

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การชักนำและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เพื่อเพิ่ม
การผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส



นางสาววิรัชญา ชวเจริญพันธ์
นางสาวเสาวภา อาสน์ศิลารัตน์
นางสาวอารยา วงศ์พิณีจิวโรคม

โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

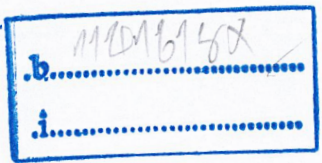
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2546

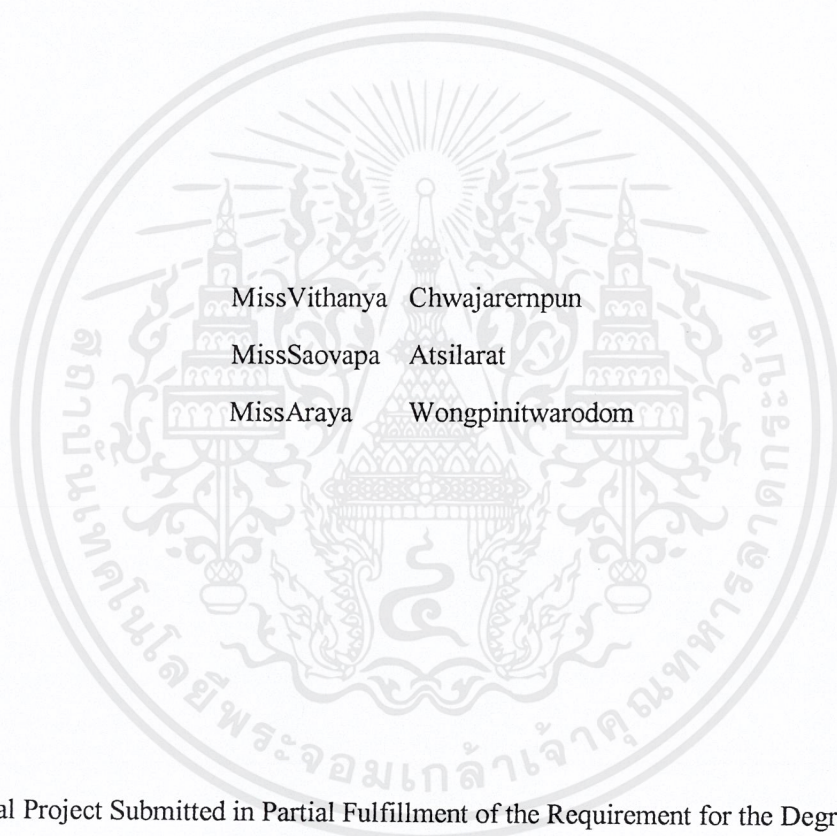
สพ.
๑ 611 ก
๒๕๔๖

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 58884
วันเดือนปี..... 10 ก.พ. 2549



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Induction and Selection Mutant of *Aspergillus fumigatus* for Enhancing
Xylanase Production



MissVithanya Chwajareernpun
MissSaovapa Atsilarat
MissAraya Wongpinitwarodom

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of
Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ เรื่อง การชักนำและคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เพื่อเพิ่มผลผลิตการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

นักศึกษา นางสาววิรัชญา ชวเจริญพันธ์ รหัสนักศึกษา 43050193
นางสาวเสาวภา อาสน์ศิริรัตน์ รหัสนักศึกษา 43050206
นางสาวอารยา วงศ์พินิจวโรดม รหัสนักศึกษา 43050213




ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบุรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม —

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชาติ	
กรรมการ รศ. สุขใจ ชูจันทร์	
กรรมการ ผศ. อารี ฤทธิบุรณ์	



(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ เรื่อง การชักนำและคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus*
เพื่อเพิ่มผลผลิตการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

นักศึกษา นางสาววิรัชญา ชวเจริญพันธ์ รหัสนักศึกษา 43050193
นางสาวเสาวภา อาศน์ศิลารัตน์ รหัสนักศึกษา 43050206
นางสาวอารยา วงศ์พินิจวโรดม รหัสนักศึกษา 43050213

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2546

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม —

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเกี่ยวกับการชักนำและคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยนำสารละลายสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ร่วมกับการใช้สารเคมี *N-Nitro-N-methylurea* (NMU) ที่ความเข้มข้น 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้เวลา 1 และ 2 ชั่วโมง นำมาเลี้ยงลงใน Complete medium นับจำนวนโคโลนี เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ จากนั้นหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากขนาดวงใสรอบโคโลนี ผลที่ได้คือสายพันธุ์กลายจำนวน 16 สายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์กลายทั้งหมดนี้มีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมทุกตัวและสายพันธุ์กลายที่ 10 มีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุดเท่ากับ 1.87 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเชื้อกลายพันธุ์ 15 สายพันธุ์และสายพันธุ์ดั้งเดิม

Special Project Title Induction and Selection Mutants of *Aspergillus fumigatus* for Enhancing Xylanase Production

Name Miss Vithanya Chwagarernpun 43050193
Miss Saovapa Atsilarat 43050206
Miss Araya Wongpinitwarodom 43050213

Department Applied Biology

Academic Year 2003

Special Project Advisor Assist. Prof. Aree Rittiboon

Special Project co-advisor —

ABSTRACT

In selection of mutants of *Aspergillus fumigatus* for producing xylanase by ultraviolet (UV) irradiation, spores in the amount of 10^6 /ml were exposed for 8 and 10 minute to UV light. UV mutant were treated for 1 and 2 hr. with *N*-nitro-*N*-methylurea (NMU) at the concentrations of 1000 and 2000 μ g/ml. Spores were washed with distilled water by suction pump. Mutant spores were plated on complete medium and incubated in 37^oc for 2 days followed by growth rate determination. Mutant colonies were transferred to medium (consisting xylan) for enzyme activities analysis, each plate was stained with congo red and the ratios of halodiameter per colony dimeter (HD/CD) were determined. The 10th mutants was the best strain which gave the highest value of the ratio (1.87).

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพซึ่ง
ทำสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษา
ระหว่างการค้นคว้าวิจัยและให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง รวมถึงการตรวจทานแก้ไข
โครงการพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.พรณี จิตาภิจิต และ ผศ.สุขใจ ชูจันทร์ ที่เป็นคณะกรรมการใน
โครงการพิเศษและช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมี
ต่างๆสำหรับการใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่ด้วยความเคารพอย่างยิ่ง ขอขอบคุณเพื่อนๆและทุกท่านที่มีได้
กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วยที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาตลอด รวมถึงมีส่วนช่วย
ให้โครงการพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นางสาว วิรัชญา ชาวเจริญพันธ์
นางสาว เสาวภา อาศน์ศิลารัตน์
นางสาว อารยา วงศ์พินิจวโรดม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	1
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	31
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	33
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก	

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงความสามารถในการหมักของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยเกิดผ่าน xylanolytic enzyme system	10
ตารางที่ 2	สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างไซลานเนส	13
ตารางที่ 3	แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของจุลินทรีย์	14
ตารางที่ 4	ผลของการกลายพันธุ์ด้วยวิธีต่างๆต่อยีน	26
ตารางที่ 5	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อราสายพันธุ์กลาย <i>Aspergillus fumigatus</i> หลังจากผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 8 นาที และ 10 นาที ร่วมกับการใช้สารเคมี <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -methylurea ที่ความเข้มข้น 1000 และ 2000 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร	33
ตารางที่ 6	ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงไซรอปโคโลนีและค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงไซรอปโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่ทำการกลายพันธุ์และเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีไซลานเป็นแหล่งคาร์บอน	35

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	โครงสร้างไซแลน	4
รูปที่ 2	โครงสร้างไซแลนในไม้เนื้อแข็ง	4
รูปที่ 3	โครงสร้างไซแลนในไม้เนื้ออ่อน	5
รูปที่ 4	Endo- β -1,4 Xylanase	6
รูปที่ 5	แสดง โครงสร้างของไซแลนที่ได้จากพืชและแสดงบริเวณ ที่เข้าจับของเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมใน xylanolytic enzyme system โดยจุลินทรีย์	7
รูปที่ 6	แสดงลักษณะการย่อยสลายไซแลนโดย <i>Crypyococcus albidus</i>	10
รูปที่ 7	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส	16
รูปที่ 8	เชื้อ <i>Aspergillus fumigatus</i> บน Czapekdox agar	18
รูปที่ 9	รูปส่วนบนของคอนิเดียม	18
รูปที่ 10	แสดงการเกิดไทมินไคเมอร์	23
รูปที่ 11	การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยวิธีโฟโตรีแอกทีเวชัน	27
รูปที่ 12	การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ถูกทำลายโดยแสงอัลตรา- ไวโอเลต	29

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมากมาย เช่น กากเมล็ดฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว เปลือกเมล็ดธัญพืช (Biely, 1985) ซึ่งถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีมากในธรรมชาติ โดยประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน ในปัจจุบันอุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษจะใช้สารเคมีคือ คลอรีนและด่างเข้มข้น ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก จากปัญหาข้างต้น อุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษจึงเปลี่ยนมาใช้วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและใช้พลังงานน้อยกว่า มาเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง โดยเอนไซม์ไซลาลเนสเป็นเอนไซม์ที่ให้ผลดีในการฟอกสี ซึ่งการใช้เอนไซม์จะไปมีผลทำให้ขั้นตอนของการใช้สารเคมีสกัดแยกลิกนินออกมานั้นสามารถเกิดได้ง่ายขึ้น เป็นการลดการใช้สารเคมีให้น้อยลง ช่วยลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้ด้วย (Pratima, 1999)

จากการศึกษาวิจัยพบว่า เชื้อ *Aspergillus fumigatus* สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้ดี ดังนั้นโครงการนี้เป็นการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* โดยวิธีการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตร่วมกับการใช้สารเคมี *N-Nitroso-N-Methylurea* (NMU)
2. ทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส โดยคัดเลือกจากขนาดของวงใสรอบโคโลนีในอาหารแข็งที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. ทำการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตร่วมกับการใช้สารเคมี *N-Nitroso-N-Methylurea* (NMU) โดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* และใช้เวลาทำการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ 8 กับ 10 นาทีและใช้สารเคมี NMU ที่ความเข้มข้น 1000 และ 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ทำการคัดเลือกสายพันธุ์กล้วยโดยการเลี้ยงเชื้อในสภาพอาหารแข็งดูจากอัตราส่วนของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี (Bakalova et al., 1998)

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผ่านการชักนำกล้วยพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส
2. เพื่อเป็นแนวทางในการทำวิจัยขั้นสูงต่อไป



บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

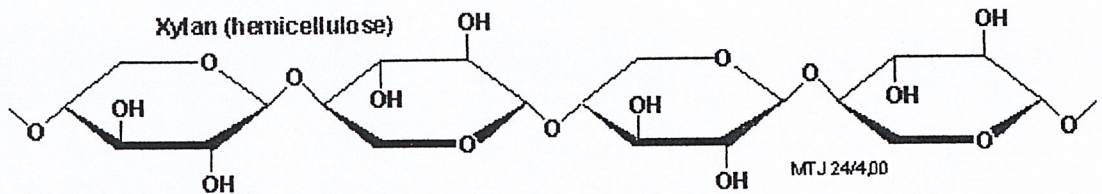
เอนไซม์ไซลาเนส เป็นเอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวกระตุ้น (catalyze) ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของไซแลน (เป็นพอลิเมอร์ของไซโลส (Hampert et al., 1992) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเฮมิเซลลูโลส (Esteban et al., 1982)) ที่พบได้ในเนื้อไม้ ทั้งในไม้เนื้อแข็ง และไม้เนื้ออ่อน (Woodward, 1984)(Puls and Sohnseil, 1993) และในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชังข้าวโพด (corn cob) ฟางข้าว (rice straw) แกลบ (rice hull) เปลือกถั่วลิสง (peanut hull) ซานอ้อย (sugarcane bagasse) (Ancharida, 1999) เป็นต้น เอนไซม์ตัวนี้นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร (Coughlan and Hazlewood, 1993) โดยเฉพาะโรงงานผลิตกระดาษในขั้นตอนการฟอกสี แทนที่การใช้สารเคมีคลอรีน-เบส โดยค่าพีเอชขณะทำการฟอกสีมีค่าเป็นเบสซึ่งตรงกับคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส (ที่ไม่มีเอนไซม์เซลลูเลสผสม) ที่มีความคงตัวที่ค่าพีเอชเป็นเบส (Srinivasan et al., 1999)

เราสามารถผลิตเอนไซม์ได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยซิส แต่ตัวที่นิยมที่สุดจะเป็นพวกราเส้นสาย (filamentous fungi) ที่ทนต่อค่าความเป็นเบส และอุณหภูมิสูงๆ ซึ่งมีไม่กี่สายพันธุ์ที่ผลิตได้ เช่น สายพันธุ์ *Aspergillus fumigatus* (Anthony et al., 2003) หรือสายพันธุ์ *Thermomyces lanuginosus* (Singh, 2002) โดยในปัจจุบันได้ทำการกลายสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ออกมาในปริมาณที่สูงขึ้นโดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ร่วมกับสารเคมี N-methyl-N'-Nitrosoguanidine ยกตัวอย่างเช่น สายพันธุ์ *Penicillium purpurogenum* (Steiner et al., 1998) หรือ *Cellulose flavigena* PN-120 (Odilia & Teresa, 2002)

ไซแลน คือ สารในกลุ่มของเพนโทซาน (pentosan) มีลักษณะเหนียวหนืด พบได้ในเนื้อไม้ เมื่อนำไปทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะได้ไซโลส ออกมาเป็นผลผลิต

