สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาคุณลักษณะบางประการของเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. จากลูกแป้งเหล้า

STUDIES ON SOME CHARACTERISTICS OF *Aspergillus* spp. FROM LOOKPANG - LAO

T 058534

คึกฤทธิ์ ศิลาลาย

KHUKRIT SILALAIY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-15-1051-9

QW
ค521ก
2547
ฉ.1

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....58534
วัน,เดือน,ปี.....25 ส.ค. 2549

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDIES ON SOME CHARACTERISTICS OF *Aspergillus* spp. FROM LOOKPANG - LAO

KHUKRIT SILALAIY

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2004

ISBN 974-15-1051-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2004

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาคุณลักษณะบางประการของเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. จากลูกแป้งเหล้า
นักศึกษา	นายคึกฤทธิ์ ศิลาลาย
รหัสประจำตัว	42065204
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Aspergillus* spp. 60 สายพันธุ์ทั้งชนิดสปอร์สีเขียว และสปอร์สีดำคัดเลือกมาจากลูกแป้งเหล้าในจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นำตัวอย่างทั้งหมดมาศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ในอาหาร Czapek agar (ดัดแปลง) และการผลิตกรดโคจิกในอาหาร Glucose peptone agar โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 และ *Aspergillus* sp. REB2 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด และพบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 สามารถผลิตกรดโคจิกได้ด้วยโดยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 12.91 หน่วยต่อมิลลิลิตร ได้จากเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ที่เจริญเติบโตภายใต้สภาวะการให้อากาศในอาหารซึ่งประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร และเฟอรัสซัลเฟต 0.01 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 11.44 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกัน แต่ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 3 กรัมต่อลิตร แทนแอมโมเนียมซัลเฟต สำหรับการผลิตกรดโคจิก พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ RE3 สามารถผลิตกรดโคจิกได้เท่ากับ 4.5 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร

นำเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้ง 14 สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกมาศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมโดยเทคนิคพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP) ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนทาคาอะไมเลสเอ ยีนเบต้า ทูบูลิน และ บริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III *Hin*dIII และ*Hin*fI ผลที่ได้พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียว และ *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำมีความแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis title	Studies on Some Characteristics of *Aspergillus* spp. from Lookpang – Lao
Student	Mr. Khukrit Silalaiy
Student ID	42065204
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2004
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nuanphan Naranong

ABSTRACT

Sixty strains of *Aspergillus* spp., both green and black conidia, were isolated from lookpang - lao collected from north - eastern provinces in Thailand. All of them were studied for amylase production on the modified Czapek agar using cassava starch as a carbon source and kojic acid production on Glucose peptone agar. Among them, *Aspergillus* sp. RE3 and *Aspergillus* sp. REB2 showed the highest capability in producing amylase. *Aspergillus* sp. RE3 also showed the kojic acid - producing ability. Maximum amylase activity of *Aspergillus* sp. RE3 (12.91 U/ml) was obtained when it was grown aerobically in a medium consisting of 100 g/l cassava starch, 3 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/l K_2HPO_4, 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g/l KCl and 0.01 g/l $FeSO_4$. *Aspergillus* sp. REB2 produced amylase activity of 11.44 U/ml when cultivated in the same medium, replacing 3 g/l $(NH_4)_2SO_4$ with 3 g/l NH_4Cl. For kojic acid production, the strain RE3 produced 4.50 g/l kojic acid in the medium containing 100 g/l cassava starch, 0.5 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 2 g/l KH_2PO_4 and 1 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Fourteen strains of *Aspergillus* spp. were selected and studied on genetic variation by PCR - RFLP technique. Fragments of Taka - amylase A, β - Tubulin genes and region of ITS were used for DNA amplification by PCR technique and digested with restriction endonucleases *Hae*III, *Hin*dIII and *Hin*fI. The results indicated that restriction digestion for DNA fragments showed the difference in the patterns between green and black conidia of *Aspergillus* spp..

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

กระผมขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์ ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วีนา ชูโชติ อาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิภายในภาควิชา และ รองศาสตราจารย์ อรไท สุขเจริญ อาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกภาควิชา ที่ได้สละเวลาในการตรวจสอบและเสนอแนะในการเขียนวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ สั่งสอน ตลอดจนเป็นที่ปรึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ พระคุณมารดาผู้ล่วงลับไปแล้ว และอุทิศวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้กับมารดา บิดา พี่น้อง และหลานๆ ที่คอยให้กำลังใจและกำลังทรัพย์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ เพื่อน พี่ และน้อง ทุกท่านที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือตลอดมา

คึกฤทธิ์ ศิลาลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VIII

สารบัญภาพ IX

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ลูกแป้งเหล้า 3

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของลูกแป้ง 4

2.1.2 วิธีการทำลูกแป้งเหล้า 5

2.1.3 จุลินทรีย์ในลูกแป้ง 6

2.2 คุณสมบัติของแป้งและเอนไซม์ย่อยแป้ง 10

2.3 กรดโคจิก (Kojic acid) 11

2.4 การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรม 12

2.4.1 เทคนิคการศึกษาความผันแปรของสิ่งมีชีวิต 12

2.4.2 การสกัดดีเอ็นเอ 13

2.4.3 เทคนิคอาร์เอฟแอลพี

(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 16

2.4.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme) 17

2.4.5 เทคนิคพีซีอาร์ (PCR Technique) 19

2.4.6 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (Gel Electrophoresis) 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย 27
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 27
3.1.1 อุปกรณ์ 27
3.1.2 สารเคมี 28
3.1.3 แหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ 28
3.2 วิธีการวิจัย 29
3.2.1 การแยกเชื้อราและการเก็บรักษาเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่คัดเลือกได้จากลูกแป้งเหล้า 29
3.2.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ในอาหารแข็ง 29
3.2.3 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ในอาหารแข็ง 29
3.2.4 การศึกษาเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อราในอาหารเหลว 30
3.2.4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้น 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ 30
3.2.4.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจน 30
3.2.5 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราในอาหารเหลว 30
3.2.6 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* spp. โดยเทคนิคพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี (PCR - RFLP) 31
3.2.1.1 การเตรียมเส้นใย 31
3.2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ 31
3.2.1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 32
3.2.1.4 การตัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 33
3.2.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา 34
3.3 วิธีวิเคราะห์ 34
3.3.1 การวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส 34
3.3.2 การวิเคระห์กรดโคจิก 34
3.3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล 35

4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus* spp. จากลูกแป้งเหล้า 35

4.2 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ในอาหารแข็ง 35

4.3 ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ในอาหารแข็ง 40

4.4 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา ในอาหารเหลว 43

4.4.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน 43

4.4.2 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ 53

4.5 ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราในอาหารเหลว 63

4.6 ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* spp. 67

4.6.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณอาร์ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS 4 67

4.6.2 ผลการศึกษาพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 68

4.6.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนบริเวณ ทาคาอะไมเลส เอ (Taka amylase A) 73

4.6.4 ผลการศึกษาพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 74

4.6.5 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์เบต้าทูบูลิน (β - tubulin) 79

4.6.6 ผลการศึกษาพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 80

4.7 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา 85

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม 90

ภาคผนวก ก 96

ภาคผนวก ข 98

ภาคผนวก ค 103

ภาคผนวก ง 106

ประวัติผู้เขียน 116

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 เชื้อราในลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ 7

2.2 แสดงยีนวงศ์ทูบูลิน 15

2.3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่เคยมีการศึกษาในรา 16

4.1 แสดงแหล่งที่มาของเชื้อรา *Aspergillus* spp. และรหัสเชื้อ 36

4.2 แสดงผลการย่อยแป้งของเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียว ในอาหารแข็ง 37

4.3 แสดงผลการย่อยแป้งของเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำ ในอาหารแข็ง 39

4.4 การจัดกลุ่มเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่คัดเลือกจากลูกแป้งเหล้า 42

ง.1 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ 106

ง.2 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์ 107

ง.3 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 10 เปอร์เซ็นต์ 108

ง.4 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน 109

ง.5 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน 110

ง.6 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน 111

ง.7 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและการผลิตกรดโคจิก เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน 112

ง.8 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและการผลิตกรดโคจิก เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน 112

ง.9 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและการผลิตกรดโคจิก เมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน 113

ง.10 การเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้น 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ 113

ง.11 การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจน 114

ง.12 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว Glucose peptone 115

ง.13 การเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว Glucose peptone 115

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ลูกแป้งเหล้า 4

2.2 แสดงบริเวณยีนที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) region primer 14

2.3 แสดงบริเวณยีนที่ไพรเมอร์ทาคาอะไมเลส เอ (Taa111 และ Taa 1280) จะเข้าจับกับดีเอ็นเอ 14

2.4 แสดงบริเวณยีนที่ไพรเมอร์ เบต้าทูบูลิน (β - tubulin, Bt2a และ Bt2b) จะเข้าจับกับดีเอ็นเอ 15

2.5 กระบวนการพีซีอาร์ 21

4.1 ลักษณะการเกิดบริเวณโซนใสของเชื้อรา *Aspergillus* spp. 41

4.2 การผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา *Aspergillus* spp 41

4.3 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน 44

4.4 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน 44

4.5 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน 45

4.6 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน 45

4.7 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน 47

4.8 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน 47

4.9 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน 48

4.10 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน 48

4.11 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.12 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน 50
4.13 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน 51
4.14 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน 51
4.15 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุกและมีแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน 54
4.16 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ และมีแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน 54
4.17 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก และมีแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน 55
4.18 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ และมีแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน 55
4.19 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก และมียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน 57
4.20 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ และมียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน 57
4.21 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก และมียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน 58
4.22 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ และมียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.23 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก และมีแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจน 60
4.24 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ และมีแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจน 60
4.25 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก และมีแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจน 61
4.26 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ และมีแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจน 61
4.27 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกรดโคจิกของเชื้อรา ในอาหารเหลว Glucose peptone และการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้น เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 64
4.28 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกรดโคจิกของเชื้อราในอาหารเหลว Glucose peptone และการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้น เมื่อใช้ยูเรีย 65
4.29 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกรดโคจิกของเชื้อราในอาหารเหลว Glucose peptone และการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้น เมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 66
4.30 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 67
4.31 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III 69
4.32 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII 69
4.33 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI 71
4.34 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*dIII 71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.35 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*fI 72

4.36 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Hin*fI 72

4.37 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ทาคาอะไมเลส เอ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 73

4.38 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ ทาคาอะไมเลส เอ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII 75

4.39 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ ทาคาอะไมเลส เอ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III 75

4.40 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ ทาคาอะไมเลส เอ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI 76

4.41 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ ทาคาอะไมเลส เอ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*dIII 76

4.42 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ ทาคาอะไมเลส เอ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*fI 78

4.43 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ ทาคาอะไมเลส เอ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Hin*fI 78

4.44 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ เบต้า ทูบูลิน ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 79

4.45 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ เบต้า ทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III 81

4.46 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ เบต้า ทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII 81

4.47 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ เบต้า ทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI 82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.48 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ เบต้า ทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*dIII 82

4.49 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ เบต้า ทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*fI..... 83

4.50 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีที่บริเวณ เบต้า ทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Hin*fI 83

4.51 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า..... 86

4.52 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า..... 86

ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส 100

ข.2 กราฟมาตรฐานของกรดโคจิก 102

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ซึ่งจุลินทรีย์บางชนิดอาจทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีและได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ จุลินทรีย์ในลูกแป้งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักพอสรุปได้ 2 ขั้นตอนคือ ขั้นแรกเชื้อราและยีสต์บางชนิดจะทำให้แป้งข้าวเหนียวเปลี่ยนเป็นน้ำตาล ขั้นต่อมาน้ำตาลจะเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์และอาจทำให้มีกลิ่นหอมของเอสเทอร์ (ester) (ชัยวัฒน์ จาติเสถียร. 2521) ลูกแป้งในประเทศไทยมีหลายชนิด เช่น ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า ลูกแป้งน้ำส้มสายชู และลูกแป้งขนมถ้วยฟู ซึ่งการใช้ประโยชน์ของลูกแป้งแล้วแต่ลักษณะของกระบวนการหมัก

ลูกแป้งเป็นภูมิปัญญาไทยที่ปัจจุบันในประเทศไทยเป็นสิ่งที่หายาก โดยเฉพาะลูกแป้งน้ำส้มสายชู และลูกแป้งขนมถ้วยฟู ยังคงเหลือแต่ลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าเท่านั้น อาจเนื่องมาจากปัจจัยหลายประการ เช่น ความยุ่งยากที่เกี่ยวกับกระบวนการผลิต ส่วนประกอบของลูกแป้งที่ยังไม่มีการถ่ายทอดความรู้ และเทคโนโลยีการผลิตสุรารายใหญ่ยังใช้เชื้อบริสุทธิ์แทน ตลอดจนในอดีตยังมีข้อจำกัดของภาครัฐที่ห้ามมีการครอบครองและจำหน่ายลูกแป้งโดยไม่ได้รับอนุญาต นอกจากนั้นยังมีข้อจำกัดจำนวนของผู้ผลิตและจำหน่ายลูกแป้งตามพระราชบัญญัติสุรา พ.ศ. 2493 และระเบียบกรมสรรพสามิตว่าด้วยการทำและการขายแป้งข้าวหมาก (กรมสรรพสามิต. 2524)

จุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้ง ได้แก่ ยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* *Endomycopsis* spp. แบคทีเรีย เช่น *Bacillus* spp. *Lactobacillus* spp. และเชื้อรา เช่น *Aspergillus* spp. *Mucor* spp. *Rhizopus* spp. และ *Penicillium* spp. เป็นต้น (วราวุฒิ ครูส่ง. 2538 ; Sukumavasi *et al.* 1975) ซึ่งจากการรายงานพบว่ามีเพียงจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่มีบทบาทในกระบวนการหมัก จุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้งเหล้านอกจากจะต้องประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ย่อยแป้งได้ดีแล้ว ยังต้องมีจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้ดีด้วย

ปัจจุบันแนวโน้มการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์โดยใช้ลูกแป้งได้รับความนิยมมากขึ้น ซึ่งการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากลูกแป้ง เช่น อุ กระแช่ สาโท และข้าวหมาก เป็นต้น เชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. มีรายงานว่าพบมากกว่า 600 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นพวกแซฟโพรไฟต์ (saprophyte) และไม่ก่อให้เกิดโรคต่อคนและพืช พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ซึ่งเชื้อราสกุลนี้ สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่มและแอลกอฮอล์ (อรวรรณ นวีภาพ. 2531) การศึกษาลูกแป้งในประเทศไทยมีมานานแล้วแต่การนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ยังมีอยู่น้อย เชื้อ *Aspergillus* spp. เป็นราที่พบในลูกแป้งเหล้าและมีบทบาทสำคัญในการย่อยแป้ง ถ้าสามารถคัดเลือกเชื้อ *Aspergillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำมาพัฒนาเพื่อผลิตเอนไซม์ใช้ในประเทศ เป็นการลดการนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศได้ รวมทั้งศึกษาความสามารถของเชื้อ *Aspergillus* spp. ในการผลิตกรดโคจิก นอกจากนี้การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของราเหล่านี้ในประเทศไทยยังมีการศึกษาน้อยมากเมื่อเทียบกับต่างประเทศ ซึ่งการใช้อาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism) ร่วมกับ พีซีอาร์ (Alain *et al.* 1995) เป็นเทคนิคที่นิยมในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อประโยชน์ในการจัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อราจากลูกแป้งหล้าที่คัดเลือกได้โดยอาศัยลักษณะของโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้น (Hiram. 1990) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 คัดเลือกเชื้อราในสกุล *Aspergillus* spp. จากลูกแป้งเหล้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

1.2.2 ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและทดสอบกรดโคจิกในอาหารแข็ง

1.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกรดโคจิกในอาหารเหลว

1.2.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งดีที่สุด และวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 รวบรวมลูกแป้งเหล้าจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและคัดเลือกเชื้อราในสกุล *Aspergillus* spp. มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและทดสอบกรดโคจิกในอาหารแข็ง

1.3.2 ศึกษาคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. ในอาหารเหลว โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.3 วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. โดยเทคนิคพีซีอาร์อาร์เอฟแอลพี (PCR -RFLP)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่คัดเลือกมาจากลูกแป้งเหล้า

1.4.2 ทราบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Aspergillus* spp. โดยเทคนิคพีซีอาร์อาร์เอฟแอลพี (PCR -RFLP)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลูกแป้งเหล้า

วรชิน สถิตนิมานการ (2492) ได้ให้ความหมายของการทำลูกแป้งว่า เป็นการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ของเชื้อราและยีสต์ในลูกแป้ง ราจะอยู่ในรูปของสปอร์และยีสต์จะอยู่ในเซลล์คงทน (durable cell)

ส่วนผสมของลูกแป้งเหล้า วรชิน สถิตนิมานการ (2492) ได้แสดงสัดส่วนต่างๆดังนี้

กระเทียม (*Allium sativum*)	40 กรัม
ขิง (*Zingiber officinale*)	40 กรัม
ข่า (*Alpinia siamensis*)	20 กรัม
ชะเอม (*Myriopteron extensum*)	40 กรัม
พริกไทย (*Piper nigrum*)	6 กรัม
ดีปลี (*Piper chaba*)	6 กรัม
หัวหอม (*Allium ascalonicuim*)	20 กรัม
ข้าวเจ้า (*Oryza sativa*)	2,500 กรัม

เครื่องเทศได้จากส่วนที่เป็นราก หน่อ ผล หรือเมล็ดของพันธุ์ไม้หลายชนิด ซึ่งเป็นพืชเขตร้อน เครื่องเทศได้แก่ โหระพา กานพลู อบเชย ขิง ข่า หอม กระเทียม และลูกจันทน์ เป็นต้น เครื่องเทศมีคุณค่าทางอาหารน้อยแต่เพิ่มรสชาติ

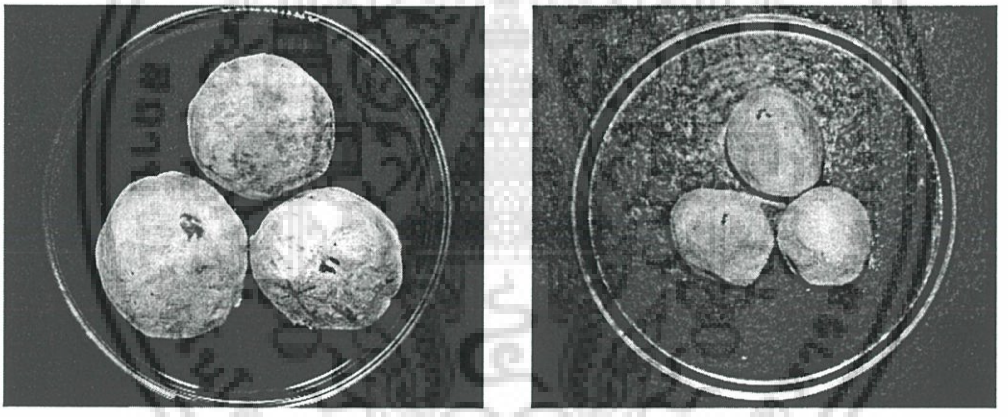
นภา โล่ห์ทอง (2534) ได้ให้ความหมายของลูกแป้ง คือ กล้าเชื้อจุลินทรีย์ (inoculum) ที่เก็บอยู่ในเชื้อแห้ง เพื่อใช้ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิดในประเทศแถบเอเชีย เทคโนโลยีการผลิตและการใช้ลูกแป้งมีมาแต่โบราณ เข้าใจกันว่ามีกำเนิดมาจากประเทศจีนและได้ถ่ายทอดเทคโนโลยีไปยังประเทศเพื่อนบ้าน เช่น อินเดีย เกาหลี และกลุ่มประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย กล้าเชื้อจะมีชื่อเรียกตามภาษาท้องถิ่นของแต่ละประเทศ การใช้ประโยชน์จะมีลักษณะคล้ายกัน คือใช้ในการหมักที่มีกิจกรรมการเปลี่ยนแป้งจากวัตถุดิบประเภทธัญพืชและพืชประเภทหัวให้เป็นน้ำตาล (saccharification) เพื่อผลิตอาหารหมักประเภท ข้าวหมาก สุราเมรัย เช่น กระแช่ สาโท หรือ อุ ยกเว้น “ราจิเทมเป้” ของประเทศอินโดนีเซียที่ใช้ในการผลิตเทมเป้ ซึ่งเป็นกิจกรรมจากถั่วเหลือง สำหรับในประเทศไทยยังมีลูกแป้งที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู ที่เรียกว่า “ส่าน้ำส้ม”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชาวตะวันตกเรียกลูกแป้งว่า “Chinese yeast cake” โดยสรุปสามารถแบ่งลูกแป้งออกเป็นชนิดใหญ่ๆ คือ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า ลูกแป้งน้ำส้มสายชู และลูกแป้งเทมเป้

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของลูกแป้ง

ลูกแป้งที่ดีจะต้องโปร่งเบา สีขาวนวล ไม่มีรอยแตกร้าว ก้อนเป็นรูพรุน ซึ่งเกิดจากการฟูของลูกแป้งขณะบ่ม เมื่อขยี้จะยุ่ยเป็นผง ไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว มีรูปร่างและขนาดต่างๆกัน ลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าจะมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 เซนติเมตร ส่วนลูกแป้งน้ำส้มสายชูนิยมปั้นให้มีขนาดประมาณ 5-6 เซนติเมตร แต่ขนาดของลูกแป้งก็ยังขึ้นอยู่กับแต่ละท้องถิ่นที่นิยมปั้นขนาดแตกต่างกัน (ภาพที่ 2.1) ลูกแป้งจากบางประเทศ เช่น ลูกแป้งจากอินเดียและมาเลเซียมีลักษณะเป็นวงแหวน ลูกแป้งเกาเหลียงจากจีนมีลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12 -15 เซนติเมตร มีลักษณะคล้ายวงแหวนเช่นกัน ลูกแป้งที่ผลิตจากไต้หวันเมื่อแห้งแล้วนิยมปั่นเป็นผงและบรรจุซองขาย ลูกแป้งแต่ละแหล่งจะมีประสิทธิภาพในการหมักแตกต่างกัน ซึ่งบางครั้งไม่สามารถบอกได้จากลักษณะที่ปรากฏ



ภาพที่ 2.1 ลูกแป้งเหล้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 วิธีการทำลูกแป้งเหล้า

การทำลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้านั้นกรรมวิธีการผลิตในแต่ละท้องถิ่นจะแตกต่างกัน ดังวิธีการดังนี้

วิธีที่ 1 วิธีการทำลูกแป้งโดยย่อ คือ นำส่วนประกอบต่างๆมาคลุกเคล้าให้เหนียวโดยการเติมน้ำ ปล่อยให้แป้งฟูแล้วนำมาปั้นเป็นก้อน ตากไว้ให้แห้ง แต่บางพื้นที่ไม่จำเป็นต้องปล่อยให้แป้งขึ้นฟูพอเสร็จปั้นเป็นก้อนได้เลย (ชัยวัฒน์ จาติเสถียร. 2521)

วิธีที่ 2 จากการรายงานของ พิไลพรรณ พงษ์พูล (2523) ได้อธิบายรายละเอียดการทำลูกแป้งข้าวหมากมีวิธีการเป็นขั้นตอนดังนี้ คือ

1. นำข้าวมาซาวน้ำแล้วแช่ค้างคืน
2. บดส่วนประกอบพวกสมุนไพรทั้งหมดให้ละเอียดยกเว้นข้าวเจ้า
3. ตำข้าวเจ้าให้ละเอียดแล้วผสมเครื่องเทศ
4. ใส่น้ำพอควร ผสมส่วนผสม นวดให้เข้ากัน ให้พอปั้นได้
5. วิธีปั้น ใส่แป้งที่นวดแล้วใส่ถ้วยตะไล แล้วนำออกมาเรียงบนใบตองที่สะอาด นำลูกแป้งเก่าที่บดละเอียดมาโรยบนลูกแป้งใหม่ นำตะแกรงมาปิด เก็บไว้ในที่อุ่น อากาศถ่ายเท เป็นเวลาประมาณ 2 คืน

วิธีที่ 3 นภา โล่ห์ทอง (2534) ได้แสดงขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบและการปั้นลูกแป้งรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. เตรียมแป้งโดยซาวข้าวให้สะอาด แช่น้ำไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำไปโม่แล้วซับน้ำให้แห้ง หรือทำให้ข้าวสะเด็ดน้ำเสียก่อนแล้วจึงนำไปบดหรือปั่นให้ละเอียด แล้วจึงนำไปร่อน ข้อควรระวังการแช่ข้าวนานเกินไปโดยไม่เปลี่ยนน้ำจะมีผลทำให้แบคทีเรีย เจริญเติบโต ทำให้ลูกแป้งที่ผลิตได้ด้อยคุณภาพ

2. บดสมุนไพรชนิดแห้งให้ละเอียด สมุนไพรสดอาจนำไปบดพร้อมกับข้าว

3. ผสมแป้ง สมุนไพร และลูกแป้ง (ลูกแป้ง 5 กรัมต่อลูกแป้ง 1 กิโลกรัม) ที่บดละเอียดให้เข้ากัน เติมน้ำร้อนหรือน้ำต้มชะเอม ในปริมาณที่นวดแป้งแล้วจะปั้นเป็นก้อนได้ ปริมาณน้ำที่ใช้กำหนดไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับความแห้งของแป้งที่ใช้

4. เมื่อนวดแป้งจนเหนียวแล้วจึงปั้นเป็นก้อนกลมขนาดต่างๆ กันตามชนิดของลูกแป้ง การหมักแป้งที่นวดแล้วประมาณ 6-12 ชั่วโมงจึงนำมาปั้นจะได้ลูกแป้งที่มีคุณภาพดีกว่า

5. เรียงลูกแป้งบนกระด้งหรือภาชนะก้นโปร่ง ให้แต่ละลูกห่างกันเล็กน้อย ลูกแป้งที่ติดกับภาชนะจะมีลักษณะแบนราบตามผิวที่สัมผัสกับวัสดุ

6. เมื่อเรียงลูกแป้งเต็มภาชนะแล้ว โรยลูกแป้งเก่าที่เตรียมไว้ลงบนผิวของลูกแป้งใหม่ โดยใช้ลูกแป้งประมาณ 15 กรัมต่อสูตรที่ใช้แป้ง 1 กิโลกรัม คลุมภาชนะด้วยผ้าหนาๆ อย่าให้ผ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัมผัสกับลูกแป้ง บ่มประมาณ 48 ชั่วโมงแล้วนำไปตากแดดให้แห้ง เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดฝาสนิท นอกจากนี้อาจนำลูกแป้งไปอบในตู้อบ

2.1.3 จุลินทรีย์ในลูกแป้ง

ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อผสม (mixed culture) ที่มีทั้งเชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรีย ถึงแม้กรรมวิธีการผลิตลูกแป้งจะไม่สามารถควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้อย่างสิ้นเชิง แต่หากการผลิตนั้นได้กระทำอย่างระมัดระวังจะพบเชื้อจุลินทรีย์เพียงไม่กี่สกุลเท่านั้น (นภา โล่ห์ทอง. 2534)

1. เชื้อรา

เชื้อราที่ตรวจพบในลูกแป้งจากทุกๆแหล่งที่มีการศึกษา ได้แก่ *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus* spp. แต่ก็ยังพบเชื้อราชนิดอื่นๆเช่น *Aspergillus* spp. *Mucor* spp. และ *Penicillium* spp. เป็นต้น เชื้อราหลักที่พบในลูกแป้งข้าวหมาก ได้แก่ *Amylomyces rouxii* ซึ่งส่วนใหญ่จะพบประมาณ 10^4 CFU ต่อกรัม ส่วนลูกแป้งที่ปั้นใหม่ๆจะพบประมาณ $1.5x10^5$ ถึง $2.7x10^5$ CFU ต่อกรัม สำหรับลูกแป้งเหล้าจะพบทั้ง *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus* spp. เป็นเชื้อหลัก ยกเว้นลูกแป้งเหล้าจากอินเดียที่เชื้อราส่วนใหญ่จะเป็น *Mucor* spp. ดังตารางที่ 2.1

2. ยีสต์

ยีสต์ที่พบในลูกแป้งข้าวหมากส่วนใหญ่ ได้แก่ *Endomycopsis* spp. เช่น *Hansennula malanga* โดยมี *Saccharomyces cerevisiae* ปนมาด้วย ส่วนลูกแป้งเหล้าจะพบ *Saccharomyces cerevisiae* ในปริมาณมากกว่า *Endomycopsis* spp. นอกจากนี้ยังมียีสต์อื่นที่พบในลูกแป้งเฉพาะแหล่งได้แก่ *Candida* spp. และ *Torulopsis* spp.

ยีสต์ที่พบในลูกแป้งทั่วๆไปมีปริมาณสูงถึง $5x10^6$ ถึง $8x10^6$ CFU ต่อกรัมลูกแป้ง

3. แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่มีการตรวจพบจะเป็นแบคทีเรียแลคติก ส่วนใหญ่ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* พบประมาณ 10^4 ถึง $8x10^7$ CFUต่อกรัม ขึ้นอยู่กับที่มาของลูกแป้ง นอกจากนี้ในลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าของไทยในบางท้องถิ่นยังตรวจพบ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียมีการปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ เช่น แป้งและสมุนไพร แต่หากส่วนผสมของสมุนไพรที่ใช้เหมาะสม จะช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ได้มาก เช่น ขิง ชะเอม อบเชย ดอกจันทน์ และลูกจันทน์ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (มนตรี เชาว์นสังเกต. 2521)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 เชื้อราในลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ

แหล่งที่มาและชนิดของลูกแป้ง	เชื้อรา
ลูกแป้งข้าวหมากไทย	*Amylomyces rouxii*
	Rhizopus spp.
	Mucor spp.
	Aspergillus niger
	Aspergillus spp.
	Penicillium spp.
	Hyalodendron spp.
ลูกแป้งอินเดีย	*Mucor fragilis*
	Amylomyces rouxii
	Rhizopus fragilis
ลูกแป้งฟิลิปปินส์	*Rhizopus* spp.
	Mucor spp.
ลูกแป้งจีน	*Rhizopus javanicus*
	Rhizopus chinesis
	Rhizopus spp.
	Amylomyces rouxii

ที่มา : นภา โล่ห์ทอง (2534)

2.1.3.1 บทบาทของจุลินทรีย์ในลูกแป้งต่อกระบวนการหมัก

ถึงแม้จะพบจุลินทรีย์หลายชนิดในลูกแป้งแต่ก็มีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีบทบาทในกระบวนการหมัก ลูกแป้งข้าวหมากจะพบจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลและพวกที่ผลิตสารให้กลิ่นหอมบางชนิดเท่านั้นที่มีบทบาทสำคัญ ส่วนลูกแป้งเหล้านอกจากจะมีจุลินทรีย์ที่ย่อยแป้งได้ดีแล้ว จุลินทรีย์ที่มีบทบาทที่แท้จริงต้องสามารถเปลี่ยนแป้งเป็นแอลกอฮอล์ได้ดี

เชื้อรา *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus* spp. เป็นเชื้อราที่พบมากในลูกแป้งและสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ เอนไซม์ที่ผลิตได้มีทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ดังนั้นในกระบวนการหมักเชื้อราเหล่านี้จึงมีบทบาทในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล ส่วน *Endomycopsis* spp. เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้เช่นกัน นอกจากนั้นยังสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ ในลูกแป้งเหล้า *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus* spp. มีบทบาทในกระบวนการหมัก และยีสต์ที่เป็นตัวเร่งในการหมักกระแช่และสาโท คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Saccharomyces cerevisiae ที่มีบทบาทในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล (ชัยวัฒน์ จาติเสถียร. 2521; นภา โล่ห์ทอง. 2534)

2.1.3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp.

