล เพิ่มความสามารถในการบดเยื่อกระดาษ และปรับปรุงคุณภาพของเส้นใย การผลิเยื่อกระดาษแบบวิธีกลจะได้ปริมาณเยื่อมากแต่ยังคงเหลือลิกนินและเฮมิเซลลูโลสอยู่ในเยื่อเกือบทั้งหมด (Saddler, 1993) ได้ศึกษาบทบาทของไซแลนเพื่อปรับปรุงคุณภาพเยื่อกระดาษโดยใช้ไซแลนเนสจาก *Sporotrichum dimorphosporum* ฟอกเยื่อกระดาษ จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่าเยื่อที่ผ่านไซแลนเนสจะมีความยืดหยุ่นดี บ่งชี้ว่าเกิดจากมีการเปลี่ยนแปลงภายในเส้นใยของเยื่อ นอกจากนี้พบว่าเยื่อกระดาษมีค่าการดูดน้ำเพิ่มขึ้น เนื่องจากเส้นใยพองตัวดี แม้ว่าการใช้เอนไซม์ในกระบวนการทำกระดาษจะไม่ให้ผลของการลดปริมาณเฮมิเซลลูโลสออกจากเยื่อมากนักอาจลด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซแลนจากเยื่อกระดาษแอสเพนได้ประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กระดาษซัลไฟต์จากไม้เนื้อแข็งอื่นๆ มีการลดลงของไซแลนเพียง 3.5-4.0 เปอร์เซ็นเท่านั้น (Paice and Jurasek, 1984) แต่การใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพก็ยังมีความน่าสนใจในด้านการลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียและได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยจากสารเคมี

เนื่องจากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษส่วนใหญ่ใช้คลอรีนในการฟอกสีกระดาษเพราะมีราคาถูกแต่มีผลข้างเคียงมากมาย โดยโรงงานที่ใช้คลอรีนฟอกสีกระดาษจะถ่ายเทสารไดออกซิน (dioxin) ซึ่งไดออกซินจะไปจับกับดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดอาการปวดตามข้อ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่ทำงานตามปกติทั้งยังมีผลให้ตัวอ่อนของสัตว์เป็นโรคบวม และยังมีการวิจัยพบสารไดออกซินในน้ำนมมารดาอีกด้วย ทั้งนี้ยังมีการใช้สารประกอบคลอรีนในรูปที่สลายตัวได้ง่าย คือ สารเคมีไดออกไซด์ (chlorine dioxide,ClO_2) เป็นก๊าซที่มีสีเหลืองแดง ซึ่งมีผลในการฟอกสีมากกว่า 2 เท่าของคลอรีน ปัจจุบันนี้เพื่อให้ได้เยื่อกระดาษที่ขาว และมีความบริสุทธิ์มากขึ้น จึงใช้สารเคมีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่คลอรีน โซเดียมไฮดรอกไซด์ไฮโปคลอไรด์ คลอรีนไดออกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ขั้นตอนในการฟอกสีตลอดจนสภาวะต่างๆในการฟอกสีที่แตกต่างกันไป โดยคำนึงถึงความสะอาดของเยื่อได้ และเยื่อได้รับความเสียหายเนื่องจากการฟอกน้อยที่สุด

การผลิตเยื่อและการฟอกสีโดยกระบวนการทางเคมีนั้น ถึงแม้จะมีข้อดีคือได้เยื่อที่มีคุณภาพสูงภายในระยะเวลาสั้นๆ แต่ต้องอาศัยเงินทุนจำนวนมหาศาลในแง่ของเครื่องจักรและสารเคมี นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารพิษที่เกิดจากกระบวนการทั้งสองออกมามาก

นอกจากกระบวนการข้างต้นจะเห็นได้ว่าลิกนินถูกสกัดออกมาจะอยู่ในรูปของ chlorolignin และ chlorinated phenol สารดังกล่าวจะออกมากับน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกเยื่อ และสาร chlorinated phenol และ guaiacols เป็นสารที่มีพิษจากกระบวนการผลิตเยื่อเช่นเดียวกันตัวอย่างเช่นในน้ำทิ้งที่ออกมาจากขั้นตอนแรกของวิธีการสกัดด้วยด่างจะมีสารพวกคลอรีนที่เป็นสารอินทรีย์มากมาย ซึ่งมี chlorinated phenol เป็นสารประกอบหลัก และมีความจำเป็นต้องมีการบำบัดก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งหากไม่มีการบำบัดสารประกอบดังกล่าวอาจมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำและอาจก่อให้เกิดมลภาวะทางน้ำตามมาอีกด้วย ปัญหาของสีในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษก็เป็นปัญหาที่สำคัญปัญหาหนึ่งซึ่งเกิดจาก 3 กระบวนการที่แตกต่าง คือ การผลิตโดยกระบวนการทางเคมี การฟอกสีเยื่อกระดาษและการผลิตกระดาษสี กระบวนการฟอกสีจะผลิตสีออกมาปริมาณมากกว่ากระบวนการทำเยื่อกระดาษ โดยมีผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อน้ำ คือสีจะขัดขวางการผ่านของแสงอาทิตย์ ซึ่งมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงทำให้ลดปริมาณสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ เกิดปัญหากับกระบวนการต่างๆในอุตสาหกรรม ค่าใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ่ายในการบำบัดน้ำเสียสูง สีที่มีโลหะอิออนปน เช่น เหล็ก หรือทองแดงจะไปขัดขวางกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตในสายใยอาหาร

ตามมาตรฐานกระทรวงอุตสาหกรรมกำหนดไว้ว่า น้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงานฟอกสีต้องมีสารแขวนลอยไม่มากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าบีโอดี (BOD) ที่ 20 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน ไม่มากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และสีที่ใช้ในกระบวนการผลิตต้องมีโลหะหนักจำพวก ตะกั่ว ปรอท แคดเมียม (+6) เป็นสารประกอบ หรือต้องเป็นสีที่ได้รับการรับรองตามกฎเกณฑ์ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทย หรือหน่วยงานนี่รับผิดชอบของประเทศต่างๆ หรือโครงการฉลากสีเขียวของประเทศต่างๆ

จากปัญหาข้างต้นอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษดังกล่าวอาจมีแนวทางใหม่ให้เลือกอาทิเช่นแนวทางการนำเทคโนโลยีการฟอกเยื่อด้วยวิธีทางชีวภาพ เข้ามาเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการฟอกเยื่อด้วยวิธีทางเคมี นับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากเพราะสามารถลดต้นทุนการผลิตและไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ ในสมัยก่อนการนำเอนไซม์จากจุลินทรีย์มาใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษมีขอบเขตจำกัด เช่นต้องมีการดัดแปลงแป้งดิบ อย่างไรก็ตามการประยุกต์เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเยื่อและกระดาษก็ยังมีการศึกษากันอย่างมากในปัจจุบัน

6.2. <u>การแปรสภาพ (Pretreatment) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร</u>

ในการปรับปรุงคุณค่าทางอาหารของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีหลายวิธีที่จะนำมาปรับปรุงเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร ปริมาณการกิน และการย่อยได้สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องแบ่งออกเป็นวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ ดังตารางที่ 4 หรือ 6

วิธีการแปรสภาพต่างๆ ได้แก่ การบดเป็นการทำให้อนุภาคของลิกโนเซลลูโลสมีขนาดเล็กลงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวและลดปริมาณเซลูโลสรูปผลึก วิธีทางเคมีโดยใช้ด่างหรือตัวละลาย (Viikari และคณะ., 1994) สกัดหรือแยกเฮมิเซลูโลส หรือการใช้ไอน้ำ อุณหภูมิ 120-180 องศาเซลเซส เป็นเวลา 15 นาทีถึง 2 ชม. ซึ่งการแปรสภาพด้วยวิธีการให้ความร้อนนี้จะทำให้ไซแลนและไซโลสออกจากวัสดุพวกลิกโนเซลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลูโลสละลายในน้ำเพิ่มขึ้น 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ภายใต้ไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและใช้เวลานานจะทำให้ไซโลสเปลี่ยนเป็น Furfural ส่วนไซแลนจะสามารถนำไปใช้สับเสตรททางเคมี ชีวเคมี หรือกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากกระบวนการหมัก เช่น การใช้กระบวนการที่ใช้ความร้อนในสภาวะที่มีน้ำ (Hydrothermolysis) จะได้ของเหลวเรียกว่า ไฮโดรไลเสท (Hydrolysate) ประกอบด้วยเฮมิเซลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 การแปรสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมโดยกรรมวิธีต่าง ๆ

วิธีทางกายภาพ	วิธีทางเคมี	วิธีทางชีวภาพ
การแช่น้ำ การสับ การบด การอัดเม็ด การนึ่ง การต้ม การใช้รังสีแกมมา	โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ยูเรีย/แอมโมเนีย โซเดียมคาร์บอเนต แก๊สคลอรีน ซัลเฟอร์ไดออกไซด์	การใช้เอนไซม์ การหมักด้วยเชื้อรา (white-rot fungi)

เซลลูโลส รวมทั้งส่วนของลิกนินที่ละลายได้เช่น Conifer alcohol, Syringa aldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, Vanillin, Furfural เป็นต้น ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมากน้อยแค่ไหนขึ้นกับชนิดของพวกลิกโนเซลลูโลส ส่วนของแข็งที่เหลือจะมีเพียงเซลลูโลสและลิกนินซึ่งสามารถย่อยด้วยเอนไซม์

การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนส (Wong และคณะ, 1988)

1. กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (Bioconversion)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสให้เป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาล ซึ่งอาจเป็นวัตถุดิบในการหมักต่อไป

Saddler และคณะ (1985) ใช้เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำหรือตัวทำละลายจากเนื้อไม้ Aspen มาเป็นสับสเตรทและย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma sp.*E 58 พบว่าได้น้ำตารีดิวส์ซึ่งเป็นน้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลักมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทธานอล-เบนซิน ให้ปริมาณน้ำตาลใกล้เคียงกับไซแลนทางการค้าและมากกว่าการใช้เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยกรดก่อนการใช้ไอน้ำ และการย่อยเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยกรดก่อนการใช้ไอน้ำ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการสกัดที่ไม่ใช้กรดก่อนการใช้ไอน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Viikari และคณะ (1994) สกัดไซแลนจาก pine kraft pulp ที่สกัดด้วย KOH เข้มข้น 1.32 โมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซไนโตรเจน และทำให้เข้มข้นโดยการระเหยให้เหลือปริมาตรเพียงครึ่งหนึ่ง จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยสารละลายผสมของเอธานอลและกรดอะซิติค แล้วล้างด้วยเอธานอลและอีเทอร์ เมื่อทดลองใช้ไซแลนที่สกัดได้ และไซแลนที่สกัดจาก brich kraft pulp ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์เป็นสับสเตรทในการย่อยด้วยเอนไซม์ไซแลเนส และจาก *Trichoderma reesei* C-30 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง พบว่าไซแลน (pH9.0) ย่อยไซแลนจาก brich kraft pulp ได้ผลิตภัณฑ์ 52 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าค่าที่ได้จากการใช้ไซแลนเนส (pH 5.5) ถึง 2 เท่า โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส ส่วนการย่อยไซแลนจาก pine kraft pulp พบว่าเอนไซม์ไซลาเนส และให้ผลิตภัณฑ์ที่ใกล้เคียงกัน (55เปอร์เซ็นต์) สำหรับคุณสมบัติการละลายน้ำ พบว่าไซแลนจาก brich kraft pulp ละลายน้ำได้ 1 เปอร์เซ็นต์ และไซแลนจาก pine kraft pulp ละลายน้ำได้ 20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมี Arabinose side-group ในส่วนแกนกลาง (blackbone) ของไซแลนอยู่สูงและมี Polymerization ต่ำ

