สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การชักนำการกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ทนสภาวะที่เป็นด่างเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus*

นางสาว ยุพิน ผิวคำ

นางสาว สิริรัตน์ จิโนวัฒน์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67303
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549

b 11 k b 3224
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Induced mutation and selection of mutants of alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* for enchancing xylanase production

Yupin Phiwkam

Sirirath Jinowath

A Special Project Submitted in Partial 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 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การชักนำการกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ทนสภาวะที่เป็นด่างเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus*
นักศึกษา	นางสาวยุพิน ผิวคำ รหัสประจำตัว 45050765
	นางสาวสิริรัตน์ จิโนวัฒน์ รหัสประจำตัว 45050785
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต	
กรรมการ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การชักนำการกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สภาวะที่เป็นด่างเพื่อเพิ่มการเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus*	
นักศึกษา	นางสาวยุพิน ผิวคำ	รหัสประจำตัว 45050765
	นางสาวสิริรัตน์ จิโนวัฒน์	รหัสประจำตัว 45050785
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม	
ปีการศึกษา	2548	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์	

บทคัดย่อ

เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีเป็นจำนวนมาก แต่เชื้อราที่ทนด่างที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสยังมีจำนวนน้อย จากการศึกษาพบว่า *Aspergillus fumigatus* ที่ทำการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 นาที สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ที่พีเอช 8-11 และเมื่อคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ที่พีเอช 11 โดยหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส จากการวัดขนาดวงใสพบว่าได้เชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายที่ให้วงใสมากกว่าสายพันธุ์แท้และไม่มีการผลิตหรือผลิตเอนไซม์เซลลูเลสน้อยมาก โดยได้สายพันธุ์กลายจำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งเมื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสพบว่าเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายที่ 7 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 121.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญจากเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายตัวอื่นๆ รวมทั้งสายพันธุ์แท้ นอกจากนี้พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยการใช้ไซแลนจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าการใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Induced mutation and selection of mutants of alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* for enchancing xylanase production
Name	Miss Yupin Phiwkam Miss Sirirath Jinowath
Department	Applied Biology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Asst.Prof. Aree Rittiboon

Abstract

Fungi producing xylanase are numerous but alkali-tolerant fungi producing xylanase are rare. Alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* mutants were induced by exposing UV light (wave lengh 254 nm for 3 minutes) to the fungus and xylanase was produced in a wide range of pH 8-11. Ten mutants at pH 11 and having high xylanase activity by measuring the sizes of their clearzones were selected. Maximum xylanase was produced from *A. fumigatus* mutants strain 7 and a significant level from other strains and wildtype of 121.5 Unit/ml was obtained. Xylan was proved to be the better substrate than corncob for xylanase production.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ซึ่งทำสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ ช่วยเหลือแก้ปัญหามาโดยตลอด รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไข ตลอดจนอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง รองศาสตราจารย์ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต ประธานกรรมการโครงงานพิเศษ รองศาสตราจารย์มาลินี ตันติยาภรณ์ กรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ และนางสาวอาภรณ์ อนุภาพที่ได้ให้ความรู้และข้อเสนอแนะในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทดลอง สุดท้ายนี้ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคน ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้

นางสาวยุพิน ผิวคำ
นางสาวสิริรัตน์ จิโนวัฒน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ (From-genus *Aspergillus*)	3
2.2 โครงสร้างและลักษณะของไซแลน	5
2.3 แหล่งที่พบไซแลน	8
2.4 การย่อยสลายไซแลน	9
2.5 ประโยชน์ของไซแลน	12
2.6 แหล่งที่พบเอนไซม์ไซลาเนส	12
2.7 คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส	13
2.8 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในระดับอุตสาหกรรม	15
2.10 มิวเตชั่น (mutation)	22
2.11 การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลน	38
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	39
3.2 วิธีการทดลอง	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อหาร้อยละของการอยู่รอด 43

4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อหาสายพันธุ์กลายที่ทนต่อสภาวะที่เป็นด่าง 44

4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณ 44

4.4 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพ 49

4.5 การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ทดแทนไซแลน 51

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เอกสารอ้างอิง

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและการวิเคราะห์ข้อมูล

ภาคผนวก ข ตารางการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่		
1	ความสามารถในการหมักจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยเกิดผ่านระบบเอนไซม์ไซลาโนไลติก	12
2	อัตราการเกิดยีนมิวเตชั่นตามสภาพธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ	25
3	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรและร้อยละของการอยู่รอดของเชื้อ *A. fumigatus* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ ในระดับความเจือจาง 10^{-1}	43
4	ขนาดวงใสของเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายในอาหารที่มีไซแลน และคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 11 และพีเอชสุดท้ายของแต่ละสายพันธุ์	45
5	ขนาดวงใสของเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายในอาหารที่มีไซแลนและคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 11 และพีเอชสุดท้ายของแต่ละสายพันธุ์	51
ตารางภาคผนวกที่		
ข6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนสายพันธุ์ของเชื้อราจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1	65
ข7	การคำนวณทางสถิติของขนาดวงใสของเชื้อสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95	66
ข8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนสายพันธุ์ของเชื้อราจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีไซแลนร้อยละ 1	73
ข9	การคำนวณทางสถิติของขนาดวงใสของเชื้อสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางภาคผนวกที่

ข10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในเชิงปริมาณและเชื้อสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน 81

ข11 การคำนวณทางสถิติค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในเชิงปริมาณและเชื้อสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 81

ข12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเชื้อราสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในเชิงปริมาณและเชื้อสายพันธุ์แท้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีไซแลนร้อยละ 1 82

ข13 การคำนวณทางสถิติของขนาดวงใสของเชื้อสายพันธุ์กลายในเชิงปริมาณและสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีไซแลนร้อยละ 1 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 83

ข14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเชื้อราสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในเชิงปริมาณและเชื้อสายพันธุ์แท้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 84

ข15 การคำนวณทางสถิติของขนาดวงใสของเชื้อสายพันธุ์กลายในเชิงปริมาณและสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 84