กลุ่ม *Aspergillus niger* มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น (septate mycelium) ส่วนของ foot cell บนเส้นใยเป็นที่ตั้งของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ซึ่งโคนิดิโอฟอร์ จะมีผิวเรียบและไม่มีสี เวสซิเคิล (vesicle) มีรูปร่างกลม ส่วนใหญ่เป็น biseriate sterigma ถ้าอายุยังน้อยส่วนของโคนิเดียล (conidial head) มีรูปร่างกลมและสีดำ เมื่อโตเต็มที่รูปร่างของโคนิเดียลเปลี่ยนเป็น spitting loose column หรือ loose radoiate โดยมีส่วนน้อยมากยังคงรูปร่างกลมเช่นเดิม (Raper and Funnell. 1965)

กลุ่ม *Aspergillus flavus* มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น (septate mycelium) โดยโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) มีผิวหยาบและไม่มีสี เวสซิเคิล มีรูปร่างกลม ส่วนใหญ่เป็น uniseriate sterigma ตอนอายุยังน้อยส่วนของโคนิเดียลมีรูปร่างกลมและมีสีเขียวปนเหลือง เมื่อโตเต็มที่โคนิเดียลจะมีรูปร่างเป็นคอลัมน์ (column) หรือ spitting loose column และมีสีเขียวอาจมีส่วนน้อยที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Raper and Funnell. 1965)

กลุ่ม *Aspergillus* spp. พวกอื่นๆ มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น (septate mycelium) โดยโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) มีผิวเรียบและไม่มีสี เวสซิเคิลมีรูปร่างกลม ส่วนใหญ่เป็น biseriate sterigma ตอนอายุยังน้อยส่วนของ conidial head มีรูปร่างกลมและมีสีน้ำตาลปนเหลือง เมื่อโตเต็มที่มีรูปร่างเปลี่ยนเป็น short column หรือ loose radiate และมีสีน้ำตาลอ่อน (Raper and Funnell. 1965)

เชื้อรา *Aspergillus* spp. มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เกิดขึ้นได้หลายวิธี ดังนี้ fission budding fragmentation chlamydospore และ conidia ซึ่งเชื้อราจะสร้างสปอร์แบบใดขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราหรือสภาพแวดล้อมขณะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีหลักการโดยที่นิวเคลียสที่อยู่ในเซลล์เดียวกันแต่ยังไม่ได้มีการรวมกัน ทำให้เกิดลักษณะที่เซลล์ 1 เซลล์มี 2 นิวเคลียส ที่เรียกว่า ไดคาริออน (dikaryon) และนิวเคลียสแบ่งตัวหลายๆครั้งได้ ไดคารีโอติกเซลล์ (dikaryotic cell) ใหม่อีกหลายอัน ต่อมานิวเคลียสทั้งสองอันในเซลล์จะมารวมกันในส่วนที่จะเจริญเป็นแอสคัส (ascus) จากนิวเคลียสซึ่งเป็นดิบพลอยด์ไซโกต (diploid zygote) จะเกิดไมโอซีส (miosis) และได้นิวเคลียส 4 อัน ต่อมา แฮบพลอยด์นิวเคลียส (haploid nucleus) ทั้ง 4 จะแบ่งตัวแบบไมโตซีส (mitosis) อีกครั้งได้ 8 นิวเคลียส ซึ่งจะเจริญไปเป็นแอสโคสปอร์ (ascospore) 8 อันภายในแอสคัส

2.1.3.3 ความสำคัญของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ในอุตสาหกรรม

ในอุตสาหกรรมเชื้อรา *Aspergillus* spp. มีบทบาทอย่างมากเช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร การผลิตสารเคมีในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเชื้อราในกลุ่มนี้มีบทบาทในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus niger* หรือ *A. wentii* ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารจำพวกกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิตริก และ กรดกลูโคนิก นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์เพคติเนสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมทำน้ำผลไม้ (Petczar *et al.* 1986) ในการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมนั้น เชื้อรา *Aspergillus* spp. ก็มีบทบาทเช่นเดียวกัน ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus oryzae* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไดเอสเทส (diestase) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสไซรัป (glucose syrup) *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส และ อะไมเลส เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ และผลิตภัณฑ์ยา เป็นต้น (Stainer *et al.* 1976)

จิราภรณ์ สุขุมาวาสี (2518) ทำการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งจากลูกแป้งเหล้า จากตัวอย่าง 10 แหล่ง สามารถแยกจุลินทรีย์ได้ 26 ไอโซเลท เมื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยแป้ง พบจุลินทรีย์ 23 ไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้แก่ เชื้อยีสต์ 7 ไอโซเลท เชื้อรา 15 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรีย 1 ไอโซเลท จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ในการย่อยแป้งคือ เชื้อราสกุล *Aspergillus niger* group และยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1

ชัยวัฒน์ จาติเสถียร (2521) ทำการแยกยีสต์และราจากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 48 ตัวอย่าง ได้เชื้อรา 122 ไอโซเลท จากตัวอย่างลูกแป้งเหล้า 10 ตัวอย่างได้เชื้อรา 26 ไอโซเลท เชื้อยีสต์ 24 ไอโซเลท เมื่อทำการจัดจำแนกเชื้อยีสต์พบว่าอยู่ใน 3 สกุลคือ *Endomycopsis* spp. *Hansenula* spp. และ *Saccharomyces* spp. ส่วนเชื้อราเมื่อจัดจำแนกพบอยู่ใน 5 สกุลคือ *Rhizopus* spp. *Mucor* spp. *Chlamydomucor* spp. *Penicillium* spp. และ *Aspergillus* spp.

มนตรี เชาว์นสังเกต (2521) ทำการแยกราจากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า จำนวน 32 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้เป็น 4 สกุล คือ *Rhizopus* spp. *Mucor* spp. และ *Amylomyces* spp. ส่วนอีก 1 ไอโซเลทไม่สามารถจัดจำแนกได้

สมพร สินธารา (2544) ทำการศึกษาปริมาณเชื้อราและยีสต์ที่คัดเลือกจากลูกแป้งข้าวหมาก 38 ตัวอย่าง และลูกแป้งเหล้า 19 ตัวอย่าง ในประเทศไทย พบว่ายีสต์มีจำนวน $10^4 - 10^7$ CFUต่อกรัมและเชื้อราจำนวน $10^3 - 10^6$ CFUต่อกรัม เมื่อแยกยีสต์และราจากลูกแป้ง พบว่าลูกแป้งเหล้าเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่จะเป็น *Saccharomyces fibuligera* ส่วนเชื้อราที่พบจะเป็นสกุล *Amylomyces* spp. *Rhizopus* spp. *Mucor* spp. *Aspergillus* spp. และ *Aspergillus niger* group

Suzuki *et al.* (1987) ทำการแยกเชื้อจากวัสดุและอาหารหมักประเภทธัญพืช 6 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ 28 ไอโซเลท โดยเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่จะเป็น *Candida krusii* ส่วนสายพันธุ์อื่นๆได้แก่ *Saccharomycopsis cerevisiae* แยกได้จากข้าวหมาก น้ำส้มสายชู และลูกแป้ง เชื้อ *Saccharomyces fibuligera* แยกได้จากลูกแป้ง ยังมีรายงานอีกว่าเชื้อ *Saccharomyces fibuligera* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงซึ่งแสดงกิจกรรมการย่อยแป้งเป็นหลัก

DSMZ. (2001a) รายงานว่า Nakazawa and Sato ทำการแยกเชื้อรา *Monascus pupureus* จากลูกแป้ง และ DSMZ. (2001b) รายงานว่า Yamazaki แยกเชื้อรา *Aspergillus candidas* จากลูกแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันได้เก็บเชื้อเหล่านี้ไว้ที่สถาบัน DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikooranismen und Zellkulturen, Braunchweig Gemany (DSMZ)

2.2 คุณสมบัติของแป้งและเอนไซม์ย่อยแป้ง

แป้งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่สำคัญในธรรมชาติเกิดขึ้น 2 แบบ คือ แอลฟาอะไมโลส (α - amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) องค์ประกอบของอะไมโลสประกอบด้วยหน่วยน้ำตาลกลูโคสต่อกัน แต่ละหน่วยกลูโคสต่อกันด้วย α (1-4) glycoside bond น้ำหนักโมเลกุล 2,000 ถึง 400,000 ปริมาณของอะไมโลส (amylose) และ อะไมโลเพคติน ในข้าวเหนียวและข้าวเจ้าไม่เหมือนกัน

ปฏิกิริยาของแป้งกับไอโอดีนจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (starch iodine complex) ซึ่งมีสีน้ำ-เงินเข้ม กลไกการเกิดยังไม่ทราบแน่นอน (Days and Underwood. 1974) ขณะที่แป้งทำปฏิกิริยากับเอนไซม์อะไมเลสได้น้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing suger) เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งสีที่เกิดจากการรวมตัวของแป้งกับไอโอดีนก็จะเปลี่ยนจากน้ำเงินไปเป็นสีม่วง (White *et al.* 1968)

เอนไซม์ที่สามารถย่อยได้คือ เอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) อะไมเลส มี 2 ประเภท คือ เอ็นโดอะไมเลส (endoamylase) ได้แก่ แอลฟาอะ-ไมเลส (α - amylase) และเอ็กโซอะไมเลส (exoamylase) ได้แก่ เบต้าอะไมเลส (β-amylase, amylo (1-4) maltosidase) และกลูโคอะไมเลส (amylo (1-4, 1-6) glucosidase)

เอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ได้จากการเตรียมมอลต์ หรือจากการผลิตโดยจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา (Belitz and Grosch. 1999) เอนไซม์อะไมเลสที่ยีสต์และราสร้างขึ้นเป็นเอนไซม์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ โดยหลังจากที่เอนไซม์เหล่านี้ไฮโดรไลซ์แป้งเป็นน้ำตาลแล้วยีสต์จะนำน้ำตาลไปใช้ยีสต์จำพวกบริวเวอร์ยีสต์ (brewer yeast) สามารถใช้กลูโคส ฟรักโตส มอลโตส ซูโครส และมอลโตไตรโอส

Bhella and Atossar (1987) ทำการศึกษาคุณสมบัติและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อรา *Aspergillus awamori* จากการทดลองเมื่อตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอทา-นอล จากนั้นทำการแยกให้บริสุทธิ์ โดยเทคนิคเจลฟิลเตรชั่น และ anion exchange chromatography พบว่า เอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 54,000 ± 2,500 และค่าไอโซอิเล็กทริกพอยท์ (isoelectric point) ที่พีเอช 4.2 เอนไซม์มีกิจกรรมที่ดีอยู่ที่พีเอช 4.8 ถึง 5 และมีความเสถียรที่พีเอช 3.5 ถึง 6.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เอนไซม์เสถียรอยู่ที่ 45 องศาเซลเซียส

Yabuki *et al.* (1987) ทำการศึกษาการผลิตแอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* M-13 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร peptone – glycerol และเติมน้ำตาลมอลโตส เพื่อช่วยเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่าชั่วโมงแรกมีกิจกรรมของเอนไซม์ 70 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ หลังจากนั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ 330 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ ส่วนการทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์บริสุทธิ์โดย คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) เจลฟิลเตรชั่น (gel filtration) และเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (gel electrophoresis)

Eric *et al.* (1988) ทำการศึกษาการหมักในอาหารแข็งโดยใช้แป้งมันสำปะหลัง เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Aspergillus niger* ในการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ จากการทดลองพบว่าน้ำมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อและปริมาณสับสเตรตก็มีผลต่อกระบวนการหมัก

Pereira *et al.* (1993) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์เพคติเนส (pectinase) จากเชื้อรา *Aspergillus niger* CH4 ในอาหารแข็งและกึ่งแข็ง โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน คือ กลูโคส ซูโครส หรือ กรดกาแลคทูโรนิค (galacturonic acid) จากการทดลอง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของคาร์บอนเพิ่มขึ้น การหมักแบบกึ่งแข็งมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อใช้กลูโคสหรือซูโครสร้อยละ 3 ส่วนการเติมกรดกาแลคทูโรนิก มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ การหมักแบบแข็งพบกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 3 ถึง 11 เท่า

Morkeberg *et al.* (1995) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* โดยวิธีการหมักแบบแบตช์ (batch) และแบบต่อเนื่อง (continuous) ซึ่งใช้เชื้อราชนิดที่เป็นสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการรีคอมบิแนนท์ (recombinant) พบว่าเชื้อราที่มีการรีคอมบิแนนท์มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าพันธุ์เดิม 4 ถึง 5 เท่า เมื่อศึกษาผลของน้ำตาลพบว่าที่ระดับน้ำตาลกลูโคสสูงมากจะมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ คือจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อเทียบกับการใช้กลูโคสในอัตราส่วนที่ต่ำกว่า

2.3 กรดโคจิก (Kojic Acid)

กรดโคจิก (5 - hydroxy - 2 hydroxymethyl - λ- pyrone) มีบทบาทในอุตสาหกรรมการผลิตเวชภัณฑ์เพื่อบรรเทาอาการเจ็บปวด และลดการอักเสบ (Kayahara *et al.* 1990) การใช้เป็นสารเร่งการสร้างกลิ่นรส การผลิตสารบำรุงผิวและป้องกันแสงอัลตร้าไวโอเลต

เชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. เป็นเชื้อหลักที่สามารถผลิตกรดโคจิก ซึ่งจะเป็นกลุ่มสายพันธุ์ *Aspergillus flavus* *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus tamarii* เป็นต้น มีรายงานว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* มีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกสูงสุด แหล่งคาร์บอนก็มีบทบาทในการช่วยให้มีการผลิตกรดโคจิก แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ได้แก่ กลูโคส ซูโครส อะซิเตต อะราบิโนส และไซโลส แต่กลูโคสจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด

สุกัญญา สายธิ (2541) ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในน้ำมะพร้าวโดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน หาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส แหล่งไนโตรเจน ยีสต์สกัด ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) และ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 .7H_2O$) ผลการศึกษา พบว่าอาหารสูตรดัดแปลงที่เหมาะสมที่สุดคือ ซูโครส 175 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 2 กรัม ยีสต์สกัด 1 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 1 ลิตร ในสภาวะแบบเขย่าให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 34 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 ในการศึกษาในถังหมักแบบแบตช์ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 37 กรัมต่อลิตร

Rosfarizan *et al.* (1998) ทำการศึกษาเชื้อราสายพันธุ์ S33-2 ที่คัดเลือกมาจากดอก morning glory (*Bixa orellana*) ซึ่งมีความสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีส่วนผสมของแป้ง และสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูง เมื่อทำการศึกษาคุณลักษณะของเชื้อราพบว่าเป็นเชื้อรา *Aspergillus flavus* จากนั้นทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันคือ แป้งสาคู แป้งมันฝรั่ง และแป้งข้าวโพด พบว่าแป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดคือ เชื้อสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดที่ระดับ 19.2 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แป้งข้าวโพด 75 กรัมต่อลิตร

Rosfarizan and Ariff (2000) ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ (kinetics) ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* Link 44-1 ที่ผลิตกรดโคจิก โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนต่างๆคือ กลูโคส ซูโครส ไซโลส แป้ง มอลโตส แลกโตส และฟรักโตส และเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไทโอซัลเฟต ($(NH_4)_2S_2O_8$) แอมโมเนียมไนเตรต ($(NH_4)_2NO_3$) ยีสต์สกัด และ เปปโตน เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลการผลิตกรดโคจิก พบว่ามีการผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดเท่ากับ 39.90 กรัมต่อลิตร ในสภาวะการหมักแบบกึ่งแข็ง ใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือ เปปโตนและยีสต์สกัด ยีสต์สกัดที่ใช้ได้เหมาะสมที่สุดอยู่ที่ระดับ 5 กรัมต่อลิตร

Futamura *et al.* (2001) ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* MK 107-39 ที่มีการทำให้กลายพันธุ์ เพื่อให้มีการผลิตกรดโคจิกมากขึ้น จากการทดลอง พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายมีการผลิตกรดโคจิกได้ 28 กรัมต่อลิตรจากกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ภายใต้การเพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงรูปชมพู่ ซึ่งผลิตได้เพิ่มขึ้น 7.7 เท่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิม และมีประสิทธิภาพการใช้กลูโคส 6 ถึง 9.8 เท่า

2.4 การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรม

2.4.1 เทคนิคการศึกษาความผันแปรของสิ่งมีชีวิต

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อจัดจำแนกความแตกต่างจากดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สมวงศ์ ตระกูลรุ่ง. 2540)

การตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยใช้ดีเอ็นเอสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีคือ

1. การวิเคราะห์หาขนาดความยาวของดีเอ็นเอซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยอาศัยหลักการที่ว่าแต่ละอัลลีล (allele) ของยีนที่ติดตามจะให้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) ซึ่งขั้นตอนที่ใช้ศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคนี้ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ การย่อยผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม หลังจากนั้นจึงทำการแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

2. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการเพิ่มขยายในหลอดทดลอง (พีซีอาร์) วิธีนี้อาศัยไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอจากการเริ่มต้นมีจำนวนน้อยให้มีจำนวนมากปริมาณขึ้นเฉพาะบางตำแหน่งเท่านั้น จนเมื่อดีเอ็นเอมีปริมาณมากขึ้นก็สามารถวิเคราะห์จากเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสหรือโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส เทคนิคนี้จึงเรียกว่าการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดี (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD)

2.4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

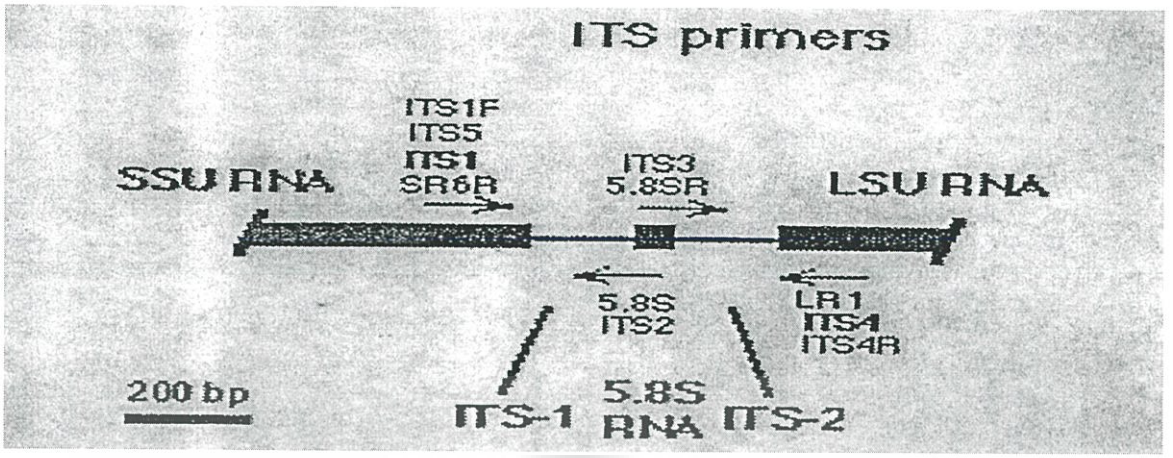
วิธีการสกัดดีเอ็นเอจะแตกต่างกันตามความเหมาะสมของงานวิจัย โดยต้องทำให้ผนังเซลล์แตกด้วยวิธีการต่างๆ เช่น นำเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงโดยใช้ glass bead ลงในบัฟเฟอร์ การบดเซลล์ด้วย microscope slide หรือการบดเซลล์ด้วยไนโตรเจนเหลว แต่บางครั้งอาจใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ไซโมเลส (zymolase) และเอนไซม์กลูซาเลส (glusalase) เมื่อเซลล์แตกสามารถทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การแขวนลอยสารละลายที่มีส่วนผสมของโซเดียมเปอร์คลอเรท (sodium perchlolate) และ ซาโครเซต (sacrosate) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปสกัดด้วย chloroform-isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24 ต่อ 1 บ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วสูง เติมเอทานอลที่เย็นจัด หรือเติม 3 M sodium acetate นำไปหมุนเหวี่ยง แยกส่วนใสที่ได้มาเติมสารละลาย isopropanol ล้างด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ละลายตะกอนด้วย TE buffer (Cenis. 1992)

ดีเอ็นเอ (DNA, Deoxyribonucleic acid) เป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เป็นส่วนประกอบหลักในโครโมโซม (chromosome) ดีเอ็นเอประกอบด้วยหน่วยย่อย เป็นนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) 4 ชนิด คือ dATP dCTP dTTP dGTP องค์ประกอบทั้ง 4 จะมาต่อกันเป็นสายดีเอ็นเอ อาจกล่าวได้ว่าดีเอ็นเอทำหน้าที่เป็นยีนที่เป็นผลให้เกิดลักษณะเฉพาะในสิ่งมีชีวิต

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เมื่อทราบลำดับเบสที่ปลายทั้งสองด้านของดีเอ็นเอแล้ว (sequence tagged site) สามารถนำมาสร้างเป็นไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ในปัจจุบันได้มีการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการศึกษาดังตัวอย่าง เช่น

1. Internal transcribed spacer (ITS) region primers ในการศึกษารา ส่วนใหญ่จะใช้ลำดับเบสของไพรเมอร์ในบริเวณเขต ITS เนื่องมาจากบริเวณนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าในบริเวณอื่นๆในอาร์ดีเอ็นเอ (rDNA) ซึ่งสามารถใช้จำแนกความแตกต่างทั้งระดับชนิดและภายในชนิด ดังภาพที่ 2.2

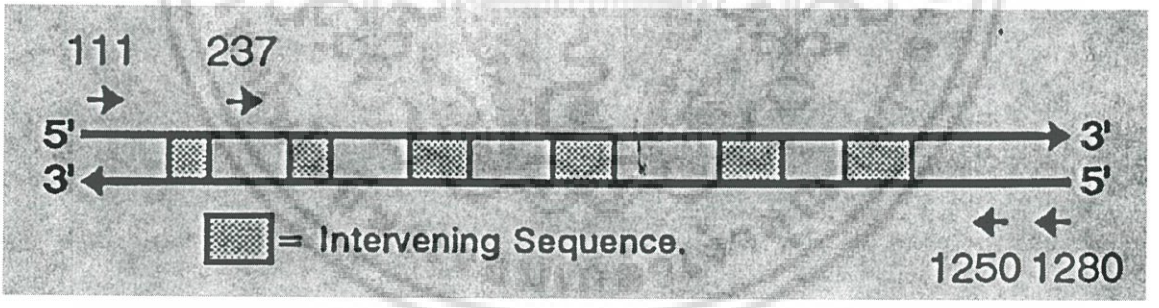
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 แสดงบริเวณยีนที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) region primer (Vilgalys lab. 1999)

2. ยีนทาคา อะไมเลส เอ (Taka – amylase A gene)

Egel *et al.* (1994) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus flavus* section *flavi* โดยศึกษาตำแหน่งจำเพาะของยีนที่มีความผันแปรบริเวณยีน Taka – amylase A ดังภาพที่ 2.3

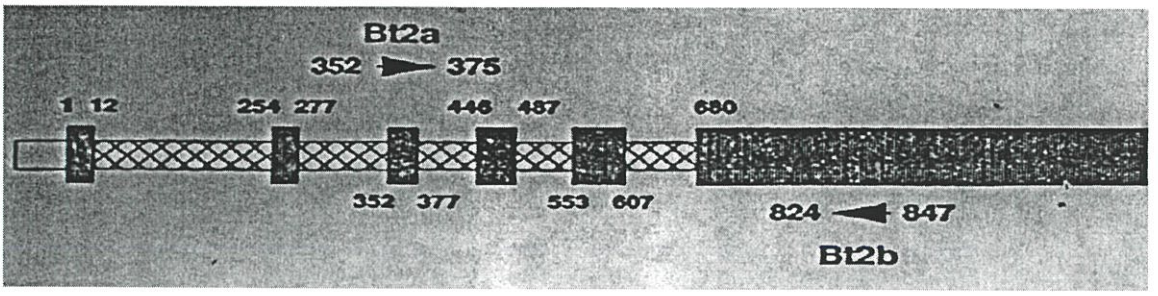


ภาพที่ 2.3 แสดงบริเวณยีนที่ไพรเมอร์ทาคา อะไมเลส เอ (Taa111 และ Taa 1280) จะเข้าจับกับดีเอ็นเอ (Tada *et al.* 1989)

3. ยีนทูบูลิน (Tubulin)

Raff. (1984) รายงานว่า ยีนทูบูลิน เป็นยีนที่อยู่ในสิ่งมีชีวิตที่เป็นพวกยูคารีโอต ซึ่งประกอบด้วยยีนที่เป็นทั้งชนิดแอลฟาทูบูลิน (α-tubuin) และยีนเบต้าทูบูลิน (β-tubulin) ซึ่งเป็นโครงสร้างพวกโปรตีนในไมโครทิวบูล (microtubule) ที่มีน้ำหนักประมาณ 50,000 ดาลตัน (dalton) ยีนเบต้าทูบูลิน เป็นยีนที่ใช้ในการตรวจสอบความผันแปรของสิ่งมีชีวิต ดังภาพที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 แสดงบริเวณยีนที่ไพรเมอร์ เบต้าทูบูลิน (β- tubulin, Bt2a และ Bt2b) จะเข้าจับกับดีเอ็นเอ (Glass and Donaldson. 1995)

ตารางที่ 2.2 แสดงยีนวงศ์ทูบูลิน

Organism	Number of gene each for α-tubulin and β- tubulin per haploid genome	Organization in the gene
Vertebrates		
Mammals	10-20 (many are pseudogenes)	Dispersed
Chicken	4	Dispersed
Drosophila	4	Dispersed
Sea urchin	9-13	α and β - gene unlink, but some clustering within families
Chlamydomonas	2	dispersed
Aspergillus	2	dispersed
Yeast (*Saccharomyces*)	1	probably unlinked

ที่มา : Raff (1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่เคยมีการศึกษาในรา

Target gene	Primer	Primer DNA Sequence
Histone 3	H3-1a	5′ ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG 3′
	H3-1b	5′ GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT 3′
β- tubulin	Bt1a	5′ TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG 3′
	Bt1b	5′ GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC 3′
	Bt2a	5′ GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3′
	Bt2b	5′ ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3′
ITS	ITS1	5′ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3′
	ITS4	5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3′

ที่มา : Glass and Donaldson (1995)

2.4.3 เทคนิคอาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

อาร์เอฟแอลพี หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตถูกเก็บไว้ในนิวเคลียสและออร์กาแนลบางชนิดเช่น คลอโรพลาสต์และไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ โมเลกุลของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตมีความสามารถในการจำลองโมเลกุลได้อย่างแม่นยำ และสามารถถ่ายทอดไปยังเซลล์ลูก แต่บางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอ เนื่องจากสิ่งแวดล้อมหรือสาเหตุอื่น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจรวมถึงการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซม เช่น มีส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น มีการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอ หรือมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งบางส่วนภายในโครโมโซมหรือจากต่างโครโมโซม ความหลากหลายนี้สามารถตรวจพบได้โดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอแล้วนำมาเปรียบเทียบ วิธีการที่ง่ายคือการนำดีเอ็นเอที่แตกต่างนั้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งขนาดและจำนวนดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่า เกิดโพลีมอร์ฟีซึมหรืออาร์เอฟแอลพี (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2540)

ประโยชน์ของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี

เทคนิคอาร์เอฟแอลพีในปัจจุบันมีบทบาทในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอย่างกว้างขวาง ในด้านต่างๆดังนี้คือ

- การศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต จากอาร์เอฟแอลพีของดีเอ็นเอในนิวเคลียส ไมโตคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์

- การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่นการติดตามความสามารถในการถ่ายทอดยีนจากพันธุ์พ่อแม่ไปยังลูก สามารถนำมาวิเคราะห์ปริมาณและวิเคราะห์ลักษณะประจำพันธุ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

- ติดตามลักษณะบางประการในสิ่งมีชีวิต โดยใช้ อาร์เอฟแอลพี มาร์กเกอร์ (RFLP Marker) ที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกับยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นๆ

เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ เช่น อาร์เอฟแอลพี อาร์เอพีดี และไอโซไซม์ มีบทบาทอย่างมากในการศึกษาความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต แต่เทคนิค อาร์เอฟแอลพีเป็นเทคนิคที่มีการใช้อย่างกว้างขวางมากที่สุด (Cenis. 1992) ซึ่งเทคนิคอาร์เอฟแอลพีมีข้อดีหลายประการ เช่น ข้อมูลจากเทคนิคอาร์เอฟ-แอลพี แสดงลักษณะชัดเจนและไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม แหล่งข้องมูลของดีเอ็นเอจากแหล่งต่างๆก็สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ และสามารถใช้มาร์กเกอร์หลายตัวในการทำแผนที่ยีนภายในกลุ่มประชากรที่ศึกษาโดยไม่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) สำหรับเทคนิคอาร์เอพีดี แสดงลักษณะ มาร์เกอร์ชัดแต่ไม่อาจจะตัดสินใจได้ชัดเจน ส่วนเทคนิคไอโซไซม์มีลักษณะด้อย คือ โปรตีนที่ปรากฏออกมาไม่สามารถแสดงออกทุกครั้งในเนื้อเยื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันและในระยะเดียวกันด้วย

2.4.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

แบคทีเรียจำนวนมากมีระบบป้องกันตัวเองจากการบุกรุกของดีเอ็นเอแปลกปลอม โดยจะตัดดีเอ็นเอที่แปลกปลอมนั้นออกเป็นชิ้นๆด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ในขณะที่ดีเอ็นเอในตัวเซลล์เองจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมทธิล (modification methylase) ที่เบสจำเพาะนั้นก่อน จึงไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ ระบบดังกล่าวนี้เรียกว่ารีสตริกชั่นโมดิฟิเคชั่น (restriction modification) ซึ่งโดยทั่วไปจะควบคู่กัน เอนไซม์แบ่งได้เป็น 3 แบบตามลักษณะการทำงาน องค์ประกอบของหน่วยย่อยของเอนไซม์ องค์ประกอบร่วม (cofactor) และวิธีการตัด (Winter *et al.* 1998)

เอนไซม์แบบที่ 1 (Type I) เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเพพไทด์ 3 ชนิด สามารถตัดดีเอ็นเอ และเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมทธิลเข้าไปที่เบสบางเบส (methylase) ในเวลาเดียวกัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำ (recognition site) ที่จำเพาะแต่จะตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไม่เจาะจงคือห่างออกไป 400 – 7000 คู่เบส การตัดดีเอ็นเอต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) เอทีพี (ATP) และ เอส - อะดีโนซิลเมไธโอนีน (S – adenosylmethionine, SAM) ในขณะที่เกิดการตัดสายดีเอ็นเอให้ขาดนั้นจะมีการสลาย เอทีพี ควบคู่กันไปด้วย หลังจากนั้นเอนไซม์จะหมดคุณสมบัติที่จะตัดดีเอ็นเอ แต่ยังคงมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่สลายเอทีพี (ATPase) เอนไซม์แบบที่ 1 จะเติมหมู่เมทธิลเข้าที่ตำแหน่งที่ 6 ของเบส A ที่บริเวณจดจำ ดังนี้

5′-AACNNNNNNGTGC-3′

3′-TTGNNNNNNCACG-5′

N คือ เบสใดๆแต่เป็นคู่กันในสองสาย A คือ ตำแหน่งที่มีการเติมหมู่เมทธิล เอนไซม์จะตัดดีเอ็นเอเมื่อไม่มีหมู่เมทธิลที่ A ทั้งสองสายของบริเวณจดจำเท่านั้น ถ้ามีหมู่เมทธิลแม้เพียงสายเดียวเอนไซม์ก็จะไม่ตัดดีเอ็นเอ แต่จะเติมหมู่เมทธิลเข้าที่ A ของอีกสายหนึ่งที่ว่างอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
58534

เอนไซม์แบบที่ 2 (Type II) เป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้ในการตัดต่อยีน เนื่องจากโมเลกุลไม่ซับซ้อนประกอบด้วยโพลีเพพไทด์เพียงชนิดเดียว การตัดดีเอ็นเอจะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำหรือจุดใกล้กับบริเวณจดจำ ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน และในปฏิกิริยาต้องการเฉพาะแมกนีเซียมไอออนเท่านั้น มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงอย่างเดียว การเติมหมู่เมทธิลให้กับเบสต้องอาศัยเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง (Eward. 1999)

เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนี้แยกได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ปัจจุบันพบแล้วกว่า 400 ชนิด การเรียกชื่อเอนไซม์ใช้ระบบอักษร 3 ตัว พิมพ์ตัวเอน ตัวแรกเป็นตัวพิมพ์ใหญ่อักษรแรกของชื่อ จีนัส (Genus) ตัวที่ 2 และ 3 เป็นตัวพิมพ์เล็กอักษรแรกของชื่อสปีชีส์ (Species) ของแบคทีเรียที่แยกเอนไซม์นั้นได้ ถ้ามีชื่อหรือรหัสสายพันธุ์ก็ใส่ตามมา และสุดท้ายเป็นเลขโรมันบอกลำดับของเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียดังกล่าว เช่น

*Eco*RI มาจาก *Escherichia coli* RY13 แยกเป็นชนิดแรก

*Hind*III มาจาก *Haemophilus influenzae* แยกเป็นชนิดที่สาม

เอนไซม์จะตัดดีเอ็นเอทั้งสองให้ปลายที่เป็น 5′- phosphase สายหนึ่ง และ 3′- hydroxy ในอีกสายหนึ่ง บริเวณจดจำของเอนไซม์ประกอบด้วยเบส 4 คู่ ถึง 6 คู่ หรือมากกว่านี้ โดยที่ลำดับเบสที่บริเวณจดจำมักจะมีการเรียงตัวของเบสเหมือนกันอยู่ตรงข้ามของ 2 สาย และมีแกนสมมาตรอยู่กึ่งกลาง (axis of symmetry) เรียกว่า พาลินโดรม (palindrome) เช่น *Eco*RI มีบริเวณจดจำและจุดตัด

5′-G AATTC-3′ 5′-G 5′-AATTC-3′

3′-CTTAA G-5′ 3′-CTTAA-5′ G-5′

เมื่อตัดดีเอ็นเอให้ขาดออกจากกันแล้ว ชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองจะมีปลายที่ยาวไม่เท่ากัน โดยเบสที่ปลายดังกล่าวอาจกลับมาจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนได้อีกเพราะมีเบสที่เป็นคู่ผสม เรียกว่า ปลายเหนียว (cohesive end หรือ sticky end) ถ้าดีเอ็นเอที่ตัดได้มีปลาย 5 ที่ยาวกว่าปลาย 3 เช่น ในกรณีของ *Eco*RI นี้เรียกว่า 5 protruding end ถ้าตัดแล้วได้ปลาย 3 ที่ยาวกว่าปลาย 5 ก็เรียกว่า 3 protruding end เช่น *Pst*I

5′-CTGCAG-3′ 5′-CTGCA-3′ G-3′

3′-GACGTC-5′ 3′-G 3′-ACGTC-5′

เอนไซม์บางชนิดจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งตรงกันทั้ง 2 สาย ทำให้ดีเอ็นเอที่มีปลายทั้งสองยาวเท่ากัน เรียกว่า ปลายทู่ (blunt end หรือ flush end) เช่น *Sma*I

5′-CCCGGG-3′ 5′-CCC GGG-3′

3′-GGG CCC-5′ 3′-GGGCCC-5′

เอนไซม์ บางชนิดมีบริเวณจดจำที่แตกต่างกันได้บ้าง เช่น *Xho*II มีบริเวณจดจำเป็น

5′-PuGATCPy-3′ Pu คือ พิวรีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3′-PyCTAGPu-5′ Py คือ ไพริมิดีน

บางชนิดก็มีบริเวณจดจำที่ไม่เป็นพาลินโดรม (palindrome) และจะตัดดีเอ็นเอที่จุดห่างจากบริเวณจดจำเช่น *Hph*I

5′-GGTGANNNNNNNN

3′-CCACTNNNNNNNN

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่พบประมาณ 400 ชนิดนั้น มีบริเวณจดจำที่แตกต่างกันประมาณ 90 แบบ ดังนั้นจึงมีเอนไซม์บางชนิดที่มีบริเวณจดจำเหมือนกัน เรียกว่าไอโซชิโซเมอร์ (isoschizomer) แม้ว่าจะมีบริเวณจดจำเหมือนกัน แต่ไม่จำเป็นต้องตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน เช่น *Xma*I และ *Sma*I เป็น ไอโซชิโซเมอร์ (isoschizomer) แต่ตัดดีเอ็นเอได้แตกต่างกัน (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2540)

เอนไซม์แบบที่ 3 (type III) ประกอบด้วยโพลีเพพไทด์ 2 ชนิด มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะและเติมหมู่เมทธิลในขณะเดียวกัน การตัดดีเอ็นเอจะเกิดห่างจากบริเวณจดจำประมาณ 25-27 คู่เบสในปฏิกิริยาต้องมีแมกนีเซียมไอออนและ เอทีพี โดยไม่จำเป็นต้องมีเอส - อะดีโนซิลเมไธโอนีน แต่ถ้ามีเอส – อะดีโนซิลเมไธโอนีน จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และเอนไซม์จะสามารถเติมหมู่เมทธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะได้ พบว่ายีนที่กำหนดการสร้างโพลีเพพไทด์ทั้ง 2 ชนิดของเอนไซม์นี้มีตำแหน่งอยู่ใกล้ๆ กัน ในส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมของ *E. coli* บางสายพันธุ์ การสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) แยกกันเป็น 2 หน่วย ยีนหนึ่งทำหน้าที่ตัดดีเอ็นเอและอีกยีนหนึ่งทำหน้าที่เติมหมู่เมทธิล

เอนไซม์แบบที่ 1 และแบบที่ 3 จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดไม่แน่นอน และปฏิกิริยามีการแข่งขันกันว่าจะเกิดการตัดดีเอ็นเอหรือ เติมหมู่เมทธิล จึงไม่นิยมใช้ในการโคลนยีน

2.4.5 เทคนิคพีซีอาร์ (PCR Technique)

ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมาตั้งแต่มีการค้นพบเทคนิค พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) ในปี ค.ศ. 1985 เทคนิคนี้ได้ถูกนำไปใช้ในงานวิจัยอย่างกว้างขวางเป็นที่ยอมรับในบรรดาผู้นำเทคนิคพีซีอาร์ไปประยุกต์ใช้ว่าไม่มีสูตรสำเร็จของวิธีสามารถนำไปใช้ได้ทุกกรณี ฉะนั้นการนำเทคนิคพีซีอาร์ ไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยแต่ละเรื่องนั้น จึงต้องทำการพัฒนาและปรับปรุง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมให้ได้ในประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์เกิดขึ้นสูงสุด ปัญหาที่มักเกิดขึ้นบ่อยในการทำ พีซีอาร์ ดังเช่น การไม่ได้ผลิตผล หรือการมีผลผลิตปริมาณต่ำ การมีผลิตผลที่ไม่จำเพาะ เกิดขึ้นจากความผิดพลาด หรือของไพรเมอร์ หรือไพรเมอร์ไดเมอร์ (primer-dimer) เป็นต้น การลดหรือกำจัดปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าวโดยการปรับปรุงหลายๆ องค์ประกอบให้พอเหมาะ จนกระทั่งได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นตามต้องการ (Glass and Donaldson. 1995)

วิธีการมาตรฐานในการทำพีซีอาร์ กำหนดให้มีส่วนผสมต่างๆ รวมอยู่ในปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ส่วนประกอบของปฏิกิริยามีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ดีเอ็นเอต้นแบบ 10^5-10^6 โมเลกุล
- ไพรเมอร์ 20 พิโกโมล (pM)
- 20 มิลลิโมล Tris-HCl พีเอช 8.3
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 1.5 มิลลิโมลาร์
- ทวีน 20 (Tween 20) 0.05 เปอร์เซ็นต์ (v/v)
- เจลาติน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือนิวคลีเอส ฟรีโบวีน ซีรัมอัลบูมิน (nuclease-free bovine serum albumin)
- 50 ไมโครโมล ของแต่ละ dNTP (dATP dCTP dGTP และ dTTP)
- เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 2 ยูนิต

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

1. Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที ดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้งสองสายจะเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2. Primer annealing เป็นการลดอุณหภูมิลงมาที่ 40-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับคู่อย่างจำเพาะที่ปลาย 3′ ของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งสองสาย

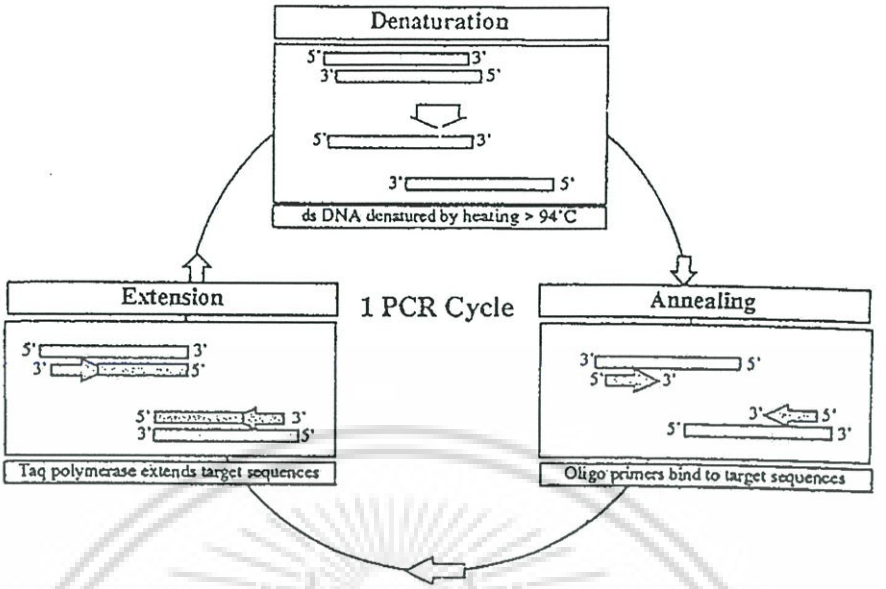
3. Primer extension เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ให้ยาวขึ้นที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

ปฏิกิริยาเกิดขึ้นทั้ง 3 ขั้นตอน นับเป็นจำนวน 1 รอบ ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอมากรอบขึ้นอัตราเพิ่มจะเป็นทวีคูณ 2^n โดย n คือจำนวนรอบในการสังเคราะห์ (ดังภาพที่ 2.5)

รอบสุดท้ายทำ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการแช่เย็นที่ 40 องศาเซลเซียสและ/หรือเติม 10 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ (10 mM EDTA)

วิธีการมาตรฐานดังกล่าวสามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA แม่พิมพ์ที่มีขนาดความยาว 150 - 2951 คู่เบส ได้ผลดีและมีความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามสำหรับบางดีเอ็นเอแม่พิมพ์อาจใช้วิธีไม่ดี กรณีเช่นนี้จะต้องทดลองศึกษาหาสภาวะเหมาะสมโดยการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบและสภาวะต่างๆ ดังนี้ (Ralph and John. 1998 ; Barbergard *et al.* 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 กระบวนการพีซีอาร์ (Ralph and John. 1998)

1. การคัดเลือกและการออกแบบไพรเมอร์

ข้อแนะนำในการคัดเลือกหรือการออกแบบไพรเมอร์ ที่สำคัญควรพิจารณา คือ

ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี random base distribution และมีปริมาณ GC ใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอ ที่ต้องการเพิ่มขยาย ควรหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มีลำดับการเรียงตัวที่ไม่ปกติ (unusual sequence) และควรมีปริมาณ GC อยู่ระหว่างร้อยละ 50-60

- หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มี secondary structure โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ปลาย 3′ (3′- end) ของไพรเมอร์ การตรวจสอบโครงสร้างของลำดับเบสทำได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เช่น Squiggles หรือ Circles ซึ่งพัฒนาขึ้นที่ University of Wiscosin ถ้ายังคงมี secondary structure ควรแทนที่ dGTP ด้วย 7-deaza-2-dGTP(2)

- ตรวจสอบการเรียงลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์ไม่ให้มีความเป็นคู่สมกัน (complementarity) โดยเฉพาะต้องไม่มี 3′-overlap ในคู่ไพรเมอร์ ซึ่งช่วยลดอัตราการเกิดไพรเมอร์ไดเมอร์

- ตามหลักเกณฑ์ควรกำหนดให้มีความยาวระหว่าง 18-28 นิวคลีโอไทด์ และมีการเรียงเป็นคู่สมกับ 3′- end ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์

- ทีเอ็ม (Tm , melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 55-80 องศาเซลเซียส การคำนวณหาค่า Tm ใช้กฎ the rule of thumb calculation โดยคิด 2 องศาเซลเซียส สำหรับ A หรือ T และ 4 องศาเซลเซียส สำหรับ G หรือ C

- ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ที่พอเหมาะควรอยู่ระหว่าง 0.1-0.5 โมลาร์ ถ้าใช้ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นสูงเกินไปส่งเสริมให้เกิดการจับคู่ผิดพลาด และมีการสะสมของผลผลิตที่ไม่จำเพาะมากขึ้นและอาจช่วยเพิ่มโอกาสการเกิดไพรเมอร์ไดเมอร์ ซึ่งเป็น temperature - independent artifact ทั้งผลผลิตจำเพาะและไม่จำเพาะ และไพรเมอร์ไดเมอร์ ต่างก็แย่งใช้เอนไซม์ ดีเอ็นทีพี และไพรเมอร์ ทำให้ได้ผลผลิตที่ต้องการปริมาณลดลง

2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase

เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่ซื้อได้จากหลายบริษัทผู้ผลิต ซึ่งอาจมีความแตกต่างกันในเรื่องของสภาวะที่เหมาะสม และคำนิยามกำหนดหน่วยวัดแอคติวิตี (unit definitions) ดังนั้นเมื่อเริ่มต้นใช้ควรจะทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ ในช่วงตั้งแต่ 0.5-5 ยูนิตต่อ 100 ไมโครลิตร และตรวจสอบผลโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (วัชรี อัตถาทิพพหลกุล และ มนตรี อัตถาทิพพหลกุล. 2539)

3. ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน

ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะขึ้นกับความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน ถ้ามีความเข้มข้นมากเกินไป ทำให้มีการเพิ่มขยายผลผลิตที่ไม่จำเป็นเกิดการสะสมมาก ถ้ามีความเข้มข้นน้อยเกินไปจะไปลดปริมาณผลผลิตที่ต้องการ

4. ความเข้มข้นของ deoxynucleotide triphosphates

deoxynucleotide triphosphates, dNTP ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปกติมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 50-200 ไมโครโมล โดยต้องปรับให้เป็นกลาง ที่ พีเอช 7.0

5. ความสำคัญและองค์ประกอบอื่นๆ ในปฏิกิริยา

บัฟเฟอร์ที่ควรใช้สำหรับพีซีอาร์คือ Tris-HCl ความเข้มข้น 10-15 ไมโครโมลาร์ พีเอช 8.3-8.8 ที่ 20 องศาเซลเซียส

2.4.6 เจลอิเล็กโทรโพรีซีส (Gel Elecrophoresis)

อิเล็กโทรโพรีซีส เป็นคำอธิบายการเคลื่อนที่ของประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดประจุและคุณสมบัติจำเพาะทางชีวภาพหรือทางเคมีของสารนั้น อิเล็กโทรโฟรีซีสเป็นเทคนิคที่นิยมแพร่หลายในหมู่นักชีวเคมี เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์และใช้มากในการวิเคราะห์โปรตีนและไอโซไซม์ (อาภัสรา ชูเทศะ. 2542)

2.6.1.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำอิเล็กโทรโพรีซีส

1. คุณสมบัติของสารตัวอย่าง

1.1. ชนิดและปริมาณของประจุ ชนิดของประจุของโมเลกุลจะเป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า นอกจากนี้ปริมาณของประจุมีผลต่ออัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าตัวกลางคือ โมเลกุลที่มีประจุมาก ชนิดและปริมาณของประจุของสารมีความสัมพันธ์โดยตรงกับสภาวะความเป็นกรด ด่างของบัฟเฟอร์ (buffer) ของสารตัวอย่างนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2. ขนาดของโมเลกุล โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีแรงเสียดทาน และแรงของประจุไฟฟ้า (electrostatic force) ซึ่งเกิดกับตัวกลางแวดล้อม (surrounding medium) สูงกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จึงช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก

1.3. รูปร่างของโมเลกุล โมเลกุลที่มีรูปร่างต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน โมเลกุลที่มีรูปร่างกลมจะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีรูปร่างรี เนื่องจากแรงเสียดทานและแรงของประจุไฟฟ้า ที่เกิดขึ้นกับสารที่มีรูปร่างไม่เหมือนกัน

2. บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์นอกจากจะทำหน้าที่รักษาสภาวะความเป็นกรด ด่างของตังกลางค้ำจุน และเป็นตัวทำละลายของสารตัวอย่างแล้วยังเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าอีกด้วยคือ

2.1. พีเอชของบัฟเฟอร์ เนื่องจากชีวโมเลกุลโดยทั่วไปไม่ว่าจะเป็นโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก จะต้องมีหมู่ที่เป็นประจุบวกและลบอยู่ในโมเลกุล ซึ่งมีค่าการแตกตัว (dissociation constant, pK) ต่างๆกัน การแตกตัวของหมู่ประจุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับพีเอชของสารละลายนั้น ดังนั้นพีเอชของบัฟเฟอร์ จึงมีบทบาทสำคัญในการกำหนดชนิดและปริมาณของประจุของสาร

2.2. ไอออนิคสเตร้งก์ (Ionic strength) ของบัฟเฟอร์ การเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุในสนามไฟฟ้าแปรผกผันกับรากที่สองของไอออนิคสเตร้งก์ นั่นคือสารชนิดเดียวกันจะเคลื่อนที่ในบัฟเฟอร์ที่มีไอออนิคสเตร้งก์ต่ำได้ดีกว่าในบัฟเฟอร์ที่มีไอออนิคสเตร้งก์สูง แต่ในขณะเดียวกันการทำอิเล็กโทร-โฟรีซีสในบัฟเฟอร์ที่มีไอออนิคสเตร้งก์สูงจะได้แถบของการแยกที่คมชัดกว่า เมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มีไอออนิค-สเตร้งก์ต่ำ (ภาควิชาพันธุศาสตร์. 2542)

3. สนามไฟฟ้า

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์และระยะเวลาในการทำอิเล็กโทร โฟรีซีสแต่จะแปรผกผันกับความต้านทานไฟฟ้า

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าจะขึ้นกับความแรงของสนามไฟฟ้าที่ใช้ แต่การใช้กำลังไฟฟ้าสูงเกินไปในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส จะทำให้เกิดผลเสียหลายประการคือ ทำให้เกิดการระเหยของสารละลายและทำให้เกิดความร้อนสูงในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ทำให้เกิดการกระจายตัวของโมเลกุลของสารทำให้การแยกสารไม่ค่อยดีเท่าที่ควร แต่ในทางตรงกันข้ามหากใช้กำลังไฟฟ้าที่ต่ำเกินไปแม้จะช่วยลดปัญหาความร้อนที่เกิดขึ้นแต่ผลของการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสจะไม่ดี เนื่องจากต้องใช้เวลาในการทำนานขึ้น ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดีจึงควรเลือกใช้กระแสหรือความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม

4. ตัวกลางค้ำจุน

การเลือกตัวกลางค้ำจุนให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการแยกโดยวิธีอิเล็กโทร-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โฟรีซีสมีผลต่อการแยกของสาร เพราะตัวกลางค้ำจุนบางชนิดอาจทำให้เกิดการดูดซับระหว่างสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุนหรืออาจมีการเปลี่ยนประจุของสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุน รวมทั้งความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenesis) ของตัวกลางค้ำจุน ตัวกลางค้ำจุนที่ดีควรมีลักษณะดังนี้

- ไม่ไวในการทำปฏิกิริยา
- ยอมให้สารตัวอย่างผ่านได้อย่างรวดเร็ว
- สามารถแยกสารตัวอย่างได้อย่างชัดเจน
- สามารถแยกเป็นชิ้นส่วนได้ง่าย

Kurtzman *et al.* (1986) ทำการศึกษาเชื้อราในสกุล *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยเป็นการศึกษาลักษณะของโพลีมอร์ฟีซึมที่เกิดขึ้นเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เชื้อราในสกุล *A. oryzae* และ *A. sojae* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก จากข้อมูลที่ได้พบว่าเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์มีดีเอ็นเอในปริมาณที่สูง(69-100 เปอร์เซ็นต์) และมีขนาดของจีโนมใกล้เคียงกัน

Croft *et al.* (1990) ทำการวิเคราะห์ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราในสกุล *Aspergillus nidulan* ทั้งที่เป็นนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (nuclear DNA) และ ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) จากการทดลองเมื่อใช้เทคนิคอาร์เอฟ-แอลพี เปรียบเทียบชนิดของดีเอ็นเอทั้งสอง พบว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีความผันแปรทางพันธุกรรมเกิดขึ้นโดยดูจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ซึ่งจะเป็นข้อมูลในการตรวจสอบนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (nuclear DNA) ต่อไป

Kusters – Van Someron *et al.* (1990) ทำการศึกษาเชื้อราในสกุล *Aspergillus* ชนิดสปอร์สีดำ โดยวิเคราะห์ทางชีวเคมีและทางพันธุวิศวกรรมเพื่อให้การตรวจสอบมีความรวดเร็วขึ้น วิธีเวส-เทิร์นบลอท (Western blot) ใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ pectin lyase และ เซาร์เทิร์น-บลอท (Southern blot) ใช้ดูลักษณะยีนของเอนไซม์ pectin lyase วิธีนี้สามารถแยกเชื้อราในสกุล *Aspergillus niger* ได้ง่าย โดยการจัดจำแนกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดจำแนกเชื้อต่อไป

Francoise *et al.* (1990) ทำการศึกษารูปแบบโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (chromosomal DNA) โดยเทคนิค transverse alternative field electrophoresis และไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) จากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 22 สายพันธุ์ จากการทดลองพบความแตกต่างถึง 20 คารีโอไทป์ (karyotype) และไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) 17 ตัวอย่าง แต่มี 3 สายพันธุ์ที่มาจากแหล่งเดียวกันไม่พบความแตกต่าง

Moody and Tyler (1990a) ทำการศึกษาไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) โดยเทคนิค restriction length polymorphism เพื่อจัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อราในสกุล *Aspergillus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

flavus, *A. parasiticus* และ *A. nomius* พบว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) ของเชื้อราในสกุล *A. flavus* และ *A. parasiticus* มีลักษณะเป็นวงและมีขนาด 32 กิโลเบส ส่วน restriction map ที่ได้จากการทดลองโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน โดยที่เชื้อราในสกุล *A. nidulans* จะมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 33 กิโลเบส

Moody and Tyler (1990b) ทำการศึกษารีคอมบิแนนท์ ดีเอ็นเอ (recombinant DNA) ที่โคลนโดยใช้ลำดับเบสที่เป็น high-copy และ low-copy จากเชื้อรา *Aspergillus nidulans* และ *Neurospora crassa* เพื่อใช้จำแนกความแตกต่างโดยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ของเชื้อราในกลุ่ม *A. flavus* ซึ่งได้แก่ *A. parasiticus* และ *A. nomius* เพื่อจัดจำแนกความแตกต่างตามลักษณะโพลีมอร์ฟิซึมที่ได้แต่ก็ยังพบข้อจำกัดในการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP) เมื่อใช้นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (nuclear DNA) ของเชื้อราในกลุ่ม *A. flavus* เนื่องมาจากไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของเชื้อราที่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินได้

Gwo-Yang *et al.* (1995) ทำการศึกษาความแตกต่างของเชื้อราในสกุล *Aspergillus parasiticus* และ *Aspergillus sojae* ซึ่งเชื้อรา *A. parasiticus* เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน แต่ *A. sojae* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิ ทำการทดลองโดยเทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) จากการทดลองสามารถจำแนกความแตกต่างของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. sojae*

Alain *et al.* (1995) ทำการศึกษาความแตกต่างของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) และทำการทดลองโดยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และ พีซีอาร์ เพื่อจัดจำแนกเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จากทั้งหมด 42 แหล่งที่ทำการคัดเลือกมา พบว่ามีความแตกต่างกันน้อยมาก

Yuko and Tsutomu (1996) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพื่อจัดจำแนกเชื้อราในสกุล *Aspergillus* section *flavi* โดยเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบ 5.8 เอส ไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ (5.8s ribosomal DNA) บริเวณ ITS (Intrnal transcribed spacer, ITSI - 5.8s - ITSII) ซึ่งเป็นยูนิเวอร์ซัล ไพรเมอร์ (universal primer) พบว่า เชื้อราในสกุล *A. flavus*/*A. oryzae A. parasiticus*/*A. sojae* และ *A. tamarii* พบความแตกต่างของโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นยกเว้น *A. nomius* ซึ่งพบยังไม่ชัดเจน

Hiroshi *et al.* (1998) ทำการศึกษาเพื่อหาวิธีการตรวจสอบเชื้อยีสต์ *Saccharomyces diastaticus* ซึ่งเป็นสาเหตุให้เบียร์เน่าเสีย โดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) เป็นการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบเชื้อ *S. diastaticus* ได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น

Toby *et al.* (1998) ทำการศึกษาโพลีมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ เพื่อจัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน ในกลุ่มของ *Aspergillus* section *flavi* ที่เป็นสายพันธุ์ใหม่ซึ่งผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินทั้งชนิด B และ G เปรียบเทียบกับ 3 สายพันธุ์ที่ไม่ผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพิษ โดยเทคนิคพีซีอาร์ และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถจำแนกเชื้อรา *Aspergillus* spp. สายพันธุ์ใหม่ได้

Peterson *et al.* (2000) ทำการศึกษาเชื้อรา *Aspergillus niger* strain BO-1 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ batch continuous และ fed batch เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะ-ไมเลสที่ความแตกต่างของระดับพีเอช 2.5-6.0 พบว่าพีเอชมีผลต่อการผลิตเอนไซม์และอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสอยู่ที่ระดับ 0-0.1 ต่อชั่วโมง และค่าความคงตัวจะอยู่ที่ระดับ 0.1-0.2 ชั่วโมง แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษาได้แก่น้ำตาลมอลโตส และมอลโตเด้กตรินซ์ เปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคส ผลที่ได้พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดจะอยู่ที่ระดับ 0.19 ต่อชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้ยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ของเชื้อราเพื่อศึกษายีน *gla*A ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

หม้อนึ่งอัดไอ	TOMY รุ่น SS 325
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ	Binder รุ่น T490181
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Shimadzu รุ่น UV-1601
ตู้ถ่ายเชื้อ	ISSCO รุ่น BVT 123
เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่งและ 4 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO รุ่น AG 204
เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ	Hermle-Lebortech รุ่น Z383K
เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง	Denver Instrument รุ่น 215
ตู้อบ	Delta Laboratory รุ่น 125
ไมโครไปเปต	Gilson รุ่น pipetman
เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส	Phamacia Biotech รุ่น GNA100
เครื่อง พีซีอาร์	Pergin Elmer รุ่น 480
เครื่องฉายแสงยูวี	SYNGENE รุ่นBTS-20.M
เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า	EC รุ่น 250-90
เทอร์โมบล็อก	BIOSAN รุ่น 1000/500
เครื่องแก้วชนิดต่างๆ	PYREX
เครื่องผสมสาร	Sciencetific Industrialรุ่น G-560 E
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	Shimadsu รุ่น UV-1601
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Mammert รุ่น WB22
หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร	
หลอด พีซีอาร์ ขนาด 0.2 และ 0.5 มิลลิลิตร	
โกร่ง	
ค็อกบอร์เรอร์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 สารเคมี

Agarose gel (USB)

dNTPs (POMEGA)

EDTA (CARLO ERBA)

โซเดียมอะซิเตต (CARLO ERBA)

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (CARLO ERBA)

โซเดียมคลอไรด์ (FLUKA)

แอมโมเนียมซัลเฟต (MERK)

ยูเรีย (J.T. Baker)

แอมโมเนียมคลอไรด์ (MERK)

โพแทสเซียมคลอไรด์ (MERK)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต (CARLO ERBA)

แมกนีเซียมซัลเฟต (UNIVAR)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme, Amersham Phamacia Biotech)

- เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI

ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker, Amersham Phamacia Biotech)

สารละลายไอโอดีน

3.1.3 แหล่งของเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้งสปอร์สีเขียวและสีดำ ที่ได้มีการคัดเลือกจากลูกแป้งเหล้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดอำนาจเจริญ จังหวัดยโสธร จังหวัดนครพนม จังหวัดบุรีรัมย์ จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดสุรินทร์ จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดอุดรธานี จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดชัยภูมิ จังหวัดมหาสารคาม จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดศรีสะเกษ และจังหวัดสกลนคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การแยกเชื้อราและการเก็บรักษาเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่คัดเลือกได้จากลูกแป้งเหล้า

วิธีการแยกเชื้อราชนิดต่างๆจากลูกแป้งเหล้าในท้องที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามวิธีของ ชัยวัฒน์ จาติเสถียร (2521) โดยการนำลูกแป้งเหล้ามาบดให้ละเอียดในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ชั่งลูกแป้งเหล้าที่บดแล้วมา 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตมา 100 ไมโครลิตร หยดลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Czapek agar (ภาคผนวก ก 2) สเปรดเพลท (spread plate) จนแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีของเชื้อราที่อยู่เดี่ยวๆและมีลักษณะต่างกัน มาทำให้เชื้อราบริสุทธิ์โดยการลาก (streak) บนอาหาร PDA (ภาคผนวก ก 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน และเก็บตัวอย่างไว้ทดลอง จากนั้นทำการคัดเลือกเฉพาะเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้งชนิดที่มีสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำ มาอย่างละ 30 ตัวอย่าง มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ในอาหารแข็ง

การศึกษาเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1 ทั้ง 60 ตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้ ค็อกบอร์เรอร์ตัดปลายเส้นใยนำมาวางลงตรงกลางจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Czapek agar ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการทดลองตัวอย่างละ 5 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมาทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสด้วยสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข) เพื่อดูบริเวณโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น ถ้าเชื้อใดผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งจะเกิดบริเวณโซนใสรอบๆโคโลนีหลังจากราดสารละลายไอโอดีน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและบริเวณโซนใส จากนั้นนำมาหาผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนี คัดเลือกตัวอย่างที่มีความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีที่สุดไปทดสอบในอาหารเหลว

3.2.3 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ในอาหารแข็ง

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้คีอร์กบอร์เรอร์ตัดปลายเส้นใย นำมาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Glucose peptone agar (ภาคผนวก ก 4) ทำการทดลองตัวอย่างละ 5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมาทดสอบกรดโคจิกด้วยสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (ภาคผนวก ข 2) ถ้าเชื้อรามีการผลิตกรดโคจิกจะปรากฏสีแดงขึ้นรอบๆโคโลนี ทำการบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อราในอาหารเหลว

3.2.4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้น 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2 ที่มีผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนีมากที่สุด มาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ดัดแปลง ที่มีการปรับระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ระดับความเข้มข้น 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใช้สปอร์ของเชื้อราเริ่มต้นที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างอาหารมา 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง นำไปตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวัดพีเอชและทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ข 1)

การศึกษาคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในแป้งดิบ นำแป้งมันสำปะหลังดิบมาชั่งน้ำหนักตามระดับความเข้มข้น 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาห่อด้วยกระดาษฟลอยด์ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นนำมาเติมในอาหารเหลว Czapek ต่อไป ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการใช้แป้งมันสำปะหลังสุก