2. Biopulping

ในอดีตกระบวนการทำกระดาษจะใช้เชื้อราในการย่อยสลายเนื้อเยื่อไม้ เพราะสามารถช่วยลดต้นทุนด้านพลังงานในกระบวนการฟอก (Refining) อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ไซลาเนสจะช่วยลดระยะเวลาในการย่อยสลายเนื้อไม้ ให้ได้เยื่อไม้ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ เนื่องจากสารละลายของเนื้อเยื่อไม้มีเฮมิเซลลูโลสซึ่งระหว่างการให้ความร้อนหรือในสภาวะที่เป็นด่าง ไซแลนบางส่วนละลายออกมาในลักษณะสายสั้นๆตกตะกอนอยู่บนผิวไมโครไฟบิล (Microfibril) ของเซลลูโลส (Ratto,et และคณะ., 1994)จึงมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซแลเนสในการฟอกเนื้อเยื่อไม้สำหรับทำเยื่อกระดาษ เพื่อลดการใช้สารเคมี เช่น คลอรีน โดยเอนไซม์จะไปย่อยไซแลนที่ตกตะกอนเหล่านั้น Christov และPrior (1993) ใช้เอนไซม์ไซแลเนสที่ได้จากเชื้อ *Aureobasidium pullulan* NRRL Y-2311-1ที่มีแอคติวิตี 1500 ยูนิต/กรัม (เตรียมสารละลายเอนไซม์ในซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5) ย่อยสารละลายเยื่อไม้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่บ่มและแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นโดยย่อยได้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อไม้ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในช่วงเวลาต่างๆส่วยใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กระบวนการอื่นๆ

เอนไซม์ทำให้น้ำผลไม้ใส ช่วยในการย่อยอาหารสัตว์ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์ มีการใช้เอนไซม์ไซแลเนสในการเตรียมวัตถุดิบในการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ใช้ศึกษาคุณสมบัติของโพลีแซคคาไรด์และผนังเซลล์ของพืช (Wong และคณะ., 1988) และประยุกต์ใช้ในการสกัดน้ำมันปาล์มเช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนส โดยใช้ในอัตรา 200-1000 กรัม/ตัน ที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง เพื่อแปรสภาพเนื้อเยื่อพืชก่อนนำไปสกัดด้วยกระบวนการที่ใช้น้ำปริมาณน้อย และแยกน้ำมันด้วยการหมุนเหวี่ยงในกระบวนการขั้นต่อไป นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันและน้ำทิ้ง โดยลดปริมาณเนื้อเยื่อของพืชที่มีโมเลกุลสูง ซึ่งทำให้เกิดความหนืดหรือข้น เช่น กลูแคน เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และเพคติน ทำให้การแยกน้ำมันในขั้นตอนการทำให้ใส (Clarification) ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

1. การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus sp.* หลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (% survival)

1.1 เลี้ยงเชื้อรา *Aspergilius sp.* ใน PDA medium เป็นเวลา 4-5 วัน ที่ อุณหภูมิ 30 ^{0}ซ

1.2 เติมน้ำกลั่นที่มี ทวีน 80 0.02 % ลงใน plate ที่มีเชื้อรา ทำการกำจัดเส้นใยเชื้อราโดยกรองด้วยแผ่นกรองซิลเทอร์กลาส (sintered glass filter) และนับจำนวนโคโลนีต่าง ๆ ด้วย Haemacytometer (Petreoff-Hausserchamber) ได้จำนวนสปอร์ 10^{-6} สปอร์/มล

1.3 เตรียมสารละลายสปอร์ 10 มล. ใส่ใน plates สำหรับเชื้อที่ผ่านและไม่ผ่าน แสง UV อย่างละ 1 ชุด ประกอบเครื่องมือสำหรับการทำการกลายพันธุ์ โดยวางตู้ฉายแสง UV บน magnetic stirrer

1.4 วาง plate ที่ใช้สำหรับทำการกลายพันธุ์บน magnetic stirrer ใส่ magnetic bar ลงใน plate ปรับความเร็วการหมุนช้า ๆ

1.5 เก็บตัวอย่างสารละลายสปอร์ทั้ง 2 ชุด ที่เวลา 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 10, 15,20, 25 และ 30 นาที โดยดูดเชื้อมา 0.1 มล. ใส่ในหลอด เก็บในที่มืด 3 ชม.

1.6 นำมาทำการเจือจางสารละลายสปอร์ที่ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ทำการ pour plate โดยใช้ complete medium (Demzin, 1986) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{0}ซ เป็นเวลา 2-3 วัน

1.7 นับจำนวนเชื้อและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น 0 นาที

1.8 เขียนกราฟระหว่างเวลากับ % การอยู่รอด ได้ killing curve

1.9 เลือกเอาเวลาใดเวลาหนึ่งที่เหมาะสมต่อการทำการกลายพันธุ์ โดยใช้เวลาที่เซลล์เริ่มต้นตายไป 90 % หรือที่เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด เท่ากับ 10%

2. ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

2.1 ทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตสารละลายสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus sp.* เป็นเวลา 12 นาที และนำสารละลายเซลล์ที่ได้มา pour plate ลงใน complete medium บ่ม 2-3 วัน อุณหภูมิ 30 ^{0}ซ ทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อลงบน minimal medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เช็คโคโลนีที่ไม่สามารถเจริญใน minimal medium แสดงว่าเป็นสายพันธุ์กลายที่มี ความต้องการสารอาหารบางชนิดสำหรับการเจริญเติบโต ในการทดลองนี้จะทำการเลือกสายพันธุ์กลายที่ต้องการสารไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต

3. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากขนาดวงใสรอบโคโลนี

3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส คือ อาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

3.2 เลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อที่มี อาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำคอร์กบอยเลอร์เจาะอาหาร PDA ที่มีสปอร์ไปวางตรงจุดกึ่งกลางอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน ทำการวัดขนาดโคโลนี

3.3 นำมาย้อมสีด้วยคองโกเรด ที่มีความเข้มข้น 0.1 % 15 นาที ล้างออกด้วย NaCl 1 โมลาร์ 10 นาที ทำการวัดขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ

3.4 หาอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อที่วัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

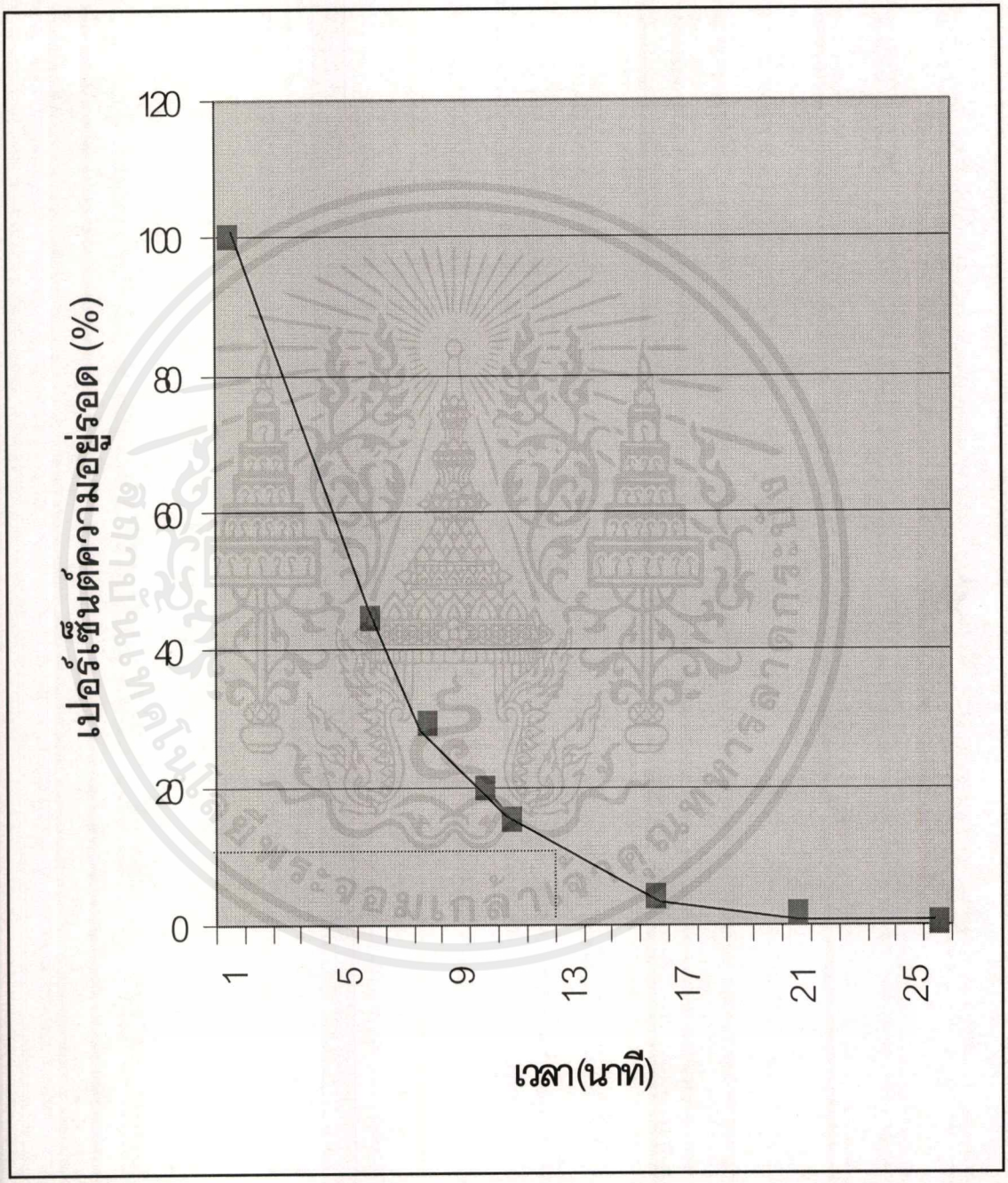
1. ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ของเชื้อราหลังจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

จากผลการทดลองหลังจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เวลา 0 นาที เชื้อที่ไม่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (ตัวควบคุม) ได้ 1.7×10^4 โคโลนี เมื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดโดยเทียบกับโคโลนีของเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (ตัวทดลอง) ที่เวลา 10 นาที จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณ 15.29% และที่เวลา 15 นาที จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณ 4.12 % (ตารางที่ 7) จากกราฟ killing curve จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ของเชื้อราการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เท่ากับ 10 % ที่เวลา 12 นาที ขั้นตอนต่อไปจึงทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่เวลา 12 นาที (Agrawal และคณะ, 1999)

<u>ตารางที่ 7</u> แสดงจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรและ % การอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus sp.* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ ในระดับความเจือจาง 10^{-2}

เวลา (นาที)	จำนวนโคโลนีของเชื้อต่อมิลลิลิตร (x 100)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)
0	170	100
5	76	44.7
7	50	29.4
9	34	20
10	26	15.29
15	7	4.12
20	3	1.77
25	1	0.59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



<u>รูปที่ 10</u> กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus sp.* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

ผลการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus sp.* เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยการทดสอบเลี้ยงเชื้อราใน complete medium แล้วทำการย้ายเชื้อโคโลนีต่อโคโลนีลงใน minimal medium พบว่า มีสายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถเจริญใน minimal medium จำนวน 36 สายพันธุ์

ซึ่งสายพันธุ์กลายทั้งหมดนี้จะนำมาตรวจสอบคุณสมบัติและคัดเลือกในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

3. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากวงใส

ผลการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus sp.* เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยการเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อราในเชิงคุณภาพจากเชื้อราสายพันธุ์กลาย 36 สายพันธุ์กับเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมต่อการใช้ไซแลนในอาหารแข็ง พบว่าสายพันธุ์ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 8) โดยเชื้อราสายพันธุ์กลาย 10 ให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบ โคโลนีต่อขนาดโคโลนีสูงสุด เท่ากับ 4.5 ในขณะที่เชื้อราสายพันธุ์กลาย 3 ให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีรองลงมา เท่ากับ 2.8 และให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เพราะฉะนั้นเชื้อราที่มีค่าของอัตราส่วนระหว่างของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงก็น่าจะผลิตเอนไซม์ได้สูงด้วย เนื่องจากค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ (Daigneault – Sylvestre and Kluepfel, 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนีและค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่ทำการกลายพันธุ์และเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

สายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus sp.*	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (ซม.)	ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของโคโลนีต่อขนาดของวงใสรอบโคโลนี
สายพันธุ์ดั้งเดิม	0.9	2.0	2.24^{c}
1	2.2	3.0	1.36^{fghijk}
2	2.5	3.0	1.2^{lmnop}
3	0.5	1.4	2.8^{b}
4	0.7	1.0	1.43^{fghi}
5	1.8	2.6	1.44^{fghi}
6	1.4	1.9	1.36^{fghijk}
7	1.0	1.5	1.5^{f}
8	2.1	2.8	1.33^{ghijkl}
9	2.0	2.6	$1.3^{hijklmn}$
10	0.6	2.7	4.5^{a}
11	1.4	2.1	1.5^{f}
12	1.6	2.1	$1.31^{ghijklm}$
13	0.6	0.7	1.17^{mnop}
14	2.0	2.3	1.15^{nop}
15	0.8	1.5	1.83^{e}
16	2.7	2.9	1.71^{e}
17	2.0	3.5	1.75^{e}
18	2.05	2.375	1.16^{nop}
19	1.0	2.0	2.00^{d}
20	2.425	3.1	$1.28^{ijklmno}$
21	2.275	3.0	$1.32^{ghijklm}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 (ต่อ)

สายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus sp.*	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใส รอบโคโลนี (ซม.)	ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของโคโลนีต่อขนาดของวงใสรอบโคโลนี
22	2.325	3.075	$1.32^{ghijklm}$
23	2.0	2.3	1.15^{nop}
24	2.025	2.25	1.11^{p}
25	2.1	2.95	1.40^{fghij}
26	1.7	2.4	1.41^{fghij}
27	1.5	2.25	1.50^{f}
28	2.48	3.0	1.21^{klmnop}
29	1.4	3.3	2.36^{c}
30	2.025	2.3	1.14^{op}
31	2.0	2.5	$1.25^{jklmnop}$
32	1.5	2.1	1.4^{fghij}
33	1.3	1.5	1.15^{nop}
34	2.0	3.0	1.50^{f}
35	1.5	2.2	1.47^{fg}
36	2.0	2.9	1.45^{fgh}

หมายเหตุ ตัวอักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความน่าเชื่อถือ 95 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภัทราพร และคณะ (2543) ได้ทำการชักนำให้เกิดการกลายออกโซโทรปจากเชื้อ *Penicillium sp.* เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสายพันธุ์กลายออกโซโทรป (A1) ในอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีเท่ากับ 1.655 ซึ่งพบว่าสายพันธุ์กลายออกโซโทรป (A1) มีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมากกว่าสายพันธุ์แท้

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้พบว่ามีความสอดคล้องกับ กล่าวคือสายพันธุ์กลายที่ได้มีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมากกว่าสายพันธุ์แท้เช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus sp.* เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยทำการเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ 10 ให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีสูงสุด เท่ากับ 4.5 ในขณะที่เชื้อราสายพันธุ์กลายที่ 3 ให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบ โคโลนีต่อขนาดของโคโลนีรองลงมา เท่ากับ 2.8 และให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ข้อเสนอแนะ

ในขั้นตอนหลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตจะต้องระวังไม่ให้โดนแสงเพราะอาจมีผงทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์กลายน้อยลง คือ เชื้อสามารถผันกลับเป็นเชื้อสายพันธุ์แท้ตามเดิม ซึ่งเป็นสาเหตุมาจากปรากฏการณ์ " photoreactivity " หรือ " reverse mutation "

สาเหตุที่ได้เชื้อสายพันธุ์กลายน้อยหรือได้เชื้อที่มีคุณสมบัติในการผลิตไซลาเนสไม่มาก อาจจะเป็นเพราะช่วง % การอยู่รอดที่คัดเลือกมาอาจมีเชื้อที่มีคุณสมยัติที่ต้องการน้อย เพราะเชื้อที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีประสิทธิภาพสูงอาจจะอยู่ในช่วง 90% ของการอยู่รอดที่ไม่ได้ทำการทดลอง แต่เนื่องจากเวลาในการทำการวิจัยจำกัดจึงต้องคัดเอาแต่ช่วง 10 % ของการอยู่รอดมาทำการวิจัยเท่านั้น เพราะฉะนั้นจึงควรต้องทำการทดลองในช่วง 90 % ของการอยู่รอดที่เหลือด้วยถึงจะมีโอกาสได้เชื้อที่ต้องการสูง