ข16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในเชิงปริมาณและเชื้อสายพันธุ์แท้ในอาหาร CD-medium ที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน 85

ข17 การคำนวณทางสถิติค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในเชิงปริมาณและเชื้อสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงเชื้ออาหาร CD-medium ที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะโครงสร้างของ *Aspergillus* sp.	4
2	ลักษณะโคนิดิโอฟอร์และโคนิเดียของ *Aspergillus* sp.	4
3	เชื้อ *Aspergillus fumigatus*	5
4	โครงสร้าง D-Xylose	6
5	โครงสร้างไซแลน	6
6	สูตรโครงสร้างของไซแลน	7
7	ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน	7
8	ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง	8
9	โครงสร้างของพืชที่มีส่วนประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน	8
10	โครงสร้างของไซแลนที่ได้จากพืชและแสดงบริเวณที่เข้าจับของเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมในระบบเอนไซม์ไซลาโนไลติกโดยจุลินทรีย์	11
11	โครงสร้าง 3 มิติ ของเอนไซม์ไซลาเนส	24
12	มิวเตชั่นเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่ความแปรผันทางพันธุกรรมและความหลากหลายของสปีชีร์ในกระบวนการวิวัฒนาการ	29
13	การเกิดไทมีนไดเมอร์เนื่องจากผลของการฉายแสงอัลตราไวโอเลต การเกิดไดเมอร์แบบนี้จะขัดขวางการแบ่งตัวหรือการสร้างตัวแทนของ DNA และมีมิวเตชั่นเกิดขึ้นในที่สุด	29
14	แผนภาพแสดงวิธีการทำเรพลิคาเพลติง เพื่อแสดงให้เห็นว่ายีนมิวเตชั่นเกิดขึ้นในสภาพธรรมชาติปกติ ในที่นี้แสดงให้เห็นเพียง 4 โคโลนีเท่านั้นเพื่อความสะดวก ความจริงแล้วในจานอาหารแต่ละจานจะมีโคโลนีของแบคทีเรียประมาณ 50-100 โคโลนี	32
15	วิธีการตรวจสอบมิวเตชั่นเกี่ยวกับความต้องการชนิดของอาหารใน *Neurospora crassa*	33
16	การซ่อมแซมโมเลกุลของ DNA โดยวิธีโฟโตรีแอคติเวชั่น	35
17	การซ่อมแซมโมเลกุลของ DNA ที่ถูกทำลายโดยแสงอัตราไวโอเลต	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่

18	ร้อยละของการอยู่รอดของเชื้อ *A. fumigatus* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่เวลาต่างๆ ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}	44
18	ลักษณะวงใสของการย่อยไซแลนที่เกิดจากเอนไซม์ไซลาเนส	49
19	การเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* ในอาหาร CD-medium ที่พีเอช 11 ซึ่งมีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน	49
20	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *A. fumigatus* แต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนและพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 11	50
22	ลักษณะโคนิดิโอฟอร์และโคนิเดียของเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายที่ 7	50
23	การเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* ในอาหาร CD-medium ที่พีเอช 11 ซึ่งมีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	51
24	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *A. fumigatus* แต่ละสายพันธุ์ที่ คัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 11	52
25	เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *A. fumigatus* แต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนและซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 11	53

รูปภาคผนวกที่

ก26	กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษ อาจมีทางเลือกใหม่ในการใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพ ซึ่งได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ในขั้นตอนการฟอกสีของเยื่อกระดาษ โดยทั่วไปแล้วโรงงานผลิตกระดาษจะใช้สารเคมีในการฟอกสี (Prebleaching) เพื่อกำจัดลิกนินในเนื้อไม้ออกไป จะทำให้กระดาษมีความขาวสว่างเพิ่มมากขึ้น เช่น คลอรีน แต่เนื่องจากคลอรีนเป็นสารเคมีที่มีราคาถูก แต่มีผลกระทบต่อร่างกาย และเกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก ปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์มาใช้ เป็นตัวฟอกสารทางชีวภาพ (Bioleaching agent) (ภัทราพร และคณะ, 2543) โดยใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการฟอกสี แทนสารเคมีบางส่วนทำให้เกิดมลภาวะกับสิ่งแวดล้อมน้อยลง สภาวะของการฟองสีเยื่อกระดาษมีอุณหภูมิและสภาพความเป็นด่างที่สูง ดังนั้นในการที่ประยุกต์นำเอนไซม์ไซลาเนสมาใช้ในกระบวนการฟอกสีซึ่งต้องการเอนไซม์ไซลาเนสที่มีคุณสมบัติที่มีอุณหภูมิสูงและสภาพความเป็นด่างมากๆได้ และได้มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิที่สูงโดยทำการกลายพันธุ์และคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

โครงงานพิเศษนี้จึงทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* โดยทำการกลายพันธุ์ เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนต่อสภาวะที่เป็นด่างได้สูงกว่าสายพันธุ์แท้ เพื่อที่จะนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *A. fumigatus* โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนต่อสภาวะที่เป็นด่างของเชื้อ *A. fumigatus* ของสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกันสายพันธุ์แท้
3. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ชักนำให้เชื้อ *A. fumigatus* เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต
2. คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความคงตัวและมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนต่อสภาวะที่เป็นด่างมากกว่าสายพันธุ์แท้
3. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในอาหารแข็งและอาหารเหลว
4. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในอาหารเหลวที่มีไซแลนและซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูง
2. ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ทนต่อสภาวะที่เป็นด่างเพื่อที่จะมีประโยชน์ในการใช้งานได้ดีขึ้น
3. เป็นแนวทางในการวิจัยขั้นสูงต่อไป

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การเตรียมสารละลายสปอร์
2. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต
   - 2.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อหาร้อยละของการอยู่รอด
   - 2.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อหาสายพันธุ์กลายที่ทนต่อสภาวะที่เป็นด่าง
3. การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย
   - 3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณ
   - 3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพ
4. การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ (From-genus *Aspergillus*)