3.2.4.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

นำเชื้อรามาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ดัดแปลง ที่ทราบความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลวสูงสุด มาศึกษาแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ ยูเรีย (NH_2CONH_2) 3 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 3 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สปอร์ของเชื้อราเริ่มต้นที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างอาหารมา 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง นำไปตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวัดพีเอชและทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

3.2.5 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราในอาหารเหลว

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด และมีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกมาทดสอบ การผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว Glucose peptone ดัดแปลง ซึ่งมีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 10 เปอร์เซ็นต์ มาศึกษาแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ ยูเรีย (NH_2CONH_2) 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.5 กรัมต่อลิตร และ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ใช้สปอร์ของเชื้อราเริ่มต้นที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Rosfarizan and Ariff. 2000) เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างอาหารมา 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง นำไปตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวัดพีเอช และทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส และกรดโคจิก (ภาคผนวก ข 2)

3.2.6 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* spp. โดยเทคนิคพีซีอาร์อาร์เอฟแอลพี (PCR – RFLP)

3.2.6.1 การเตรียมเส้นใย

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1 โดยเป็นเชื้อราที่มีผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนีตั้งแต่ 1 ขึ้นไป ทั้งหมด 14 ตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหารเหลว GYEP (ภาคผนวก ก 3) ในขวดเพาะเลี้ยงรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร สปอร์เริ่มต้น 10^6-10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ภายใต้สภาวะแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง (Yuko and Tsutomu. 1996) จากนั้นนำเส้นใยมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง เก็บตัวอย่างเส้นใยไว้สกัดดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.2.6.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยที่ได้จากข้อ 3.2.6.1 จำนวน 14 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Cenis (1992) ; Louis *et al.* (1997) โดยชั่งเส้นใยให้ได้ 0.5 กรัม (น้ำหนักเปียก) จากนั้นนำเส้นใยมาบดในโกร่งที่เย็นจัด เติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมเส้นใย บดให้ละเอียดอย่างรวดเร็วจนมีลักษณะคล้ายแป้ง ถ่ายลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม 3M Sodium acetate 200 ไมโครลิตรทันที เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสถ่ายลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ผสม Isopropanol ลงในหลอดในปริมาตรที่เท่ากันเพื่อเป็นการตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งจะเหลือดีเอ็นเอที่ก้นหลอด ล้างดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ดูดเอทานอลทิ้ง คว่ำหลอดให้แห้ง ประมาณ 20 นาที ละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสารละลาย TE buffer 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบหาปริมาณโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (ภาคผนวก ค 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การทดลองนี้ได้ศึกษาไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ดังวิธีการดังนี้

1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ ITS 2 ตัวคือ ไพรเมอร์ ITS 1 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ คือ 5′ TCCGTAGGTGAACCTGCGCG 3′ และไพรเมอร์ ITS 4 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ คือ 5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3′ (White *et al.* 1990)

นำดีเอ็นเอจากข้อ 3.2.6.2 ที่ทราบปริมาณความเข้มข้นแน่นอนมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยปิเปตดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 5X buffer ปริมาณ 5 ไมโครลิตร 10M dNTP 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ITS 1 และไพรเมอร์ ITS 4 อย่างละ 2.5 ไมโครลิตร และน้ำ DI 29 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตรต่อหลอด ผสมให้เข้ากัน นำไปเข้าเครื่องพีซีอาร์ ภายใต้สภาวะดังนี้คือ Initial denature อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 นาทีและ Extention อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทั้ง 3 สภาวะใช้จำนวนรอบ 30 รอบ Final extention อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส แต่เพิ่มปริมาณความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1.5 ถึง 2.5 เปอร์เซ็นต์

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ ไพรเมอร์ Taa111 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ คือ 5′GGATCGATTTGCAAGGACGG 3′ และ ไพรเมอร์ Taa1280 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ คือ 5′ TAGAGGTCGTCCATGCTGCC 3′ (Egel *et al.* 1994)

นำดีเอ็นเอจากข้อ 3.2.6.2 ที่ทราบปริมาณความเข้มข้นแน่นอนมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ตามวิธีของ Yuko and Tsutomu (1996) โดยปิเปตดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 5X buffer ปริมาณ 5 ไมโครลิตร 10M dNTP 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Taa 111 และไพรเมอร์ Taa 1280 อย่างละ 2.5 ไมโครลิตร และน้ำ DI 29 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตรต่อหลอด ผสมให้เข้ากัน นำไปเข้าเครื่องพีซีอาร์ ภายใต้สภาวะดังนี้คือ Initial denature อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที Annealing อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาทีและ Extention อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทั้ง 3 สภาวะใช้จำนวนรอบ 29 รอบ Final extention อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธีเจลอิเล็กโทร-โฟรีซีส แต่เพิ่มปริมาณความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1.5 ถึง 2.5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ Bt2a ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ คือ 5′ GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3′ และ ไพรเมอร์ Bt2b ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้ คือ 5′ ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3′ (Glass and Donaldson. 1995)

นำดีเอ็นเอจากข้อ 3.2.6.2 ที่ทราบปริมาณความเข้มข้นแน่นอนมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยปิเปตดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 5X buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10M dNTP 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Bt2a และไพรเมอร์ Bt2b 4 อย่างละ 2.5 ไมโครลิตร และน้ำ DI 29 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตรต่อหลอด ผสมให้เข้ากัน นำไปเข้าเครื่องพีซีอาร์ ภายใต้สภาวะดังนี้คือ Initial denature อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที Annealing อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาทีและ Extention อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทั้ง 3 สภาวะใช้จำนวนรอบ 28 รอบ Final extention อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส แต่เพิ่มปริมาณความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1.5 ถึง 2.5 เปอร์เซ็นต์

3.2.6.4 การตัดผลผลิต พีซีอาร์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้จากข้อ 3.2.6.3 ที่ทราบปริมาณความเข้มข้น โดยปิเปตผลผลิตพีซีอาร์ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 0.5 มิลลิลิตร สารละลาย 10X buffer 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ 0.5 ไมโครลิตร และ น้ำDI 12.5 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสหรือตามสภาวะของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ นาน 10 ชั่วโมง นำไปตรวจสอบผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

ในการทดลองนี้เลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *Hae*III *Hin*fI *Hin*dIII และ การตัดด้วยเอนไซม์ผสม ทั้ง 3 ชนิด คือ *Hae*III กับ *Hin*fI *Hin*dIII กับ *Hae*III และ *Hin*fI กับ *Hin*dIII

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

นำเชื้อรา *Aspergillus* ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังสูงสุด ทั้งชนิดสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำอย่างละตัวอย่างมาศึกษาสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์ (slide culture) โดยตัดอาหาร PDA ให้เป็นชิ้นส่วนสี่เหลียมวางลงบนสไลด์ที่ปลอดเชื้อ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเส้นใย หรือสปอร์มาวางลงบนชิ้นอาหารทั้งสี่ด้านปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปลอดเชื้อบนชิ้นอาหาร วางสไลด์บนแท่งแก้วในจานเพาะเชื้อ เติมน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 4 วัน จากนั้นนำชิ้นอาหารออกจะเห็นเส้นใยราเกาะอยู่กับแผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์ หยด lactophenol cotton blue (ภาคผนวก ค 4) ลงบนสไลด์ 1 หยด เอากระจกปิดสไลด์นำสปอร์และเส้นใยไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายภาพ

3.3 วิธีวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ข1)

3.3.2 การวิเคราะห์กรดโคจิก (ภาคผนวก ข2)

3.3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus* spp. จากลูกแป้งเหล้า

ผลการคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus* spp. จากลูกแป้งเหล้า ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สามารถจัดจำแนกได้เชื้อรา 2 กลุ่มคือ กลุ่มเชื้อราที่มีลักษณะสปอร์สีเขียวมีทั้งหมด 30 ตัวอย่างซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกมาจากจังหวัดอำนาจเจริญ ยโสธร บุรีรัมย์ นครพนม ร้อยเอ็ด สุรินทร์ อุบลราชธานี และอุดรธานี อีกกลุ่มเป็นเชื้อราที่มีลักษณะสปอร์สีดำมีทั้งหมด 30 ตัวอย่างซึ่งเป็นเชื้อราที่คัดเลือกมาจากจังหวัด บุรีรัมย์ ชัยภูมิ มุกดาหาร มหาสารคาม นครราชสีมา นครพนม ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ สกลนคร และ สุรินทร์ โดยได้ทำการกำหนดรหัสเชื้อ แสดงดังตารางที่ 4.1 ผลการทดลองสอดคล้องกับการรายงานของ ชัยวัฒน์ จาติเสถียร (2521) จิราภรณ์ สุขุมาวาสี (2518) และสมพร สินธารา (2544) ได้กล่าวว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้คัดแยกจากลูกแป้งเหล้า และลูกแป้งข้าวหมาก ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งได้แก่ เชื้อยีสต์ เชื้อราสกุล *Aspergillus niger* *Aspergillus* spp. และ *Rhizopus* spp. เป็นต้น

4.2 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ในอาหารแข็ง

ผลจากการตรวจสอบความสามารถของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 ถึงประสิทธิภาพในการย่อยแป้งมันสำปะหลังบนอาหาร Czapek agar หลังจากการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน เพื่อดูบริเวณโซนใสที่เกิดขึ้น แสดงดังภาพที่ 4.1 ผลปรากฏว่า เชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่คัดเลือกจากจังหวัดต่างๆโดยมีการกำหนดรหัส คือ เชื้อรารหัส AJ1 AJ2 AJ3 AJ4 BR1 BR2 BR3 BR4 BR5 NP1 NP2 NP3 NP4 RE1 RE2 RE3 SR1 SR2 SR3 SR4 UB1 UB2 UB3 UD1 UD2 UD3 UD4 YT1 YT2 YT3 และ YT4 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียว โดยเชื้อแต่ละตัวมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้แตกต่างกันไป สำหรับเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่มีผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนีตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไป เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียว มีจำนวน 10 เชื้อ ดังนี้คือ เชื้อรารหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ เชื้อรารหัส NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม เชื้อรารหัส RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด เชื้อรารหัส SR1 SR3 จากจังหวัดสุรินทร์ และเชื้อรารหัส YT2 YT3 จากจังหวัดยโสธร เชื้อราจากจังหวัดร้อยเอ็ด รหัส RE3 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารมากที่สุด โดยมีผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนีเท่ากับ 2.467 เซนติเมตร แสดงดังตารางที่ 4.2 และได้นำเชื้อราที่มีผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนีมากที่สุดมาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่มาของเชื้อรา *Aspergillus* spp. และรหัสเชื้อ

รหัสเชื้อรา	จังหวัด
1. สปอร์สีเขียว	
AJ1 AJ2 AJ3 AJ4	อำนาจเจริญ
BR1 BR2 BR3 BR4 BR5	บุรีรัมย์
NP1 NP2 NP3	นครพนม
RE1 RE2 RE3	ร้อยเอ็ด
SR1 SR2 SR3 SR4	สุรินทร์
UB1 UB2 UB3 UB4	อุบลราชธานี
UD1 UD2 UD3	อุดรธานี
YT1 YT2 YT3 YT	ยโสธร
2. สปอร์สีดำ	
BRB1 BRB2 BRB3	บุรีรัมย์
CPB1 CPB2 CPB3	ชัยภูมิ
MDB1 MDB2 MDB3	มุกดาหาร
MKB1 MKB2 MKB3	มหาสารคาม
NMB1 NMB2 NMB3	นครราชสีมา
NPB1 NPB2 NPB3	นครพนม
REB1 REB2 REB3	ร้อยเอ็ด
SKB1 SKB2 SKB3	ศรีสะเกษ
SNB1 SNB2 SNB3	สกลนคร
SRB1 SRB2 SRB3	สุรินทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการย่อยแป้งของเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวในอาหารแข็ง

รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใส (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร)	ผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
AJ1	4.200	3.500	0.700
AJ2	4.233	3.275	0.958
AJ3	4.242	3.484	0.758
AJ4	3.942	2.567	1.375
BR1	4.508	4.416	0.092
BR2	3.342	3.929	0.050
BR3	3.900	3.858	0.042
BR4	3.700	3.658	0.042
BR5	2.458	2.398	0.060
NP1	2.519	1.161	1.358
NP2	5.817	4.617	1.200
NP3	4.867	3.850	1.017
RE1	3.458	1.416	2.042
RE2	5.017	4.479	0.533
RE3	3.550	1.083	**2.467**
SR1	4.067	3.017	1.050
SR2	4.375	2.842	1.533
SR3	5.158	4.466	0.692
SR4	4.200	3.300	0.900
UB1	4.325	3.425	0.900
UB2	4.025	3.175	0.850
UB3	4.508	4.266	0.242
UD4	4.158	4.058	0.100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใส (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร)	ผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
YT1	4.125	3.133	0.992
YT2	4.558	3.508	1.050
YT3	4.383	3.308	1.075
YT4	4.042	3.217	0.825

ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำ เชื้อรารหัส BRB1 BRB2 BRB3 CPB1 CPB2 CPB3 MDB1 MDB2 MDB3 MKB1 MKB2 MKB3 NMB1 NMB2 NMB3 NPB1 NPB2 NPB3 REB1 REB2 REB3 SKB1 SKB2 SKB3 SNB1 SNB2 SNB3 SRB1 SRB2 และ SRB3 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเข็งแตกต่างกันไป ซึ่งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่มีผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนีตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไปนั้น เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำ มีจำนวน 4 เชื้อ ดังนี้คือ เชื้อรารหัส MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม เชื้อรารหัส REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ เชื้อรารหัส SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ ส่วนเชื้อราจากจังหวัดร้อยเอ็ด รหัส REB2 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเข็งมากที่สุด โดยมีผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนีเท่ากับ 1.275 เซนติเมตร แสดงดังตารางที่ 4.3 ซึ่งใกล้เคียงกับเชื้อรารหัส REB1 สำหรับเชื้อรารหัส REB1 มีผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนีเท่ากับ 1.242 เซนติเมตร แต่ได้นำเชื้อที่มีผลต่างระหว่างบริเวณโซนต่อขนาดโคโลนีมากที่สุดมาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส RE3 มีผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนีมากกว่าเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส REB2 ถึง 1.93 เท่า อาจแสดงได้ว่าเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส RE3 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมากกว่า เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส REB2 จึงทำการคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus* sp. รหัส RE3 สปอร์สีเขียว และเชื้อรา *Aspergillus* sp. รหัส REB2 สปอร์สีดำ จากจังหวัดร้อยเอ็ด มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมลสในอาหารเหลว Czapek ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการย่อยแป้งของเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำในอาหารแข็ง

รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใส (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร)	ผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
BRB1	6.092	6.042	0.050
BRB2	6.092	6.042	0.050
BRB3	6.108	6.058	0.050
CPB1	3.683	3.341	0.342
CPB2	3.750	3.325	0.425
CPB3	3.750	3.325	0.425
MDB1	6.475	6.417	0.058
MDB2	6.475	6.417	0.058
MDB3	6.717	6.656	0.061
MKB1	3.975	3.208	0.767
MKB2	3.908	3.384	0.633
MKB3	4.158	3.158	1.000
NMB1	4.000	3.308	0.692
NMB2	4.017	3.384	0.633
NMB3	4.042	3.325	0.792
NPB1	6.075	5.783	0.292
NPB2	6.075	5.783	0.292
NPB3	6.633	6.341	0.292
REB1	4.077	2.833	1.242
REB2	3.925	2.650	**1.275**
REB3	3.775	2.908	0.867
SKB1	3.533	3.275	0.258
SKB2	3.600	3.424	0.358
SKB3	3.600	3.233	0.367

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการย่อยแป้งมันสำปะหลัง		
	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใส (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร)	ผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
SNB1	4.092	3.684	0.408
SNB2	4.092	3.684	0.408
SNB3	4.200	3.677	0.533
SRB1	3.683	2.650	1.033
SRB2	3.708	2.716	0.992
SRB3	3.708	2.716	0.992

4.3 ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ในอาหารแข็ง

เมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหาร Glucose peptone agar เป็นเวลา 5 วัน ทำการตรวจสอบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สารละลายเฟอริกคลอไรด์ราดบนผิวอาหารแข็ง ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ถ้ารอบๆโคโลนีของสายพันธุ์ใดเกิดสีแดง แสดงว่าเชื้อนั้นสามารถผลิตกรดโคจิกได้ แสดงดังภาพที่ 4.2 จากผลการทดลองพบว่า เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวเท่านั้นที่ผลิตกรดโคจิกได้ ซึ่งได้แก่ เชื้อรารหัส BR1 BR2 BR3 BR4 BR5 จากจังหวัดบุรีรัมย์ เชื้อรารหัส NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม เชื้อรารหัส RE1 RE2 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด เชื้อรารหัส UB1 UB2 UB3 จากจังหวัดอุบลราชธานี เชื้อรารหัส UD1 UD2 UD3 และ UD4 จากจังหวัดอุดรธานี สอดคล้องกับการรายงานของ Rosfarizan and Ariff (2000) ที่ได้รายงานผลการศึกษาเชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียวมีความสามารถในการผลิตกรดโคจิก ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำทุกตัวอย่างไม่มีความสามารถในหารผลิตกรดโคจิก

จากผลการทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้ง 60 ตัวอย่าง ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและความสามารถในการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็ง สามารถจัดจำแนกเชื้อรา *Aspergillus* spp. ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะ-ไมเลสและสามารถผลิตกรดโคจิกได้ด้วย โดยเป็นกลุ่มเชื้อราที่คัดเลือกจากลูกแป้งจังหวัดบุรีรัมย์ นครพนม ร้อยเอ็ด อุดรธานี และอุบลราชธานี รหัสเชื้อ คือ BR1 BR2 BR3 BR4 BR5 NP1 NP2 NP3 RE1 RE2 RE3 UB1 UB2 UB3 UD1 UD2 UD3 และ UD4 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียวทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก ข

ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเกิดบริเวณโซนใสของเชื้อรา *Aspergillus* spp.
ก เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียว
ข เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำ

ก ข

ภาพที่ 4.2 การผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา *Aspergillus* spp.
ก เชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่ไม่สามารถผลิตกรดโคจิก
ข เชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่สามารถผลิตกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่สองเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารแข็งได้อย่างเดียว ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียวจากจังหวัดอำนาจเจริญ ยโสธร และสุรินทร์ มีรหัสของเชื้อราคือ AJ1 AJ2 AJ3 AJ4 SR1 SR2 SR3 SR4 YT1 YT2 YT3 และ YT4 เชื้อรา *Aspergillus* spp สปอร์สีดำทั้งหมด ได้แก่ เชื้อรารหัส BRB1 BRB2 BRB3 CPB1 CPB2 CPB3 MDB1 MDB2 MDB3 MKB1 MKB2 MKB3 NMB1 NMB2 NMB3 NPB1 NPB2 NPB3 REB1 REB2 REB3 SKB1 SKB2 SKB3 SNB1 SNB2 SNB3 SRB1 SRB2 และ SRB3 ผลที่ได้สามารถจัดจำแนกดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การจัดกลุ่มเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่คัดเลือกได้จากลูกแป้งเหล้า

รหัสเชื้อ	การผลิตเอนไซม์อะไมเลส	การผลิตกรดโคจิก
BR1 BR2 BR3 BR4 BR5 NP1 NP2 NP3 RE1 RE2 RE3 UB1 UB2 UB3 UD1 UD2 UD3 และ UD4	+	+
AJ1 AJ2 AJ3 AJ4 SR1 SR2 SR3 SR4 YT1 YT2 YT3 YT4 BRB1 BRB2 BRB3 CPB1 CPB2 CPB3 MDB1 MDB2 MDB3 MKB1 MKB2 MKB3 NMB1 NMB2 NMB3 NPB1 NPB2 NPB3 REB1 REB2 REB3 SKB1 SKB2 SKB3 SNB1 SNB2 SNB3 SRB1 SRB2 และ SRB3	+	-

จากผลการทดลองจึงทำการคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus* sp. รหัส RE3 มาทำการทดสอบกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว Glucose peptone เนื่องจาก เป็นเชื้อราที่มีผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนีมากที่สุด และยังสามารถผลิตกรดโคจิกได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อราในอาหารเหลว

4.4.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

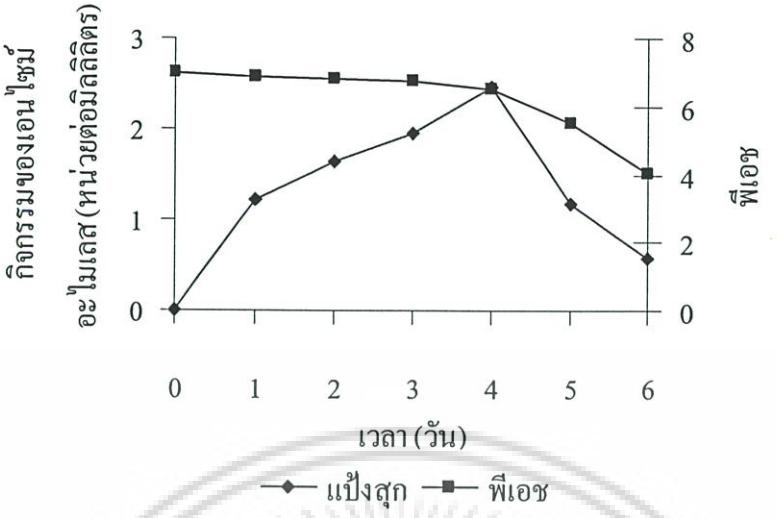
ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียวมาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกและดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุก เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 และวันที่ 3 เท่ากับ 1.64 และ 1.96 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.84 และ 6.85 ตามลำดับ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 2.46 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.50 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสก็จะลดลง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.3 และตารางภาคผนวก ง ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ต่ำมากโดยเชื้อราจะมีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 และจะมีการผลิตเพิ่มขึ้นน้อยมาก แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 0.36 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.80 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.4 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ผลการทดลองเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 6.83 เท่า

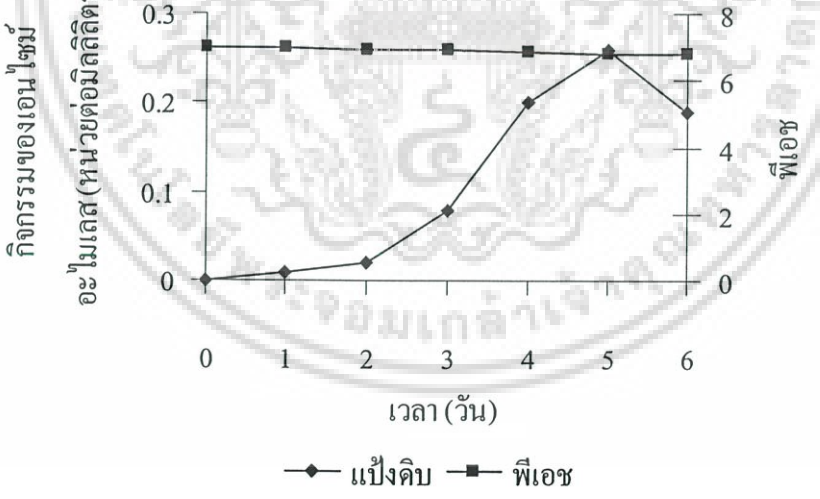
ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีดำ มาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกและดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุก เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 และวันที่ 3 เท่ากับ 1.24 และ 1.80 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.87 และ 6.77 ตามลำดับ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 2.36 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.75 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสก็จะลดลง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.5 และตารางภาคผนวก ง ผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ต่ำมากโดยเชื้อราจะมีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเพิ่มขึ้นน้อยมาก แต่มีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.35 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.82 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.6 และ ตารางภาคผนวก ค ง เมื่อเปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ผลการทดลองเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 6.74 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

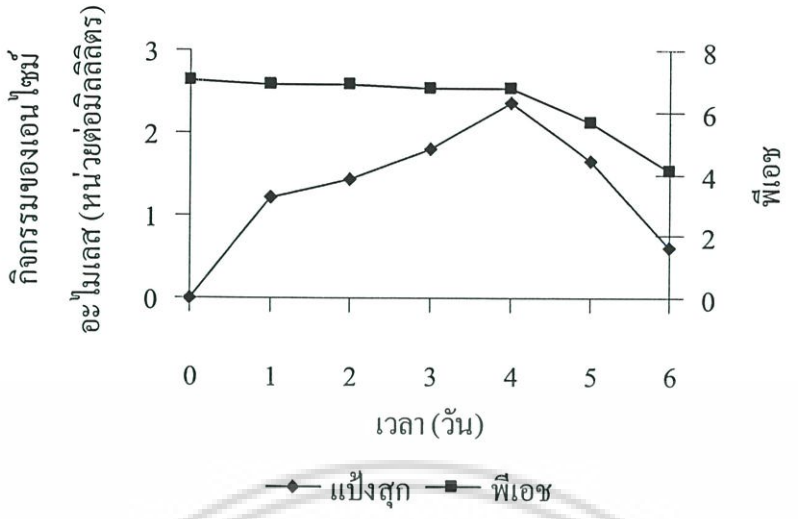


ภาพที่ 4.3 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

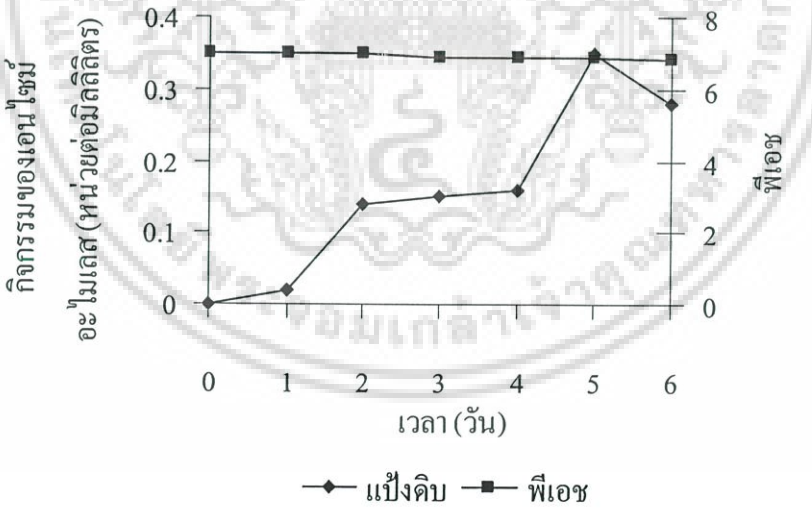


ภาพที่ 4.4 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 4.6 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

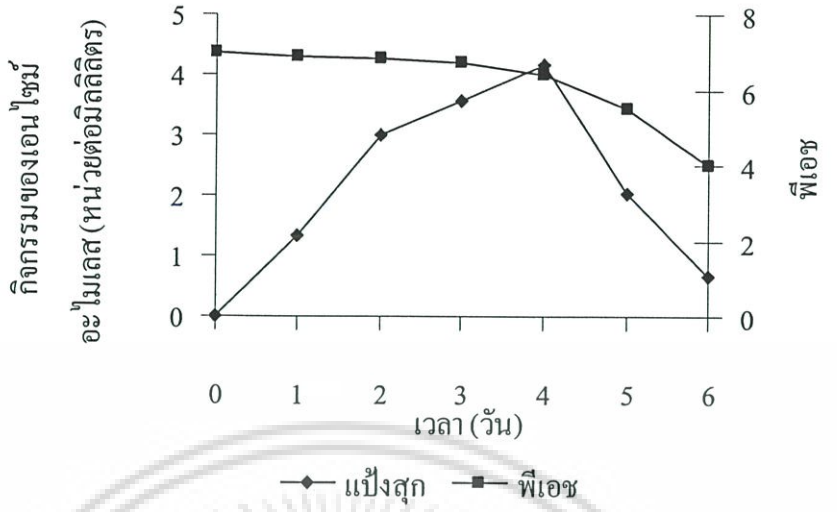
ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียว มาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกและดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุก เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 และวันที่ 3 เท่ากับ 3.00 และ 3.57 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.83 และ 6.74 ตามลำดับ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4.15 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.41 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะลดลง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.7 และตารางภาคผนวก ง การผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ต่ำมาก โดยเชื้อราจะมีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง แต่จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.29 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.75 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.8 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ผลการทดลองเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 14.31 เท่า

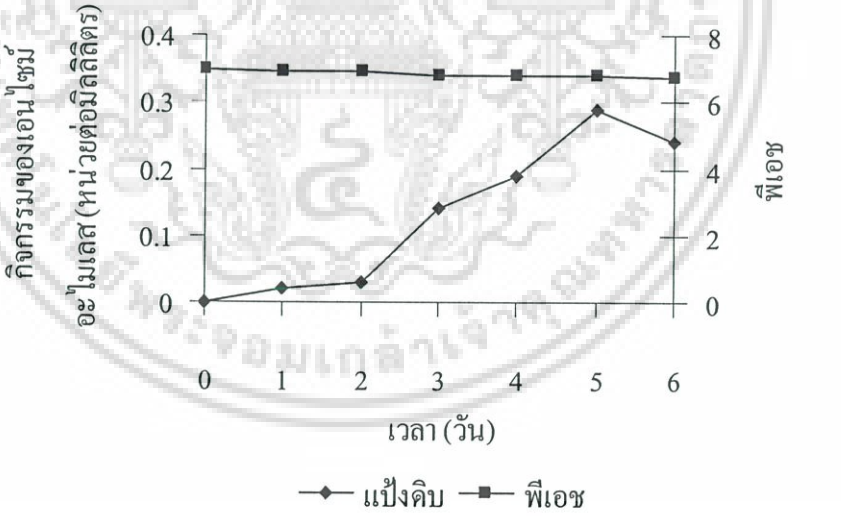
ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีดำ มาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกและดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุก เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 และวันที่ 3 เท่ากับ 2.64 และ 3.15 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.86 และ 6.72 ตามลำดับ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 3.68 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.70 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะลดลง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.9 และตารางภาคผนวก ง ผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ต่ำมาก โดยเชื้อราจะมีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดที่ระดับ 0.40 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.80 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.10 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ผลการทดลองเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 9.2 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

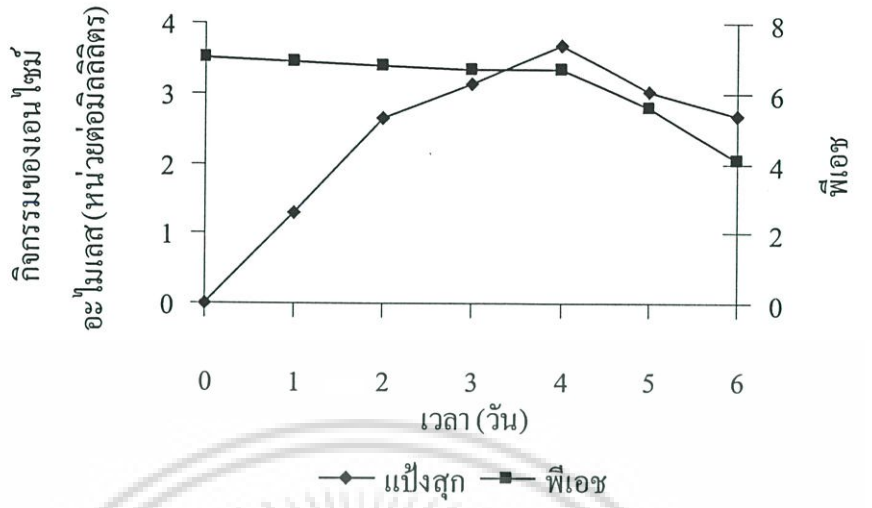


ภาพที่ 4.7 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

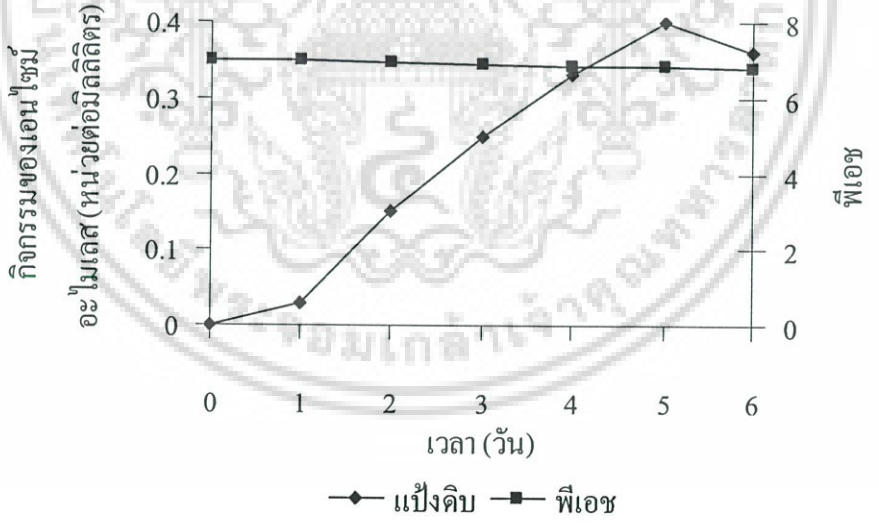


ภาพที่ 4.8 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 4.10 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