ผังรูปที่ 1 โครงสร้างของไซแลนประกอบด้วย 1,4-linked β -D-xylopyranosyl residues (Whistler and Richards, 1970) ที่มาของไซแลนคล้ายกับ heteropolysaccharides ที่มีหมู่แทนที่ทั้งในโซ่หลักและโซ่ข้าง (Biely, 1985)(Puls and Poutanen, 1989) หมู่แทนที่ในโซ่หลักของไซแลน คือ arabinosyl และ glucuronosyl residues (Whistles and Richards, 1970) Homoxylans บนแขนอื่นๆ ประกอบด้วยหมู่เฉพาะของ xylosyl residues ชนิดของไซแลนพบไม่มากนักในธรรมชาติ (Chando et al., 1950), tobacco stalks (Eda et al., 1976) และ guar seed husk (Montgomery et al., 1956)

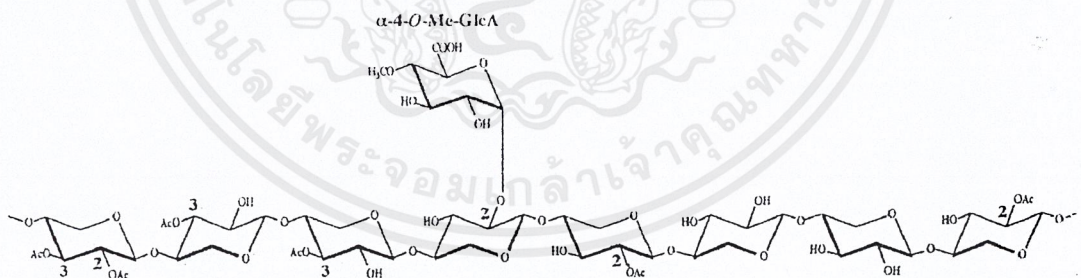
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 โครงสร้างไซแลน

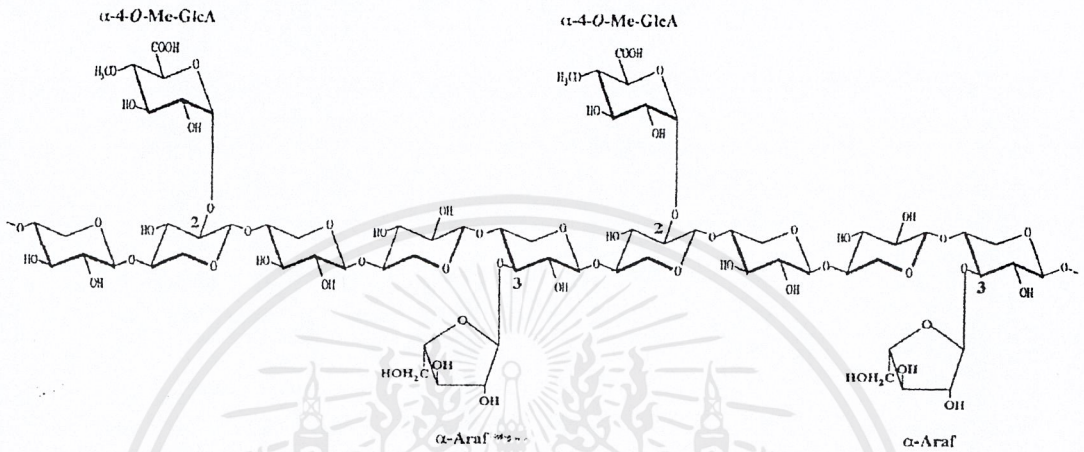
ที่มา <http://www.biosite.dk/staabi/xylan.htm>

โครงสร้างของไซแลนนั้นมีความซับซ้อนทำให้มีเอนไซม์เพียงบางชนิดที่สามารถทำลายพันธะของไซแลน ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนไซแลนให้เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น อีทิลแอลกอฮอล์ (fuel ethanol) และสารเคมีต่างๆ และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในขั้นตอนฟอกสีกระดาษในโรงงานด้วยวิธีทางชีวภาพ ช่วยทำให้น้ำผลไม้หรือน้ำผักใสขึ้น ชักน้ำให้เกิดการย่อยในอาหารสัตว์และทำเป็นสารที่ช่วยเพิ่มเส้นใย (fiber) ในเบเกอรี่ (<http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000009/20/0000092095.html>) ไซแลนในไม้เนื้อแข็งเป็น *O*-acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylan (รูปที่ 2) พอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วย β -xylopyranose residues 70 ตัว (average degree of polymerization [DP] ระหว่าง 150 และ 200) เชื่อมโดย β -1,4-glycosidic bonds (Timell, 1964) ทุกๆ 10 ตัวของ xylose residue จะมี 4-*O*-methylglucuronic acid จับกับ 2 ตำแหน่งของไซโลส (Woodward, 1984)



รูปที่ 2 โครงสร้างไซแลนในไม้เนื้อแข็ง ประกอบด้วย *O*-acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylan ตัวเลขแสดงตำแหน่งของคาร์บอนอะตอมซึ่งถูกแทนที่ (Ac: Acetyl group; α -4-Me-GlcA: α -4-*O*-methylglucuronic acid)

ไซเลนในไม้เนื้ออ่อนจะมี arabino-4-O-methylglucuronoxylans เป็นองค์ประกอบซึ่งมีในปริมาณมากกว่าในไม้เนื้อแข็ง โครงสร้างมีลักษณะเป็น α -arabinofuranose ต่อกันด้วยพันธะ α -1,3-glycosidic ต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ xylose (รูปที่ 3) (Puls and Sohnseil, 1993) ความยาวของสายจะสั้นกว่าที่พบในไม้เนื้อแข็ง



รูปที่ 3 โครงสร้างไซเลนในไม้เนื้ออ่อน ประกอบด้วย arabino-4-O-methylglucuronoxylan ตัวเลขแสดงตำแหน่งของคาร์บอนอะตอมซึ่งถูกแทนที่ (α -Araf: α -Arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcA: α -4-O-methylglucuronic acid)

การย่อยสลายไซเลน

การย่อยสลายไซเลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถย่อยสลายโดยใช้สารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน

1. การย่อยสลายไซเลนด้วยสารเคมี สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1.1 การย่อยสลายไซเลนด้วยกรด

การย่อยสลายไซเลนด้วยกรดเพื่อผลิตน้ำตาลไซโลสเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษ เช่น ฟอสฟอรัส ซึ่งมีผลต่อการนำไปเลี้ยงจุลินทรีย์ และยังคงใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดและอุณหภูมิสูงได้

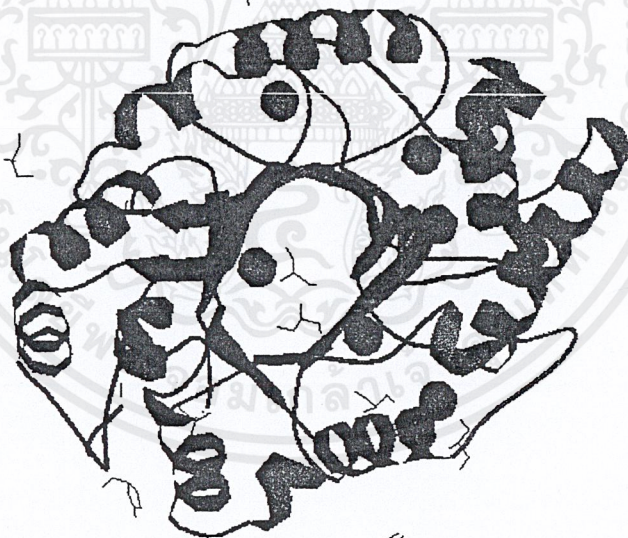
1.2 การย่อยสลายไซเลนด้วยด่าง

การย่อยสลายไซเลนด้วยด่าง มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ ในขั้นตอน kraft cooking ซึ่งจะนำชิ้นของเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นเพื่อให้เปลือกไม้

อยู่และกำจัดกลินินที่อยู่บนชั้นของลิกโนเซลลูโลสออกบางส่วน หลังจากนั้นจะนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยการใช้สารเคมีที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide) ก๊าซคลอรีน (Cl_2) เป็นต้น ที่อุณหภูมิสูงไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส และความดันเป็นกรด่างไม่ต่ำกว่า 10 แต่ทำให้เกิดสารพิษพวกไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอรีนที่เป็นพิษชนิดอื่นๆด้วย

2. การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะกว่าการใช้สารเคมีในการย่อยสลาย เนื่องจากภาวะที่ใช้ขณะทำงานเป็นกลาง นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษและสารเคมีตกค้าง ทำให้สามารถนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปใช้ผลิตสารอื่นๆต่อไป เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการ คือใช้ในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ ลดความหนืดของอาหารสัตว์และอุตสาหกรรมอาหาร (Wong and Saddler, 1988) ซึ่งเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเบตา-1,4 ของเส้นสายหลักให้ได้น้ำตาลไซโลสคือเอนโดไซแลนเนส (endo-xylanase) ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 Endo- β -1,4 Xylanase

ที่มา <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1bg4.html>

ที่มา : Biely (1985)

ประโยชน์ของไซเลนและเฮมิเซลลูโลส

1. ใช้ในกระบวนการหมักสำหรับผลิตเชื้อเพลิง เช่น เอทานอล (Biely,1985)
2. ใช้ในการผลิตสารเคมี เช่น สารทำลายกรดอินทรีย์ (Biely,1985)
3. อาหารสำหรับคนและสัตว์ ได้แก่ อาหารเสริมโปรตีนและอาหารเสริมเส้นใย (Biely,1985)

ประโยชน์ของไซลานเนส

1. ใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกกระดาษ (Wong and Saddler, 1992)(Singh et al., 1995) ในขั้นตอนการฟอกและย่อยเยื่อไม้
2. การปรับปรุงเส้นใย เพื่อให้เส้นใยมีคุณภาพดีขึ้น (Singh, 1998)
3. การสกัดกาแฟ โดยใช้ในขั้นตอนการย่อยเปลือกกาแฟ (Wong and Saddler, 1992)(Singh, 1998)
4. ใช้ในการผลิตน้ำมันพืชและการทำแป้ง (Wong and Saddler, 1992)(Singh, 1998)
5. ใช้ในการปรับปรุงที่ดินสำหรับการเกษตรและการปลูกข้าว โดยเอนไซม์ไซลานเนสจะไปช่วยเพิ่มแร่ธาตุ ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์เหมาะแก่การเพาะปลูก (Wong and Saddler, 1992) (Singh, 1998)
6. การกำจัดส่วนที่เหลือจากการเกษตรโดยใช้กระบวนการหมักแบบแข็ง (Biely, 1985) (Smith and Wood, 1991)(Myburgh et al., 1991)(Ancharida, 1999)
7. การทำให้น้ำผักและผลไม้ใส โดยเอนไซม์ไซลานเนสจะไปทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์ของผักและผลไม้ ทำให้น้ำผักแยกตัวออกมา เรียกว่าการนี้ว่า clarification (Biely, 1985)(Wong and Saddler, 1992)
8. การผลิตอาหารที่เพิ่มไฟเบอร์ หรือคล้ายเนื้อสัตว์ ใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพและอาหารเพิ่มโปรตีนและอาหารสัตว์ (Kuhad et al., 1997)(Adham, 2001)
9. การผลิตเชื้อเพลิงทางเคมี ไชลิตอล เอทานอล ตัวทำลาย และกรดอินทรีย์ (Biely, 1985) (Singh, 1995)
10. ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Dubau, 1987)(Singh, 1995)(Kuhad, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต่อ8อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไซลานเนส

การย่อยสลายไซแลนซึ่งมีกิ่งก้านสาขาของเอนไซม์ไซลานเนสอาศัยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่

1. Endoxylanase (1,4- β -D-xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) เอนไซม์จะย่อยสลายไซแลนและโอลิโกแซคคาไรด์สายยาวๆซึ่งเป็นการย่อยแบบสุ่มที่ตำแหน่งต่างๆของเส้นสาย จำแนกได้ 4 รูปแบบ ตามผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ

1.1 Non-arabinose liberating endoxylanase เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่จะย่อยสลายไซแลนได้มี 2 แบบคือ

ก. เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถย่อย L-arabinosyl initiated branch ที่ตำแหน่ง β -(1,4) linkages ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือ ไซโลไบโอสและไซโลส สามารถย่อยไซโลไตรโอสได้ แต่อัตราการย่อยจะต่ำกว่าไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายยาว

ข. เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถตัดสายโซ่ที่ตำแหน่ง แอลฟา (1,2) และแอลฟา (1,3) ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์มากกว่าไซโลไบโอส ไม่สามารถย่อยไซโลเตตระโอสรวมทั้งไซโลไบโอส