เป็นเชื้อที่ถิ่นที่อยู่กว้างขวางทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อน ในอากาศทุกหนทุกแห่งมีโคนิเดีย (Conidia) ของเชื้อราชนิดนี้ปะปนอยู่ นอกจากนี้ยังพบมากในดิน เจริญได้ในอินทรียวัตถุแทบทุกชนิดซึ่งให้เกิดผลดีและผลเสีย โดยเฉพาะในเขตร้อน เชื้อ *Aspergillus* ทำให้เครื่องหนัง เช่น กระเป๋า รองเท้าตลอดจนเสื้อผ้าเสียหาย *A. fumigatus, A. flavus*, *A. niger* และสปีชีร์อื่นๆ ทำให้เกิดโรค Aspergillosis ซึ่งมีอาการคล้ายวัณโรค บางชนิดทำให้หูอักเสบได้

เนื่องจากเชื้อนี้สร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด จึงมีประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมผลิตกรดต่างๆ อุตสาหกรรมผลิตเบียร์ และการผลิตยาปฏิชีวนะ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อนี้ คือไมซีเลียมของเชื้อนี้ประกอบด้วยเส้นใยที่แตกแขนงมากมาย เส้นใยมีผนังกั้นและไม่มีสี แต่ละเซกเมนต์ มีนิวเคลียสหลายอัน

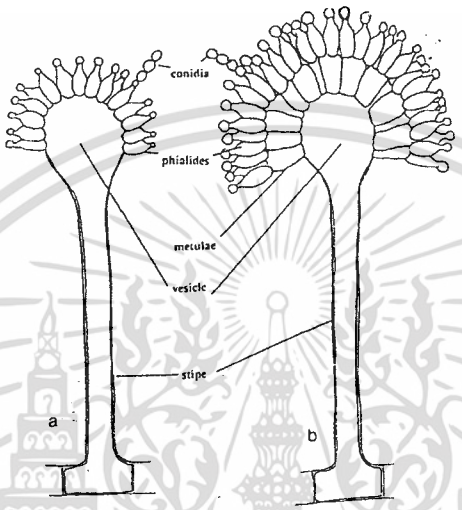
2.1.1 ลักษณะการสืบพันธุ์

มีทั้งการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ คือ ในราพวก *Aspergillus* (รูปที่ 1) จะมีส่วนของเส้นใยที่ทำหน้าที่สร้างโคนิดิโอฟอร์ (Conidiophore) (รูปที่ 2) เรียกว่า foot-cell โคนิดิโอฟอร์มีลักษณะยาวและตรง ส่วนปลายจะโป่งออกเรียกว่า vesicle รอบๆ vesicle จะมีโครงสร้างที่ยื่นออกมามีลักษณะคล้ายขวดเรียกว่า สเตอริกมาตา (sterigmata) โดยจะมีหนึ่งชั้นหรือสองชั้นก็ได้ขึ้นอยู่กับสปีชีร์ของเชื้อ เชื้อจะสร้างโคนิเดียในสเตอริกมาตา โดยโปรโตพลาสซึม (protoplasm) ที่ส่วนปลายสเตอริกมาตาจะมีผนังกั้นและเปลี่ยนแปลงรูปร่างจนมีลักษณะค่อนข้างกลม จากนั้นสร้างผนังล้อมรอบเจริญเป็นโคนิเดีย โคนิเดียที่ถูกสร้างทีหลังจะอยู่ลึกเข้าไปภายในสเตอริกมาตาและดันโคนิเดียอันแรกให้โผล่พ้นสเตอริกมาตาออกมา และถูกดันกันต่อมาเรื่อยๆ โดยที่โคนิเดียแต่ละอันยังไม่หลุดขาดออกจากกัน ทำให้ได้เป็นสายโซ่ของโคนิเดีย ดังนั้นโคนิเดียที่มีอายุน้อยๆ จึงอยู่ติดกับส่วนของสเตอริกมาตา

โคนิเดียของ *Aspergillus* มีสีต่างๆ กัน เช่น สีดำ น้ำตาล เหลือง เขียว ฯลฯ สีของโคนิเดียขึ้นอยู่กับธาตุอาหารบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น *A. niger* จะสร้างโคนิเดียสีดำ ถ้าอาหารนั้นมีธาตุทองแดงอยู่ไม่น้อยกว่า 2.5×10^{-6} กรัม ถ้ามีทองแดงต่ำกว่านี้สีของโคนิเดียจะอ่อนลง และถ้าไม่มีธาตุทองแดงอยู่ในอาหารเลย สีของโคนิเดียที่เคยเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือดำจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ยังศึกษาไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในเชื้อ *Aspergillus* หลาย

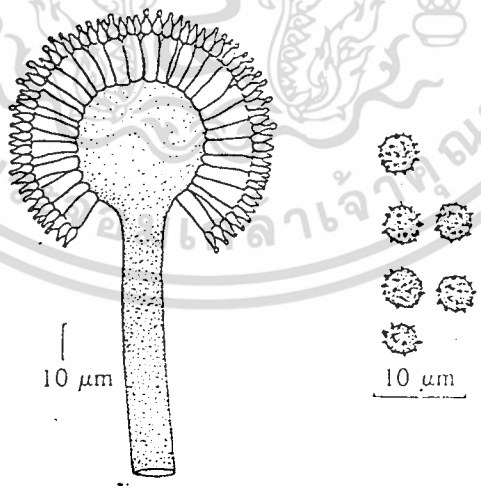
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สปีชีร์และเชื่อกันว่าเหล่านั้นสูญเสียความสามารถในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศไปแล้ว แม้แต่ในสปีชีร์ที่สร้างแอสคัส (ascus) ก็ยังพบแนวโน้มว่าการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศกำลังจะเสื่อมไป จากการศึกษาพบว่ามีระยะพลาสโมแกมมี่ (plasmogamy) เกิดขึ้นจากการผสมของแกมมีแทนเจียม (gamythangium) ไปจนถึงบางชนิดที่ไม่สร้างแอนเธอริเดียม (antheridium) และบางชนิดสร้างแอสคัสจากแอโคโกเนียม (ascogonium) เพียงอย่างเดียวโดยไม่ต้องมีแอนเธอริเดียม



รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของ *Aspergillus* sp.