ไซแลนที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ควรจะวิจัยหาแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ที่สามารถทดแทนกันได้ คือ วัสดุเศษเหลือจากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าว

ในขั้นตอนทดสอบคุณสมบัติของสายพันธุ์กลายที่ได้โดยอาหารคัดเลือกสายพันธุ์ อาจจะเติมแหล่งคาร์บอนที่เป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ไซลาเนสด้วย เพื่อที่จะศึกษาได้ว่าเชื้อที่ได้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้หรือไม่ เช่นเชื้อสายพันธุ์กลายออกโซไทรปบางตัว ถ้าเราเติมแหล่งคาร์บอนลงไปด้วย ก็อาจจะทราบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายออกโซไทรปตัวนั้นไม่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส อาจไม่ต้องนำไปศึกษาหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากทำการกลายพันธุ์ในเชื้อ *Aspergillus sp* เพื่อหาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสแล้ว ควรจะทำการกลายพันธุ์ในเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ด้วย หรืออาจจะทดลองใช้กรรมวิธีการก่อการกลายพันธุ์อื่น ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติตามที่เราต้องการ

สายพันธุ์กลายที่ได้ทั้ง 3 ชนิดอาจจะนำมารวมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสายพันธุ์กลายให้สูงขึ้น ทั้งนี้อาจจะทดสอบหาคุณสมบัติของสายพันธุ์กลายด้วยวิธีอื่น ๆ ด้วย เช่น ทดสอบกับอาหารที่มียาปฏิชีวนะ ซึ่งถ้าเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้สามารถเจริญในอาหารที่มียาปฏิชีวนะนั้นแสดงว่าเชื้อสายพันธุ์กลายมีคุณสมบัติในการต้านยาชนิดนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญนา วรวิทย์วัฒนะ. 2530. การผลิตไซแลนเนสจากสเตรพโตมัยซีสสายพันธุ์ 42-9. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 7-8 น.

ชวนพิศ ดีเอกนามกุล. 2536. การทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยเชื้อรา, ในวัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ) หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ, เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม เล่มที่ 1, น. 20-33, สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

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

ประเสริฐ สันตินานาเลิศ. 2536. การทำให้เกิดการกลายโดยการใช้แสงอัลตราไวโอเลต, ใน วัฒนาลัยปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ) หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ, เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม เล่มที่ 1, น.52, สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

ภัทราพร แสงสว่าง. , พัชรี จารุวัฒนชัยกุล และอธิพงษ์ สายหยุด. 2543. การชักนำให้เกิดสายพันธุ์กลายออกโซโทรปจากเชื้อ Penicillium sp. เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส. ปริญญานิพนธ์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 80 น.

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

อารี ฤทธิบูรณ์. 2541. การแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในสภาพธรรมชาติ เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 5: 138-146.

อัญชริดา สวารชร. 2526. การผลิตเอนไซม์ Xylanase จากเชื้อราโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งของเกษตรกรรมในขบวนการหมัก แบบแห้ง. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 9 น.

Adriane, M. F. Milagras., Lynda, S. Lacis and Rolf Alexander Prade. 1993. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum* . *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 684-687.

B. K. Chaudhuri., Vvvi kram Sahai. 1993. Production of cellulase using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on lactose in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 194-196.

Biely, P. 1985. Microbal xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*. 3 : 286-290.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Deshpande, M. V., Srinivasan, M. C. and Deshmukh, S. S. 1987. Effect of fatty acids on cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its mutants. *Biotechnology Letters*. 9 : 301-304.

Douglas O. Mountfort and Colin G. Orpin. 1994. Anaerobic Fungi Biology, Ecology and Function. Marcel Dekker Publ. Co. Inc.,New York. 290 pp.

Dubeau, H., Chahal, D. S. and Ishaque, M. 1987. Xylanase of *Chaetomium cellulolyticum* : its nature of production and hydrolytic potential. *Biotechnology Letters*. 9 : 275-280.

Gerald James Stine. 1973 Laboratory Exercise in Genetics. Macmillan Publishing Co., Inc. New York. : 183-198.

Kuhad, R. C. and Singh, A. 1993. Lignocellulose biotechnology : current and future prospects, *Critical Reviews in Biotechnology*. 13 : 151-173.

Kuhad, R. C., Singh, A., Tripathi, K.K., sexena, R. K. and Eriksson, K. E. L. 1997. Microorganisms as an alternative source of protein. *Nutrition Reviews*. 55 : 65-75.

Kumar, P. K. R., Singh, A. and Schügerl, K. 1991. Formation of acetic acid from cellulosic materials by *Fusarium oxysporum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 34 : 570-572.

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

M. N. Anwer., M. Suto., F. Temita. 1996. Isolation of *Penicillium purpurogenum* resistant to catabolite repression. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 45: 684-687.

Myburgh, J., Prior, B. and Kilian, S. G. 1991. The temperature and pH properties of the extracellular hemicellulose-degrading enzymes of *Aureobasidium pulluuans* NRRL Y2311-1. *Process Biochemistry*. 26 : 343-348.

Neville J. Din and John Webster F. O. 1995. Fungal Ecology. Chapman & Hall Publ. Co. Inc., London. 54-58.

Smith, D. C. and Wood, T. M. 1991. Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and β-xylosidase, while maintaining low protease production. *Biotechnology and Bioengineering*. 38 : 883-890.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singh, A., Kuhad, R. C. and Kumar, M. 1995. Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 17 : 551-553.

Sirin A. I. Adham., Ana B. Campelo., Angelina Ramos and Josė A. Gil. 2001. Construction of a Xyulanase-Producing Strain of *Brevibacterium lectofermentum* by Stable Integration of an Engineered *xysA* Gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *Applied and Environmontal Microbiology*. 67. (12) : 5425-5430.