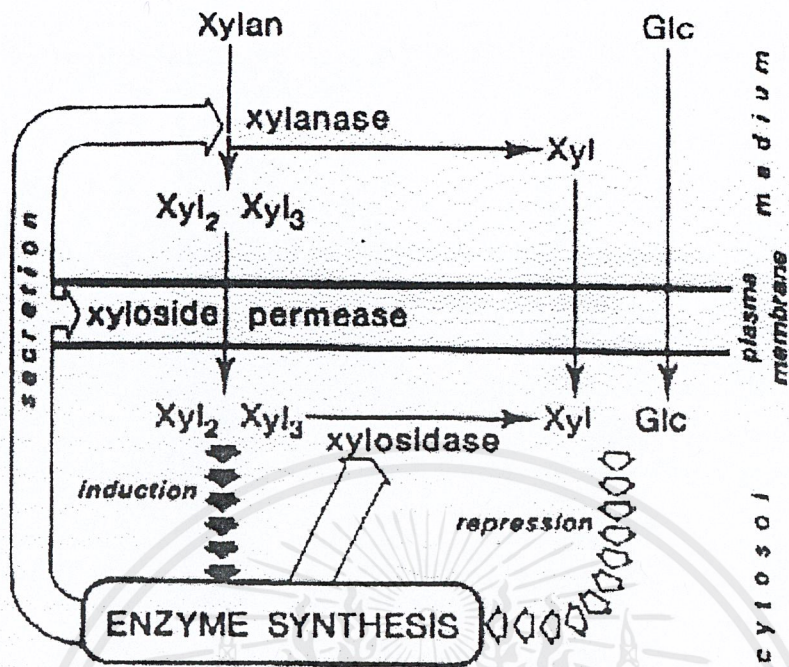
1.2 Arabinose liberating endoxylanases มี 2 แบบคือ

ก. เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยสายโซ่ของไซแลน ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ ไซโลไบโอสและอะราบินอส

ข. ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ อะราบินอสและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดกลาง การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Endoxylanase สามารถตรวจสอบโดยใช้ไซแลนเป็นสับสเตรต

2. Exo-xylanase (1,4- β -D-xylanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยไซแลนและโอลิโกแซคคาไรด์ทางด้าน non-reducing end ได้ผลิตภัณฑ์คือไซโลส โดยอัตราการเกิดไซโลสจากการย่อยไซแลนสูงกว่าจากการย่อยโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น

3. 1,3- β -xylosidase หรือ Xylobiase ทำหน้าที่ย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น เช่น ไซโลไบโอสได้ไซโลส วิเคราะห์เอนไซม์นี้โดยใช้ p-nitrophenyl- β -D-xyloside เป็นสับสเตรต (สมรักษ์, 2537)



รูปที่ 6 แสดงลักษณะการย่อยสลายไซแลนโดย *Cryptococcus albidus*
 ที่มา : Biely (1985)

ตารางที่ 1 แสดงความสามารถในการหมักของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยเกิดผ่าน xylanolytic enzyme system

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

^aDirect fermentation of xylan to ethanol has not been demonstrated with these species yet.

^bH. Lee, P. Biely and H. Schneider, unpublished.

ที่มา : Biely (1985)

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยจุลินทรีย์

โดยทั่วไปกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจากจุลินทรีย์ที่เหมาะสมอยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 50° ซ แต่สำหรับพีเอชที่เหมาะสมพบว่าเอนไซม์ไซลานเนสจากแบคทีเรียและแอสคิโนมัยซิสมีพีเอชที่เหมาะสมค่อนข้างเป็นกลาง แต่เชื้อราค่อนข้างจะเป็นกรด ส่วนค่าความคงตัวของเอนไซม์จะต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 2

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

Christov และคณะ (1999) ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 และ *Gliocladium viride* CBS 658.70 พบว่าเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 60°ซ และ *Gliocladium viride* CBS 658.70 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 50°ซ

จากการทดลองของ Milagres และคณะ (1993) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium janthinellum* คือ 40°ซ และมีความเสถียรของอุณหภูมิที่ 20-40°ซ

Tan และคณะ (1987) รายงานว่าเชื้อ *Trichoderma harzianum* E58 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสคือ 50°ซ

ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

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

Connerton และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ D3 พบว่าที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมที่พีเอชเท่ากับ 6.5 และมีกิจกรรมของไซลานเนสในช่วงพีเอชกว้าง

Milagres และคณะ (1993) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Penicillium janthinellum* มีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 5.5 และมีค่าความเสถียรของพีเอชเท่ากับ 6.0

รายงานของ Tan และคณะ (1987) *Trichoderma harzianum* E58 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสคือ 4.8

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

Christov และคณะ (1999) ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ รำข้าวสาลี แคนผักข้าวโพด oat spelt xylan และของเหลวจากโรงงานฟอกสี พบว่า oat spelt xylan และแกนข้าวโพด เมื่อ

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 และ *Gliocladium viride* CBS 658.70 มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้ผลิตไซทานเนสได้สูง ในขณะที่ของเหลวจากโรงงานฟอกสีก็เป็นตัวเหนี่ยวนำในการผลิตไซทานเนสที่ปราศจากเซลล์โลสได้ดี ซึ่งของเหลวจากโรงงานฟอกสีก็เป็นแหล่งที่มีคาร์บอนมากมายและราคาถูก ดังนั้นจึงเป็นจุดที่น่าสนใจในขณะนี้ในการเป็นสารตั้งต้นให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไซทานเนส

Connerton และคณะ (1999) ได้ศึกษาการผลิตไซทานเนสจากเชื้อ *Bacillus D3* โดยใช้ birch wood xylan ที่ละลายได้เป็นสารตั้งต้น พบว่าไซทานเนสที่ผลิตได้จากเชื้อนี้มีกิจกรรมเท่ากับ 960 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Milagres และคณะ (1993) ศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซทานเนส พบว่าการใช้ไซแลนเป็นสารตั้งต้นมีผลเหนี่ยวนำให้มีกิจกรรมของไซทานโนไลติกสูงและมีกิจกรรมของเซลล์โลไลติกต่ำ

ไซแลนเป็นสารประกอบของโครงสร้างหลักของผนังเซลล์พืช ซึ่งเป็นส่วนประกอบในเฮมิเซลล์โลส (hemicellulose) ที่ประกอบด้วยพันธะ 1,4 กับ β -D-xylopyranosyl annual plants ไม้เนื้อแข็ง (hardwood) และ ไม้เนื้ออ่อน (softwood) จะมีไซแลนร้อยละ 20-25 และร้อยละ 7-12 ตามลำดับ

เอนไซม์ไซทานเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำได้และสามารถย่อยไซแลนได้อย่างสมบูรณ์ (Gupta, 1999)

วิเชียรณ กิจปรีชาวนิช และคณะ (2535) ได้ศึกษาพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F คือฟางข้าว โดยศึกษาเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆคือ ชานอ้อย ชังข้าวโพด และรำข้าวสาลี

ฟางข้าวเป็นอาหารหยาบที่มีคุณค่าทางอาหารต่ำสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องมีการย่อยได้เพียงร้อยละ 45-50 ซึ่งฟางข้าวประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นเนื้อเซลล์ร้อยละ 21 และผนังเซลล์ร้อยละ 79 ซึ่งส่วนผนังเซลล์นี้แบ่งเป็นส่วนที่เป็นเซลล์โลสร้อยละ 33 เฮมิเซลล์โลสร้อยละ 26 ลิกนินร้อยละ 7 และซิติการ้อยละ 13 (Jackson, 1977) และการย่อยฟางข้าวในห้องทดลอง (In vitro) จะย่อยไซแลนได้ประมาณร้อยละ 25 ในขณะที่การย่อยแบบ In vivo จะย่อยไซแลนได้ประมาณร้อยละ 24-30

Chahal (1985) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei* QMY 1 ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันคือร้อยละ 1 เท่ากับ 1.65 หน่วยต่อมิลลิลิตร ได้ผลผลิตของเซลล์เลสเท่ากับ 412 หน่วยต่อกรัมเซลล์โลส ในขณะที่ความเข้มข้นของฟางข้าวสาลีร้อยละ 5 จะมีเวลาในการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 7 วันเป็น 11 วัน และกิจกรรมของเซลล์เลสเพิ่มขึ้นเป็น 6 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่ผลผลิตของเซลล์เลสลดลงเป็น 100 หน่วยต่อกรัมเซลล์เลส

ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างไซลาเนส

สายพันธุ์ของ จุลินทรีย์	ความเป็น กรด ค่าเริ่มต้น ของอาหาร เลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิที่ ใช้ ในการ เพาะเลี้ยง (°ซ)	ระยะเวลา ในการ เพาะเลี้ยง (วัน)	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus sp.</i> AANG19	4	35	4-7	Smith and Wood, 1991b
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	40	5	Kitprechavanich et al., 1986
<i>Aspergillus niger</i>	5.5	30	3	John et al., 1979
<i>Aspergillus ochraceus</i>	6.5	30	6-14	Biswas et al., 1987
<i>Aspergillus terreus</i>	4.8-4.9	30	7	Ghosh and Kunda, 1980
<i>Bacillus fibrisolvens</i>	8.0-8.5	30	2-3	Ratto et al., 1992
<i>Dictyoglomus sp.</i> B 1	6.8-7.0	37	2	Sewell et al., 1988
<i>Cellulomonas uda</i>	7.0	68	3	Ratto et al., 1994
<i>Penicillium wortmanni</i>	7.0	30	5	Rapp and Wagner, 1986
<i>Rhodobacter marinus</i>	5.4	30	5	Matsuo et al., 1987
<i>Rhodothermus marinus</i>	7.1	65	2	Dahlberg et al., 1993
<i>Streptomyces sp.</i> T 7	7.1	65	1	Dahlberg et al., 1993
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	7.0	50	3	Ross et al., 1992
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	5.0-5.5	45	8	Gomes et al., 1994
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	4.0	50	-	Gomes et al., 1994
<i>Thermomonospora fusca</i>	8.0	50	3	Bechmann and McCarthy, 1989
<i>Thermomonospora fusca</i> BD 25	7.0	50-55	2-4	Trigo and Ball, 1994
<i>Thermomonospora strain LL</i>	7.6	55	2	Ristoph and Humphreyt, 1985
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	-	50	5-6	Gomes et al., 1993

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของจุลินทรีย์

Substrates	Microorganism	Enzyme
Bagasses	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Aspergillus phoenicis</i>	Xylanase
Wheat straw	<i>Phlebia radiata</i>	Xylanase, Laccase, Aryl-alcohol
Wheat bran	<i>Bacillus licheniformis</i>	Xylanase
Wheat bran+ Bagasses	<i>A. niger</i>	Xylanase
Wheat bran, defined media	<i>P. chrysosporium</i>	Xylanase, β -xylooxidase
Wheat straw	<i>P. sojae caja</i>	Xylanase, Cellulase, β -xylooxidase
Rice straw+cotton stalks+ Kenaf	<i>L. edodus</i>	Xylanase, Laccase, β -xylooxidase
Ligno-cellulosics	Bacterial isolates B698 (Giovannozzi-Sermanni, 1996)	Xylanase
Rice straw,soybean hull, kraft pulp,birchwood, oat- spelt,beet pulp,wheat bran	<i>A. sojae</i>	Xylanase, α -arabinofurano- sidase
Wheat/rice straw,rice husk, bagasses	<i>Melanocarpus albomyces</i>	Xylanase, Acetoesterase
Wheat bran,sugar beet pulp	<i>Cheatomium globosum</i> , <i>A. niger</i>	Xylanase
Corncoobs,corn hull,bagasse	<i>A. fumigatus</i>	Xylanase, Xylosidase
Wheat straw	<i>P. sanguineous</i>	Xylanase, CMCCase, Catahol oxidase
Wheat bran	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Xylanase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและ 14 อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Substrates	Microorganism	Enzyme
Wheat bran	<i>Humicola sp.</i>	Xylanase
Apple pomace	<i>A. niger, A. fumigatus, T. viride</i>	Xylanase, CMCCase
Coffee processing plant - waste	<i>Thermomonospora sp.</i>	Xylanase, cellulase, β -xylooxidase, α -arabinofuranosidase
Solka floc, barley straw	<i>Talaromyces emersoaii</i>	Xylanase
Wheat bran	<i>A. awamori</i>	β -xylooxidase
Wheat bran	<i>T. harzianum</i>	β -xylooxidase
Wheat bran	<i>A. terreus</i>	β -xylooxidase
Wheat bran	<i>A. fumigatus</i>	β -xylooxidase, β -glucosidase

ที่มา: <http://www.ias.ac.in/cutrsci/jul10/articles23.htm>

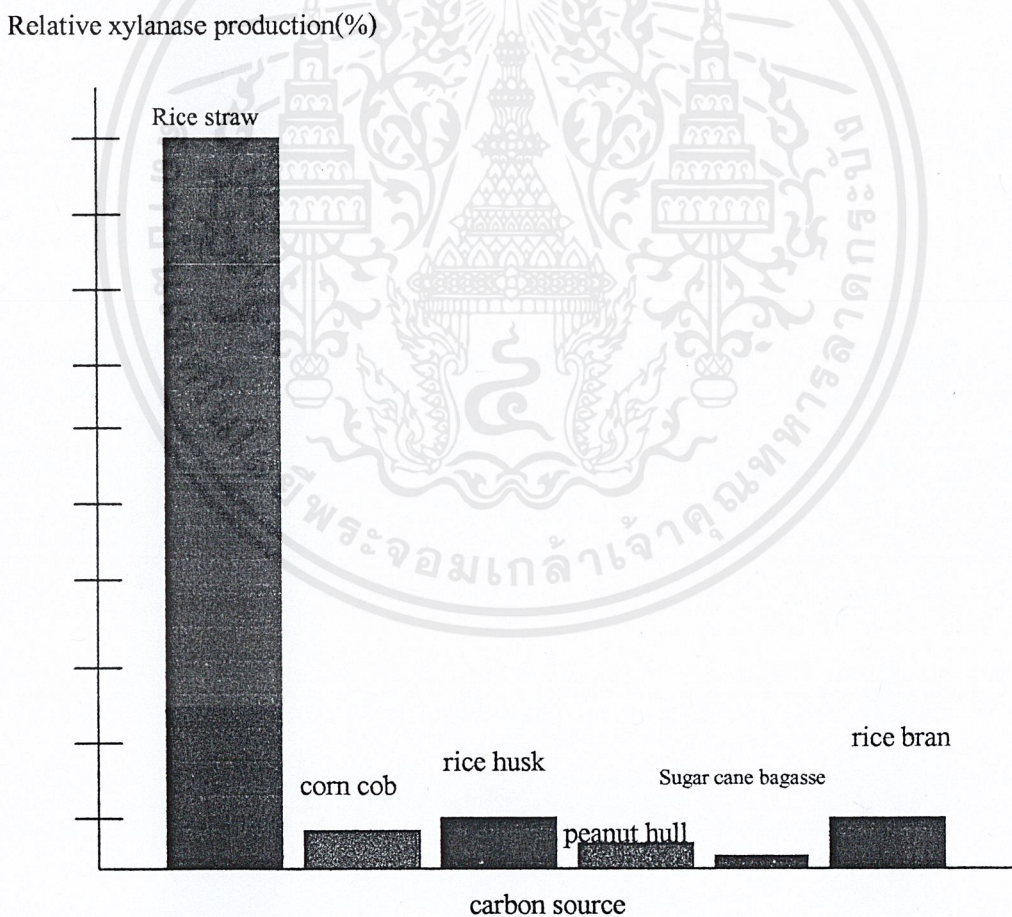
การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส

กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยวิธีการใช้กรดไดไนโตรซาลิซิลิก (dinitrosalicylic acid) วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปล่อยจาก oat spelt xylan และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ตามลำดับ

1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ กำหนดได้จากปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายเตรทให้น้ำตาลไซโลสหรือกลูโคส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาทีของการเกิดปฏิกิริยา (Christov และคณะ, 1999)

Milagres และคณะ (1993) ทำกิจกรรมของไซลานเนสจากการบ่มส่วนฟิวเตรต (filtrate) ที่ผ่านการเจือจางปริมาณ 0.05 มิลลิลิตรด้วยสารแขวนลอยของไซเลน 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 6.0) นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 30°C จากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959) โดยใช้สารละลายไซโลสเป็นมาตรฐานในการอ้างอิง

Ancharida (1999) ทำการทดลองเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ทำให้ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ในปริมาณมากที่สุด โดยใช้ ข้าวเปลือก ชังข้าวโพด รำข้าว เปลือกถั่ว ชานอ้อย ข้าวโอ๊ต กับ *A. fumigatus* สายพันธุ์ 4-45-1F ผลที่ได้ดังรูปที่ 7 คือ เปลือกข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตไซลานเนสมากที่สุด



รูปที่ 7 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสเมื่อทำการเพาะเลี้ยงสารละลายสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 6 ชนิด และแอมโมเนียมไนเตรต 0.2% และยีสต์สกัด 0.02% ปรับพีเอชให้ได้ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 6 วัน

เชื้อ *Aspergillus sp.*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

เป็นเชื้อที่มีถิ่นที่อยู่กว้างขวางทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อน ในอากาศทุกหนทุกแห่งมีโคนินเดียของเชื้อราชนิดนี้ปะปนอยู่ นอกจากนี้ยังพบมากในดิน เจริญได้ในอินทรีย์วัตถุแทบทุกชนิด ซึ่งก่อให้เกิดทั้งผลดีและผลเสียโดยเฉพาะในเขตร้อน เชื้อ *Aspergillus* ทำให้เครื่องหนัง เช่น กระเป๋า รองเท้า ตลอดจนเสื้อผ้าเสียหาย *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* และสปีชีส์อื่นๆทำให้เกิดโรค บางชนิดทำให้หุ้ออกเสปได้

เนื่องจากเชื้อนี้สร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด จึงมีประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมผลิตกรดต่างๆ อุตสาหกรรมทำเบียร์ และการผลิตยาปฏิชีวนะ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อนี้ คือไมซีเลียของเชื้อนี้ประกอบด้วยเส้นใยที่แตกแขนงมากมาย เส้นใยมีผนังกันและไม่มีสี แต่ละเซกเมนต์(segment) มีนิวเคลียสหลายอัน ดังแสดงในรูปที่ 8 และรูปที่ 9

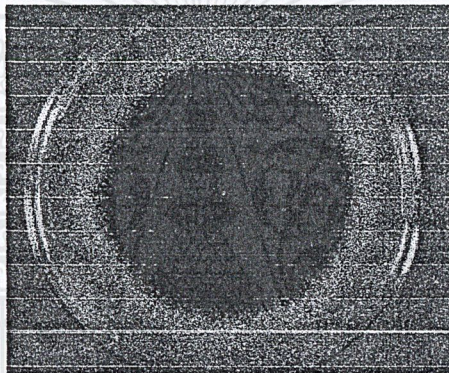
ลักษณะการสืบพันธุ์

มีทั้งการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ คือในราพวก *Aspergillus* จะมีส่วนของเส้นใยที่ทำหน้าที่สร้างโคนิดิโอฟอร์เรียกว่า foot cell โคนิดิโอฟอร์มีลักษณะยาวและตรง ส่วนปลายจะโป่งออกเรียกว่า vesicle รอบๆ vesicle จะมีโครงสร้างที่ยื่นออกมามีลักษณะคล้ายขดเรียกว่า สเตอริกมาตา (sterigmata) โดยจะมีหนึ่งชั้นหรือสองชั้นก็ได้ ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของเชื้อ เชื้อสร้างโคนินเดียในสเตอริกมาตา และดันโคนินเดียอันแรกให้โผล่พ้นสเตอริกมาตาออกมา และถูกดันกันต่อมาเรื่อยๆ แบบ ซักเซสชัน (succession) โดยที่โคนินเดียแต่ละอันยังไม่หลุดขาดจากกัน ทำให้ได้เป็นสายโซ่ของโคนินเดีย ดังนั้นโคนินเดียที่มีอายุน้อยๆจึงอยู่ติดกับส่วนของสเตอริกมาตา โดยโปรโตพลาสซึม (protoplasm) ที่ส่วนปลายสเตอริกมาตาจะมีผนังกันและเปลี่ยนแปลงรูปร่างจนมีลักษณะค่อนข้างกลม

โคนินเดียของ *Aspergillus* มีรูปร่างเป็นทรงกลมจนถึงเกือบกลม (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5-3 ไมโครเมตร) มีสีต่างๆกัน เช่น สีดำ น้ำตาล เหลือง เขียว ผนังไม่เรียบ สีของโคนินเดียขึ้นอยู่กับธาตุอาหารบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น *A. niger* จะสร้างโคนินเดียสีดำ ถ้าอาหารนั้นมีธาตุทองแดงอยู่ไม่น้อยกว่า 2.5×10^{-6} กรัม ถ้ามีทองแดงต่ำกว่านี้สีของโคนินเดียจะอ่อนลง และถ้าไม่มีธาตุทองแดงอยู่ในอาหารเลย สีของโคนินเดียที่เคยเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือดำจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและการสืบพันธุ์แบบมีเพศ ยังศึกษาไม่พบการสืบพันธุ์แบบมีเพศในเชื้อ *Aspergillus* หลายสปีชีส์ และ

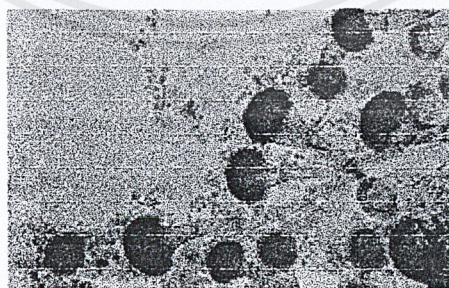
เชื่อกันว่าสปีชีส์เหล่านั้นสูญเสียความสามารถในการสืบพันธุ์แบบมีเพศไปแล้ว แม้แต่ในสปีชีส์ที่สร้างแอสคัส (ascus) ก็ยังพบแนวโน้มว่าการสืบพันธุ์แบบมีเพศกำลังจะเสื่อมไป จากการศึกษพบว่า มีระยะพลาสมोगามมี (plasmogamy) เกิดขึ้นจากการผสมของแกมมาแกมมา (gametangium) 2 เพศ ไปจนถึงบางชนิดที่ไม่สร้างแอนเทอริเดียม (antheridium) และบางชนิดสร้างแอสคัสจากแอสโคโกเนียม (ascogonium) เพียงอย่างเดียว โดยไม่ต้องมีแอนเทอริเดียม

Aspergillus fumigatus มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงๆ ได้ และเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส และสามารถพบได้โดยทั่วไป ในทุกๆ ที่ โดยเฉพาะในดินและในสารอินทรีย์ที่กำลังย่อยสลาย แดกหักผุพัง จุลินทรีย์สายพันธุ์นี้เป็นตัวสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในคน และเป็นสาเหตุหลักในโรคแอสเพอซิลโลซิส (aspergillosis) (Stevens *et al.*, 2000)(Patterson *et al.*, 1982)



รูปที่ 8 เชื้อ *Aspergillus fumigatus* บน Czapekdox agar ลักษณะ โคลโลนีที่พื้นผิวแสดงการสร้างเม็ดสีน้ำเงิน-เขียว มีลักษณะคล้ายหนังไม้เรียบ ขรุขระ เต็มไปด้วยคอนิดิโอเฟอร์ (conidiophore) ที่ตกกระจายอยู่อย่างหนาแน่น

ที่มา: De Hoog G.S. and J Guarro (1995) and Kwon-Chung, K.J. and J.E. Bennett (1992)



รูปที่ 9 รูปส่วนบนของคอนิเดียม (conidial) มีลักษณะ columnar (มีขนาดใหญ่กว่า 400x50 ไมโครเมตร แต่ปกติแล้วจะเล็กกว่านี้) และ uniseriate

ที่มา: De Hoog G.S. and J Guarro (1995) and Kwon-Chung, K.J. and J.E. Bennett (1992)

การชักนำการกลายพันธุ์

1. ประวัติของการศึกษาเกี่ยวกับมิวเตชัน

มีความเชื่อว่าความแปรปรวนทั้งหลายที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตจนถึงกับได้พวกใหม่หรือพันธุ์ใหม่นั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทีละเล็กละน้อยค่อยเป็นค่อยไป จนกระทั่งถึงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 Hugo De Vries นักพฤกษศาสตร์ชาวเนเธอร์แลนด์ ได้พบความจริงซึ่งแตกต่างจากข้อเสนอของ Darwin ทั้งนี้พบว่า การเปลี่ยนแปลงในสิ่งมีชีวิตอาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลันทันที และพืชหรือสัตว์สามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ เรียกการเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้ว่า มิวเตชัน

2. มิวเตชันคืออะไร

มิวเตชัน หมายถึง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับหน่วยควบคุมลักษณะ เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ฉับพลันที่พืชหรือสัตว์สามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงอันนี้จะรวมไปถึงการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม แต่คำว่า มิวเตชัน ในปัจจุบันมักจะหมายความถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปยังอีกสภาพหนึ่ง ดังนั้น อาจเรียกการเปลี่ยนแปลงอันนี้ว่า “gene หรือ point mutation” ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของดีเอ็นเอ คือนิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งเข้าไปแทนที่นิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม อาจเกี่ยวข้องกับลักษณะรูปร่างทั่วไป หรือเกี่ยวกับลักษณะทางสรีระหรือทางชีวเคมี หรือลักษณะทางพฤติกรรมของสปีชีส์ มิวเตชันเป็นสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิต และเป็นกลไกสำคัญอันดับแรกที่ทำให้เกิดความแตกต่างแปรผันในพันธุกรรม (genetic variation) อันเป็นพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับกระบวนการ

3. ชนิดของมิวเตชัน

ชนิดของมิวเตชันที่ศึกษากัน มักเป็นพวกที่แสดงออกมาให้เห็นในรูปของลักษณะอย่างชัดเจน ตัวอย่างของมิวเตชัน ได้แก่ ลักษณะคาตัสขาว ปีกสั้น ปีกกุด ฯลฯ ของแมลงหวี่ ดังนั้นเราจึงเรียกมิวเตชันดังกล่าวว่า เป็นพวก “สังเกตเห็นได้ (visible)” ซึ่งมีอยู่ราว 1 เปอร์เซ็นต์ของมิวเตชันทั้งหมด และไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่สิ่งมีชีวิตมากนัก แต่มิวเตชันส่วนใหญ่ คือ ราว 80 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ พวก “แสดงผลในทางเสื่อม (detrimental)” ซึ่งไม่อาจตรวจผลได้แน่ชัด แต่เข้าใจว่ากระทบกระเทือนต่อการเจริญเติบโตของพืชหรือสัตว์ได้อย่างมาก ในมิวเตชันชนิดนี้ยีนที่เปลี่ยนไปแต่ละยีนก่อผลเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อรวมผลของทุกยีนก็จะรุนแรงขึ้น มิวเตชันอีกพวกหนึ่ง คือ พวก “ก่อ

ผลถึงตาย (lethal)" ซึ่งมีอยู่ประมาณ 19 เปอร์เซนต์ ถ้าอยู่ในสภาพ homozygous มิวเตชันชนิดนี้จะกระทบกระเทือนต่อขบวนการทางสรีระจนพืชหรือสัตว์ไม่อาจมีชีวิตอยู่ได้

ในสิ่งมีชีวิตพวก haploid เช่น เชื้อราที่เป็น recessive lethal จะก่อผลถึงตาย ในสิ่งมีชีวิตพวกนี้มียีนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอีกประเภทหนึ่งซึ่งไม่ก่อผลถึงตาย เราเรียกยีนนี้ว่า conditional lethal ตัวอย่างเช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิดของเชื้อรา *Neurospora* อาจเปลี่ยนไปจากเดิม เราเรียกยีนที่เปลี่ยนไปนี้ว่า conditional lethal ทั้งนี้เชื้อราที่มียีนนี้ จะไม่เจริญหรือขยายพันธุ์ใน minimal medium แต่กลับเจริญตามปกติเมื่อเสริมกรดอะมิโนบางชนิดลงไป ใน selective medium