ที่มา : Samson และ Ellen (1988)

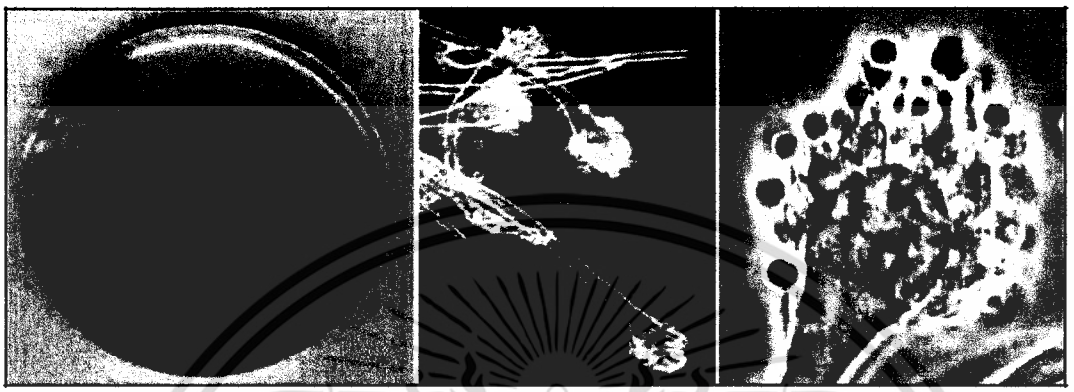


รูปที่ 2 ลักษณะโคนิดิโอฟอร์และโคนิเดียของ *Aspergillus* sp.

ที่มา : Samson และ Ellen (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A. fumigatus (รูปที่ 3) มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูง ๆ ได้ และเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส และสามารถพบได้โดยทั่วไป ในทุกๆ ที่โดยเฉพาะในดินและในสารอินทรีย์ที่กำลังย่อยสลาย แตกหักพุพัง จุลินทรีย์สายพันธุ์นี้เป็นตัวสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในคน และเป็นสาเหตุหลักของโรค Aspergillosis (พิไลพรรณ, 2525)



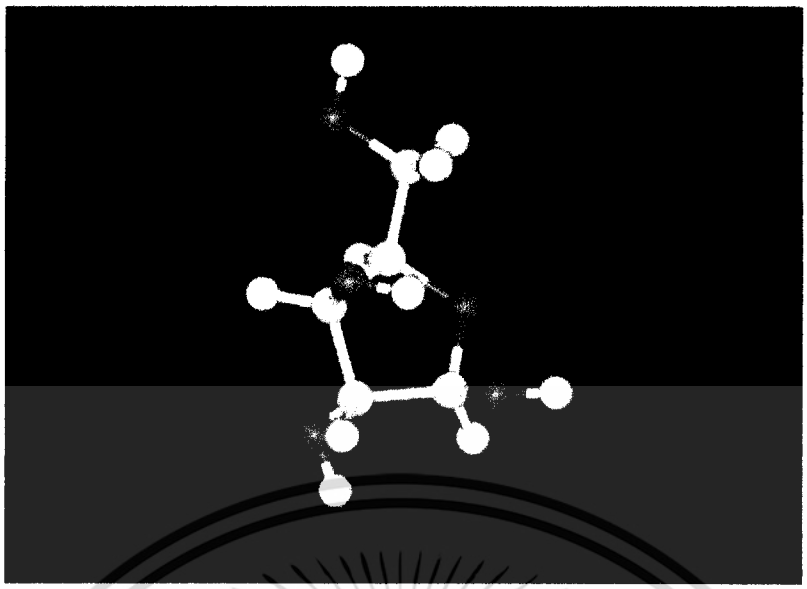
รูปที่ 3 เชื้อ *Aspergillus fumigatus*
ที่มา: http://helios.bto.ed.ac.uk/btomicrobes/thermo.htm

2.2 โครงสร้างและลักษณะของไซแลน

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ของน้ำตาลดีไซโลส (D-xylose) (รูปที่ 4) ที่เป็นส่วนประกอบทั้งในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไซโลดิก (β-1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก (backbone) (รูปที่ 6) และมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่น หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) สายสั้นๆ มาเชื่อมเป็นสายโซ่กิ่ง ยกเว้นไซแลนในพืชบางชนิด เช่น หญ้าเอสาโต (esparto gress) ลำต้นของใบยาสูบ (tobacco stalk) จะมีโครงสร้างเป็นไซแลนชนิดที่ไม่โซ่กิ่ง ซึ่งสายโซ่กิ่งของไซแลนอาจประกอบด้วยหมู่อะราบิโนซิล (arabinosyl) กลูคูโรนิล (glucuronyl) หรืออะเซตทิล (acetyl)