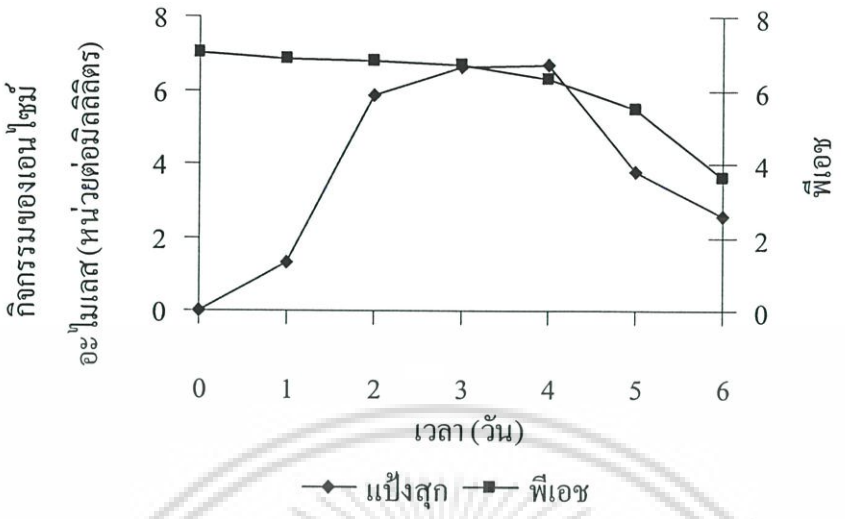
ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียว มาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกและดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุก เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 และวันที่ 3 เท่ากับ 5.86 และ 6.46 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.80 และ 6.70 ตามลำดับ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะ-ไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 6.68 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.32 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะลดลง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.11 และตารางภาคผนวก ง ผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ต่ำมากโดยเชื้อราจะมีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง แต่จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.38 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.76 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.12 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ผลการทดลองเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 17.58 เท่า

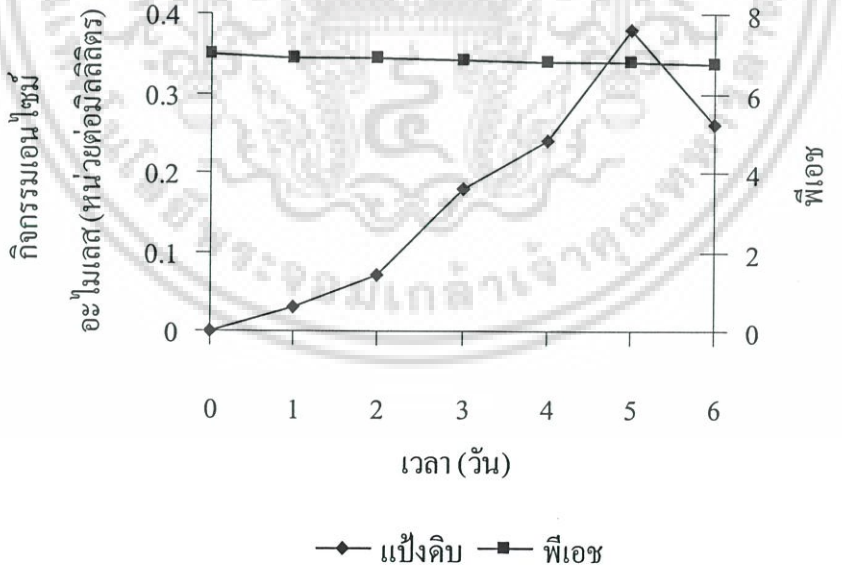
ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* spp. รหัส REB2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีดำ มาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกและดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้พบว่า เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 และวันที่ 3 เท่ากับ 4.51 และ 5.36 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.84 และ 6.69 ตามลำดับ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 6.06 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.68 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะลดลง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.13 และตารางภาคผนวก ง ผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ต่ำมากโดยเชื้อราจะมีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง แต่มีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.44 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.86 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.14 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ผลการทดลองเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 13.77 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

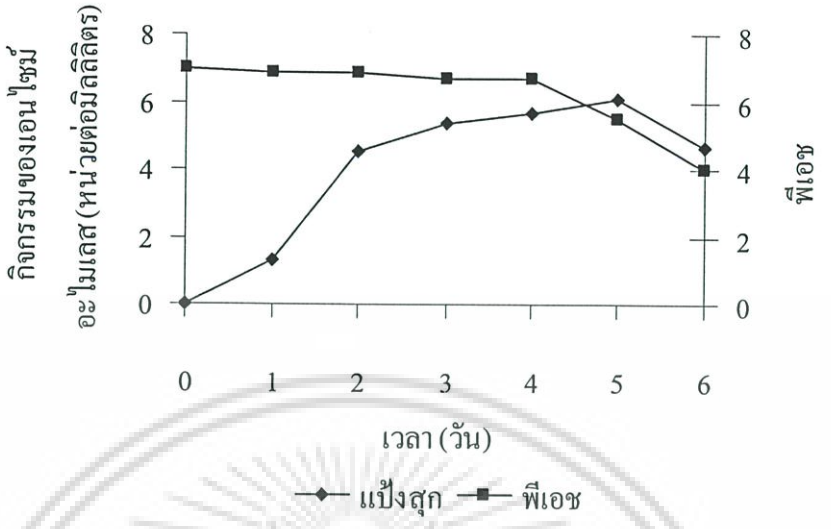


ภาพที่ 4.11 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

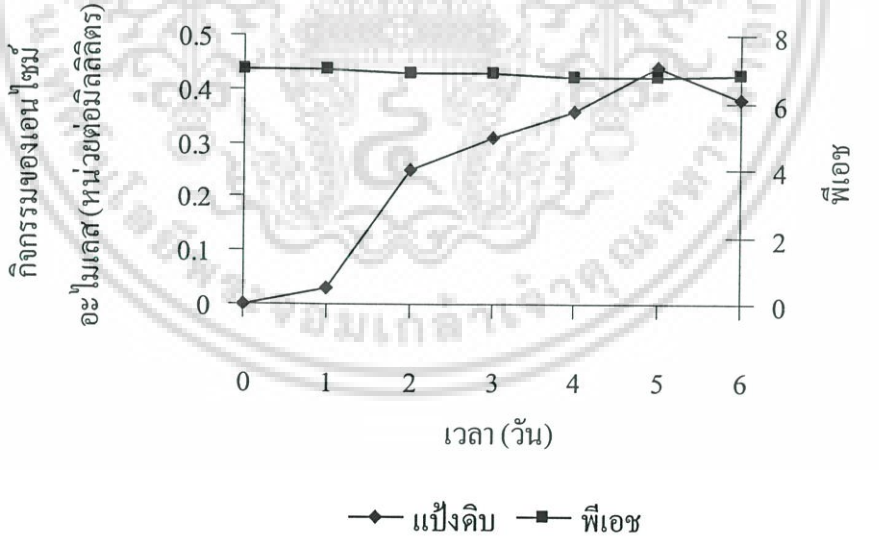


ภาพที่ 4.12 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุก 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 4.14 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาเชื้อรา *Aspergillus* sp. ถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ระดับความเข้มข้นต่างๆกันคือ 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อใช้แป้งมัน-สำปะหลังสุกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 6.68 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.32 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 แต่ในแป้งมันสำปะหลังดิบนั้นพบว่าเชื้อรามีประสิทธิภาพในการผลิตต่ำ คือ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 0.38 พีเอช 6.86 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเชื้อรามีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 17.58 เท่า ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีดำ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 6.06 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.68 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง แต่ในแป้งดิบนั้นพบว่าเชื้อรามีประสิทธิภาพในการผลิตต่ำ คือ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 0.44 พีเอช 6.86 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเชื้อรามีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 13.79 เท่า ผลการทดลองสอดคล้องกับการรายงานของ Hiroshi *et al.* (1998) ที่ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus* สายพันธุ์ A-11 โดยเป็นการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในสภาวะอาหารเหลวที่ใช้แป้งมัน-สำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ระดับ 710 หน่วยต่อมิลลิลิตร Peterson *et al*. (2000) ได้ทำการศึกษาเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ BO –1 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสภายใต้สภาวะที่มีพีเอชระหว่าง 2.5 ถึง 6.0 ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ที่ระดับ 2,700 ถึง 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และยังพบว่าเชื้อรามีความสามารถในการผลิตอะไมเลส เพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชอยู่ระหว่าง 4.0 ถึง 5.0 Sadhukhan *et al.* (1990) ได้ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อรา *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48104) ผลการศึกษา พบว่าแป้ง เซลลูโลส และมอลโตส มีความสามารถในการเป็นตัวชักนำ (inducer) ให้เชื้อมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์มากขึ้น แต่น้ำตาลกลูโคส ฟรักโตส กา-แลกโตส และอะราบิโนส ไม่มีความสามารถในการเป็นตัวชักนำให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ และ Soccol *et al.* (1994) ได้ศึกษาความสามารถของเชื้อรา *Rhizopus* ซึ่งได้มีการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบในสภาวะการหมักแบบแข็ง ผลที่ได้ พบว่าเชื้อรา *Rhizopus* 19 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และยังพบว่าเชื้อรามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

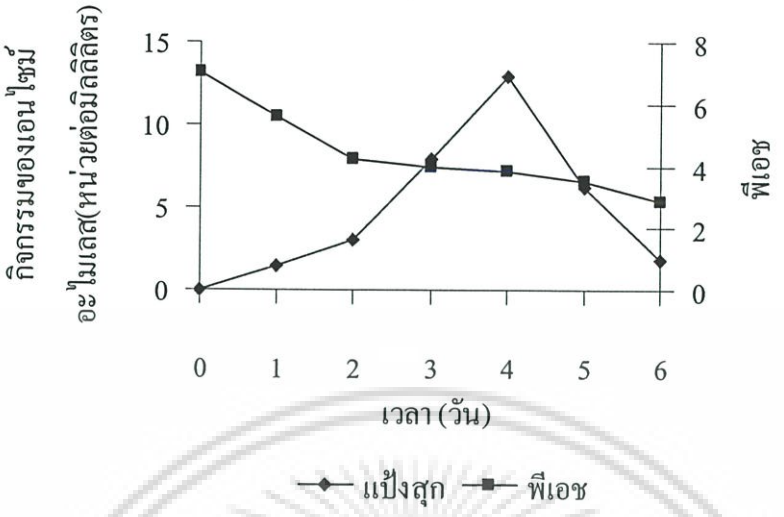
ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียว มาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกและดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์แต่มีการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุก เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 และวันที่ 3 เท่ากับ 3.08 และ 7.87 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 4.22 และ 3.95 ตามลำดับ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 12.91 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.83 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะลดลง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.15 และตารางภาคผนวก ง ผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ต่ำมากโดยจะมีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง แต่จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดที่ระดับ 0.49 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.22 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.16 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับยูเรียและแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ผลการทดลองเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 26.35 เท่า

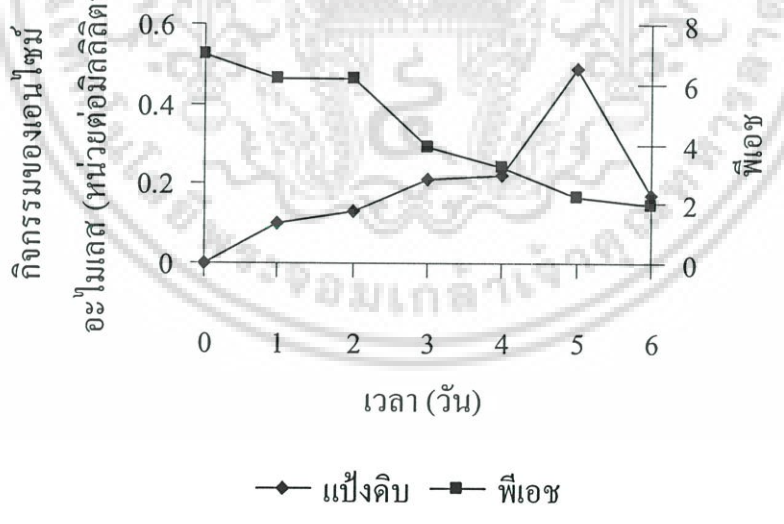
ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีดำ มาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกและดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์แต่มีการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุก เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 และวันที่ 3 เท่ากับ 2.73 และ 6.76 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 4.34 และ 4.09 ตามลำดับ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 10.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.91 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะลดลง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.17 และตารางภาคผนวก ง ผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ต่ำมากโดยจะมีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง แต่จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.46 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.97 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.18 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับยูเรียและแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ผลการทดลองเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 22.83 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

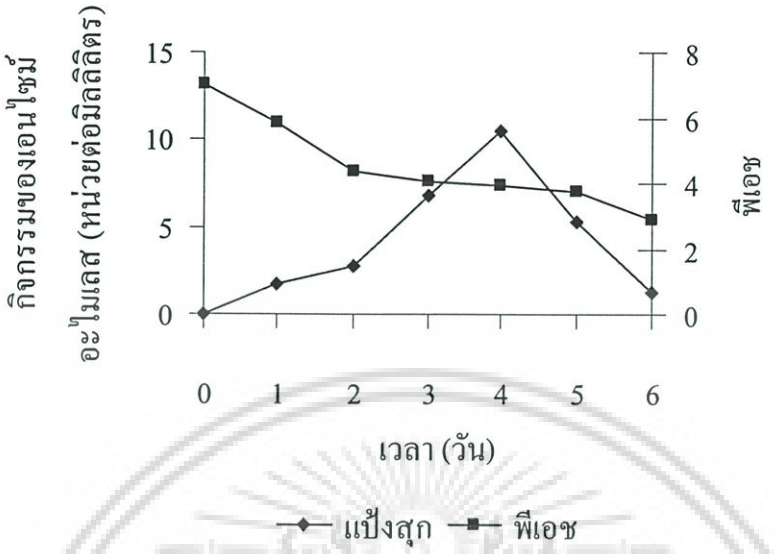


ภาพที่ 4.15 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุกและมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

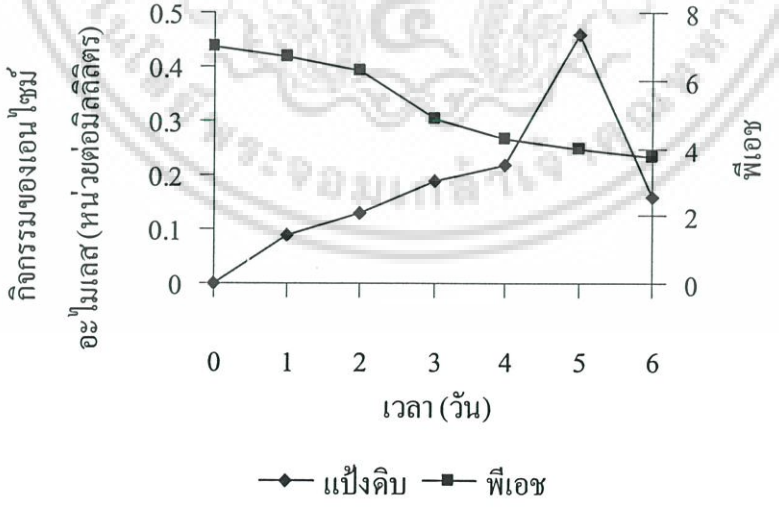


ภาพที่ 4.16 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบและมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.17 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุกและมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 4.18 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบและมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

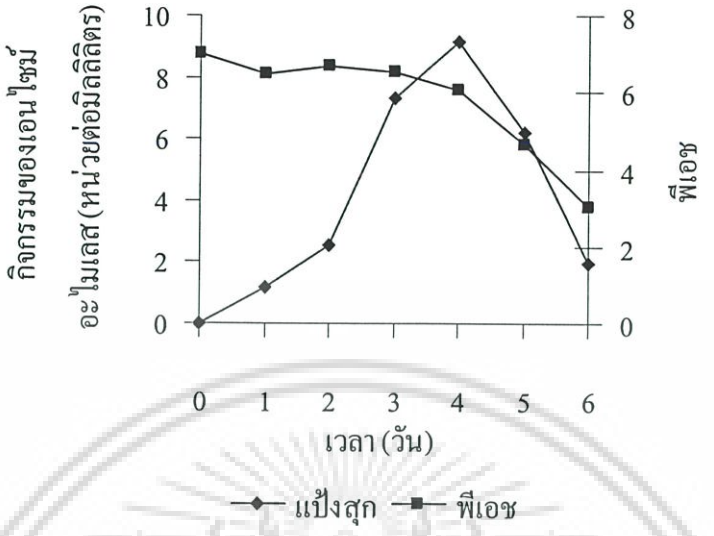
ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. รหัส RE3 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียว มาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกและดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์แต่มีการใช้ยูเรีย 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุก เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 และวันที่ 3 เท่ากับ 2.56 และ 7.12 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.44 และ 6.30 ตามลำดับ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 9.18 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.15 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะลดลง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.19 และตารางภาคผนวก ง ผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ต่ำมากโดยจะมีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง แต่จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.46 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.11 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.20 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับยูเรียและแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ผลการทดลองเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 19.96 เท่า

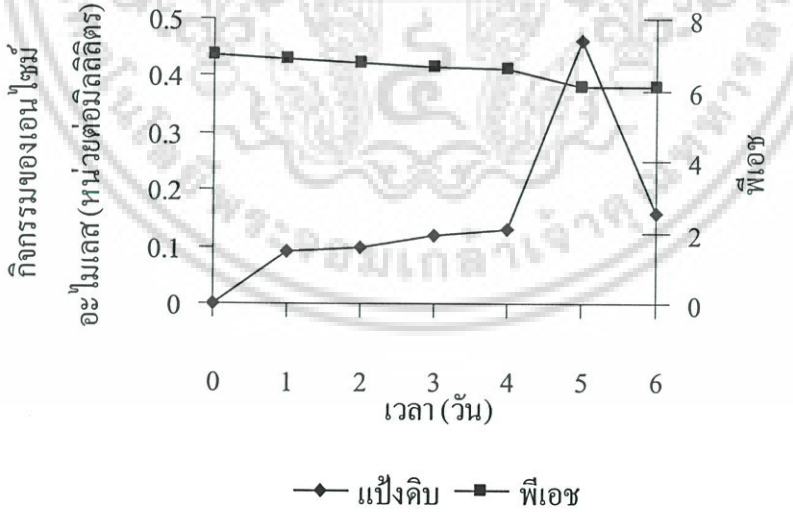
ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีดำ มาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกและดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แต่มีการใช้ยูเรีย 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุก เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 และวันที่ 3 เท่ากับ 2.39 และ 6.14 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.68 และ 6.55 ตามลำดับ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 8.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.08 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะลดลง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.21 และตารางภาคผนวก ง ผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ต่ำมากโดยจะมีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง แต่จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.38 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.31 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.22 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ผลการทดลองเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 22.35 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

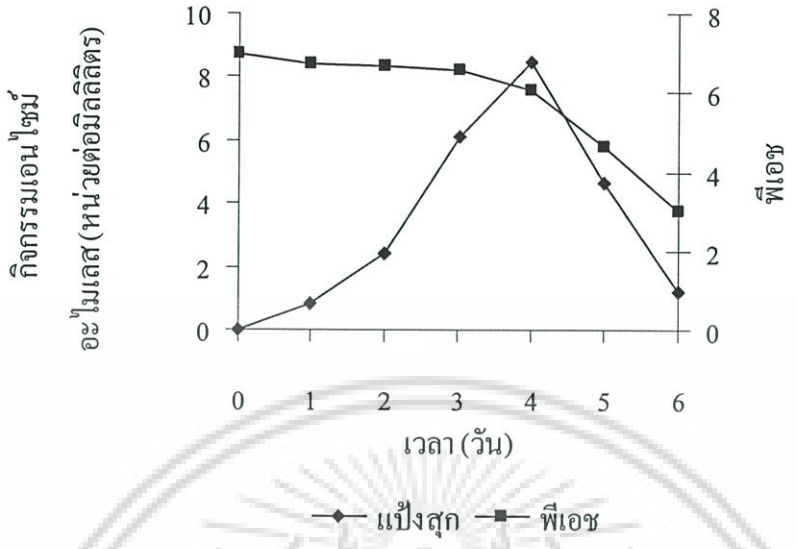


ภาพที่ 4.19 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุกและมียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

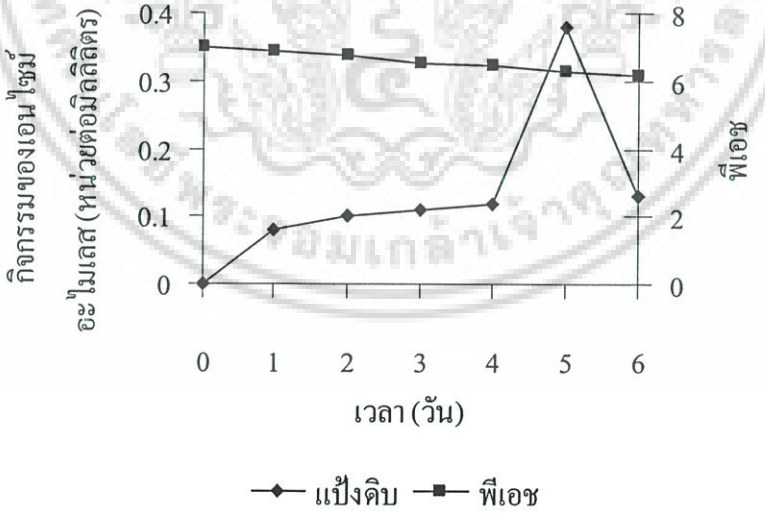


ภาพที่ 4.20 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบและมียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.21 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุกและมียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 4.22 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบและมียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

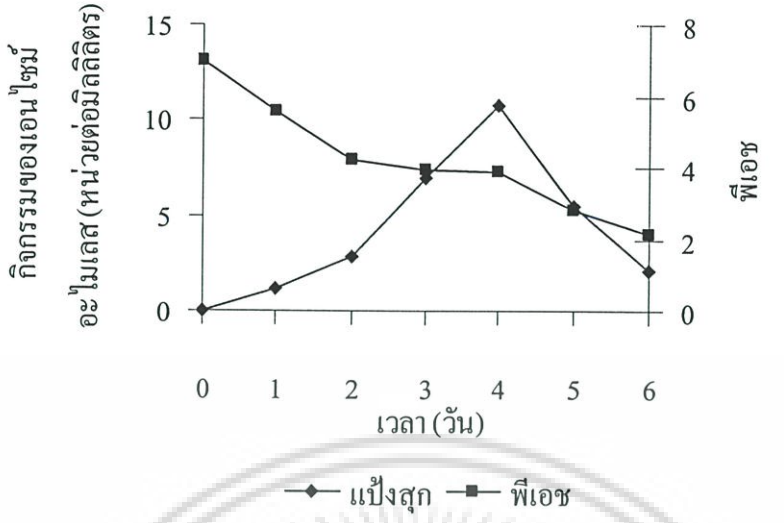
ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียว มาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกและดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์แต่มีการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.3 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุก เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง และจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 และวันที่ 3 เท่ากับ 2.86 และ 7.01 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 4.23 และ 3.97 ตามลำดับ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 10.81 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.88 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะลดลง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.23 และตารางภาคผนวก ง ผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบพบว่ามีการผลิตเอนไซม์ต่ำมาก โดยจะมีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง แต่จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.41 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.02 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.24 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ผลการทดลองเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 23 เท่า

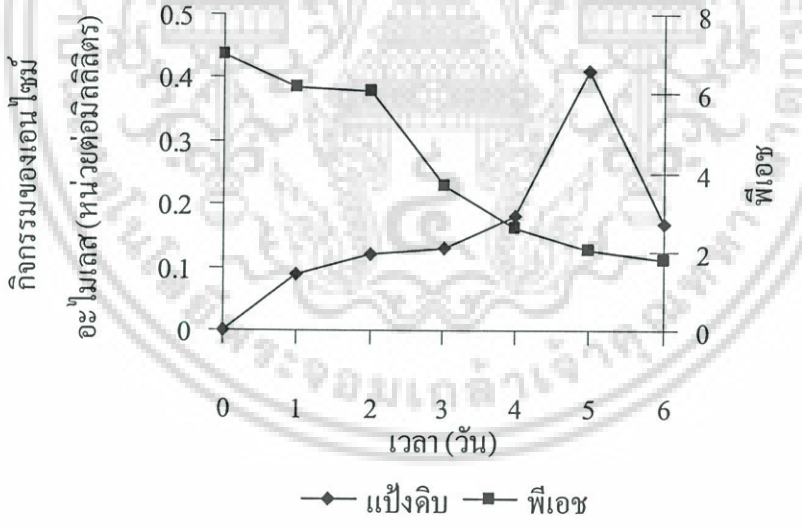
ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีดำ มาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกและดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แต่มีการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.3 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังสุก เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง และจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 และวันที่ 3 เท่ากับ 2.62 และ 7.61 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 5.39 และ 3.77 ตามลำดับ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 11.44 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.83 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะลดลง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.25 และตารางภาคผนวก ง ผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในแป้งดิบพบว่ามีการผลิตเอนไซม์ต่ำมากโดยจะมีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง แต่จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.53 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.19 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.26 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ผลการทดลองเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังสุกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 21.32 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

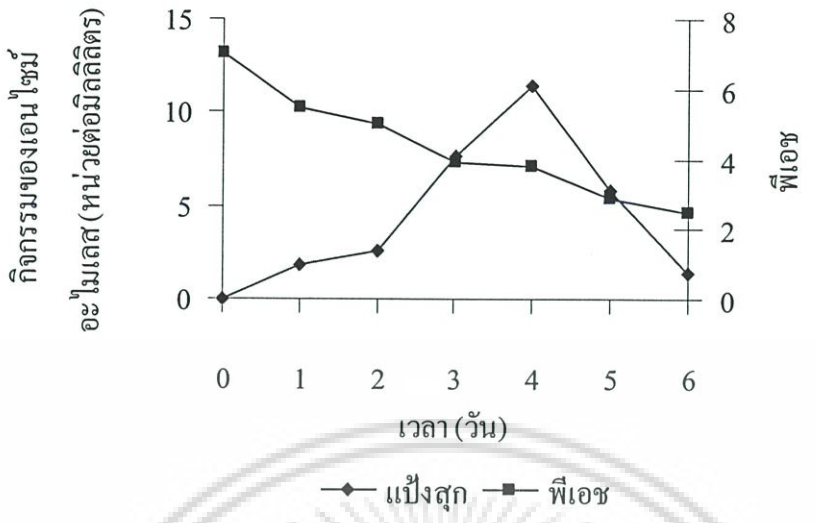


ภาพที่ 4.23 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุกและมีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน

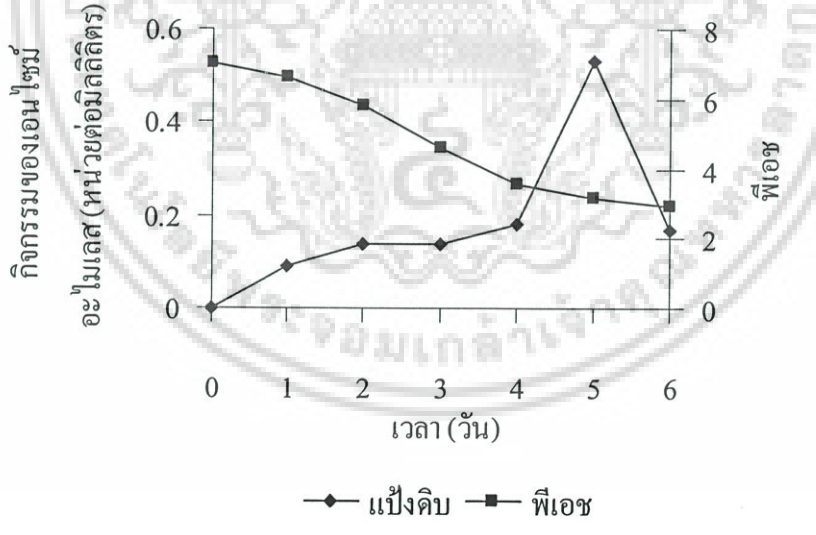


ภาพที่ 4.24 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบและมีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.25 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังสุกและมีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 4.26 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรารหัส REB2 ในอาหารเหลว Czapek ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบและมีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและได้มีการศึกษาแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่า เชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียวมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 12.91 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.83 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนในแป้งมันสำปะหลังดิบเชื้อรามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 0.49 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.22 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีดำมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 10.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.91 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนในแป้งมันสำปะหลังดิบเชื้อรามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 0.46 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.97 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ผลของยูเรียต่อกิจกรรมการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียวมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อใช้ยูเรีย เท่ากับ 9.18 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.15 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนในแป้งมันสำปะหลังดิบเชื้อรามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 0.46 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.11 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีดำมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อใช้ยูเรีย เท่ากับ 8.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.08 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนในแป้งมันสำปะหลังดิบเชื้อรามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 0.38 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.31 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ผลที่ได้พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียวมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 10.81 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.88 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนในแป้งมันสำปะหลังดิบเชื้อรามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 0.41 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.02 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีดำมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ เท่ากับ 11.44 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.83 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนในแป้งมันสำปะหลังดิบเชื้อรามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 0.53 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.19 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลการทดลองแสดงว่าชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 สามารถใช้แอมโมเนียมซัลเฟตได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ ยูเรียและแอมโมเนียมคลอไรด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ซึ่งเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสในแป้งสุกสูงกว่าแป้งมันสำปะหลังดิบถึง 26.35 เท่า และเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 สามารถใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยูเรีย และแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ซึ่งเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสในแป้งสุกสูงกว่าแป้งมันสำปะหลังดิบ 21.32 เท่า จากผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Pandey *et al.* (2000) รายงานว่าผลการศึกษาของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆมีผลต่อความสามารถ