3.1 มิวเตชันที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

มิวเตชันชนิดนี้เป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาทอโทเมอร์ริซิฟท์ (tautomeric shift) หรือการก่อให้เกิดไอออน (ionization) ในโมเลกุลของเบสดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสในสายพอลินิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (ประคิษฐ์, 2543) มิวเตชันที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีอัตราต่ำมาก อัตราโดยเฉลี่ยประมาณ 10^{-5} - 10^{-6} จำนวนเซลล์ต่อรุ่นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม โดยแตกต่างกันออกไปตามตำแหน่งและชนิดของยีน และชนิดของสิ่งมีชีวิต (ประเสริฐ, 2536) ยีนมิวเตชันอาจเกิดในทางไปข้างหน้า (forward mutation : $A \rightarrow a$) คือ ลักษณะปกติเปลี่ยนไปเป็นลักษณะกลาย หรืออาจเกิดขึ้นในทางกลับกัน (back mutation : $a \rightarrow A$) คือ จากมิวเตนต์ยีนเปลี่ยนกลับไปเป็นยีนปกติตามเดิม (วิสุทธิ, 2533) อย่างไรก็ตามก็ตี นับว่ามิวเตชันที่มีความสำคัญและก่อให้เกิดวิวัฒนาการขึ้นในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ายีนแทบทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ เคยผ่านการเปลี่ยนแปลงโดยมิวเตชันมาแล้วในอดีต จากการคัดเลือกอันเข้มงวดในธรรมชาติยีนซึ่งก่อผลในทางเสื่อกก็ค่อยๆหายไปจากหมู่ประชากรของพืชและสัตว์ เมื่อปราศจากมิวเตชันในธรรมชาติแล้วก็แทบจะกล่าวได้ว่าสิ่งมีชีวิตไม่อาจดำรงเผ่าพันธุ์หรือมีวิวัฒนาการมาจนถึงทุกวันนี้

จากการศึกษาอัตราของมิวเตชันของยีนต่างๆของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนไปยังสภาพอื่น และการเปลี่ยนแปลงกลับสู่สภาพเดิมมีอัตราการเกิดไม่เท่ากัน นอกจากนั้นยีนของพืช และสัตว์ชั้นสูงมีอัตรามิวเตชันสูงกว่ายีนของแบคทีเรียและไวรัส

3.2 มิวเตชันที่เกิดจากการกระตุ้น (induced mutation)

นอกจากจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแล้ว มิวเตชันก็อาจจะถูกทำให้เกิดได้โดยใช้วิธีการกระตุ้น โดยได้เริ่มใช้รังสีเอ็กซ์ (X-ray) เพื่อกระตุ้นให้เกิดมิวเตชันในแมลงหวี่ พบว่าอัตราของมิวเตชันที่เกิดขึ้นจะสูงกว่าพวกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติถึงราว 150 เท่า ต่อมาได้พบว่ารังสีเอ็กซ์นี้ได้ก่อให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) โดยการใช้รังสีเอ็กซ์มักจะก่อผลใน

ทางเสื่อม และมิวเตชันที่เกิดขึ้นก็จะมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม บางยีนอาจถูกทำลายก็ได้หรือบางส่วนของโครโมโซมอาจขาดหายไป

4. สิ่งที่ทำให้เกิดมิวเตชัน (mutagens)

4.1 สิ่งทีก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ อุณหภูมิ รังสี ต่างๆ

4.1.1 อุณหภูมิ จากการทดลองเลี้ยงแมลงหวี่ในอุณหภูมิต่างๆกัน พบว่ายีนด้อยที่ทำให้เกิดการตายอยู่บนโครโมโซม X (sex linked recessive lethal gene) และทำให้เกิดการตายในอัตราที่แตกต่างกัน ดังนี้

อุณหภูมิ	14	องศาเซลเซียส	เกิดร้อยละ	0.87
อุณหภูมิ	22	องศาเซลเซียส	เกิดร้อยละ	0.188
อุณหภูมิ	28	องศาเซลเซียส	เกิดร้อยละ	0.325

4.1.2 รังสีและแสง เป็นสิ่งทีก่อการกลายพันธุ์ที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ สามารถแบ่งแสงและรังสีตามช่วงความยาวคลื่นออกเป็นพวกๆ ดังนี้

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

คลื่นวิทยุ แสง และรังสี คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีช่วงคลื่นขนาดต่างๆกัน คลื่นวิทยุมีช่วงคลื่นที่ยาวมาก คือ มีความยาวระหว่าง 10^{10} ซม. แสงที่เรามองเห็นมีช่วงคลื่น 10 เซนติไมครอน คลื่นที่มีช่วงสั้นกว่านี้ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต รังสีเอ็กซ์ จัดว่าเป็นคลื่นที่มีพลังงานสูง เมื่อช่วงคลื่นยังสั้นลงพลังงานก็ยิ่งสูงขึ้น การที่แสงบางอย่าง และรังสีมีพลังงานสูงนี้เองทำให้สามารถแทรกซึมวัตถุ และก่อผลให้เกิดมิวเตชันในสิ่งมีชีวิต เราอาจแยกคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและพลังงานในรูปแบบจากสารที่อาจแผ่รังสี (radioactive isotope) ออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ

1) รังสี (ionizing radiation) คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า หรือพลังงานในรูปแบบที่มีพลังงานสูง เมื่อกระทบเป้าแล้ว จะทำให้มีการผลิตไอออน (ions) และรังสีนี้จัดเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมสูง มีอยู่หลายชนิดด้วยกัน แต่ละชนิดอาจมีแหล่งที่เกิดและแรงแทรกซึมต่างกัน รังสีเหล่านี้ ได้แก่ รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา รังสีคอสมิก รังสีแอลฟา รังสีเบตา และนิวตรอน รังสีบางชนิดในจำนวนนี้ได้

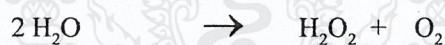
จากการแผ่รังสีของธาตุที่อาจแผ่รังสีได้ (radioactive elements) เช่น รังสีแอลฟา ซึ่งประกอบด้วย โปรตอนและนิวตรอน และรังสีเบตาซึ่งประกอบด้วยอิเล็กตรอน เป็นต้น

รังสี ทำให้เกิดมิวเตชันโดยวิธีการที่ทำให้เกิดอออน ทั้งนี้เมื่อรังสีวิ่งไปกระทบกับอะตอมของวัตถุ ก็จะทำให้อะตอมนั้นยังอิเล็กตรอนออกไป หลังจากสูญเสียอิเล็กตรอนไปแล้ว อิเล็กตรอนตัวที่ถูกยิงออกไปจะถูกจับไว้โดยอะตอมข้างเคียง จึงทำให้อะตอมนั้นกลายเป็นอออนที่มีประจุลบ โดยเหตุนี้เองอออนจึงเกิดเป็นคู่ๆ เสมอ

รังสีอาจก่อให้เกิดมิวเตชันได้หลายวิธี เช่น เมื่ออออนนั้นอยู่ในส่วนของยีน การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดกับอออนนั้น ก็จะทำให้ยีนเปลี่ยนแปลงสภาพไป ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือ รังสีอาจทำให้น้ำที่อยู่ภายในเซลล์ผลิตอออนของไฮโดรเจน (H^+) และกลุ่มไฮดรอกซิล (OH^-) แล้ว H^+ จะรวมตัวกับออกซิเจนได้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา คือ อาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ โปรตีน หรือโครโมโซมก็ได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับโครโมโซม ก็จะทำให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซมหรือเกิดมิวเตชันของยีนได้



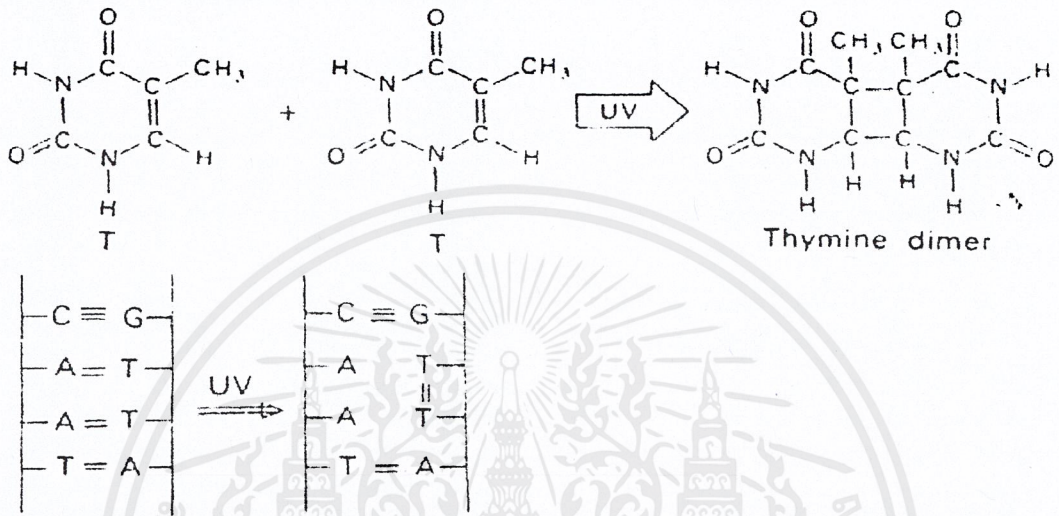
ในที่ที่มีออกซิเจน ไฮโดรเจนอะตอมที่เกิดจากโมเลกุลของน้ำจะเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ง่าย ดังปฏิกิริยา



2) แสง (nonionizing radiation) คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าช่วงยาวๆ ไม่ทำให้มีการผลิตอออน ทั้งนี้เพราะพลังงานที่มีอยู่นั้นค่อนข้างต่ำ ดังนั้นเราเรียกคลื่นพวกนี้ว่า แสง แสงที่อาจทำให้เกิดมิวเตชัน ได้แก่ แสงอัลตราไวโอเลต (UV) แสงชนิดนี้มีช่วงคลื่นยาวกว่ารังสีเอ็กซ์ และเนื่องจากมีพลังงานต่ำนี้เอง แสงอัลตราไวโอเลตจึงมีแรงแทรกซึมน้อย และไม่อาจแทรกซึมผ่านส่วนของร่างกายที่มีความหนาแน่นสูงๆ ดังนั้นจึงมักใช้กับส่วนเล็กๆของพืช เช่น อาจใช้กับอับละอองเกสร เป็นต้น หรือ ใช้กับบางส่วนของไข่แมลงหวี่และมักใช้ได้ผลดีกับเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส แสงอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในส่วนของโพลาร์แคป (polar cap) ของไข่แมลงหวี่ รังสีอัลตราไวโอเลตอาจจะทำให้โครโมโซมผิดปกติ แต่ประสิทธิภาพน้อยกว่ารังสีเอ็กซ์ (ประดิษฐ์, 2543)

เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตไม่ทำให้มีการผลิตอออน ดังนั้นมิวเตชันที่เกิดขึ้นก็เนื่องมาจาก การที่เซลล์ดูดแสงเข้าไปโดยตรง ส่วนของเซลล์ที่ดูดแสงได้ดีคือ กรดนิวคลีอิก หรืออาจกล่าวลงไปให้แน่ชัดอีกว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเบส โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ไพริมิดีนนั่นเอง เมื่อเบส

กระทบกับแสงอัลตราไวโอเล็ตก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับเกาะของพันธะ (bond) เปลี่ยนไป คือ ทำให้มีการจับเกาะระหว่างเบสชนิดเดียวกัน เบสที่จับเกาะกันนี้ เรียกว่าเป็น ไดเมอร์ (dimer) การจับเกาะที่เกิดขึ้นง่ายที่สุด คือการจับเกาะกันระหว่างไทมีน (thymine) ซึ่งทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงการเกิดไทมีนไดเมอร์
ที่มา: Gerald (1973)

ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนในเส้นนิวคลีโอไทด์เส้นเดียวกัน ก็จะมีการขัดขวางไม่ให้ดีเอ็นเอแบ่งตัว ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนของเส้นตรงกันข้ามก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับคู่ของไทมีนกับอะดีนีน (thymine กับ adenine : T-A) เปลี่ยนไป ดังนั้นทำให้ไทมีนไปจับกับกวานีน ซึ่งจะยังผลให้ T-A เปลี่ยนไปเป็น C-G ซึ่งจัดเป็นการเปลี่ยนแปลง แบบทรานซิชัน (transition) ส่วนไดเมอร์ชนิดอื่นที่พบคือ ไซโตซีนไดเมอร์ (cytosine dimer : C-C) ซึ่งเกิดขึ้นน้อยกว่าพวกแรก ไดเมอร์ชนิดนี้ ก่อให้เกิดมิวเตชันโดยการที่ NH₂ ถูกขับออกไปจึงทำให้ได้ยูราซิลไดเมอร์ (uracil dimer : U-U) แต่ยูราซิลจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับไทมีน ดังนั้นจึงทำให้ G-C เปลี่ยนเป็น A-T

ผลของแสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีต่อสิ่งมีชีวิต ก็คือทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครโมโซมและยีน (gene mutation) เช่นเดียวกับการใช้รังสีเอ็กซ์ แต่มีรายงานว่าขนาดการใช้ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนได้เท่ากันนั้น รังสีเอ็กซ์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมได้มากกว่า คุณสมบัติอีกประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเล็ตก็คือ แสงที่มีช่วงคลื่นต่างกันจะมีผลทางมิวเตชันไม่เท่ากัน ช่วงคลื่นที่มีผลในทางมิวเตชันดี คือพวกที่ DNA สามารถดูดซับเอาไว้ได้มาก แสงอัลตราไวโอเล็ตไม่สามารถผ่านแก้วได้แต่สามารถทำลายสายตาได้ (Gerald, 1973)