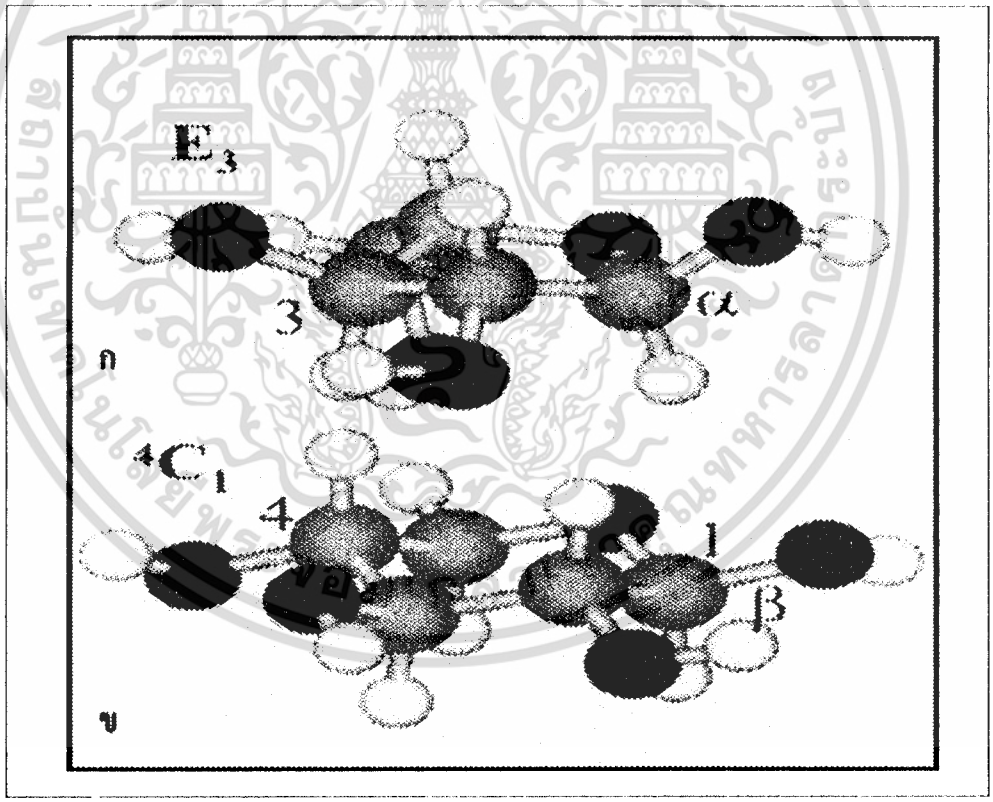
ไซแลนที่พบในส่วนเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้ออ่อน ส่วนใหญ่จะเป็นอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (rabinoglucuronoxylan) ซึ่งมีสายหลักเป็นเบต้า-1,4-ดี-ไซโลไพราโนซิล (β-1,4-D-xylopyranosyl) ที่มี 4-โอ-เมทธิล-แอลฟา-กลูคูโรนิคแอซิก (4-O-methyl-α-D-glucuronic acid) เชื่อมต่อที่ O ตำแหน่ง 2 และมีแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนส (α-L-arabinofuranose) (รูปที่ 5) เชื่อมต่อที่ O ตำแหน่ง 3 (รูปที่ 7) จำนวนหน่วยไซโลสที่มาเชื่อมกัน (degree of polymerization) อยู่ในช่วง 70-130 หน่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 โครงสร้าง D-Xylose

ที่มา: www.nakamura.bio.titech.ac.jp/ xyn/xyn.html



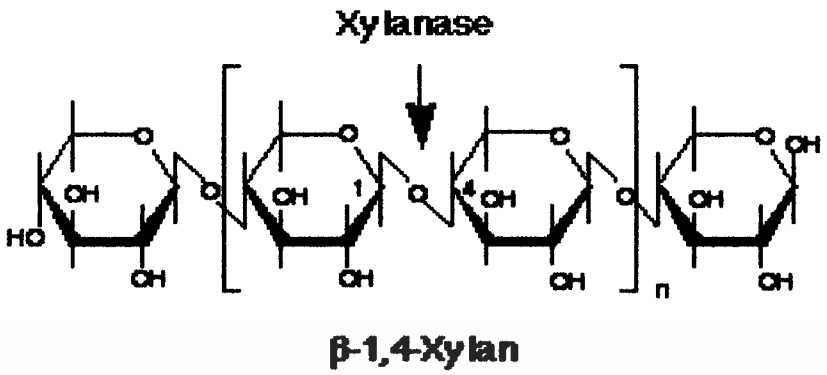
รูปที่ 5 โครงสร้างไซแลน

รูป ก. : แอลฟา-แอล- อะราบิโนฟูราโนส (α-L-arabinofurannose)

รูป ข. : เบต้า-1,4-ดี-ไซโลไพราโนส (β-1,4-D-xylopyranose)

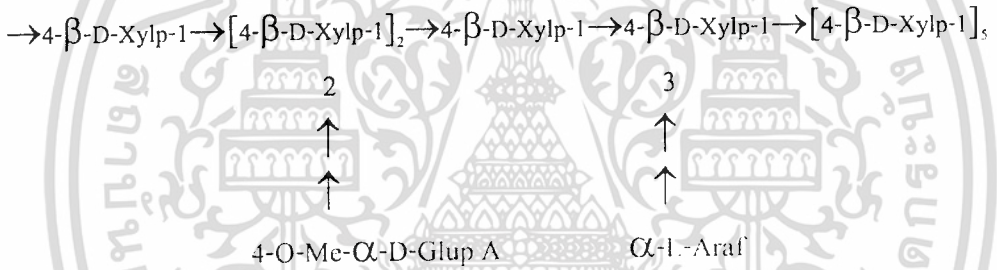
ที่มา : http://www.lsbu.ac.uk/water/hyara.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 สูตรโครงสร้างของไซแลน

ที่มา : www.nakamura.bio.titech.ac.jp/ xyn/xyn.html

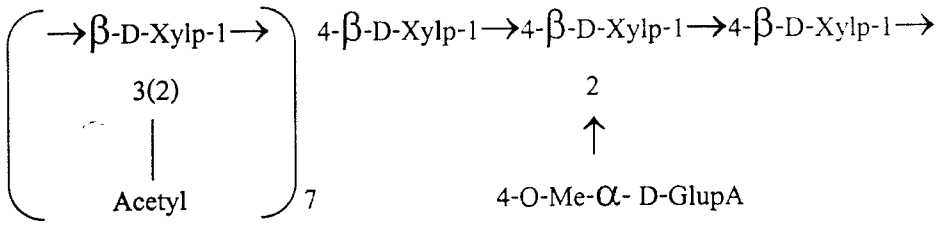


รูปที่ 7 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน

ที่มา : Biely (1985)