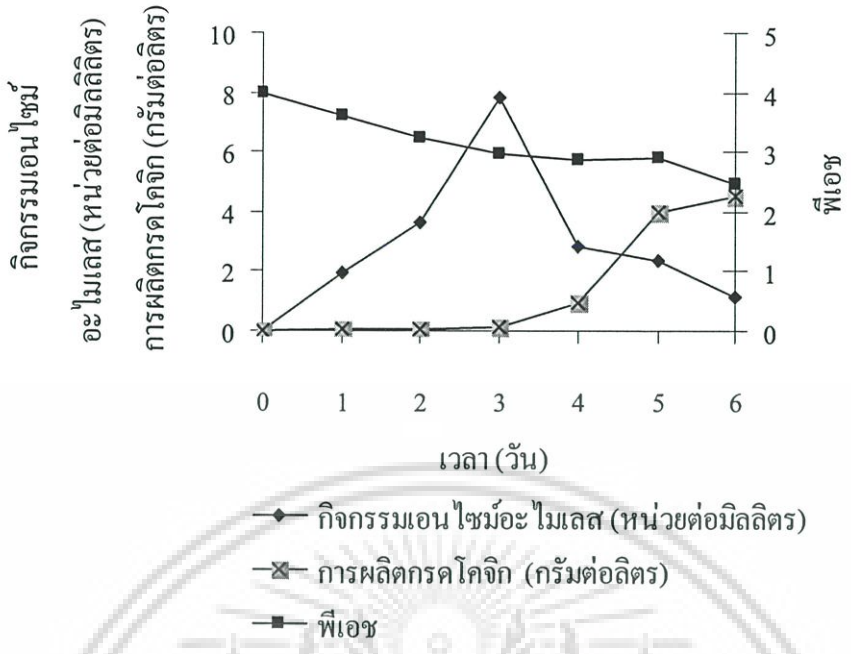
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อใช้ น้ำแช่ข้าวโพด เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต ในสูตรอาหารมีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยแอมโมเนียมซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์มีผลทำให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และยังมีรายงานของ Morita and Fujio (2000) รายงานว่าผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบโดยเชื้อรา *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ MKU40 พบว่าการเติมนีโอเปปโตน (neopeptone) เคซีน และเนื้อสกัด (meat extract) ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้น และ Jin *et al.* (1999) ได้รายงานถึงความสามารถของเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ในการผลิตโปรตีนและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากน้ำทิ้งของโรงงานผลิตแป้ง โดยใช้แหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.9 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 3.89 และ 3.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.5 ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราในอาหารเหลว

ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียว มาเลี้ยงในอาหารเหลว Glucose peptone พีเอช 4 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์และมีการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองที่ได้พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 เท่ากับ 3.64 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.98 แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.87 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.98 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสก็จะลดลง ส่วนการผลิตกรดโคจิกนั้นเชื้อราจะมีการผลิตกรดโคจิกตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและมีการผลิตเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 4.50 กรัมต่อลิตรพีเอช 2.79 ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.27 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับยูเรียและแอมโมเนียมคลอไรด์พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

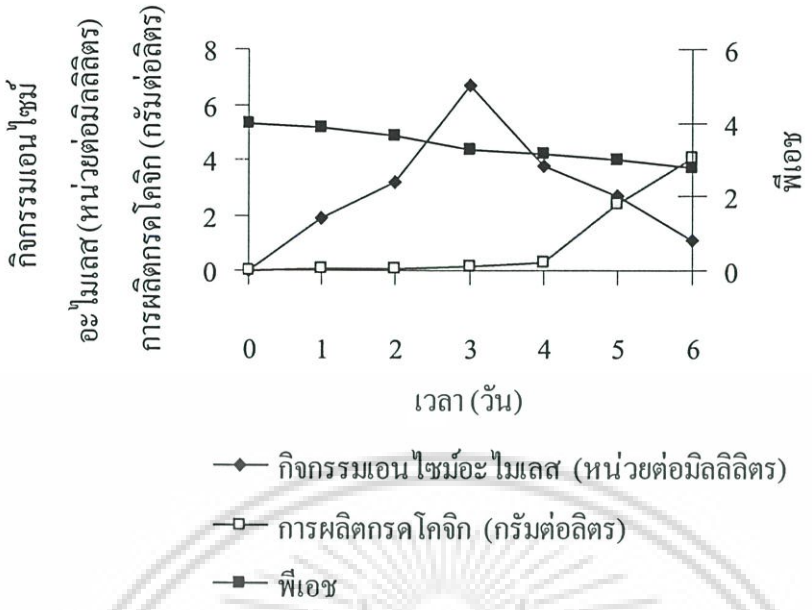
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.27 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกรดโคจิกของเชื้อรา ในอาหารเหลว Glucose peptone และการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียว มาเลี้ยงในอาหารเหลว Glucose peptone พีเอช 4 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์และมีการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองที่ได้พบว่า เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้น ในวันที่ 2 เท่ากับ 2.23 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.64 แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 6.76 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.25 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสก็จะลดลง ส่วนการผลิตกรดโคจิกนั้นเชื้อราจะมีการผลิตกรดโคจิกตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและมีการผลิตเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ระดับ 4.06 กรัมต่อลิตร พีเอช 2.77 ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.28 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมคลอไรด์พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

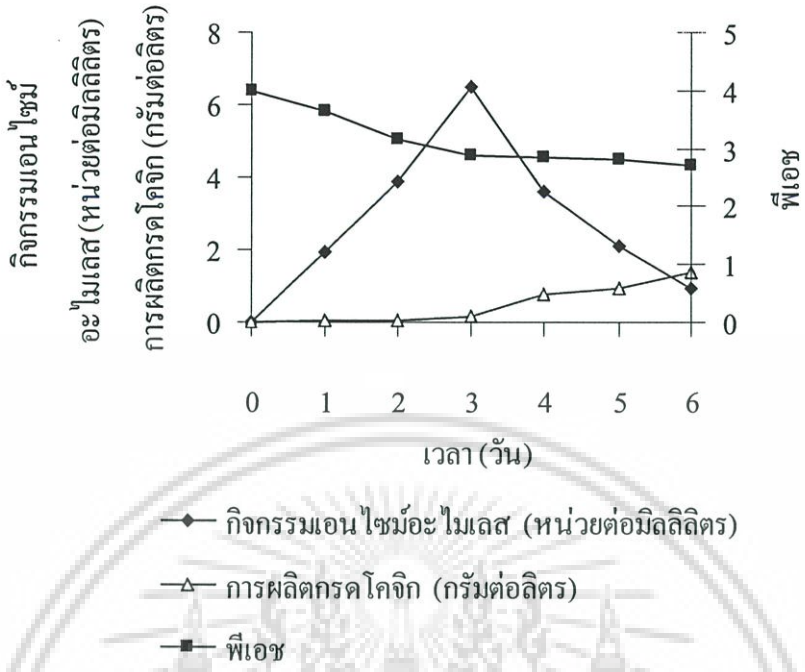
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.28 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกรดโคจิกของเชื้อราในอาหารเหลว Glucose peptone และการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ยูเรีย

ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียว มาเลี้ยงในอาหารเหลว Glucose peptone พีเอช 4 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังสุกที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์และมีการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองที่ได้พบว่า เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 เท่ากับ 3.88 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.15 แต่จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 6.48 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.87 จากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสก็จะลดลง ส่วนการผลิตกรดโคจิกนั้นเชื้อราจะมีการผลิตกรดโคจิกตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและมีการผลิตเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 1.39 กรัมต่อลิตรพีเอช 2.72 ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.29 และตารางภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.29 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกรดโคจิกของเชื้อราในอาหารเหลว Glucose peptone และการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์

จากผลการทดลองเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. รหัส RE3 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต มีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกที่ปริมาณ 4.50 กรัมต่อลิตร พีเอช 2.45 ส่วนการใช้ยูเรีย มีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกที่ปริมาณ 4.06 กรัมต่อลิตร พีเอช 2.76 และเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ มีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกที่ปริมาณ 1.39 กรัมต่อลิตร พีเอช 2.76 ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ปริมาณ 7.87 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.98 ส่วนการใช้ยูเรีย มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ปริมาณ 6.76 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.25 และเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ปริมาณ 6.48 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.87 ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากผลการทดลองเชื้อรามีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 จากผลการทดลองสอดคล้องกับการรายงานของ Rosfarizan and Ariff (2000) ว่าผลของแหล่งไนโตรเจน ที่เป็นอนินทรีย์สารมีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ต่ำกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นอินทรีย์สารเช่น ยีสต์สกัดหรือเปปโตน แต่พบว่าการใช้แอมโมเนียมไนเตรต ($(NH_4)_2NO_3$) เชื้อรามีความสามารถในการ

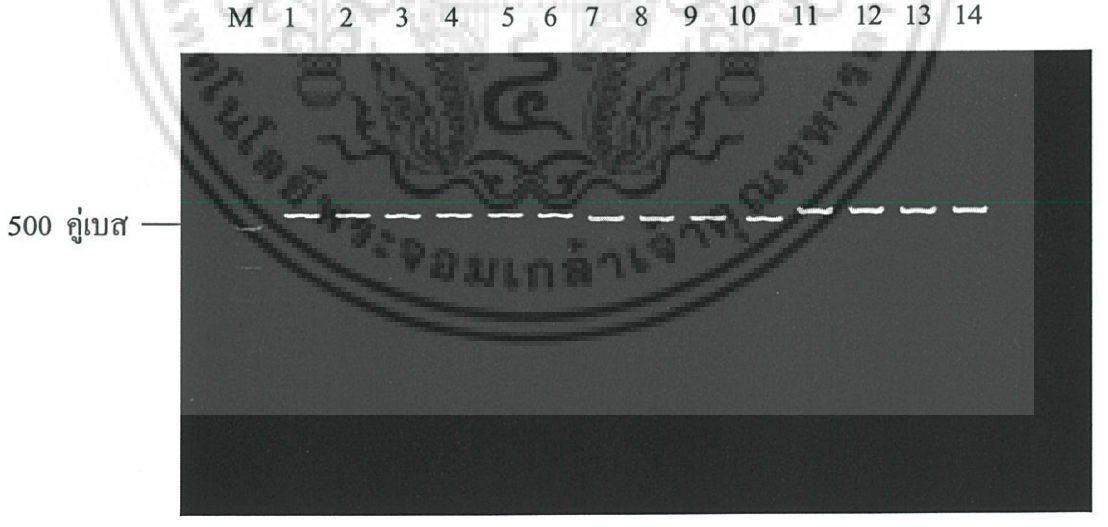
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตกรดโคจิกได้สูงถึง 12 กรัมต่อลิตร และ Carlsen *et al.* (1995) ได้กล่าวถึง แอมโมเนียมไอออนว่ามีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและโปรติเอสมากแต่จะมีผลลบต่อการผลิตกรดโคจิก และยังพบว่าเชื้อรา *Aspergillus oryzae* สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตกรดโคจิก

4.6 ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* spp.

4.6.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณอาร์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4

จากการศึกษาเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. ทั้งชนิดที่เป็นสปอร์สีดำและสปอร์สีเขียวที่คัดเลือกมา เมื่อใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราทุกตัวอย่าง *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร พบขนาดดีเอ็นเอประมาณ 602 คู่เบส ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1จากจังหวัดสุรินทร์ พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 630 คู่เบส ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะมีตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันมาก สอดคล้องกับการรายงานของ Yuko และ Tsutomu (1996) ที่ได้ทำการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมเพื่อจัดจำแนกเชื้อราในสกุล *Aspergillus flavus* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบอาร์ดีเอ็นเอ บริเวณ ITS พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจะอยู่ที่ตำแหน่ง 570 – 590 คู่เบส ผลแสดงดังภาพที่ 4.30



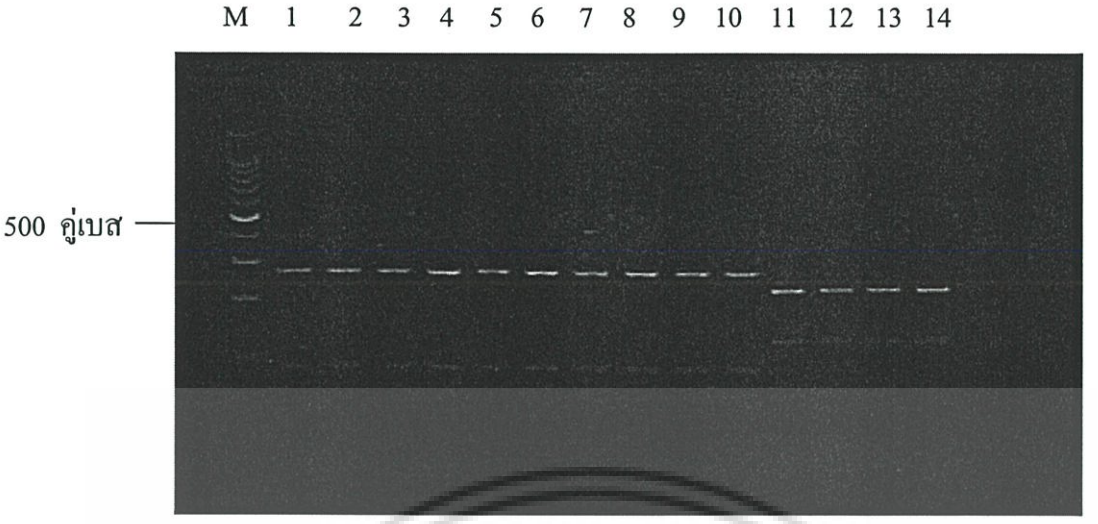
ภาพที่ 4.30 ขนาดดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์
เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder)
1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3
7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3
12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2 ผลการศึกษาพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 4.6.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Hae*III *Hin*dIII *Hin*fI และเอนไซม์ผสม 3 คู่ คือ *Hae*III กับ *Hin*dIII *Hae*III กับ *Hin*fI และ *Hin*dIII กับ *Hin*fI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำที่แตกต่างกันพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะทุกตัวสามารถตัดผลผลิตพีซีอาร์ได้ในบริเวณ ITS พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิดสามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้งชนิดสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำ เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส พบว่า เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 275 และ 83 คู่เบส เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 244 และ 141 คู่เบส จากลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถจำแนกเชื้อราชนิดสปอร์สีเขียวและสีดำได้ค่อนข้างชัดเจน (ภาพที่ 4.31) เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 240 และ 76 คู่เบส และเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 285 และ 66 คู่เบส จากลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถจำแนกเชื้อราชนิดสปอร์สีเขียวและสีดำได้ (ภาพที่ 4. 32) เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI พบว่า เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 240 คู่เบส เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 316 คู่เบส ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีลักษณะใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4. 33) จากผลการทดลองเมื่อใช้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด สามารถจัดจำแนกเชื้อราสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำออกจากกันได้ค่อนข้างชัดเจนแต่ไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อราภายในสปอร์สีเดียวกันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.31 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

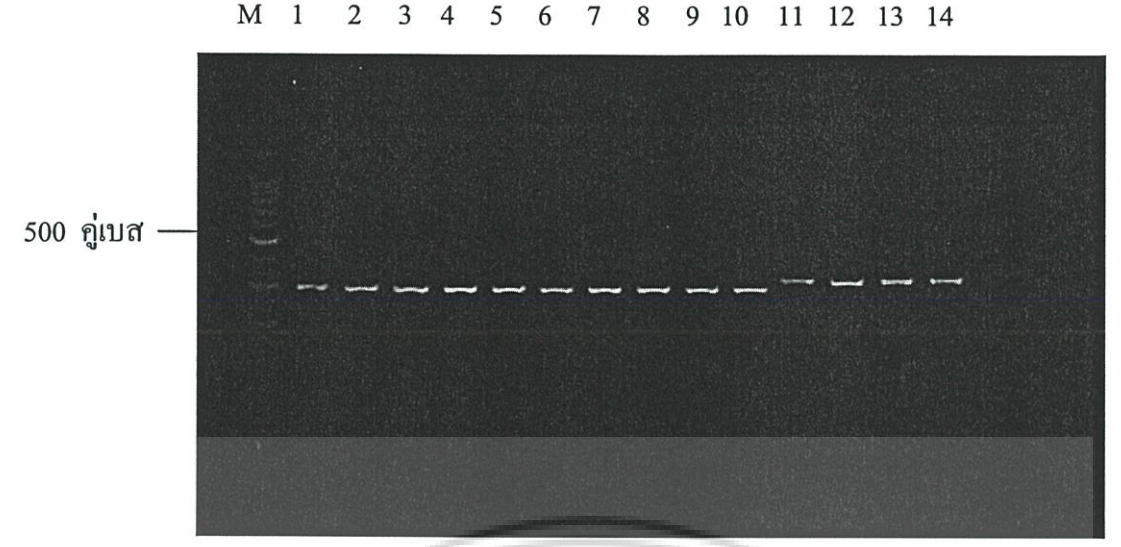
ภาพที่ 4.32 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อใช้เอนไซม์ผสม 3 คู่ ผลการทดลองที่ได้คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*dIII เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 240 และ 174 คู่เบส เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 270 และ 70 คู่เบส ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถจัดจำแนกสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำได้ค่อนข้างชัดเจน (ภาพที่ 4.34) เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*fI เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 276 และ 132 คู่เบส เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 300 และ 41 คู่เบส ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถจัดจำแนกสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำได้ (ภาพที่ 4.35) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Hin*fI เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดี-เอ็นเอประมาณ 275 และ 176 คู่เบส เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 300 คู่เบส ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดมีความใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.36) ผลการทดลองเมื่อใช้เอนไซม์ผสม 3 คู่ สามารถจัดจำแนกเชื้อราสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำออกจากกันได้ค่อนข้างชัดเจนแต่ไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อราภายในสปอร์สีเดียวกันได้

เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้ทั้งในสปอร์เขียวและสปอร์ดำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าเชื้อราทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษาผลที่ได้มีตำแหน่งยีนที่ใกล้เคียงกันมาก สอดคล้องกับการรายงานของ Kurtzman *et al.* (1986) ที่ศึกษาความแตกต่างของเชื้อราในกลุ่ม *Asprgillus flavus* พบว่าเชื้อราสกุล *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus oryzae* มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมมากถึง 90-100 เปอร์เซ็นต์

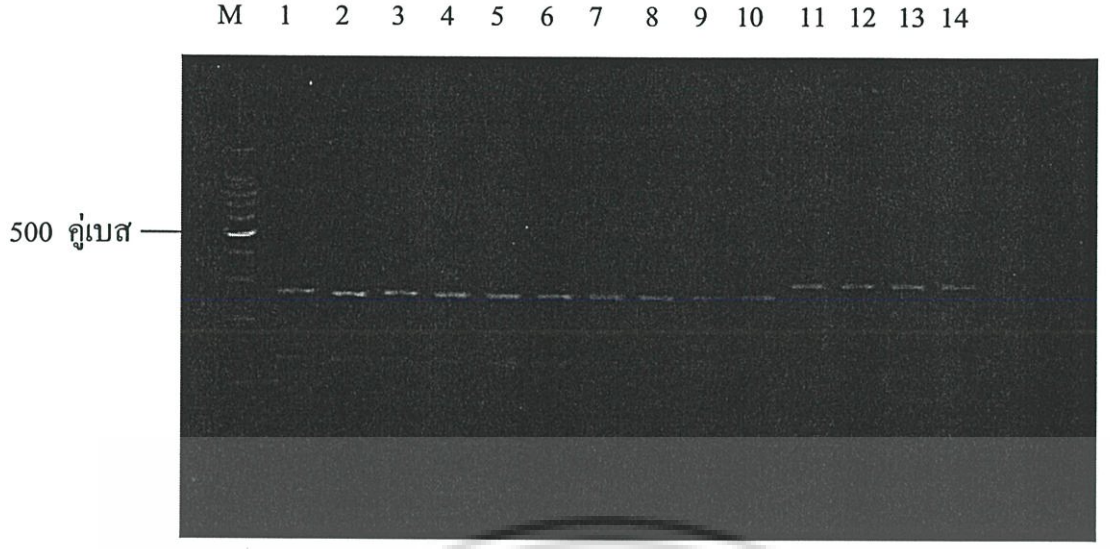
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.33 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

ภาพที่ 4.34 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*dIII เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



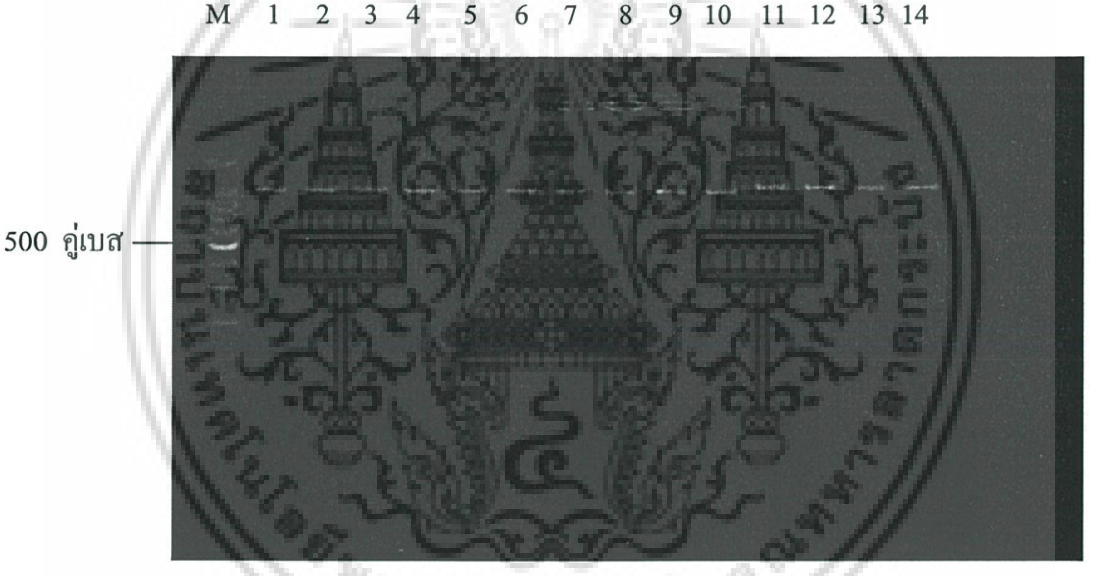
ภาพที่ 4.35 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*fI เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

ภาพที่ 4.36 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Hin*fIเมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนบริเวณทาคาอะไมเลส เอ (Taka amylase A)

จากการศึกษาเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. ทั้งชนิดที่เป็นสปอร์สีดำและสปอร์สีเขียวที่คัดเลือกมา เมื่อใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน ทาคาอะไมเลส เอ โดยใช้ไพรเมอร์ Taa111 และ Taa1280 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียว รหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร พบแถบดีเอ็นเอประมาณ 1,047 คู่-เบส ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำ MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเชื้อราสปอร์สีเขียวและสีดำมีความใกล้เคียงกันมาก ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Egel *et al.* (1994) ได้กล่าวว่าตำแหน่งดีเอ็นเอของเชื้อรา *Aspergillus flavus* มีตำแหน่งของผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 1,168 คู่เบส เมื่อใช้ไพรเมอร์ ทาคาอะไมเลส เอ ยีน ดังภาพที่ 4.37



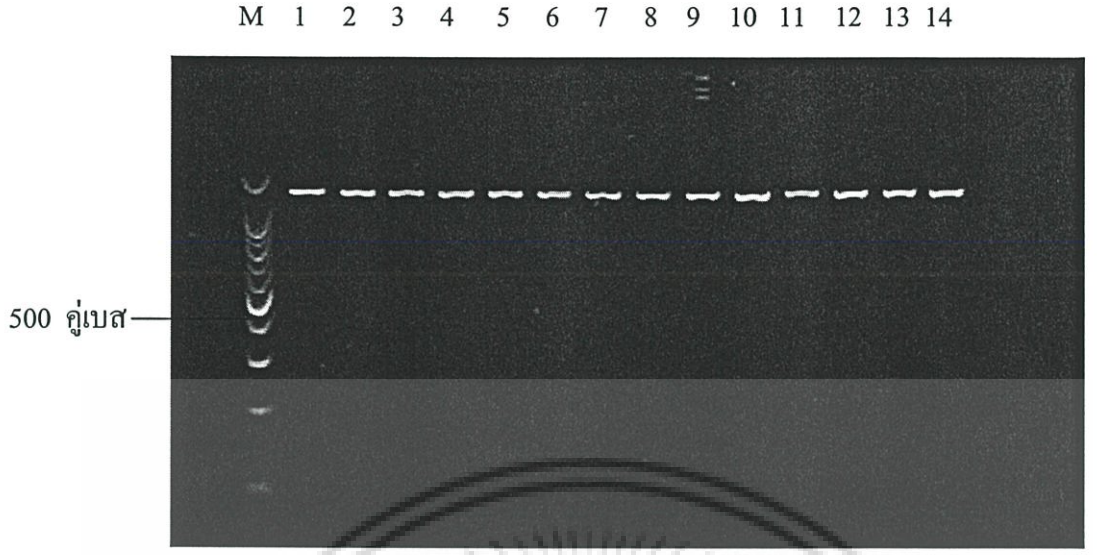
ภาพที่ 4.37 ขนาดดีเอ็นเอบริเวณทาคาอะไมเลสยีนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder)
1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3
7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3
12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.4 ผลการศึกษาพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 4.6.3 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ *Hae*III *Hin*dIII *Hin*fI และเอนไซม์ผสม 3 คู่ คือ *Hae*III กับ *Hin*dIII *Hae*III กับ *Hin*fI และ *Hin*dIII กับ *Hin*fI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำที่แตกต่างกันพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะทุกตัวสามารถตัดผลผลิตพีซีอาร์ได้ในบริเวณ ทาคาอะไมเลส เอยีน โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด พบว่าสามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ ทาคาอะไมเลสเอ ยีน ของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้งชนิดสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำ เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร และเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำ MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอได้ อาจเนื่องมาจากยีนบริเวณทาคาอะ-ไมเลสไม่มีบริเวณตัดจำเพาะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะจะไปตัดได้ (ภาพที่ 4.38) เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 501 437 และ 151 คู่เบส และเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำ MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 500 410 และ 170 คู่เบส ซึ่งจากลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถจัดจำแนกสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำแต่ค่อนข้างไม่ชัดเจน (ภาพที่ 4.39) เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 724 และ 450 คู่เบส ยกเว้น ตัวอย่างรหัส NP1 NP2 และ NP3 ซึ่งเป็นตัวอย่างจากจังหวัดนครพนมมีขนาดดีเอ็น-เอประมาณ 724 301 และ 114 คู่เบส และเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำ MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 750 และ 490 จากลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถจัดจำแนกเชื้อราภายในสปอร์สีเขียวได้ค่อนข้างชัดเจน และนอกจากนี้ยังสามารถจัดจำแนกเชื้อราสปอร์สีดำและสปอร์สีเขียวได้ด้วย (ภาพที่ 4.40) จากผลการทดลองเมื่อใช้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด สามารถจัดจำแนกเชื้อราภายในกลุ่มสปอร์สีเขียว โดยเชื้อราที่แยกมาจากจังหวัดนครพนมมีลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากจังหวัดอื่น นอกจากนี้ยังสามารถจัดจำแนกสปอร์สีดำและสปอร์สีเขียวได้ค่อนข้างชัดเจนแต่ไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อราภายในสปอร์สีเดียวกันได้

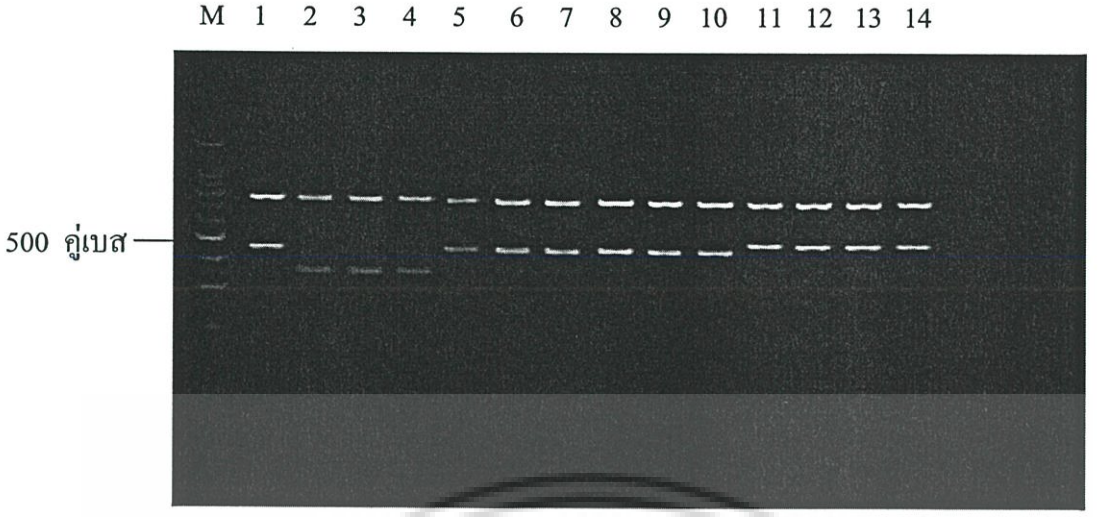
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



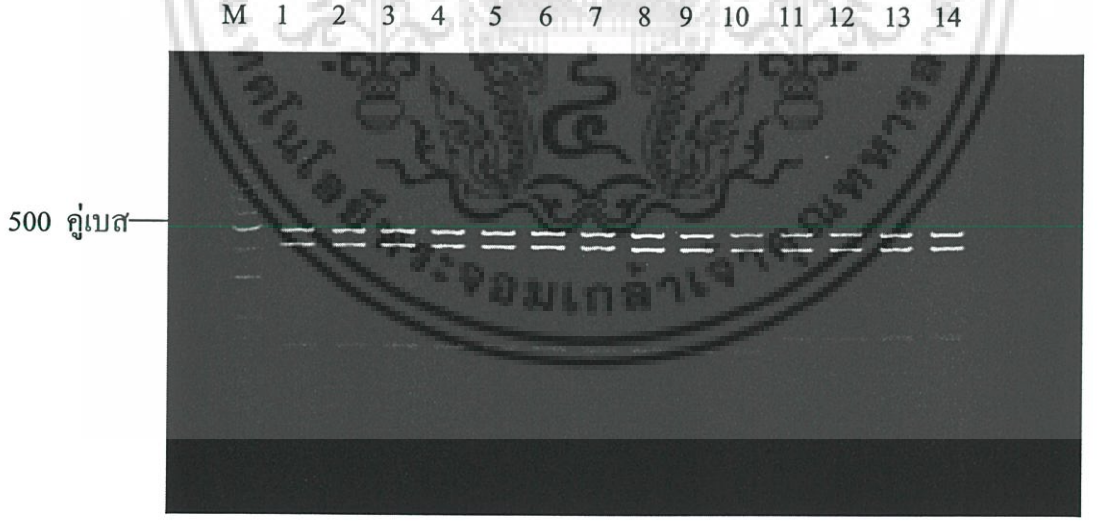
ภาพที่ 4.38 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี บริเวณ ทาคาอะไมเลส เอ ยีน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

ภาพที่ 4.39 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีบริเวณ ทาคาอะไมเลส เอ ยีน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.40 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีบริเวณ ทาคาอะไมเลสเอ ยีน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1



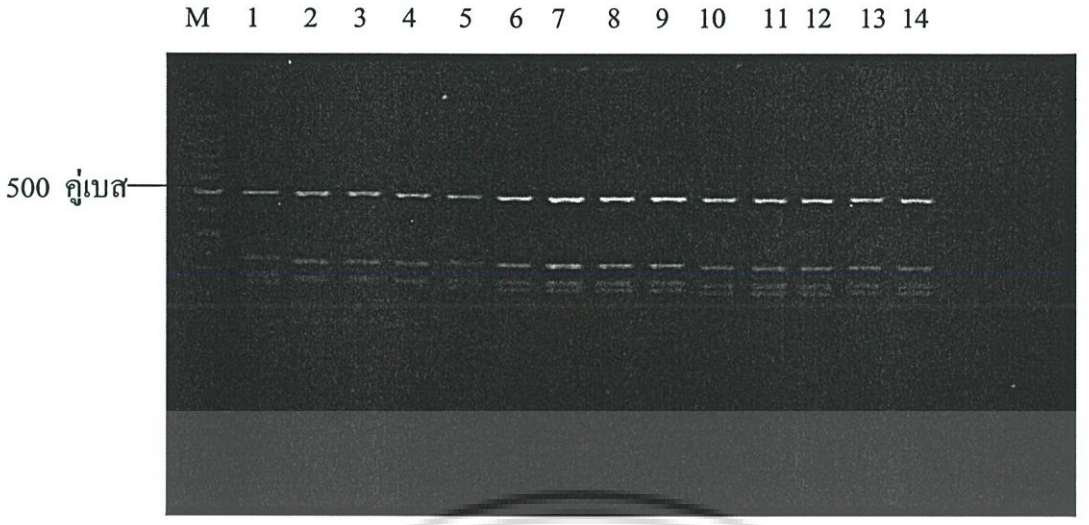
ภาพที่ 4.41 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีบริเวณ ทาคาอะไมเลสเอ ยีน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*dIII เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