Svarachorn A. 1999. Productin of Fungal- Xylanase using Agricaltural Waste by Solid State Fermentation. *J. Sci. Res. Chula. Univ.* 24. (1) : 15-20.

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

www.biosite.dk/

www.clinical-mycology.com/diagnostic%20technique-5.html

www.enzymes.co.uk/Basics/cell_wall.gif

www.traitree.com/images/Trees/Birchwood%20Trils%20Mrg.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารสูตรต่างๆในการเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ก. PDA medium

1. มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
2. เด็กโทส	20	กรัมต่อลิตร
3. วุ้น	15	กรัมต่อลิตร

ข. Complete medium (Demzin, 1986)

1. มอลโตส(BHD)	40	กรัมต่อลิตร
2. เปปโตน(oxoid)	10	กรัมต่อลิตร
3. มอลล์สกัด(oxoid)	24	กรัมต่อลิตร
4. วุ้น	20	กรัมต่อลิตร

ค. Minimal medium (Demzin, 1986)

1. $NaNO_3$	3	กรัมต่อลิตร
2. KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
3. $MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
4. $FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
5. KH_2PO_4	1	กรัมต่อลิตร
6. กลูโคส (glucose)	40	กรัมต่อลิตร

ง. Minimal medium agar

ใส่วุ้น 18 กรัมต่อลิตรใน minimal medium เติมโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ. อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์

ส่วนที่ 1

1. KH_2PO_4	2	กรัมต่อลิตร
2. $(NH_4)_2HPO_3$	1.4	กรัมต่อลิตร
3. $MgSO_4.7H_2O$	0.3	กรัมต่อลิตร
4. $CaCl_2.2H_2O$	0.3	กรัมต่อลิตร
5. ยูเรีย	0.3	กรัมต่อลิตร
6. โปรติเอสเปปโตน	0.23	กรัมต่อลิตร
7. Yeast extract	0.1	กรัมต่อลิตร

ส่วนที่ 2 แร่ธาตุผสม

1. $FeSO_4.5H_2O$	5	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร
2. $ZnSO_4.7H_2O$	1.40	กรัมต่อน้ำ 1ลิตร
3. $MnSO_4.7H_2O$	4.56	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร
4. $CoCl_2$	2.0	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียมอาหารสูตรต่างๆในการเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ก. วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์ (PDA medium)

1. ชั่งอาหารPDAในสัดส่วนให้ได้ปริมาตรตามต้องการ
2. ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
3. นำไปปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.0
4. บรรจุลงในหลอดฝาเกลียว
5. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
6. เอียงอาหารในหลอดฝาเกลียวจนกระทั่งวุ้นแข็งโดยวิธีปลอดเชื้อ

ข. วิธีการเตรียมอาหาร complete medium

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

ค. วิธีการเตรียมอาหาร minimal medium

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง. วิธีการเตรียมอาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์

1. แบ่งอาหารออกเป็น 2 ส่วน ละลายสารทั้งหมดทั้งส่วนที่ 1 (ยกเว้น $(NH_4)HPO_3$ และ $MgSO_4.7H_2O$) และส่วนที่ 2 (ยกเว้นไซแลน) เข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. นำส่วนที่ 2 ผสม 0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร ในส่วนแรกตามสัดส่วนที่กำหนดไว้
3. ปรับค่าพีเอชด้วย HCl เข้มข้น 1 นอมอล จากนั้นเติมไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์และวุ้นลงไป
4. ต้มให้วุ้นละลาย แล้วเติม $MgSO_4.7H_2O$ (เพื่อป้องกันไม่ให้ Mg ไปจับทำให้เกิดตะกอน
5. บรรจุลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ เป็นเวลา 15 นาที
6. $(NH_4)_2HPO_3$ ที่แยกไว้นำไปกรองจุลินทรีย์ด้วยแผ่นกรองขนาด 0.25 ไมครอน
7. สารจากข้อ 5 ที่ได้พออุ่นๆ ให้นำไปผสมกับ $(NH_4)_2HPO_3$ ที่กรองจุลินทรีย์แล้วตามสัดส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การตรวจนับสปอร์ของเชื้อราโดยใช้ Haemacytometer (Petreoff-Hausserchamber)

วิธีการตรวจนับสปอร์ของเชื้อรา

1. เตรียมตัวอย่างที่จะทำการตรวจนับ ถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมานับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ละลายในน้ำกลั่นในปริมาตรที่ต้องการก่อน เช่น ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร (จะได้ความเจือจางเป็น 10^{-1}) หรืออาจต้องทำการเจือจางมากขึ้นในกรณีที่มี สปอร์จำนวนมาก เช่น เจือจาง 10^{-2} หรือ 10^{-3} เป็นต้น
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงใน Haemacytometer (Petreoff-Hausserchamber) (ที่ปิดด้วย cover slip) โดยใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างมา 1 – 2 หยด หยดลงด้านข้างของแผ่น cover slip
3. ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัว objective กำลังขยาย 10 เท่า
4. นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก หรือนับช่องใหญ่แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับ นำไปคูณด้วย 4×10^6 จะได้เป็นปริมาณสปอร์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตร

วิธีการคำนวณหาค่า 4×10^6

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในช่องใหญ่ มีค่า = 0.0025 ตารางมิลลิลิตร

ความลึกระหว่าง cover slip และช่อง = 0.1 มิลลิเมตร

ดังนั้น ปริมาตร 1 ช่องเล็กจะมีค่า = 0.0025×0.1 = 0.00025 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะมีจุลินทรีย์ = Z สปอร์

ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะมีจุลินทรีย์ = $Z \times 1000 / 0.00025$ สปอร์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์แบบ DUNCAN