ไซแลนที่พบในส่วนเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้อแข็ง ส่วนใหญ่จะเป็นกลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) ซึ่งมีสายหลักประกอบด้วยเบต้า-ดี-ไซโลไพราโนส (β-D-xylopyranose) เชื่อมต่อด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไซโลติกและทีหมู่อะเซติล (acetyl) เป็นสายโซ่กิ่งทุกๆ 7-10 หน่วยของสายหลักที่ตำแหน่ง โอ-2 หรือ โอ-3 ส่วนโอ-4-เมทธิล-แอลฟา-กลูคูโรนิคแอซิก (4-O-methyl-α-D-glucuronic acid) เชื่อมต่อด้วยพันธะเบต้า-1,2 ประมาณทุกๆ หน่วยของไซแลน (รูปที่ 8) จำนวนหน่วยไซโลสที่มาเชื่อมกัน อยู่ในช่วง 150-200 หน่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

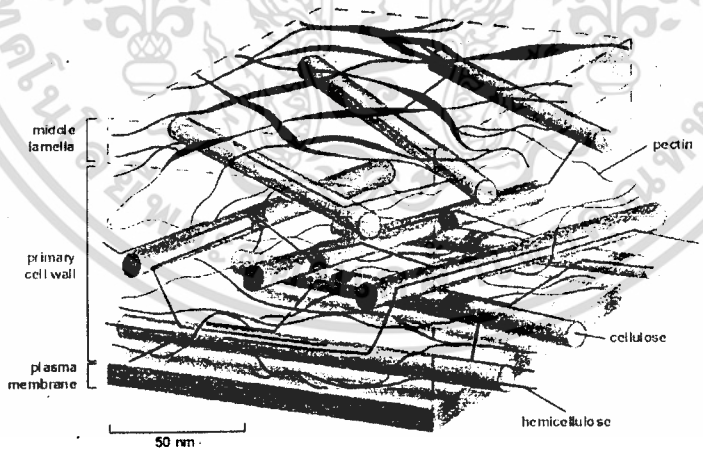


รูปที่ 8 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง
ที่มา : Biely (1985)

เนื่องจากองค์ประกอบหลักของไซแลน คือน้ำตาลดีไซโลส (D-xylose) เป็นสารให้ความหวานสามารถเรียกอีกชื่อหนึ่งได้ว่า wood sugar มีสูตรเคมี CHO มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 150.13 มักไม่ค่อยพบในรูป monomer มีจุดหลอมเหลว 144-145 องศาเซลเซียส น้ำตาลชนิดนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายประการ เช่น ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ผลิตเชื้อเพลิง เช่น เอทานอล บิวทานอล ผลิตไซลิทอลเป็นต้น (Biely, 1985)

2.3 แหล่งที่พบไซแลน

พบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิด ซึ่งโครงสร้างของพืชจะประกอบด้วย ส่วนประกอบหลัก 3 ส่วน ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน และไซแลนจะเป็นส่วนประกอบหลักในส่วนของเฮมิเซลลูโลส (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 โครงสร้างของพืชที่มีส่วนประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน
ที่มา : www.enzymes.co.uk/Basics/cell_wall.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซแลนจึงสามารถพบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิด แต่ในปริมาณไซแลนในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามโครงสร้างของการเจริญและสภาพแวดล้อม โดยส่วนใหญ่ใช้ไซแลนจากพืชไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน ได้แก่ ไซแลนจากต้นโอ๊ค ไซแลนจาก Birchwood (Biely, 1985) พืชล้มลุกในผนังเซลล์ชั้นแรกของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวมทั้งในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว ซังข้าวโพด เปลือกเมล็ดทานตะวัน และในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่างๆ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการลอกเนื้อไม้เพื่อทำเยื่อกระดาษ (Wong และคณะ, 1988)

2.3 การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถย่อยสลายโดยสารเคมี (Chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน

2.4.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยสารเคมี สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

2.4.1.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด

การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดเพื่อผลิตน้ำตาลไซโลสเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษ เช่น เฟอรูรัล ซึ่งมีผลต่อการนำไปเลี้ยงจุลินทรีย์ และยังต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดและอุณหภูมิสูงได้

2.4.1.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง

การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทำกระดาษในขั้นตอน kraft cooking ซึ่งจะนำชิ้นของเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นเพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ยและกำจัดลิกนินที่อยู่ในชั้นของลิกโนเซลลูโลสออกบางส่วน หลังจากนั้นจะนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยการใช้สารเคมีที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (Chlorinedioxide) ก๊าซคลอรีน (Cl_2) เป็นต้น ที่อุณหภูมิสูงไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่างไม่ต่ำกว่า 10 แต่ทำให้เกิดสารพิษพวกไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอไรด์ที่เป็นพิษชนิดอื่นๆ ด้วย

2.4.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะมากกว่าการใช้สารเคมีในการย่อยสลาย เนื่องจากภาวะที่ใช้ขณะทำงานเป็นกลาง นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษและสารเคมีตกค้างทำให้สามารถนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปใช้ผลิตสารอื่นๆ ต่อไป เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการ คือใช้ในการฟอกสีเยื่อกระดาษ ลดความหนืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะ เบต้า-1,4-ของสายหลักให้ได้ไซโลสมีอยู่ 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ

2.4.2.1 เอนโดไซลาเนส (endo- xylanase) หรือ 1,4–เบต้า-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส(1,4-β-D-xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ1,4–เบต้า-ดี-ไซโลซิดิกแบบสุ่ม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่ากลไกแบบเอนโด (endo-mechanism) ได้ไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ เป็นผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้าย

2.4.2.2 เบต้าไซโลซิเดส (β-xylosidase) หรือ 1,4–เบต้า-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4 -β-D-xylohydrolase, EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้ย่อยสลายพันธะ1,4 –เบต้า-ดี-ไซโลฟิวราโนซิล (β-D-xylofuranosly) ทีละ 1 หน่วยจากปลายสายด้านนอน-รีดิวซ์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่า กลไกแบบเอคโซ (exo-mechanism) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้าย

นอกจากนี้การย่อยไซแลนให้สมบูรณ์ต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น