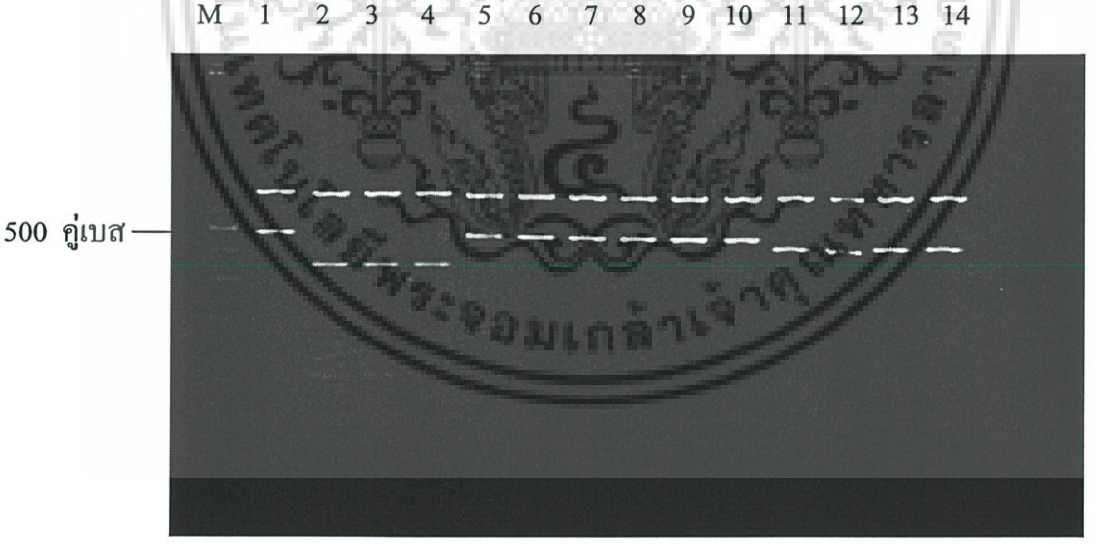
เมื่อใช้เอนไซม์ผสม 3 คู่ ผลการทดลองที่ได้คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*dIII พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 490 420 และ 150 คู่เบส และเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำ MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 500 400 และ 170 คู่เบส จากลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถจัดจำแนกสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำได้ (ภาพที่ 4.41) เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*fI เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 502 230 180 และ 160 คู่เบสยกเว้น ตัวอย่างรหัส NP1 NP2 และ NP3 ซึ่งเป็นตัวอย่างจากจังหวัดนครพนมมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 510 230 180 และ 100 คู่เบสและเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำ MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 500 220 190 และ 170 คู่เบส จากลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถจัดจำแนกเชื้อราภายในกลุ่มสปอร์สีเขียวรหัส NP1 NP2 และ NP3 จากจังหวัดนครพนมได้ชัดเจน และยังจัดจำแนกเชื้อราสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำได้ (ภาพที่ 4.42) และเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Hin*fI เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 730 และ 480 คู่เบส ยกเว้น ตัวอย่างรหัส NP1 NP2 และ NP3 ซึ่งเป็นตัวอย่างจากจังหวัดนครพนมมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 730 370 และ 125 คู่เบส และเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำ MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 776 และ 430 คู่เบส จากลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถจำจำแนกเชื้อราภายในสปอร์สีเขียวได้ค่อนข้างชัดเจน และนอกจากนี้ยังสามารถจัดจำแนกเชื้อราสปอร์สีดำและสปอร์สีเขียวได้ด้วย (ภาพที่ 4.43) จากผลการทดลองเมื่อใช้เอนไซม์ผสมทั้ง 3 คู่ สามารถจัดจำแนกเชื้อราภายในกลุ่มสปอร์สีเขียว โดยเชื้อราที่แยกมาจากจังหวัดนครพนมมีลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากจังหวัดอื่นนอกจากนี้ยังสามารถจัดจำแนกสปอร์สีดำและสปอร์สีเขียวได้ค่อนข้างชัดเจนแต่ไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อราภายในสปอร์สีเดียวกันได้

จากผลการทดลอง Egel *et al.* (1994) ได้กล่าวว่าตำแหน่งดีเอ็นเอของเชื้อรา *Aspergillus flavus* มีตำแหน่งของพีซีอาร์ประมาณ 1,168 คู่เบส เมื่อใช้ไพรเมอร์ ทาคาอะไมเลส เอ ยีน และเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ตัดผลผลิตพีซีอาร์ พบว่ามีขนาดของดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน แต่ก็ยังพอสามารถจัดจำแนกเชื้อราภายในกลุ่มเดียวกันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.42 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีบริเวณ ทาคาอะไมเลส เอ ยีน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*fI เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1



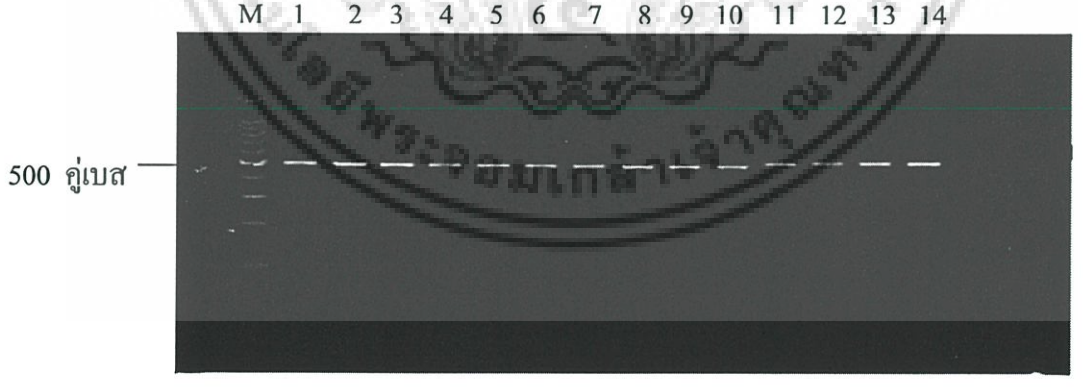
ภาพที่ 4.43 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพีบริเวณ ทาคาอะไมเลส เอ ยีน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Hin*fI เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอสามารถจัดจำแนกเชื้อรา *Aspergillus* spp. ภายในกลุ่มของสปอร์สีเขียวได้ ซึ่งเป็นตัวอย่างจากจังหวัดนครพนม และนอกจากนี้ยังสามารถจำแนกเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำได้ Egel *et al.* (1994) ได้กล่าวถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* sect. *flavi* เมื่อใช้ไพรเมอร์ Taa111 และ Taa1280 ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมบริเวณยีน ทาคาอะไมเลส เอ เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอ พบว่าไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อรา *A. flavus* และ *A. oryzae* ได้ แต่สามารถจัดจำแนก *A. flavus* และ *A. nomius* ได้

4.6.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์เบต้า ทูบูลิน (β - Tubulin)

จากการศึกษาเชื้อราสกุล *Aspergiillus* spp. ทั้งชนิดที่เป็นสปอร์สีดำและสปอร์สีเขียวที่คัดเลือกมา เมื่อใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีนเบต้าทูบูลิน โดยใช้ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร พบขนาดดีเอ็นเอประมาณ 490 คู่เบส ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ พบขนาดดีเอ็นเอประมาณ 500 คู่เบส ดังภาพที่ 4.44 จากลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งในสปอร์สีเขียวและสีดำมีความใกล้เคียงกัน Feibelman *et al.* (1998) รายงานว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์เบต้าทูบูลิน ศึกษา เชื้อรา *Aspergillus nomius* ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้อยู่ที่บริเวณ 495 คู่เบส



ภาพที่ 4.44 ขนาดดีเอ็นเอบริเวณเบต้าทูบูลิน ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์
เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder)
1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3
7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3
12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB

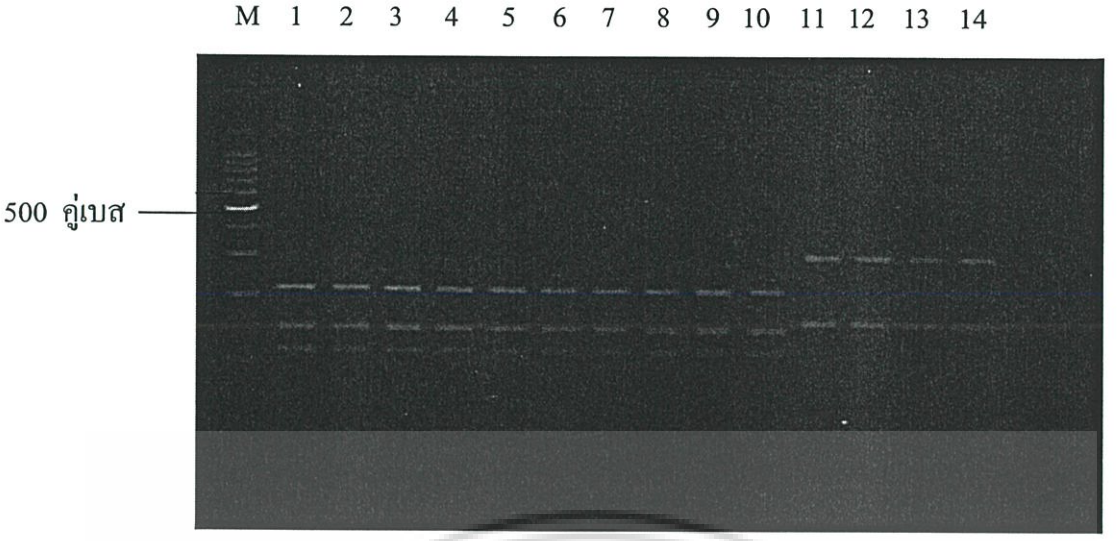
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.6 ผลการศึกษาพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 4.6.5 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ *Hae*III *Hin*dIII *Hin*fI และเอนไซม์ผสม 3 คู่ คือ *Hae*III กับ *Hin*dIII *Hae*III กับ *Hin*fI และ *Hin*dIII กับ *Hin*fI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำที่แตกต่างกันพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะทุกตัวสามารถตัดผลผลิตพีซีอาร์ได้ในบริเวณยีนเบต้าทูบูลิน พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณเบต้าทูบูลิน ของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้งชนิดสปอร์สีเขียวและสีปอร์สีดำ เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 230 158 และ 110 คู่เบส และเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 320 และ 170 คู่เบส จากลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารรถจัดจำแนกเชื้อราสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำได้ค่อนข้างชัดเจน (ภาพที่ 4.45) เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Hin*fI ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอได้ ทั้ง *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียว และ สปอร์สีดำได้ อาจเนื่องจากว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิดไม่มีบริเวณตัดเมื่อใช้ไพรเมอร์ เบต้า ทูบูลิน (ภาพที่ 4.46 และ ภาพที่ 4.47)

เมื่อใช้เอนไซม์ผสม 3 ชนิด ผลการทดลองที่ได้คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*dIII เชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวรหัส AJ4 จากจังหวัดอำนาจเจริญ NP1 NP2 NP3 จากจังหวัดนครพนม RE1 RE3 จากจังหวัดร้อยเอ็ด SR1 SR2 จากจังหวัดสุรินทร์ YT2 และ YT3 จากจังหวัดยโสธร มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 235 150 และ 110 คู่เบส เบส และเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส MKB3 จากจังหวัดมหาสารคาม REB1 REB2 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และ SRB1 จากจังหวัดสุรินทร์ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 320 และ 170 คู่เบส (ภาพที่ 4.48) เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*fI มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 230 160 และ 110 คู่เบส และเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำรหัส MKB3 REB1 REB2 และ SRB1 มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 316 และ 160 คู่เบส (ภาพที่ 4.49) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Hin*fI ไม่สามรถตัดดีเอ็นเอได้ จากลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะใกล้เคียงกันกับที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III แต่สามารถจัดจำแนกสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำออกจากกันได้ชัดเจน (ภาพที่ 4.50)

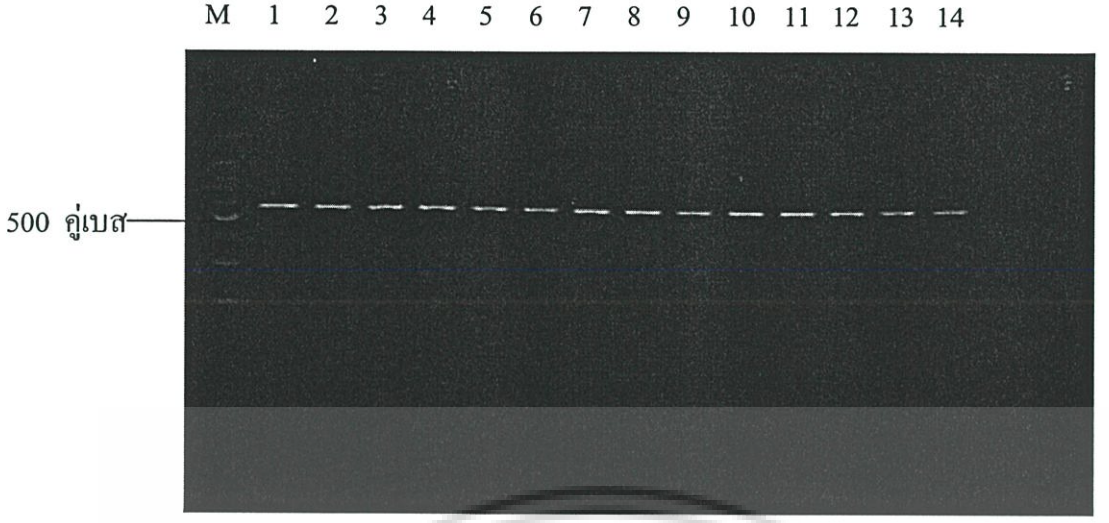
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



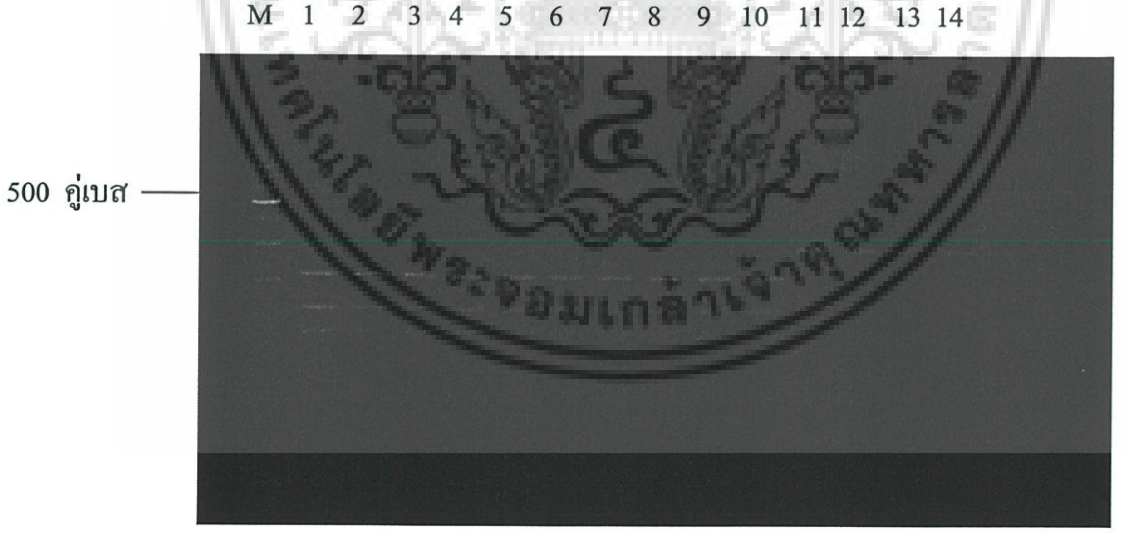
ภาพที่ 4.45 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ เบต้าทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

ภาพที่ 4.46 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ เบต้าทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

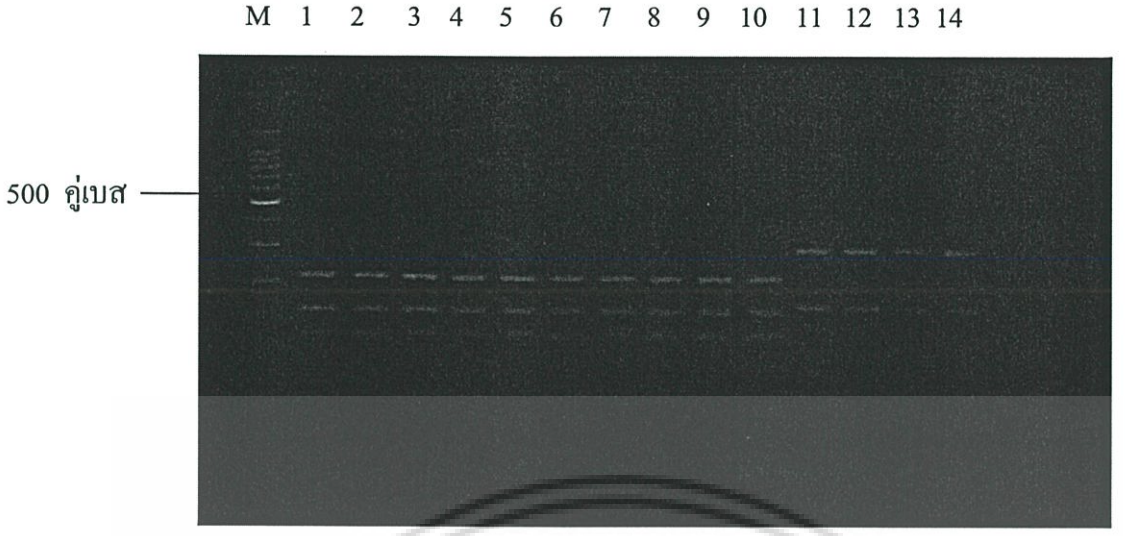


ภาพที่ 4.47 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ เบต้าทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder)
1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3
7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3
12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1



ภาพที่ 4.48 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ เบต้าทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*dIIIเมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder)
1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3
7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3
12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.49 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ เบต้าทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III กับ *Hin*fI เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

ภาพที่ 4.50 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ เบต้าทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Hin*fI เมื่อ M คือ Marker (100 bp Ladder) 1 คือ AJ4 2 คือ NP1 3 คือ NP2 4 คือ NP3 5 คือ RE1 6 คือ RE3 7 คือ SR1 8 คือ SR2 9 คือ YT2 10 คือ YT3 11 คือ MKB3 12 คือ REB1 13 คือ REB2 และ 14 คือ SRB1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอบริเวณ เบต้าทูบูลิน สามารถจัดจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* spp. สปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำได้ แต่ภายในกลุ่มเดียวกันไม่สามารถจำแนกได้ซึ่ง Feibelman *et al.* (1998) ได้กล่าวถึงความแตกต่างของเชื้อรา *Aspergillus nomius A. flavus A. sojae* และ *A. tamarii* โดยใช้ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอ สามารถจัดจำแนกเชื้อรา *Aspergillus nomius* ออกจาก *A. flavus A. sojae* และ *A. tamarii* ได้ แต่ไม่สามารถจำแนก *A. flavus* และ *A. sojae* ออกจากกันได้ ซึ่งจากการทดลองเชื้อราทั้ง 2 ชนิดมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมถึง 89 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Peterson *et al.* (2001) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Aspergillus bombysis* ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้มาจากหนอนไหม เปรียบเทียบกับเชื้อราสายพันธุ์อื่น โดยใช้ไพรเมอร์ Ben0 และ Ben0b ซึ่งใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณเบต้าทูบูลิน ผลการทดลองที่ได้พบว่าสามารถจัดจำแนกเชื้อรา *Aspergillus bombysis* ออกจากเชื้อรา *Aspergillus nomius* ได้ แต่ไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อราภายในกลุ่มเชื้อรา *Aspergillus bombysis* และ *Aspergillus nomius*

จากผลการศึกษาที่ได้ พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆตรวจสอบความแตกต่างของตัวอย่างที่ได้จากการคัดเลือก แถบโพลีมอร์ฟีซึมที่เกิดขึ้นทั้งในสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำพบว่ามีความแตกต่างกัน สอดคล้องกับการรายงานของ Toby *et al.* (1998) ที่ได้ทำการจำแนกเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus flavus* ด้วยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี ที่ตำแหน่งยีน b - tubulin ยีน nitrate reductase ยีน taka - amylase และยีน calmolin A พบว่า *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus flavus* มีความคล้ายกัน 83 94 99 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วน Moody and Tyler (1990) ได้ใช้เทคนิคอาร์เอฟแอลพี ในการจัดจำแนกกลุ่มเชื้อรา *Aspergillus flavus Asprgillus parasiticus* และ *Aspergillus nomius* พบว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ไม่มีความแตกต่างกันในระดับยีน และ Kurtzman *et al.* (1986) ที่ศึกษาความแตกต่างของเชื้อราในกลุ่ม *Asprgillus flavus* พบว่าเชื้อราสกุล *Aspergiilus flavus* และ *Aspergillus oryzae* มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมมากถึง 90-100 เปอร์เซ็นต์ จากความไม่แตกต่างของตัวอย่างที่ทำการศึกษามีรายงานของ Sukumavasi *et al.* (1975) และชัยวัฒน์ จาติเสถียร (2521) ว่าในลูกแป้งเหล้าจะพบเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus flavus* ซึ่งมีสปอร์สีเขียว *Aspergillus niger* ซึ่งมีสปอร์สีดำ และกลุ่ม *Aspergillus* กลุ่มอื่นๆ

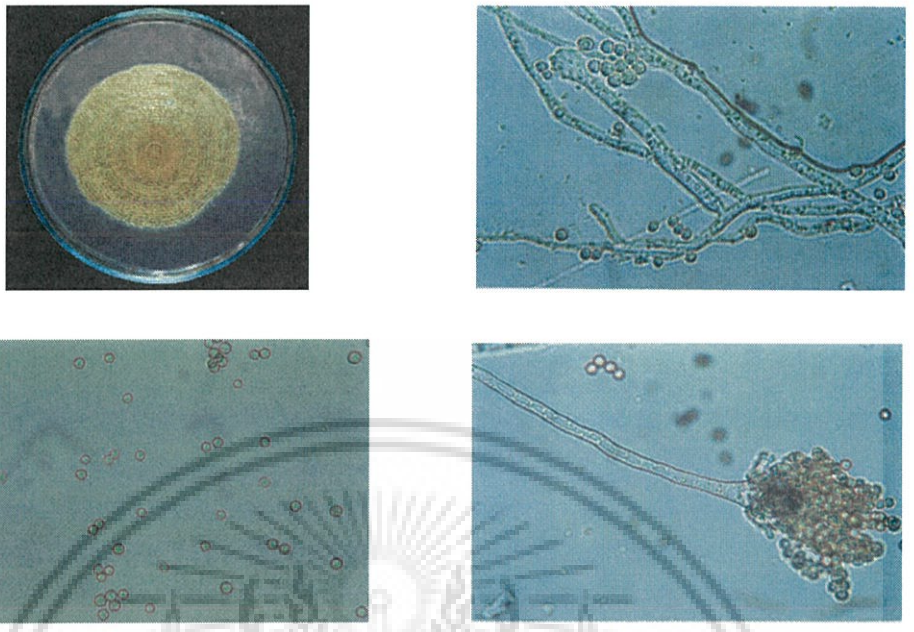
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

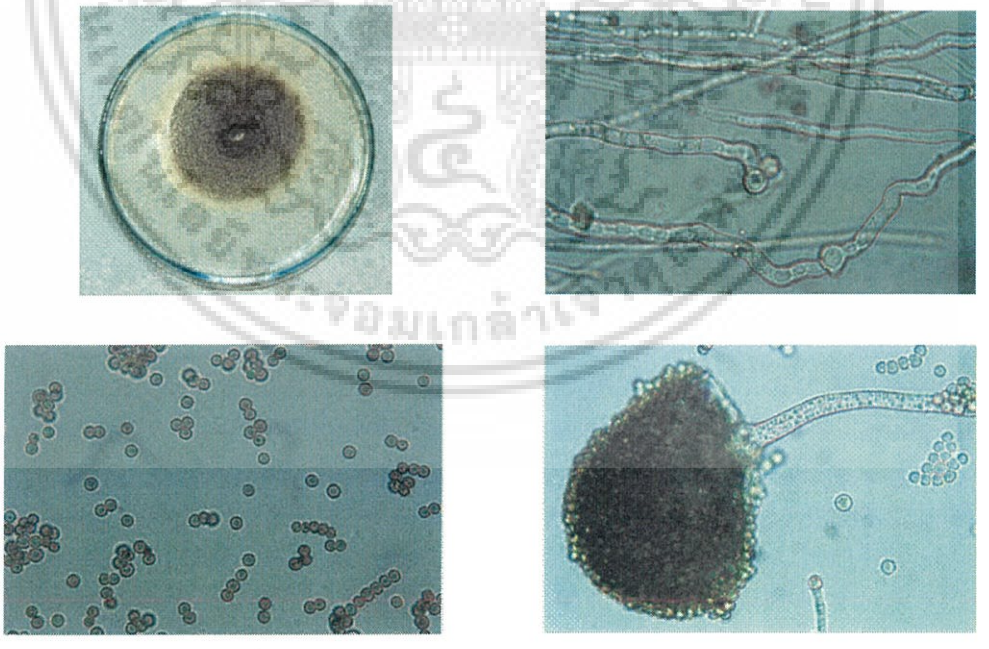
ผลจากการนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. รหัส RE3 มาทำการจัดจำแนกในระดับจีนัส (Genus) โดยอาศัยสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA และสัณฐานวิทยาเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการเลี้ยงราบนสไลด์ (slide culture) พบว่าลักษณะของโคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องมีลักษณะกลม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน พบว่ามีขนาดโคโลนีประมาณ 3 ถึง 3.5 เซนติเมตร เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวหรือสีเขียวอมเหลือง ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยมีผนังกั้นขวาง สปอร์ค่อนข้างกลม และพบเวสซิเคิล แสดงดังภาพที่ 4.51

เมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. รหัส REB2 มาทำการจัดจำแนกในระดับจีนัส โดยอาศัยสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA และสัณฐานวิทยาเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการเลี้ยงราบนสไลด์ (slide culture) พบว่าลักษณะของโคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องมีลักษณะกลม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน พบว่ามีขนาดโคโลนีประมาณ 3 ถึง 3.5 เซนติเมตร เส้นใยสีขาว สปอร์สีดำจำนวนมาก ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยมีผนังกั้นขวาง สปอร์ค่อนข้างกลม และพบเวสซิเคิลเช่นเดียวกับเชื้อรา *Aspergillus flavus* แสดงดังภาพที่ 4.52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.51 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 4.52 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus* spp. จากลูกแป้งเหล้า ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สามารถจัดจำแนกได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ เชื้อราที่มีลักษณะสปอร์สีเขียว และเชื้อราที่มีลักษณะสปอร์สีดำ เมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* spp. แต่ละตัวอย่างมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหาร Czapek agar พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ที่มีสปอร์สีเขียวมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์สูงสุดคือมีผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนดโคโลนีเท่ากับ 2.467 เซนติเมตร ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ที่มีสปอร์สีดำ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์สูงสุดคือมีผลต่างระหว่างบริเวณโซนใสต่อขนาดโคโลนีเท่ากับ 1.276 เซนติเมตร ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้น้อยกว่า เชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกบนอาหาร Glucose peptone agar ยังพบว่า เชื้อรา *Aspergillus* sp. รหัส RE3 สามารถผลิตกรดโคจิกได้อีกด้วย แต่เชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ไม่สามารถผลิตกรดโคจิกได้

เมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 และ *Aspergillus* sp. REB2 มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว Czapek ที่ระดับควาเข้มข้น 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* spp. รหัส RE3 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในแป้งสุกสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรต 3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสซียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร เฟอรัสซัลเฟต 0.01 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในแป้งสุกเท่ากับ 6.68 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.32 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และในแป้งมันสำปะหลังดิบเชื้อรามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ระดับต่ำคือที่ระดับ 0.38 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.76 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในแป้งสุกเท่ากับ 6.06 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.68 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และในแป้งมันสำปะหลังดิบเชื้อรา มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสต่ำมากเท่ากับ 0.40 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 6.80 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง

การศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนของเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 ที่ระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมเซัลฟต 3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสซียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร เฟอรัสซัลเฟต 0.01 กรัมต่อลิตร เชื้อรา *Aspergillus* sp. รหัส RE3 มีความสามารถใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตเอนไซม์อะไมเลสในแป้งสุกสูงที่สุดเท่ากับ 12.91 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.83 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และในแป้งมันสำปะหลังดิบเชื้อรามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ระดับต่ำเท่ากับ 0.49 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.22 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์ 3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร เฟอรัสซัลเฟต 0.01 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 11.46 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.83 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และในแป้งมันสำปะหลังดิบเชื้อรา มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ระดับต่ำเท่ากับ 0.53 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.19 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงจากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 แหล่งที่ใช้ในการทดลอง พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลวสูงเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลวสูงเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาการผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว Glucose peptone ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน 3 ชนิดคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และ แอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตมีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 4.50 กรัมต่อลิตร พีเอช 2.45 ยูเรีย เชื้อรามีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 4.06 กรัมต่อลิตร พีเอช 2.76 และแอมโมเนียมคลอไรด์ เชื้อรามีความสามารถในกรผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1.39 กรัมต่อลิตร พีเอช 2.76 ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสพบว่า เชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 7.87 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.78 เมื่อใช้ยูเรีย มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 6.76 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 3.25 และเมื่อใช้ แอมโมเนียมคลอไรด์ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 6.48 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.87 ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้ง 14 ตัวอย่างพบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ ITS 1 กับ ITS 4 ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS 1 กับ ITS 4 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III *Hin*dIII *Hin*fI และเอนไซม์ผสมทั้ง 3 ชนิดคือ *Hae*III กับ *Hin*dIII *Hae*III กับ *Hin*fI และ *Hin*dIII กับ *Hin*fI สามารถตัดผลผลิตพีซีอาร์ได้ แสดงว่าเอนไซม์ทุกตัวมีบริเวณในการตัดผลผลิตพีซีอาร์ ซึ่งจากลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถจัดจำแนกเชื้อราสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำได้ ไพรเมอร์ ทาคาอะไมเลส เอ ยีน พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจาการเพิ่มปริมาณของยีนทาคาอะไมเลส เอ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III *Hae*III กับ *Hin*dIII จากลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถจัดจำแนกเชื้อราสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำได้ เอนไซม์ *Hin*fI *Hae*III กับ *Hin*fI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Hin*dIII กับ *Hin*fI สามารถใช้จัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อรารหัส NP1 NP2 และ NP3 จากจังหวัดนครพนมออกจากกลุ่มสปอร์สีเขียวได้ ไพรเมอร์เบต้า ทูบูลิน พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณของยีน เบต้าทูบูลิน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III *Hae*III กับ *Hin*dIII และ *Hae*III กับ *Hin*fI สามารถตัดผลผลิตพีซีอาร์ได้จากลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถจัดจำแนกเชื้อราสปอร์สีเขียวและสปอร์สีดำได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus* spp. จากแหล่งต่างๆให้มากขึ้น และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกรดโคจิกในระดับถังหมัก

2. ในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ควรเพิ่มและคัดเลือกไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบให้มากขึ้น

3. เพิ่มปริมาณตัวอย่างของเชื้อราในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมให้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมสรรพสามิต. 2524. "ระเบียบกรมสรรพสามิต 2524 ว่าด้วยการทำและการขายแป้งข้าวหมาก." **กรมสรรพสามิต.** กระทรวงการคลัง. กรุงเทพฯ.