ตารางภาคผนวกที่ ก การคำนวณทางสถิติของอัตราส่วนระหว่างขนาดของโคโลนีต่อขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์กลายต่าง ๆ กับสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่ความน่าเชื่อถือ 95 %

CLEARZONE

Duncan

	จำนวนซ้ำ	Subset for alpha = .05															
สายพันธุ์กลายที่		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
24.00	2	1.1100															
30.00	2	1.1400	1.1400														
14.00	2	1.1500	1.1500	1.1500													
23.00	2	1.1500	1.1500	1.1500													
33.00	2	1.1500	1.1500	1.1500													
33.00	2	1.1500	1.1500	1.1500													
18.00	2	1.1600	1.1600	1.1600													
18.00	2	1.1600	1.1600	1.1600													

13.00	2	1.1700	1.1700	1.1700	1.1700												
2.00	2	1.2000	1.2000	1.2000	1.2000	1.2000											
28.00	2	1.2100	1.2100	1.2100	1.2100	1.2100	1.2100										
31.00	2	1.2500	1.2500	1.2500	1.2500	1.2500	1.2500	1.2500									
20.00	2		1.2800	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800								
9.00	2			1.3000	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000							
21.00	2				1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200						
22.00	2				1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200						
12.00	2				1.3250	1.3250	1.3250	1.3250	1.3250	1.3250	1.3250						
8.00	2					1.3300	1.3300	1.3300	1.3300	1.3300	1.3300						
1.00	2						1.3600	1.3600	1.3600	1.3600	1.3600	1.3600					
6.00	2						1.3600	1.3600	1.3600	1.3600	1.3600	1.3600					
25.00	2							1.4000	1.4000	1.4000	1.4000	1.4000					
25.00	2							1.4000	1.4000	1.4000	1.4000	1.4000					
32.00	2							1.4000	1.4000	1.4000	1.4000	1.4000					
32.00	2							1.4000	1.4000	1.4000	1.4000	1.4000					
26.00	2							1.4100	1.4100	1.4100	1.4100	1.4100					
26.00	2							1.4100	1.4100	1.4100	1.4100	1.4100					
4.00	2								1.4320	1.4320	1.4320	1.4320					
4.00	2								1.4320	1.4320	1.4320	1.4320					
5.00	2								1.4400	1.4400	1.4400	1.4400					
5.00	2								1.4400	1.4400	1.4400	1.4400					
36.00	2									1.4500	1.4500	1.4500					
36.00	2									1.4500	1.4500	1.4500					

35.00	2										1.4700	1.4700					
7.00	2											1.5000					
11.00	2											1.5000					
27.00	2											1.5000					
34.00	2											1.5000					
16.00	2												1.7100				
17.00	2												1.7500				
15.00	2												1.8300				
19.00	2													2.0000			,
สายพันธุ์ดั้งเดิม	2														2.2400		
29.00	2														2.3600		
3.00	2															2.8000	
10.00	2																4.5000
10.00	2																4.5000
Sig.		.084	.084	.064	.054	.106	.064	.051	.052	.068	.068	.088	.098	1.000	.081	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

<u>ตารางภาคผนวกที่ ข</u> การคำนวณทางสถิติของอัตราส่วนระหว่างขนาดของโคโลนีต่อขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์กลายต่าง ๆ และสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่ความน่าเชื่อถือ 99 %

CLEARZONE

Duncan

	จำนวนซ้ำ	Subset for alpha = .1													
สายพันธุ์กลายที่		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
24.00	2	1.1100													
30.00	2	1.1400	1.1400												
14.00	2	1.1500	1.1500												
23.00	2	1.1500	1.1500												
33.00	2	1.1500	1.1500												
18.00	2	1.1600	1.1600	1.1600											
13.00	2	1.1700	1.1700	1.1700	1.1700										
2.00	2	1.2000	1.2000	1.2000	1.2000	1.2000									
28.00	2	1.2100	1.2100	1.2100	1.2100	1.2100	1.2100								
31.00	2	1.2500	1.2500	1.2500	1.2500	1.2500	1.2500	1.2500							
20.00	2	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800						
20.00	2	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800	1.2800						
9.00	2	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000						
9.00	2	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000						
12.00	2	1.3100	1.3100	1.3100	1.3100	1.3100	1.3100	1.3100	1.3100						
12.00	2	1.3100	1.3100	1.3100	1.3100	1.3100	1.3100	1.3100	1.3100						
21.00	2	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200						
21.00	2	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200						
22.00	2	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200						
22.00	2	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200	1.3200						
8.00	2	1.3300	1.3300	1.3300	1.3300	1.3300	1.3300	1.3300	1.3300						

1.00	2		1.3600	1.3600	1.3600	1.3600	1.3600	1.3600	1.3600						
6.00	2		1.3600	1.3600	1.3600	1.3600	1.3600	1.3600	1.3600						
25.00	2			1.4000	1.4000	1.4000	1.4000	1.4000	1.4000						
32.00	2			1.4000	1.4000	1.4000	1.4000	1.4000	1.4000						
26.00	2				1.4100	1.4100	1.4100	1.4100	1.4100						
4.00	2					1.4300	1.4300	1.4300	1.4300						
5.00	2					1.4400	1.4400	1.4400	1.4400						
36.00	2						1.4500	1.4500	1.4500						
35.00	2							1.4700	1.4700						
7.00	2								1.5000	1.5000					
11.00	2								1.5000	1.5000					
27.00	2								1.5000	1.5000					
34.00	2								1.5000	1.5000					
16.00	2									1.7100	1.7100				
17.00	2										1.7500				
15.00	2										1.8250	1.8250			
19.00	2											2.0000			
สายพันธุ์ดั้งเดิม	2												2.2400		
29.00	2												2.3600		
3.00	2													2.8000	
10.00	2														4.5000
Sig.		.133	.133	.101	.101	.102	.102	.133	.134	.123	.369	.150	.320	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.