1. เอนไซม์แอลฟา-แอล-อะราบิโนซิเดส (α-L-arbinosidase, EC 3.2.1.55) จะย่อยสลายหมู่นอน-รีดิวซ์ ที่พันธะแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิล (α-L-arbinofuranosly) ของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์อะราบิแนน (α-L-arbinofuranoside arabinan) และอะราบิโนกาแลคแทน (arabinogalactan) ได้น้ำตาลไซโลสและน้ำตาลที่เป็นพันธะกิ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

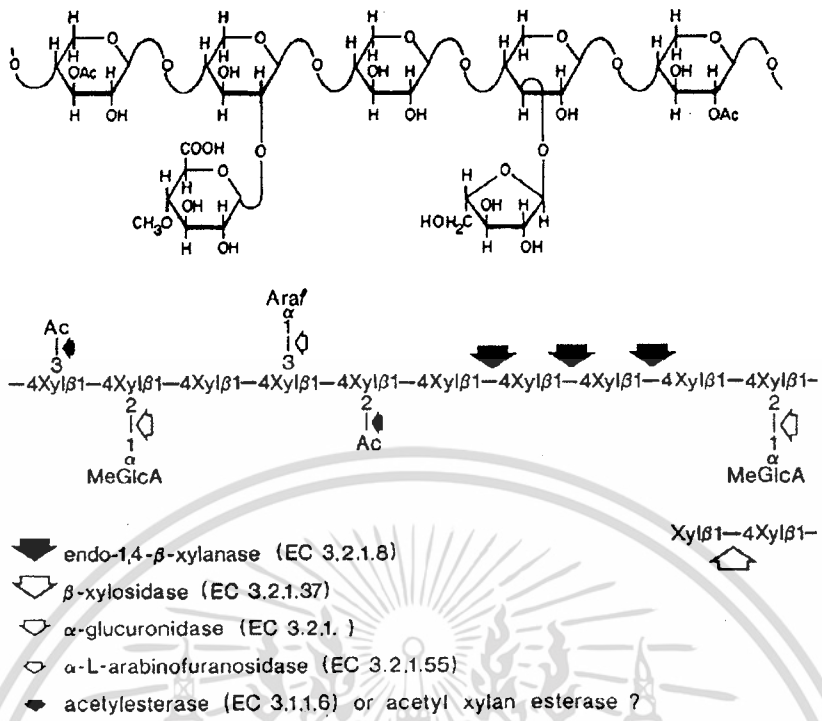
2. เอนไซม์แอลฟา-ดี-กลูคูโรโนซิเดส (α-D-gluronosidase, EC 3.2.1.139) จะย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2-ใน 4-โอ-เมทธิล-แอลฟา-กลูคูโรนิคแอซิก (4-O-methyl-α-D-glucuronic acid)

3. เอนไซม์อะเซตติลไซแลนเอสเทอเลส (acetylxylanesterase) จะย่อยสลายพันธะเบตา-1,2-และเบตา-1,3 ที่เชื่อมหมู่อะเซตติลกับสายหลัก ได้กรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (ชนัญญา และคณะ, 2545)

จากเอนไซม์ในกลุ่มในกลุ่มนี้ย่อยสลายไซแลนทั้งหมด สามารถแสดงแผนภาพรวมการทำงานของเอนไซม์ (รูปที่ 10)

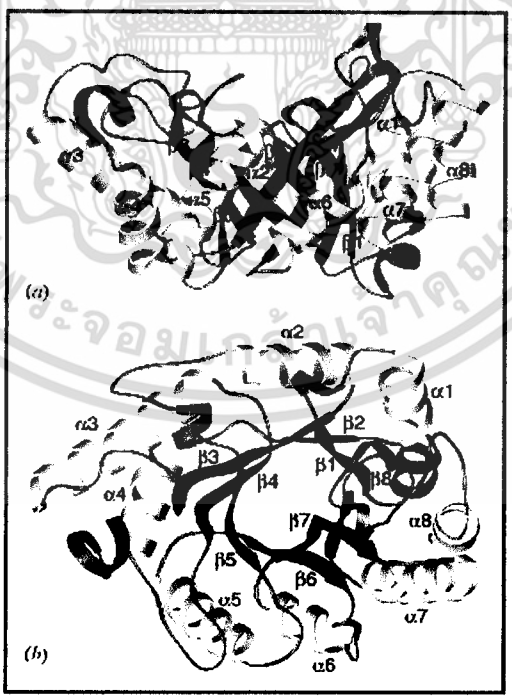
กระบวนการการย่อยสลายไซแลนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จะเรียกว่า เอนไซม์ไซลาโนไลติก (xylanolytic enzyme) เกิดในกระบวนการหมัก โดยเกิดจากการสลายแขนงของหมู่อะซิติลในโครงสร้างของไซแลนโดยใช้เอนไซม์ทำการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนโดเบตาไซลาเนส (endo-1,4-β-xylanase) หรือไซลาเนสที่เข้าจับที่พอลิแซคคาไรด์ และเบตาไซโลซิเดส (β-xylosidase) ที่ไฮโดรไลซ์ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharde) ไปเป็นดี-ไซโลส (D-xylose) (Biely, 1985) (ตารางที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 โครงสร้างของไซแลนที่ได้จากพืชและแสดงบริเวณที่เข้าจับของเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมในระบบเอนไซม์ไซลาโนไลติกโดยจุลินทรีย์

ที่มา : Biely (1985)



รูปที่ 11 โครงสร้าง 3 มิติ ของเอนไซม์ไซลาเนส

ที่มา : www.cid.csic.es/homes/xgricri/prtease.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ความสามารถในการหมักจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยเกิดผ่านระบบเอนไซม์ไซลาโนไลติก

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

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

ที่มา : Biely (1985)

2.5 ประโยชน์ของไซแลน

1. ใช้ในการหมักสำหรับผลิตเชื้อเพลิง เช่น เอทานอล (Biely, 1985)
2. ใช้ในการผลิตสารเคมี เช่น สารทำละลาย กรดอินทรีย์ (Biely, 1985)
3. อาหารสำหรับคนและสัตว์ ได้แก่ อาหารเสริมโปรตีน และอาหารเสริมเส้นใย (Biely, 1985)
4. ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ เป็นตัวชักนำที่ดีในการผลิตเอนไซม์ (Siedenberg และคณะ, 1998)