จิราภรณ์ สุขุมาวาสี. 2518. "การศึกษาทางชีววิทยาของลูกแป้งข้าวหมาก" เอกสารการประชุมทางวิชาการเกษตรและชีววิทยา ครั้งที่ 14 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ชัยวัฒน์ จาติเสถียร. 2521. "การคัดเลือกสายพันธุ์ราและยีสต์ในลูกแป้งสำหรับการหมักข้าวหมาก." วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นภา โล่ห์ทอง. 2534. "**กล้าเชื้อถังหมักและเทคโนโลยีการผลิต**". ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. **ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา.** ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

พิไลพรรณ พงษ์พูล. 2523. "การศึกษาชีววิทยาของลูกแป้งข้าวหมาก" รายงานการวิจัยสำนักคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2542. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง **เทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม.** ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

มนตรี เชาว์นสังเกต. 2521. "การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ และราเพื่อใช้ผลิตไวน์ข้าว." วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วรชิน สถิตนิมานการ. 2492. **การผลิตสุราและแอลกอฮอล์จากข้าว.** วิทยาศาสตร์. 3 (9) : 320-324

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. **จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

วัชรี อัตถาทิพพหลกุล และ มนตรี อัตถาทิพพหลกุล. 2539. **ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR เทคโนโลยี.** คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. **เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม.** สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

สมพร สินธารา. 2544. "การแยกการจำแนกและการเก็บรักษายีสต์ และราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง. 2540. "DNA Fingerprinting และ การตรวจสอบสายพันธุ์พืช" ในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประชุมปฏิบัติการเรื่อง " **ชีวเคมีกับการพัฒนาอุตสาหกรรมไทย**" ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร. นครปฐม.

สุกัญญา สายธิ. 2541. "การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 จากน้ำมะพร้าว." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2540. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรวรรณ นวีภาพ. 2531. **เชื้อราก่อให้เกิดโรคในสัตว์**. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

อาภัสรา ชูเทศะ. 2542. **เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส**. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์รั้วเขียว. กรุงเทพฯ.

Alain, V., Philippe, C., Claudie, R., Laurent D. and Jean-Novel, H.. 1995. "Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strain from the wine producing area of Charentes, France." **Applied and Environmental Microbiology**. 61(9) : 3521-3529.

Bainbridge, B. W., Spreadybudy, C. L.,Scalise, F. G. and Cohen, J.. 1990. "Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale culture of filamentous fungi." **FEMS Microbiological Letters**. 66 : 113-118.

Barbergard, P., Heldt Hansen, H. P. and Diderichsen, B. 1992. "Mini review on the safety of *Aspergillus oryzae*." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 36 : 569-572.

Belitz, H. D. and Grosch, W. 1999. **Food chemistry**. (English translation from German) 2nd New York : Spring Verlas.

Bently, R. 1957. "Preparation and analysis of kojic acid." **Methods in Enzymology**. 3: 238-241.

Bernfeld, P. 1955. **Amylase alpha and beta Method in Enzymology**. New York :Academic Press Inc.

Bhella, R.S. and Atossar, T. 1987. "Translation control of amylase gene expression in *Aspergillus awamori*". **Applied Microbiology and Biochemistry** 9 : 287-293.

Carlsen M., Spohr, A.B., Nielson, J. and Villadsen, J. 1995. "Morphology and Physiology of an amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations." **Biotechnology Bioengineering**. 81 : 906-912.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cenis, J. L.. 1992. "Rapid extraction of fungal DNA for amplification". **Nucleic Acids Research**. 20 : 2380.

Croft, J. H., Bhutachejee, V. and Champman, K. E.. 1990. "RFLP analysis of nuclear and mitochondrial DNA and ITS use in *Aspergillus* systematics. New York : Plenum Press.

Day, R.A. and Underwood, A.L.1974. **Ceucentitative Analysis Laboratory Manual**. New Jersey : Prentices Hall .

DSMZ(a). "Chinese yeast Cake" DSMZ strain DSM 1603 (*Monascus purpueus*) "on line" Available:http//www.DSMZ.de/strains/No.001603.htm.2001.

DSMZ(b). "Chinese yeast Cake" DSMZ strain DSM K14 (*Aspergillus candidus*) "on line" Available:http//www.DSMZ.de/strains/No.00814.htm. 2001.

Egel, D. S., Peter, J. C., and Korol, S. . 1994. "Relationships among isolates of *Aspergillus* sect. *flavi* that vary in aflatoxin production." **Phytopathology.** 84 : 906-912.

Eric, O., Maurice, R., Sevastianos, R. and Gustavo, V. G. 1988. "Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger.*" **Applied Microbiology and Biotechnology.** 27 : 498-503.

Eward, I. A.. 1999. **DNA TECHNOLOGY**, second edition. New York : Academic Press.

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

Francoise, V., Bruno, B. and Jean-Novel, H.. 1990. "Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of elongation strains of *Saccharomyces.*" **Applied Microbiology and Biotechnology.** 32 : 568-571.

Futamura, T., Mitsuyasu, O., Takayoshi, T., Kyouko, T., Toshio, M. and Yong, S. P. 2001. "Improvement of production of Kojic acid by mutant strain *Aspergillus oryzae* MK 107-39." **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 91 (3) : 272-276.

Glass, N. L. and Donaldson, G. C.. 1995. "Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes." **Applied and Environmental Microbiology.** 61 (4) : 1323-1330.

Gwo-Yang, Y., Chiung-shu, L. and Chann-chao, C.. 1995. "Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by Random Amplification of Polymorphic DNA." **Applied and Environmental Microbiology**. 61 (6) : 2384-2387.

Hiram, F. G. 1990. Basic conception in biochemmistry, **A Student's survival Guide**.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Houston : McGraw Hill.

Hiroshi, Y., Hiromasa, Y., Yuji, S., Nariko, A. and Takeshi, S.. 1998. "Rapid Methods for detection *Saccharomyces diasticus* a beer spoilage yeast using the Polymerase Chain Reaction". **Journal of American Social Brewery Chemistry**. 56(2) : 58-63.

Jin, B., Leeuwen van, H. J., Patel, B., Doelle, H.W. and Yu, Q. 1999. "Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing waste water." **Process Biochemistry**. 34 : 59-65.

Kayahara, H., Shibata, N., Tadasa, K., Maeda, H., Kotami, T. and Ichimoto, I.. 1990. "Amino acid and peptide derivative of kojic acid and their antifungal properties." **Agricultural Biological Chemistry**. 54: 2441-2442.

Kurtzman, C.P., Smiley, M. J., Robnett, C.J. and Wiklow, D.W.. 1986. "DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group". **Mycologia**. 78(6) : 955-959.

Kusters-Van Someron, M.A., Kester, H.C.M., Samson, R. A. and Visser, J.. 1990. "Variation in pectinolytic enzymes of the black *Aspergillus*: a biochemical and genetic approach". **In Modern Concept in *Penicillum* and *Aspergillus* Classification**. New York : Plenum press.

Lodder, J.. 1970. **The Yeasts a Taxonomy Study**. Amsterdam : North Holland Publishing Co.

Louis, P., Monika, H., Markus, W., Michale, T and Adolphus, P.G.M. Vanloon. 1997. " Gene cloning purification and characterization of a half stable phylose from the fungus *Aspergillus fumigatus.*" **Applied and Environmental Microbiology**.. 63 : 1696-1700.

Moody, S. F. and Tyler, B. M. 1990 (a). "Use of nuclear DNA Restriction Fragment Polymorphism to analyze the diversity of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus, A. parasiticus, and A. nomius.*" **Applied and Environmental Microbiology**. 56(8) : 2453-2461.

Moody, S. F. and Tyler, B. M. 1990(b). "Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus, A. parasiticus, and A. nomius*. **Applied and Environmental Microbiology**. 56(8) : 2441-2452.

Morita, H. and Fujio, Y. 2000. "Effect of organic nitrogen source on raw starch digesting glucoamylase production of *Rhizopus* sp. MKU 40." **Starch/Starke**. 52 :18-21.

Morkeberg, R., Carlsen, M. and Neilsen, J. 1995. "Induction and repression of alpha-amylase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

production in batch and continuous culture of *Aspergillus oryzae*." **Microbiology** 141 : 2449-2454.

Pandey, A., Nigam, C.R., Soccol, V.Y., Shigh, D. and Moham, R.. 2000. "Advances in microbial analyzes." **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 31 : 135-152.

Pereira, S.S., Torres, E.F., Gonzalez, G.V., and Rojas, M.G. 1993. "Effect of different carbon sources on the septhesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and Solid state fermentations." **Applied Microbiology and Biotechnology** 39, 36-41.

Petczar, M. J. J., Chan, E. C. S. and Krieg, N. R. 1986. **Microbiology.** 5th ed. New York : Mcgraw - Hill Book Company.

Peterson, H., Beyer, M. and Nielsen, J.. 2000. "Glucoamylase production in batch chemostat and fed – batch cultivation by an industrial strain of *Aspergillus niger*." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 53 : 272-277.

Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W. and Goto, T.. 2001. "*Aspergillus bombysis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*." **Mycologia**. 93(4) : 689-703.

Raff, E. C. 1984. "Genetics of microtubule systems" **The Journal of cell Biology**. 99 :1-10.

Ralph, R. and John, M. W.. 1998. **Molecular Biomethods Handbook.** New Jersey : Humana Press.

Raper, K. B. and Funnell , D. I.. 1965. **The Genus *Aspergillus*.** Baltimore : The Williams and willians Company.

Rosfarizan, M., Madihah, S. and Arift, A.B. 1998. "Isolation of a kojic acid producing fungus capable of using starch as a carbon source." **Letters in Applied Microbiology.** 26 : 27-30.

Rosfarizan, M. and Ariff, A.B. 2000. "Kinetic of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources." **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology.** 25 : 20-24.

Sadhukhan, R.K., Manna, S., Roy, S.K. and Chakrabarty, S.L.1990. "Thermostable amylolytic enzyme from cellulolytic fungus *Myceliophthora thermophita* D14CATCC48104." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 33 : 692-696.

Soccol, C. R., Marin, B., Raimbault, M. and Lebault, J. M. 1994. "Breeding and growth of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rhizopus in raw cassava by solid state fermentation." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 41 : 330-336.

Stainer, R. Y., Adelberg, E. A. and Ingraham, J. 1976. **The Microbial World**. 4th ed. Engle wood : Prentice – Hall. Inc.

Sukumavasi, J., Kato, K. and Harada, T.. 1975. "Glucoamylase of a strain of *Endomycopsis fibuligera* isolated from mould bran (look pang) of Thailand." **Journal of Fermentation**. 53(8) : 559-561.

Suzuki, M. , Nakase, T., Daengsupha , W., Chousangket , M., Suganano luner , P. and Komagato, K.. 1987. "Identification of yeast isolation from fermentated foods and related material in Thailand." **Journal of General Applied Microbiology.** 33 : 210-220.

Tada, S. Iimura, Y., Gomi, K., Takashashi, K., Hara, S. and Yoshizowa, K 1989. "Cloning and nucleotide sequence of the genomic Taka amylase A gene of *Aspergillus oryzae*." **Agricultural Biological Chemistry**. 53 : 593-599.

Toby, P. F., Peter, J. C., Doster, M.A. and Michailides, T. J.. 1998. "A morphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*." **Mycologia**. 90(4) : 618-623.

Vilgalys lab. "ribosome DNA" [online] Available:http//www.Vilgalys lab.com. 1999.

White, A. Handler, P. and Smith, E.L. 1968. **Principle of Biochemistry.** New York : McGran Hill book.Co.

White, T. J., Innis, M. A. Gelfand., D. H. and Snnisky, J. J. 1990 "Amplification and direct sequencecing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic." 315-322. in Innis, M.A. *et al.* **PCR Protocol** : A Guide to Methods and Applications. New York : Academic Press.

Winter, P.C., Hickey, G.I. and Fletcher, H. L..1998. **Instant Notes in GENETICS**. Guildford :BIOS Scientific Publishers Ltd.

Yabuki, M., Ono, N., Hoshino, K. and Fukui, S. 1987. "Rapid induction of alpha-amylase by nongrowing mycelia of *Aspergillus oryzae*." **Applied and Environmental Microbiology**. 34 :1-6

Yuko, K. and Tsutomu, A.. 1996. " Single strand conformation polymorphism analysis of PCR amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *flavi*". **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (8) : 2947-2952.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร PDA (Potato Dextrose agar)

มันฝรั่ง (Potato)	200 กรัม
เด้กโตรส (Dextrose)	20 กรัม
วุ้น (Agar)	15 กรัม

หั่นมันฝรั่งเป็นก้อนขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร หนัก 200 กรัม ต้มให้เดือดจนก้อนมันฝรั่งเริ่มนิ่ม กรองเอาแต่น้ำ เติมน้ำตาลเด้กโตรส วุ้น และน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที

2. อาหาร Czapek agar

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	3 กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 กรัม
โพแท่สเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5 กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01 กรัม
กลูโคส (Glucose)	20 กรัม
วุ้น (Agar)	15 กรัม

ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตรพีเอช 7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที (Raper and Funnell. 1965)
ดัดแปลงโดยใช้แป้งมันสำปะหลังแทนกลูโคส

3. อาหาร GYEP (Glucose Yeast Extract Peptone)

กลูโคส (Glucose)	20 กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3 กรัม
เปปโตน (Peptone)	10 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที (Bainbridge *et al.* 1990)

4. อาหาร Glucose Peptone agar

กลูโคส (Glucose)	100	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1	กรัม
เปปโตน (Peptone)	0.5	กรัม
วุ้น (Agar)	15	กรัม

ละลายให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส

การวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส ทำตามวิธีของ นวลพรรณ ณ ระนอง (2540)

สารเคมี

1. สารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (1% soluble starch)

สารละลายแป้ง 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นต้มด้วยไฟอ่อนจนแป้งละลายปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. บัฟเฟอร์ 0.1 M พีเอช 5

สารละลาย A : 0.1 M citric acid (ละลาย citric acid 21.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate (ละลาย $Na_2HPO_4 \cdot 7H2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

ผสมสารละลาย A 243 มิลลิลิตร และ สารละลาย B 257 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

3. สารละลาย 3, 5 -Dinitrosalicylic acid, DNS

เตรียมตามวิธีของ Benfeld (1955) โดยละลาย 3, 5-Dinitrosalicylic acid 1 กรัม ในสารละลาย NaOH 2.0 M ปริมาตร 200 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บสารละลายในขวดสีชา หรือขวดทึบแสง

4. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส

สารละลายน้ำตาลมอลโตส 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5. สารละลายไอโอดีน

เตรียมตามวิธีของ Lodder (1970) โดยชั่งไอโอดีน 1 กรัม และโพแทสเซียมไอโอได 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. ใส่สารละลายเอนไซม์อะไมเลส (ที่มีความเจือจางเหมาะสม) 1มิลลิลิตร และบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

2. เติมน้ำแป้งที่อุ่นที่ 50 องศาเซลเซียส ลงในหลอดที่มีสารละลายเอนไซม์หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

4. นำสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำทุกหลอดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (A_{540}) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน

6. ทำหลอดควบคุม (control) ทำเช่นเดียวกันแต่นำสารละลายเอนไซม์ต้ม 5 นาที ก่อนใส่น้ำแป้งและบัฟเฟอร์ ทำแบลงค์ (blank) โดยใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์

7. ทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส นำสารละลายน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 0 100 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 4-5 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส ดังแสดงในภาพที่ ก 1

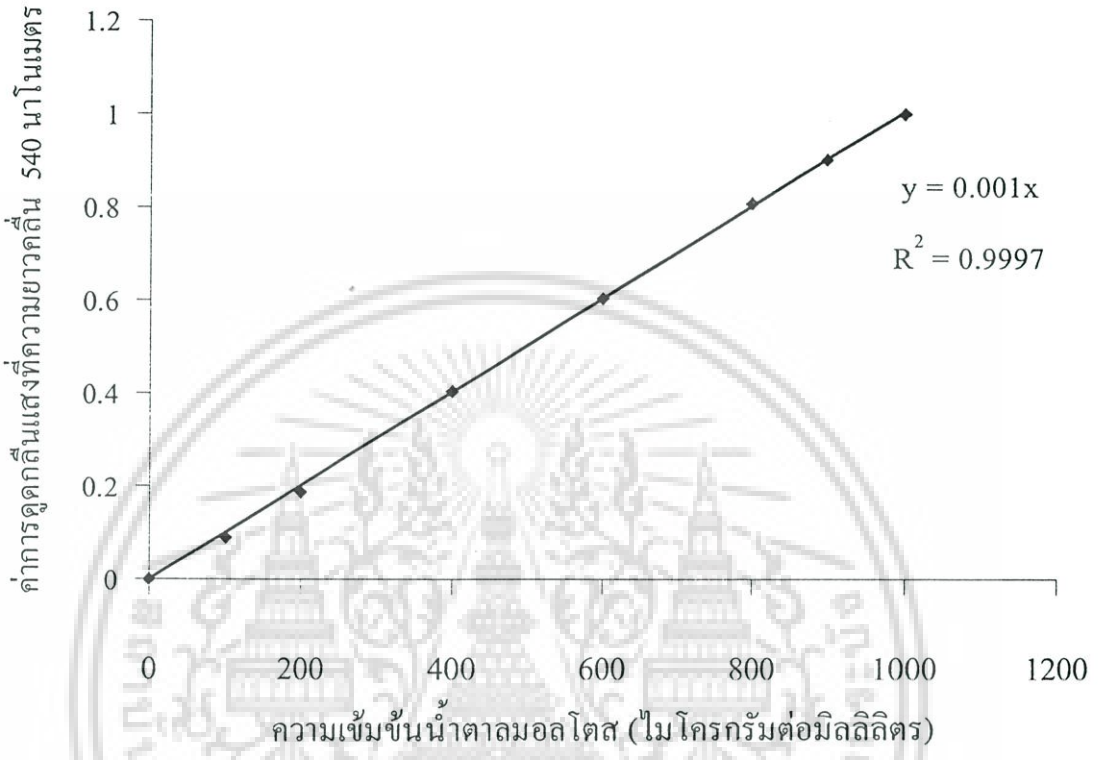
8. การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย)} = \frac{A_{540} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{สโลปของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลา} \times \text{น้ำหนักโมเลกุล}}$$

หน่วย (unit) ต่อ มิลลิลิตร

เมื่อ 1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้น้ำตาลรีดิวส์เทียบเท่าน้ำตาลมอลโตส 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์กรดโคจิก

การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกตามวิธีของ Bentley. (1957) โดยการใช้สารละลายเฟอริกคลอไรด์ (ferric chloride) ทำปฏิกิริยากับสารประกอบแอลฟา-ไฮดรอกซิล แอซิด (α- hydroxy acid) และสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compound)

สารเคมี

1. สารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 1 กรัม ละลายใน 0.1 N HCl และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

2. สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานของ Sigma โดยชั่งกรดโคจิก 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของกรดโคจิก 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่างที่จะทำการวัดปริมาณกรดโคจิกปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ทำแบลงค์ (blank) ควบคู่กันไปโดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเป็นตัวควบคุม

2. เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

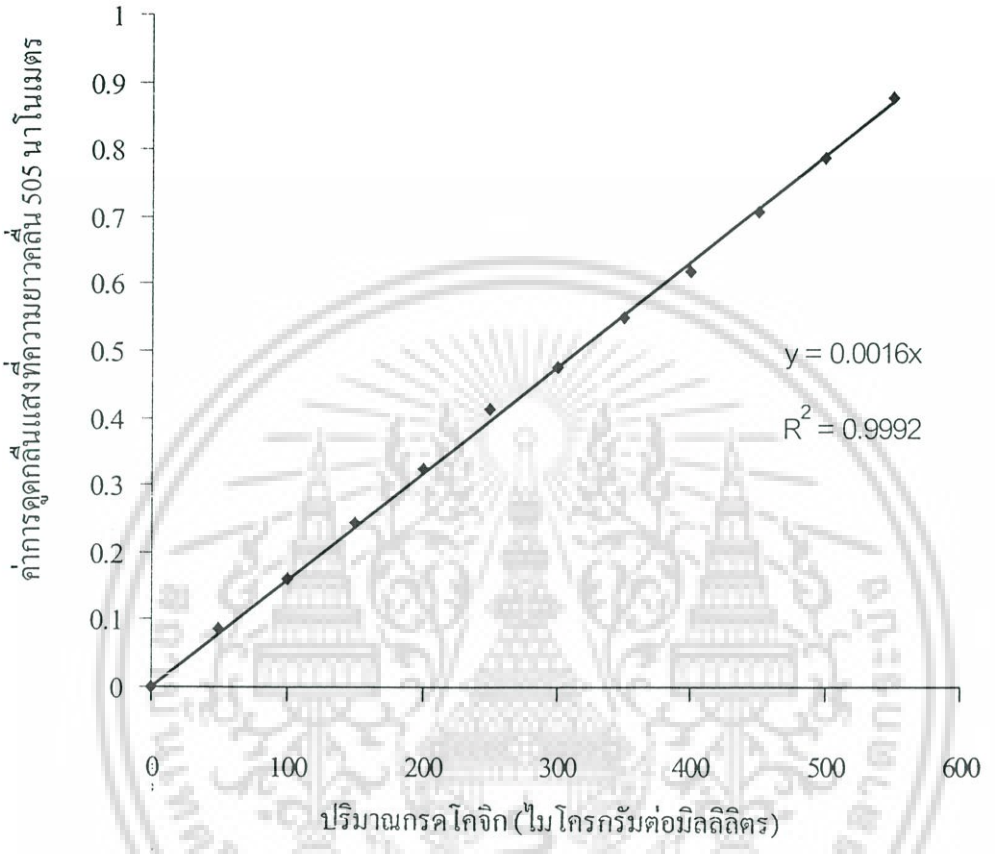
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับแบลงค์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร

4. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 0 100 200 300 400 500 ถึง 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดโคจิก ดังแสดงในภาพที่ ก 2

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากตัวอย่าง คำนวณปริมาณกรดโคจิกจากสูตร ดังนี้คือ

$$\text{ปริมาณกรดโคจิก} = \frac{A_{505} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1.1. 3M Sodium acetate, pH 5.2

ละลาย $CH_3COONa.3H_2O$ จำนวน 408.1 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ให้ได้ 5.2 ด้วยแกลเซียล อะซีเตต (glacial acetate) จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

1.2. Extraction buffer

นำ 1 M Tris-HCl พีเอช 8.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับ 1 mM EDTA พีเอช 8.0 5 M NaCl และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ SDS อย่างละ 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายดังนี้คือ 200 mM Tris-HCl 250 mM NaCl 25 mM EDTA และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ SDS

1.3. TE- EDTA buffer, TE buffer

เตรียมโดยการนำ 1M Tris-HCl พีเอช 8.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับ 0.5M EDTA พีเอช 8.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ที่ได้จะมีความเข้มข้นของสารละลายดังนี้คือ 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl และ 1 mM EDTA พีเอช 8.0

1.4. Sodium dodecyl sulfate, SDS

ละลาย Sodium dodecyl sulfate 0.5 กรัมในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปรับพีเอช ให้เท่ากับ 7.2 ด้วย 1N HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

1.5. 1N HCl

เตรียมโดยเติมกรด HCl เข้มข้น 86.2 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 913.8 มิลลิลิตรและผสมให้เข้ากัน จะได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2. สารเคมีในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

2.1. 0.5 M EDTA

ละลาย disodium ethylene diamine tetra acetate จำนวน 186.1 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer ในการหมุนเพื่อช่วยละลาย ปรับพีเอช ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางที่ ง.1 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์

	แป้งสุก		แป้งดิบ	
วัน	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
เชื้อRE3				
0	0.00	7.00	0.00	7.00
1	1.23	6.86	0.01	6.96
2	1.64	6.84	0.02	6.94
3	1.96	6.75	0.08	6.89
4	2.46	6.50	0.20	6.84
5	1.17	5.54	0.26	6.80
6	0.58	4.02	0.19	6.77
เชื้อ REB2				
0	0.00	7.00	0.00	7.00
1	1.23	6.89	0.02	6.99
2	1.24	6.87	0.14	6.67
3	1.80	6.77	0.15	6.90
4	2.36	6.75	0.16	6.88
5	1.65	5.69	0.35	6.86
6	0.61	4.140	0.28	6.82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์

วัน	แป้งสุก		แป้งดิบ	
	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
เชื้อRE3				
0	0.00	7.00	0.00	7.00
1	1.32	6.87	0.02	6.92
2	3.00	6.83	0.03	6.91
3	3.57	6.74	0.14	6.81
4	4.15	6.41	0.19	6.83
5	2.02	5.50	0.29	6.78
6	0.67	4.00	0.24	6.75
เชื้อ REB2				
0	0.00	7.00	0.00	7.00
1	1.30	6.88	0.03	6.98
2	2.64	6.86	0.15	6.96
3	3.15	6.72	0.25	6.88
4	3.68	6.70	0.33	6.81
5	3.03	5.58	0.40	6.85
6	2.69	4.06	0.36	6.80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.3 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 10 เปอร์เซ็นต์

วัน	แป้งสุก		แป้งดิบ	
	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
เชื้อRE3				
0	0.00	7.00	0.00	7.00
1	1.34	6.86	0.03	6.89
2	5.86	6.80	0.07	6.90
3	6.64	6.70	0.18	6.85
4	6.68	6.32	0.24	6.80
5	3.76	5.48	0.38	6.76
6	2.55	3.95	0.26	6.72
เชื้อ REB2				
0	0.00	7.00	0.00	7.00
1	1.33	6.87	0.03	6.96
2	4.51	6.84	0.25	6.89
3	5.36	6.69	0.31	6.85
4	6.06	6.68	0.36	6.77
5	5.67	5.49	0.44	6.86
6	4.63	4.01	0.38	6.78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.4 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

วัน	แป้งสุก		แป้งดิบ	
	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
เชื้อRE3				
0	0.00	7.00	0.00	7.00
1	1.44	5.58	0.10	6.21
2	3.08	4.22	0.13	6.19
3	7.87	3.95	0.21	3.88
4	12.91	3.83	0.22	3.26
5	6.20	3.49	0.49	2.22
6	1.89	2.84	0.17	1.96
เชื้อ REB2				
0	0.00	7.00	0.00	7.00
1	1.69	5.86	0.09	6.71
2	2.73	4.34	0.13	6.28
3	6.77	4.09	0.19	4.85
4	10.50	3.91	0.22	4.28
5	5.26	3.74	0.46	3.97
6	1.32	2.89	0.16	3.74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.5 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

วัน	แป้งสุก		แป้งดิบ	
	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
เชื้อRE3				
0	0.00	7.00	0.00	7.00
1	1.19	6.48	0.09	6.86
2	2.56	6.44	0.10	6.75
3	7.12	6.30	0.12	6.62
4	9.18	6.15	0.13	6.61
5	6.24	3.65	0.46	6.11
6	1.97	2.10	0.16	6.09
เชื้อ REB2				
0	0.00	7.00	0.00	7.00
1	0.80	6.74	0.08	6.90
2	2.39	6.68	0.10	6.76
3	6.14	6.55	0.11	6.50
4	8.50	6.08	0.12	6.47
5	4.63	4.66	0.38	6.31
6	1.23	3.03	0.13	6.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.6 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน

วัน	แป้งสุก		แป้งดิบ	
	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
เชื้อRE3				
0	0.00	7.00	0.00	7.00
1	1.16	5.59	0.09	6.16
2	2.86	4.23	0.12	6.08
3	7.01	3.97	0.13	3.67
4	10.81	3.88	0.18	2.59
5	5.54	2.84	0.41	2.02
6	2.10	2.15	0.17	1.80
เชื้อ REB2				
0	0.00	7.00	0.00	7.00
1	1.80	5.44	0.09	6.62
2	2.62	4.99	0.14	5.82
3	7.61	3.90	0.14	4.62
4	11.44	3.83	0.18	3.55
5	5.79	2.88	0.53	3.19
6	1.36	2.45	0.17	2.92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.7 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

วัน	แอมโมเนียมซัลเฟต		
	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช	การผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
เชื้อRE3			
0	0.00	4.00	0.00
1	1.99	3.60	0.03
2	3.64	3.23	0.06
3	7.87	2.98	0.16
4	2.86	2.88	0.94
5	2.35	2.89	3.99
6	1.18	2.45	4.50

ตารางที่ ง.8 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

วัน	ยูเรีย		
	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช	การผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
เชื้อRE3			
0	0.00	4.00	0.00
1	1.89	3.85	0.05
2	3.23	3.64	0.07
3	6.76	3.25	0.12
4	3.76	3.15	0.29
5	2.71	2.98	2.41
6	1.07	2.76	4.06

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.9 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน

วัน	แอมโมเนียมคลอไรด์		
	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	พีเอช	การผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
เชื้อRE3			
0	0.00	4.00	0.00
1	1.97	3.65	0.05
2	3.88	3.15	0.06
3	6.48	2.87	0.15
4	3.59	2.84	0.38
5	2.12	2.85	0.98
6	0.93	2.72	1.39

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Ducan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.01$)

ตารางที่ ง.10 การเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้น 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

เชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3	แป้งมันสำปะหลังสุก		
	2 เปอร์เซ็นต์	5 เปอร์เซ็นต์	10 เปอร์เซ็นต์
กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	2.46^{a}	4.15^{b}	6.68^{c}

เชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3	แป้งมันสำปะหลังดิบ		
	2 เปอร์เซ็นต์	5 เปอร์เซ็นต์	10 เปอร์เซ็นต์
กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	0.26^{a}	0.29^{a}	0.38^{b}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.10 (ต่อ)

เชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2	แป้งมันสำปะหลังสุก		
	2 เปอร์เซ็นต์	5 เปอร์เซ็นต์	10 เปอร์เซ็นต์
กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	2.36[a]	3.68[b]	6.48[c]

เชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3	แป้งมันสำปะหลังดิบ		
	2 เปอร์เซ็นต์	5 เปอร์เซ็นต์	10 เปอร์เซ็นต์
กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	0.35[a]	0.40[b]	0.44[c]

ตารางที่ ง.11 การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจน

เชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3	แป้งมันสำปะหลังสุก		
	แอมโมเนียมซัลเฟต	ยูเรีย	แอมโมเนียมคลอไรด์
กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	12.91[a]	9.18[b]	10.81[c]

เชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3	แป้งมันสำปะหลังดิบ		
	แอมโมเนียมซัลเฟต	ยูเรีย	แอมโมเนียมคลอไรด์
กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	0.49[a]	0.46[b]	0.41[c]

เชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2	แป้งมันสำปะหลังสุก		
	แอมโมเนียมซัลเฟต	ยูเรีย	แอมโมเนียมคลอไรด์
กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	10.50[b]	8.50[c]	11.44[a]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.11 (ต่อ)

เชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2	แป้งมันสำปะหลังดิบ		
	แอมโมเนียมซัลเฟต	ยูเรีย	แอมโมเนียมคลอไรด์
กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	0.46[a]	0.38[b]	0.51[c]

ตารางที่ ง.12 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลวGlucose peptone

เชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3	แป้งมันสำปะหลังสุก		
	แอมโมเนียมซัลเฟต	ยูเรีย	แอมโมเนียมคลอไรด์
กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	7.87[a]	6.76[b]	6.48[c]

ตารางที่ ง.13 การเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวGlucose peptone

เชื้อรา *Aspergillus* sp. RE3	แป้งมันสำปะหลังสุก		
	แอมโมเนียมซัลเฟต	ยูเรีย	แอมโมเนียมคลอไรด์
การผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	4.50[a]	4.06[b]	1.39[c]

กำหนดให้ อักษรเหมือนกัน คือ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
อักษรต่างกัน คือ ค่ากิจกรรมเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นายคึกฤทธิ์ ศิลาลาย เกิดเมื่อวันที่ 30 กันยายน 2517 ที่จังหวัดสุรินทร์ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสิรินธร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร ในปีการศึกษา 2539 และสำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ในปีการศึกษา 2546 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้