ผลของมิวเตชันจากการให้แสงอัลตราไวโอเล็ตจะไม่สอดคล้องกับทฤษฎีการกระทบเป้า (target theory) ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการให้ (dosage) และอัตรามิวเตชันจะไม่เป็นแบบเส้นตรง แต่จากการทดลองกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ปรากฏว่าได้กราฟเส้นโค้ง หลากหลายแบบ เช่นนี้แล้วก็แสดงว่า มิวเตชันย่อมเกิดจากการกระทบกับเป้าหมายหลายๆครั้ง ซึ่งการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นวิธีการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กับเชื้อรา (ชวนพิศ, 2536) ซึ่งความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์จะใกล้เคียงกับการแผ่รังสีอัลตราไวโอเล็ต ความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถคำนวณได้จากอัตราการอยู่รอดของจำนวนโคโลนีภายหลังการฉายแสง ถ้าให้แสงอัลตราไวโอเล็ตสูงขึ้นไปจะทำให้อัตราการกลาย และอัตราการตายเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงให้อัตราการกลายพันธุ์สัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของจุลินทรีย์ภายหลังได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต (Gerald, 1973)

ผลอันน่าสนใจประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเล็ต ก็คือ การเกิด photoreactivation คือผลของการใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตจะบรรเทาหลงหรือหมดไป เมื่อให้เซลล์ถูกกับแสง (visible light) และได้มีการค้นพบถึงความผิดปกติที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแสงอัลตราไวโอเล็ต กล่าวคือแสงอัลตราไวโอเล็ตที่มองเห็นด้วยตาเปล่าสามารถทำให้เซลล์ถูกเปลี่ยนไปจากสภาพเดิมได้ (Gerald, 1973) ปรากฏการณ์เช่นนี้ ได้มีการพบในแบคทีเรียและไวรัส ทั้งนี้เกิดจากการที่มีเอนไซม์บางชนิดเข้าไปตัดให้ไทมีนในไทมีนโคเมอร์แยกออกจากกัน และทำให้ DNA กลับคืนสู่สภาพเดิม การซ่อม DNA หรือการทำให้มิวเตชันเปลี่ยนกลับโดยขบวนการที่กล่าวมานี้จะเกิดได้ดี ในแสงสีน้ำเงิน อย่างไรก็ตามก็ยังมีรายงานว่าใน *E. coli* นั้นอาจมีการจัดโคเมอร์โดยวิธี dark reactivation ซึ่งหมายถึงว่า ปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นโดยไม่ต้องการแสง (visible light) การขจัดแบบนี้ พบว่าเกิดจากการที่มีเอนไซม์บางอย่างตัดโคเมอร์จาก DNA ทิ้งและจะมีนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าไปแทนที่ในส่วนนั้น

การแสดงออกของยีนที่เกิดความล่าช้า เนื่องมาจากปัจจัยต่างๆหลายปัจจัย มีดังต่อไปนี้

1. การกลายพันธุ์ของยีนไม่สามารถเกิดได้ทันทีหลังจากได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต
2. ยีนที่ก่อการกลายพันธุ์ต้องใช้เวลามากกว่าปกติเพื่อให้เกิด metabolic activity ก่อนที่จะเกิดการกลายพันธุ์ต่อไป
3. การแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์จะเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ

4.2 สิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen)

ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามค้นคว้าเพื่อหาว่าสารเคมีชนิดใดที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชหรือสัตว์ จนทราบว่าสารเคมีเป็นจำนวนมากที่เป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น กรดไนตริก (nitrous acid) ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Aspergillus spp.* มี

รายงานพบว่าสารไนโตรเจน มีสตาร์ต และซัลเฟอร์มีสตาร์ต สามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ได้ ทั้งนี้สารฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ไดเอธิลซัลเฟต (diethylsulfate) ไดอะโซมีเทน (diazomethane) และสารประกอบอื่นๆ ก็เป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และมีผลรุนแรงต่อผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมีสารบางชนิดที่ก่อให้เกิดมะเร็ง

อย่างไรก็ตามสารเคมีบางชนิดอาจจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตหนึ่ง แต่จะไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง สารเคมีบางชนิดอาจจะมีผลในช่วงที่มีการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต หรือมีผลเฉพาะในเพศใดเพศหนึ่งเท่านั้น เช่น สารฟอร์มัลดีไฮด์จะก่อเกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ตัวผู้ระยะที่เป็นตัวหนอน แต่จะไม่มีผลต่อตัวเมียระยะที่เป็นตัวหนอน นอกจากนี้สารเคมีแต่ละชนิดก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีนแต่ละตำแหน่งด้วยความถี่ที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาสายพันธุ์กลายของเชื้อ *Aspergillus alliaceus* BIM-83 เพื่อผลิตเพคตินไฮโดรเลส (Pectin hydrolase) โดยทดสอบด้วยวิธีทางกายภาพ (physical) และการชักนำการกลายพันธุ์โดยการใช้สารเคมี โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร เป็นเวลา 1, 3, 6, 10 และ 15 นาที ร่วมกับ *N*-Nitroso-*N*-Methylurea (NMU) และ *N*-methyl-*N*-nitrosoguanidine (NG) ที่ความเข้มข้น 500, 1000, 2000 และ 4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Mikhailova *et al.*, 1996)

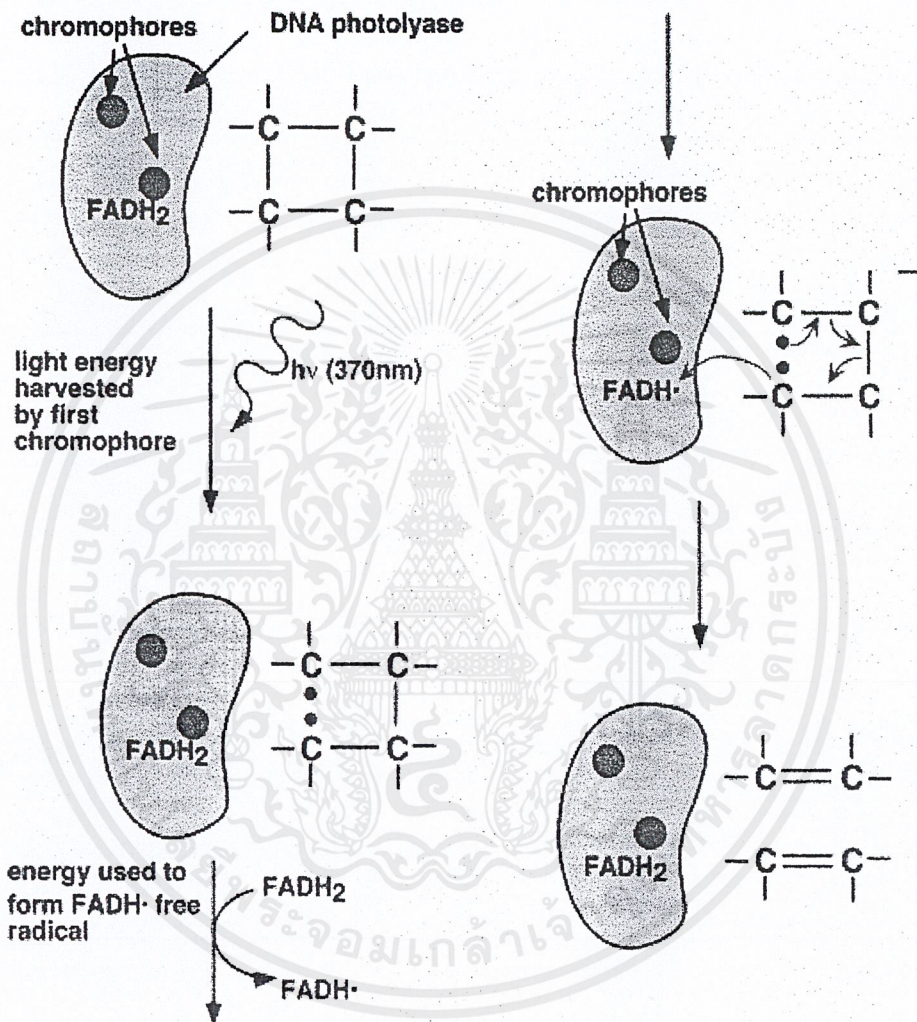
การซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair)

โมเลกุลของดีเอ็นเออาจเกิดความเสียหายหรือชำรุดได้หลายทาง ถ้าเสียหายมากอาจมีผลต่อการดำรงชีวิต อย่างไรก็ตามในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีกลไกในการซ่อมแซม โมเลกุลดีเอ็นเอที่เสียหายให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ รูปแบบของความเสียหายของโมเลกุลดีเอ็นเอที่พบบ่อยๆ ได้แก่

1. เกิดการแตกหักบนสายใดสายหนึ่งหรือทั้งสองสายของ โมเลกุลดีเอ็นเอเนื่องจากการโค้งงอหรือบิด
2. เกิดการสูญเสียโมเลกุลของเบสไปจาก โมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบส ภายในเซลล์
3. เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสตัวหนึ่งหรือหลายๆตัวใน โมเลกุลของดีเอ็นเอเนื่องจากสารเคมีเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว
4. สิ่งก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ เช่น รังสีเอกซ์ แสงอัลตราไวโอเล็ต รังสีแกมมา สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติของเบสนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอได้ เช่น แสงอัลตราไวโอเล็ต ทำให้เกิดการจับกันของเบสไทมีนในสายเดียวกัน

อะดีนีนของสายตรงข้ามได้เหมือนเดิม หลังจากนั้นเอนไซม์ชนิดนี้ก็จะหลุดออกจากตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ผิดปกติก็จะได้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปกติเหมือนเดิม

Photoreactivation of Thymine Dimers



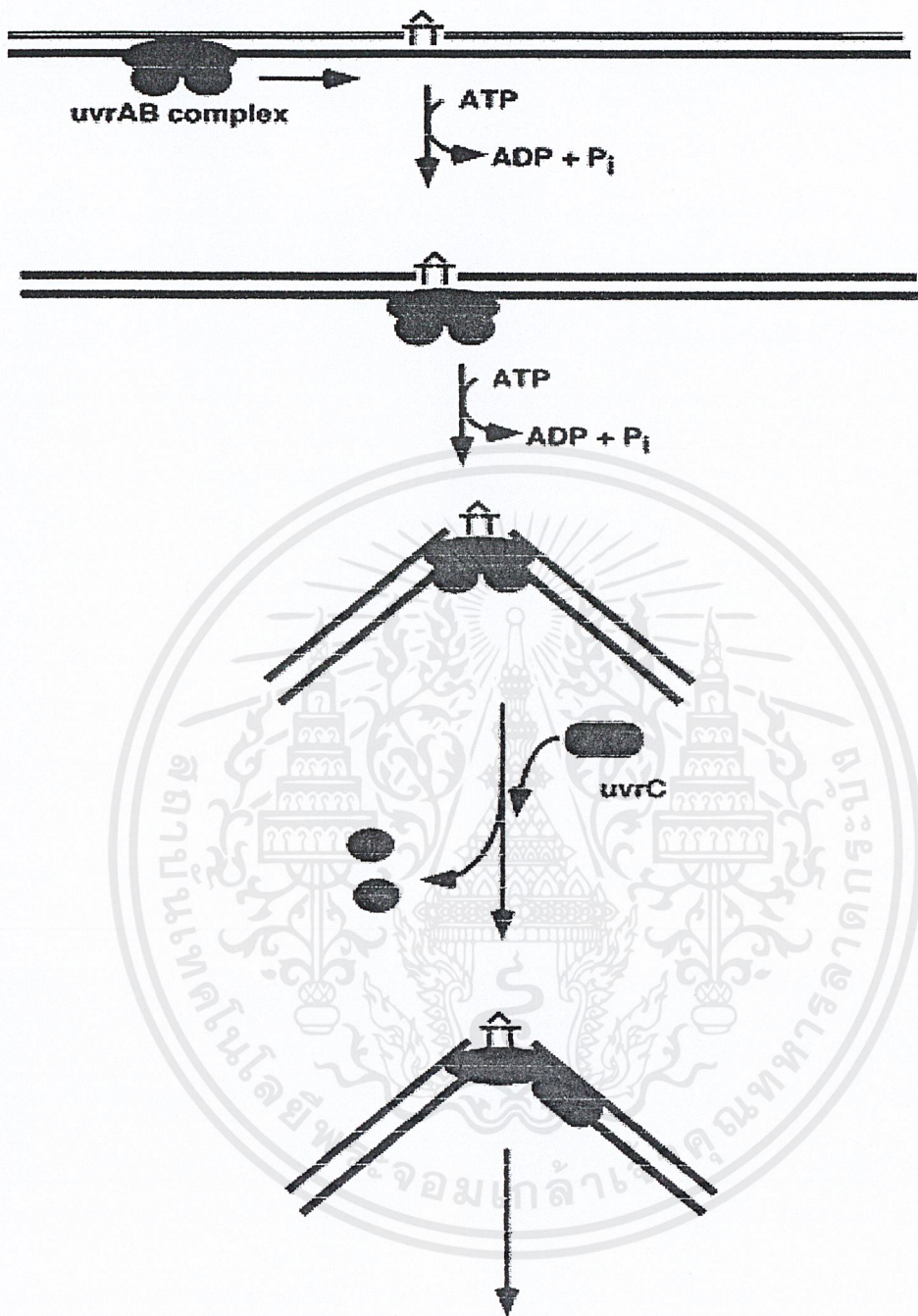
รูปที่ 11 การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยวิธีโฟโตรีแอกทีเวชัน

ที่มา: <http://www.blc.arizona.edu/marty/411/Modules/mod6.html>

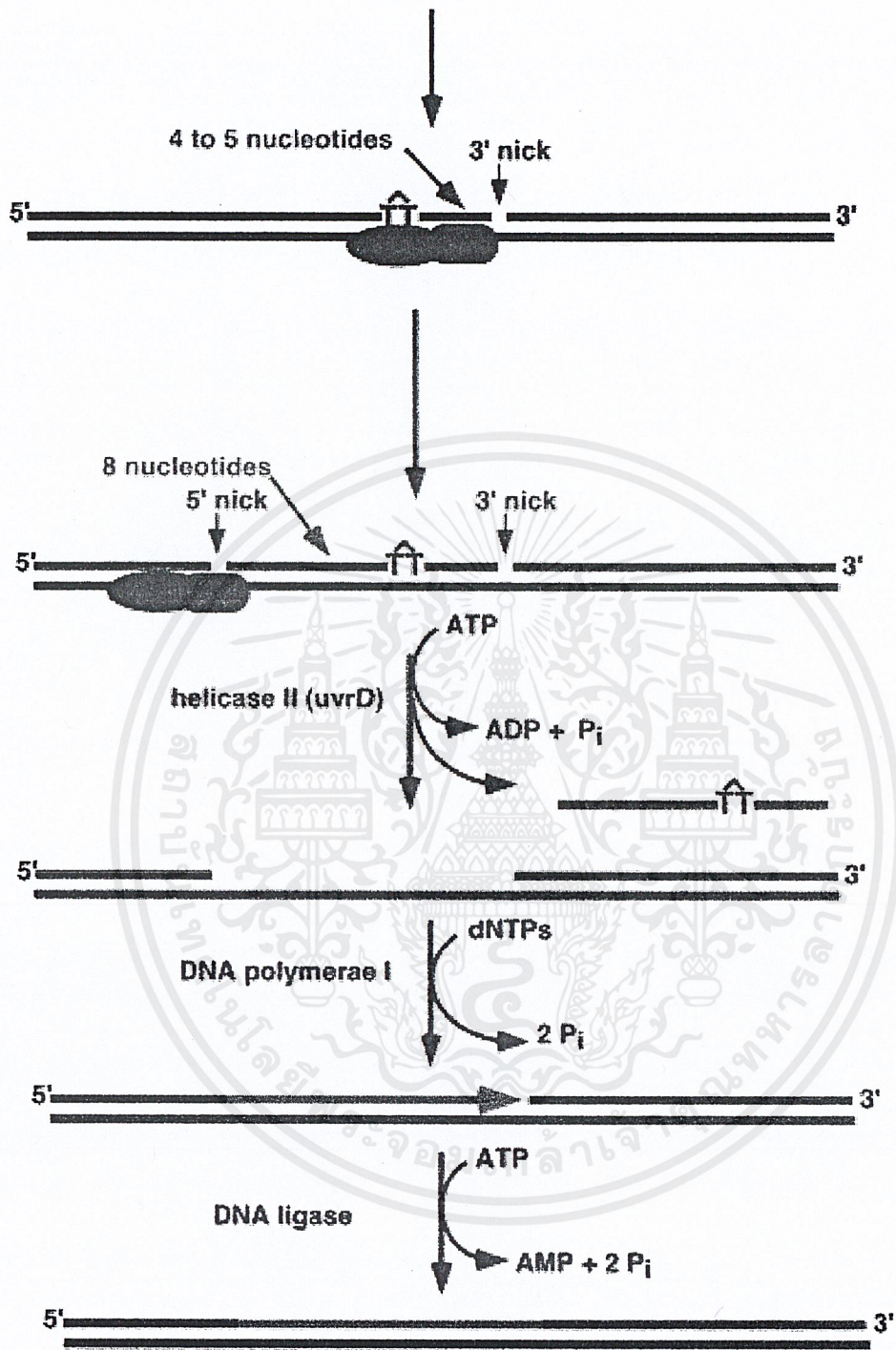
ในกรณีที่เกิดความผิดปกติของโมเลกุลดีเอ็นเอเนื่องจากมีหมู่เมทิล (methyl group) เกิดมาจากปกติที่ตำแหน่ง O' ของเบสกวานีน (O'-methylguanine) ก็จะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอ

เรส (O^6 -mGua DNA methyltransferase: O^6 -mGua) ทำหน้าที่กำจัดหมู่เมธิลที่เกิดขึ้นมาจากโมเลกุลของเบสกวานีน ก็จะทำให้ได้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปกติเหมือนเดิม

2. เอ็กซิชันรีแพร์ (exision repair) เป็นกระบวนการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ผิดปกติต่างๆไป โดยจะมีการตัดส่วนของดีเอ็นเอที่เสียหายและผิดปกติออกไปโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ และจะมีการเติมส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกต้องแทนส่วนที่ถูกตัดออกไปนี้ การซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้มีหลายแบบด้วยกัน เช่น การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เสียหายจากแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV damage repair) เมื่อโมเลกุลของดีเอ็นเอได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ตจะเกิดไทมีนไคเมอร์ขึ้นภายในเวลา 1-2 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่มีกระบวนการซ่อมแซมโดยวิธีโฟตรีแอกติเวชันแล้ว การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดไทมีนไคเมอร์จะเกิดขึ้นโดยมีเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (endonuclease) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ย่อยอีก 3 ชนิดคือ A, B, C เอ็กซิชันนิวคลีเอส (A, B, C exinuclease) ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยยีน *urv A*, *urv B* และ *urv C* เอนไซม์ย่อยเหล่านี้จะทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phosphodiester) ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 8 นับจากปลาย 5' ของบริเวณที่เกิดไทมีนไคเอสเตอร์และตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 4 นับจากปลาย 3' ของบริเวณที่เกิดไทมีนไคเมอร์จากนั้นจะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอเฮลิเคส 2 (DNA helicase 2) ซึ่งถูกสังเคราะห์จากยีน *urv D* ทำหน้าที่แยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยเบส 12 เบส นั้นออกมาซึ่งชิ้นส่วนดังกล่าวจะถูกย่อยสลายไป ต่อจากนั้นจะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส 1 (DNA polymerase 1) และไลเกส (ligase) ทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องตรงบริเวณช่องว่างที่ถูกตัดออกไปให้สมบูรณ์ (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ถูกทำลายโดยแสงอัลตราไวโอเล็ต
ที่มา: <http://www.blc.arizona.edu/marty/411/Modules/mod6.html>



รูปที่ 12 (ต่อ) การซ่อมแซม โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ถูกทำลายโดยแสงอัลตราไวโอเล็ต
ที่มา: <http://www.blc.arizona.edu/marty/411/Modules/mod6.html>

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

1.1 เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* โดยถ่ายเชื้อลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C เพื่อให้เกิดสปอร์เต็มๆ ใส่ น้ำกลั่นที่มีทวิน 80 ร้อยละ 0.02 ลงในสปอร์ จะได้เป็นสารละลายสปอร์ จากนั้นกำจัดเส้นใยด้วยแผ่นกรองซินเตอร์กลาส (Sinter glass) จะใช้สปอร์ของเชื้อราจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (การนับจำนวนสปอร์จะใช้เฮมาไซโทมิเตอร์) ดังแสดงในภาคผนวก ข.

1.2 นำสารละลายสปอร์ที่ได้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แบ่งออกมาใส่ในงานเพาะเชื้อ เพื่อนำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตในตู้ฉายแสง (ซึ่งอยู่ภายในตู้ปลอดเชื้อ) และเก็บตัวอย่างสารละลายที่เวลา 8 และ 10 นาที ให้เวลาที่ 0 นาที เป็นชุดควบคุม โดยชุดควบคุมต้องทำการเจือจางสารละลายสปอร์ที่ 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} แล้วทำการ pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Complete medium ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.3 ส่วนสารละลายสปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแล้ว จะทิ้งไว้ในที่มีดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายสปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตมาเติมสารเคมี *N-Nitroso-N-Methylurea* (NMU) ที่ความเข้มข้น 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแต่ละความเข้มข้นตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ

1.4 ทำการล้างสารเคมีออกจากสารละลายสปอร์ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้เครื่องกรอง (suction filter) ที่มีเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อที่จะกรองและล้างสารเคมีออกไป เหลือแต่สปอร์ติดอยู่ที่เมมเบรน นำเมมเบรนมาใส่ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.5 นำสารละลายสปอร์ที่ได้มากรองด้วยซิลิโคนกลาส เพื่อกรองเอาเส้นใยที่เจริญออกจากนั้นทำการ pour plate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Complete medium อย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน

1.6 นับจำนวนโคโลนีแล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น 0 นาที (ชุดควบคุม) เลือกว่าเวลาใดเวลาหนึ่งที่เหมาะสมต่อการกลายพันธุ์ โดยใช้เวลาที่เซลล์เริ่มต้นตายไปร้อยละ 90 หรือเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับร้อยละ 10

2 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจากขนาดวงใสรอบโคโลนี

2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสในรูปอาหารแข็ง ทำการเลี้ยงเชื้อในงานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน โดยไม่เกิดสปอร์ นำคอร์กบอยเลอร์เจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเจริญอยู่ไปวางตรงกึ่งกลางอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับสร้างเอนไซม์ไซลานเนส บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วันทำการวัดขนาดของโคโลนี

2.2 จากนั้นทำการย้อมสีด้วยคองโกเรด ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 15 นาที ล้างสีออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ทำการวัดขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ และหาอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีของเชื้อที่วัดได้ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์แท้



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์เชื้อราหลังจากการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตร่วมกับการใช้สารเคมี *N-Nitroso-N-Methylurea* (NMU) ที่ระยะเวลา 8 นาที และ 10 นาที

ผลการทดลอง ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อราสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* หลังจากผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 8 นาที และ 10 นาที แล้วนำไปทรีตเมนต์สารเคมี *N-Nitroso-N-Methylurea* (NMU) ที่สองค่าความเข้มข้น โดยแต่ละความเข้มข้นทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการทดลอง การฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเชื้อราสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* เป็นเวลา 8 นาทีจะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดมากกว่าเชื้อราสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ต 10 นาที และเมื่อเปรียบเทียบการหาค่าความเข้มข้นของ NMU ที่เหมาะสม จะได้ว่าทั้งสองความเข้มข้นให้ผลที่ต่างกันไม่มากนัก และเมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้สารเคมีที่ 1 และ 2 ชั่วโมง จะได้ว่าที่ 1 ชั่วโมงจะให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่สูงกว่าทั้งสองความเข้มข้นของสารเคมี

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อราสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* หลังจากผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 8 นาที และ 10 นาทีร่วมกับการใช้สารเคมี *N-Nitro-N-Methylurea* (NMU) ที่ความเข้มข้น 1000 และ 2000 ไมโครกรัม/มล.

ใช้ NMU ความเข้มข้นที่ (ไมโครกรัม/มล.)	ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี			เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด		
	เมื่อฉายแสงยูวีเป็นเวลา (นาที)			เมื่อฉายแสงยูวีเป็นเวลา (นาที)		
	0	8	10	0	8	10
1000						
เมื่อเก็บไว้ 1 ชม.	3.636x10 ⁷	5.6667	4.2000	100	15.58	11.50
เมื่อเก็บไว้ 2 ชม.		3.3334	2.8563		9.17	7.86
2000						
เมื่อเก็บไว้ 1 ชม.	3.636x10 ⁷	4.8945	3.5000	100	13.46	9.63
เมื่อเก็บไว้ 2 ชม.		3.5370	2.0000		9.73	5.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งวิธีการชักนำให้เกิดสายพันธุ์กลายมี Mikhailova และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายของเชื้อ *Aspergillus alliaceus* ที่ผลิต Pectin Hydrolase โดยทำการกลายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus sp.* ด้วยวิธีเดียวกันคือ ใช้วิธีทางกายภาพ (การฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร) และทางเคมีคือ ใช้สารเคมี *N-Nitroso-N-methylurea* (NMU) และ *N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine* (NG) จนได้เชื้อราสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิต Pectin Hydrolase ได้เพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ Brown and Elander (1966) ก็ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ โดยใช้วิธีทางกายภาพ เช่นเดียวกันคือ การฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่นแตกต่างกันและคัดเลือกเอาเฉพาะสายพันธุ์กลายที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 10

2. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจากวงใส

ผลการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส โดยทำการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสระหว่างเชื้อราสายพันธุ์กลาย 16 สายพันธุ์และเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยใช้ไซเลนในอาหารแข็งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สายพันธุ์ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตในอาหารแข็งที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 6) ตารางในที่นี่คัดเลือกเฉพาะเชื้อราที่มีค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีและขนาดของโคโลนีสูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมและพบว่าเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ 10 ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุดเท่ากับ 1.87 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเชื้อสายพันธุ์ที่เหลือ 15 สายพันธุ์และสายพันธุ์ดั้งเดิม

ตารางที่ 6 ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงไฮรอปโคโลนีและค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงไฮรอปโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่ทำกรกลายพันธุ์และเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน

สายพันธุ์กลายของเชื้อรา <i>Aspergillus fumigatus</i>	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงไฮรอปโคโลนี (ซม.)	ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงไฮรอปโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี
0	4	4.75	1.19 ^f
1	4.1	5.6	1.37 ^d
2	3.5	4.7	1.34 ^d
3	4.5	6.75	1.5 ^c
4	3.95	6.7	1.7 ^b
5	5.3	6.45	1.22 ^{ef}
6	4.5	5.4	1.2 ^f
7	3.75	4.7	1.25 ^{ef}
8	4.65	5.65	1.22 ^{ef}
9	4.75	5.85	1.23 ^{ef}
10	2.25	4.2	1.87 ^a
11	2.9	4.9	1.69 ^b
12	3.8	5.2	1.37 ^d
13	2	2.7	1.35 ^d
14	2.25	2.9	1.29 ^{de}
15	1.9	2.5	1.32 ^d
16	2.5	3	1.2 ^f

หมายเหตุ ตัวอักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความน่าเชื่อถือ 95%

เชื้อราที่มีค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงก็น่าจะผลิตเอนไซม์ได้สูงด้วย เนื่องจากค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ (Daigneault-Sylvestre and Kluepfel, 1979)

ซึ่งจากการที่ ภัทรพร และคณะ (2543) ได้ทำการชักนำให้เกิดการกลายออกโซโทรปจากเชื้อ *Penicillium sp.* เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลเนสโดยศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลเนสในอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสายพันธุ์กลายออกโซโทรป (A1) ในอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีเท่ากับ 1.655 ซึ่งพบว่าสายพันธุ์กลายออกโซโทรป (A1) ระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมากกว่าสายพันธุ์แท้

ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้พบว่ามีผลสอดคล้องกัน กล่าวคือสายพันธุ์กลายที่ได้มีมีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมากกว่าสายพันธุ์แท้เช่นเดียวกัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยทำการเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อราสายพันธุ์กลายทุก 15 สายพันธุ์ มีค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีและขนาดของโคโลนีสูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมและเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ 10 ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุดเท่ากับ 1.87 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเชื้อราสายพันธุ์ที่เหลือ 15 สายพันธุ์และสายพันธุ์ดั้งเดิม

ข้อเสนอแนะ

ไซเลนที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสมีราคาสูง จึงหาแหล่งคาร์บอนอื่นๆที่สามารถทดแทนกันได้ คือ วัสดุเศษเหลือจากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ชังข้าวโพด กากเมล็ดฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว เปลือกเมล็ดธัญญาพืช (Biely, 1985) เพื่อลดต้นทุนการผลิต

สามารถใช้วิธีการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตร่วมกับการใช้สารเคมี *N-Nitroso-N-Methylurea* (NMU) เพื่อทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติตามที่เรต้องการหรือเพิ่มการผลิตเอนไซม์ซึ่งจุลินทรีย์สามารถผลิตได้แต่เดิมอยู่แล้ว

มีอีกวิธีการหนึ่งในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่เพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสคือ การนำสารละลายสปอร์ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทั้งทางกายภาพและทางเคมีแล้ว มาเลี้ยงลงในอาหารที่ทำให้สร้างเอนไซม์ไซลานเนส จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ของเชื้อแต่ละชนิดมาหยดลงในจานเพาะเชื้อเดียวกันที่มีอาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์คือ มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อดูว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้หรือไม่ และผลิตได้มากน้อยแค่ไหน วิธีนี้เป็นวิธีที่ลดเวลา ขั้นตอนและจำนวนจานเพาะเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

จากการทดลองทั้งหมดนี้เรียกว่า primary screen ซึ่งเป็นการวัดเชิงคุณภาพคือ วัดขนาดโคโลนี วัดขนาดวงใสรอบโคโลนี เพื่อหาค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี นอกจากนี้ยังมีวิธีการหาคีจกรรมของเอนไซม์ ส่วน secondary screen เป็นการวัดเชิงปริมาณ เพื่อยืนยันว่าเชื้อกลายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์แท้แน่นอน โดยดูจากการทำ amino sequence หรือดูสายของดีเอ็นเอ วิธีนี้จะใช้ในขั้นสูงต่อไป

สามารถคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายโดยใช้อาหารเป็นตัวคัดเลือก ซึ่งในอาหารนั้นจะมียาปฏิชีวนะเป็นส่วนประกอบก็คือ ถ้าเชื้อเจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ แสดงว่าเชื้อตัวนั้นเป็นสายพันธุ์แท้ไม่ใช่สายพันธุ์กลาย



- Bakalova N.G. ,S.D. Petrova , A.P. Atev , M.K. Bhat and Kolev D.N. 2002. Biochemical and Catalytic properties of endo-1,4- β -xylanases from *Thermomyces Lanuginosus* (wild and mutant stains). *Biotechnology Letters*, 24: 1167-1172.
- Bailey, M.J. and Viikari L. 1993. Production of xylanase by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan – based medium. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 9: 80-84.
- Biely, P 1985. Microbial Xylanolytic Systems. *Trends Biotechnol* 3. 11: 286-290.
- Chahal, D.S. 1985. Solid State Fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Applied Environmental Microbiology*, 49(1): 205-210.
- Chaudhuri B.K., Vikram Sahai. 1993. Production of cellulase using a mutant stain of *Trichoderma reesei* growing on lactose in batch culture. *Applied Microbiology Biotechnology*, 39: 194-196.
- Christov, L.P., G., Szakacs and H. Balakrishnan. 1999. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanase in pulp bleaching. *Process Biochemistry*, 34: 511-517.
- Connerton, I., Cummings, N., Harris, G.W., P., Debeire, and Breton. 1999. A single domain thermophilic xylanase can bind insoluble xylan: evidence for surface aromatic clusters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1433: 110-121.
- Coughlan M.P, Hazlewood G.P. 1993. β -1,4-D-Xylan degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and application. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 17:259-289.
- Eda S, Ohnishi A, Kato K 1976. Xylan isolated from the stalk of *Nicotiana tabacum*. *Agricultural Biology Chemistry*, 46: 359-364.
- Esteban, R., Villanueva J.R. and Villa , T.G. 1982. β -D Xylanase of *Bacillus circulans* WL-12 *Canadian Journal Microbiology*, 28: 733-739.
- Desphande, V., Lachke, A., Mishra, C., Keshar, S. and Roat, M. 1985. Mode of Action and Properties of xylanase and β -xylosidase from *Neurospora crassa*. *Biotechnology Bioengineering*, 28: 1832-1837.
- Gerald James Stine. 1973. *Laboratory Exercise in Genetics*. Macmillan Publishing Co., Inc. New York. pp. 424-427.

Steiner J.,P. Carmona, C. Ponce, M. Berti and Eyzaguirre J. 1998. Short Communication:

Isolation of mutants of *Penicillium purpurogenum* with enhanced xylanase and β -xylosidase production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 589-590.

Tan, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis-Seize, G.W. and Saddler, J.N. 1987. Inexpensive, Rapid

Procedure for Bulk Purification of Cellulase-Free β -1,4-D-Xylanase of high Specific Activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 30: 96-100.

Thangamani Anthony, Krishnan chandra Raj, Ayyappan Rajendran, and Paramasamy

Gunasekaran. 2003. Inhibition of Proteases during Fermentation Improves Xylanase Production by Alkali Tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. *Journal of Bioscience and Bioengineer*, 96: 394-396.

Wong, K.K.Y., Tang, L.U.L. and Saddler J.N. 1998. Multiplicity of β -1,4-xylanase in

Microorganism: function and applications. *Microbiology Reviews*, 52: 305-317.

www.biosite.dt/staabi/xylan.htm

www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1bg4.html

www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles23.htm

www.blc.arizona.edu/marty/411/Modules/mod6.html

ภาคผนวก ก

อาหารสูตรต่างๆในการเลี้ยงและเก็บรักษาจุลินทรีย์

PDA medium

มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
เตี๋ยโทส	20	กรัมต่อลิตร
วุ้น	15	กรัมต่อลิตร

Complete medium (Demzin, 1986)

มอลโตส(BHD)	40	กรัมต่อลิตร
เปปโติน(oxid)	10	กรัมต่อลิตร
มอลต์สกัด(oxid)	24	กรัมต่อลิตร
วุ้น	20	กรัมต่อลิตร

Minimal medium (Demzin, 1986)

NaNO ₃	3	กรัมต่อลิตร
KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	กรัมต่อลิตร
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01	กรัมต่อลิตร
KH ₂ PO ₄	1	กรัมต่อลิตร
กลูโคส(glucose)	40	กรัมต่อลิตร

ง. Minimal medium agar

ใส่วุ้น 18 กรัมต่อลิตรใน minimal medium เดิมโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์

ฉ. อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์

ส่วนที่ 1

KH ₂ PO ₄	2	กรัมต่อลิตร
(NH ₄) ₂ HPO ₃	1.4	กรัมต่อลิตร
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3	กรัมต่อลิตร
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0.3	กรัมต่อลิตร

ส่วนที่ 2	ยูเรีย	0.3	กรัมต่อลิตร
	โพรติเอสเปปโตน	0.23	กรัมต่อลิตร
	Yeast extract	0.1	กรัมต่อลิตร
	แร่ธาตุผสม		
	FeSO ₄ · 5H ₂ O	5	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.40	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร
	MnSO ₄ · 7H ₂ O	4.56	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร
	CoCl ₂	2.0	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร

วิธีการเตรียมอาหารสูตรต่างๆ ในการเลี้ยงและเก็บรักษาจุลินทรีย์

วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์ (PDA medium)

ชั่งอาหาร PDA ในสัดส่วนให้ได้ปริมาณตามต้องการ
ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
นำไปปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.0
บรรจุลงในหลอดฝาเกลียว
นำอาหารที่เตรียมไว้หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
เลี้ยงอาหารในหลอดฝาเกลียวจนกระทั่งขึ้นแข็งโดยวิธีปลอดเชื้อ

วิธีการเตรียมอาหาร complete medium

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
นำไปปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.0
เติมผงวุ้นลงไป ต้มจนวุ้นละลาย บรรจุลงในขวดอาหาร
นำอาหารที่เตรียมไว้หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
เทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อ

วิธีการเตรียมอาหาร minimal medium

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
นำไปปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.0
เติมผงวุ้นลงไป ต้มจนวุ้นละลาย บรรจุลงในขวดอาหาร
นำอาหารที่เตรียมไว้หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
เทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อ

ง. วิธีการเตรียมอาหารทดสอบการสร้างเอ็นไซม์

แบ่งอาหารออกเป็น 2 ส่วน ละลายสารทั้งหมดทั้งส่วนที่ 1 (ยกเว้น $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และส่วนที่ 2 (ยกเว้น โซเดียม) เข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นำส่วนที่ 2 ผสม 0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร ในส่วนแรกตามสัดส่วนที่กำหนดไว้ ปรับค่าพีเอชด้วย HCl เข้มข้น 1 นอร์มอล จากนั้นเติม โซเดียม 1 เปอร์เซ็นต์และวุ้นลงไป ต้มวุ้นให้ละลาย แล้วเติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (เพื่อป้องกันไม่ให้ Mg ไปจับทำให้เกิดตะกอน บรรจุลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ ที่แยกไว้นำไปกรองจูลินทรีย์ด้วยแผ่นกรองขนาด 0.25 ไมครอน สารจากข้อ 5 ที่ได้พออุ่นๆ ให้นำไปผสมกับ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ ที่กรองจูลินทรีย์แล้วตามสัดส่วน



ภาคผนวก ข

การตรวจนับสเปิร์มของเชื้อราโดยใช้ Haemocytometer (Petreoff-Hausserchamber)

วิธีการตรวจนับสเปิร์มของเชื้อรา

เตรียมตัวอย่างที่จะทำการตรวจนับ ถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมานับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ละลายในน้ำกลั่นในปริมาณที่ต้องการก่อน เช่น ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร (จะได้ความเจือจางเป็น 10-1) หรืออาจต้องทำการเจือจางมากขึ้นในกรณีที่มีสปอร์จำนวนมาก เช่น เจือจาง 10-2 หรือ 10-3 เป็นต้น

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงใน Haemocytometer (Petreoff-Hausserchamber) (ที่ปิดด้วย cover slip) โดยใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างมา 1-2 หยด หยดลงด้านข้างของแผ่น cover slip

ตรวจนับ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัว objective กำลังขยาย 10 เท่า

นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก หรือนับช่องใหญ่แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับ นำไปคูณด้วย 4 ค 106 จะได้เป็นปริมาณสปอร์ต่อกรัม หรือมิลลิลิตร

วิธีการคำนวณหาค่า 4 ค 106

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในช่องใหญ่ มีค่า	= 0.0025	ตารางมิลลิลิตร
ความลึกระหว่าง cover slip และช่อง	= 0.1	มิลลิเมตร
ดังนั้น ปริมาตร 1 ช่องเล็กจะมีค่า	= 0.0025 × 0.1 = 0.00025	ลูกบาศก์เซนติเมตร
ปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์เซนติเมตร	จะมีจุลินทรีย์ = Z	สปอร์
ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร	จะมีจุลินทรีย์ = Z × 1000/0.00025	สปอร์
	= Z × 4 × 106	

ภาคผนวก ก

ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงโคจรของโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่ทำการกลายพันธุ์และเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีไขมันเป็นแหล่งคาร์บอน

สายพันธุ์ กลาย	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
สายพันธุ์ดั้งเดิม	3	1.1900					
6.00	3	1.2000					
16.00	3	1.2000					
5.00	3	1.2200	1.2200				
8.00	3	1.2200	1.2200				
9.00	3	1.2300	1.2300				
7.00	3	1.2400	1.2400				
14.00	3		1.2900	1.2900			
15.00	3			1.3200			
2.00	3			1.3400			
13.00	3			1.3500			
1.00	3			1.3700			
12.00	3			1.3700			
3.00	3				1.5000		
11.00	3					1.6900	
4.00	3					1.7000	
10.00	3						1.8700
Sig.		.226	.082	.051	1.000	.777	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 1.847E-03.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้