2.6 แหล่งที่พบเอนไซม์ไซลาเนส

จะพบเอนไซม์ไซลาเนสได้ทั่วในธรรมชาติ อาจจะพบในแบคทีเรียที่อยู่ในทะเลและพื้นดิน แบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง สาหร่ายทะเล โปรโตซัว สัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง หอยทาก แมลงและเมล็ดพืชที่กำลังงอก นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในจุลินทรีย์จำพวกเชื้อรา ยีสต์ และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย (Biely, 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

2.7.1 สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อมิวแตนท์ที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

โดยทั่วไปกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรย์ที่เหมาะสมอยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แต่สำหรับพีเอชที่เหมาะสมพบว่าเอนไซม์ไซลาเนสจากแบคทีเรียและแอคติโนมัยซิสมีพีเอชที่เหมาะสมค่อนข้างเป็นกลางแต่ของเชื้อรา ค่อนข้างเป็นกรด ส่วนความคงตัวต่อพีเอชและความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์จะต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* GCBCX-20 ที่ทำการกลายพันธุ์แล้วมีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมงให้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 250 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับเวลาอื่นๆและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส มีพีเอชเท่ากับ 4.5-5 และปริมาตรของอาหารหมักเท่ากับ 25 ลิตรสภาวะต่างๆเหล่านี้เป็นสภาวะที่มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงที่สุด (Ikram และคณะ, 2004)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อที่ทำการกลายพันธุ์ *Aspergillus niger* GCBCX-45 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 4.5 และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คือ meat extract ความเข้มข้นร้อยละ 1 จะให้การผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด ถ้าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนสูงจะเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสลดลง (Ikram และคณะ, 2002)

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่ทำให้กลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสคือไซแลน แต่ว่าไซแลนจะมีราคาแพงอาจจะเลือกของเหลือทิ้งทางการเกษตรแทนซึ่งรำข้าวสาลีที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีเท่ากับการใช้ไซแลน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ เปปโตน (peptone) อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมคือ 3 และ 3.5 พีเอชสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อบ่มเป็นเวลา 96 ชั่วโมงเท่ากับ 6.1-9.2 น้ำมันมะกอกช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ได้สูงถึงร้อยละ 40 (Kuhad และคณะ, 1998)

2.7.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส และคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยวิธีการใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid) วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากการย่อย oat spelt xylan และคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสตามลำดับ

1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ กำหนดได้จากปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยและปลดปล่อยน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อ 1 นาทีของการเกิดปฏิกิริยา (Christov และคณะ, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากการบ่ม ส่วนของฟิวเตรต (filtrate) ที่ผ่านการเจือจางที่เหมาะสมปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรด้วยสารแขวนลอยของไซแลน 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 6.0) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ตามวิธีของ Miller (1959) โดยใช้สารละลายไซโลสเป็นมาตรฐานในการอ้างอิง (Milagres และคณะ, 1993)

จากการศึกษาราสายพันธุ์ *Penicillium Janthinellum* ที่ถูกแยกมาจากวัสดุที่ทำจากพืชซึ่งถูกพบในรังปลวก เมื่อเปรียบเทียบ *Trichoderma reesei* ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูง โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจะถูกเหนี่ยวนำโดยไซแลน น้ำตาลชานอ้อย หรือน้ำตาลไซโลสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน การเหนี่ยวนำโดยถูกย่อยกลายเป็นน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคส มีสภาวะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 5.5 1 ยูนิต (U) หมายถึงความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับเสตรทให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้วิธีวิเคราะห์แบบมาตรฐาน (Milagres และคณะ, 1993)

2.7.3 ประโยชน์ของไซลาเนส

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

2. การปรับปรุงเส้นใย เพื่อให้เส้นใยมีคุณภาพดีขึ้น (Kuhad และคณะ, 1998)

3. การสกัดกาแฟโดยใช้ขั้นตอนการย่อยเปลือกกาแฟ (Wong และ Saddler, 1992; Kuhad และคณะ, 1998)

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

5. ใช้ในการปรับปรุงที่ดินสำหรับทำการเกษตรและการปลูกข้าวโดยเอนไซม์ไซลาเนสจะไปช่วยเพิ่มแร่ธาตุ ทำดินมีความอุดมสมบูรณ์เหมาะแก่การเพาะปลูก(Wong และ Saddler, 1992; Kuhad และคณะ, 1998)

6. การกำจัดส่วนที่เหลือจากการเกษตร โดยใช้กระบวนการหมักสภาวะอาหารแบบแข็ง (Biely, 1985; Smith และ Wood, 1991; Myburgh และคณะ, 1991)

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

8. การผลิตอาหารที่เพิ่มไฟเบอร์หรือคล้ายเนื้อสัตว์ในอาหารเสริมสุขภาพ และเพิ่มโปรตีนในอาหารและอาหารสัตว์ (Kuhad และคณะ, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. การผลิตเชื้อเพลิง เช่น ไซลิทอล เอทานอล สารทำละลายและกรดอินทรีย์ (Biely, 1985; Singh และคณะ, 1995)

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

2.8 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในระดับอุตสาหกรรม

2.8.1 การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการฟอกเยื่อกระดาษเพื่อกำจัดลิกนินและลดการใช้คลอรีน

2.8.1.1 การผลิตเยื่อกระดาษ

การผลิตกระดาษมีหลายวิธี การที่จะใช้วิธีใดนั้นขึ้นกับว่าเยื่อกระดาษที่ได้จะนำไปทำกระดาษชนิดใด นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ กรรมวิธีใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษแบ่งตามกรรมวิธีใหญ่ๆ ดังนี้

1. กรรมวิธีใช้กำลังกล (mechanical process) วิธีใช้แรงอัด อัดท่อนไม้ที่ปลอกเปลือกแล้วให้สัมผัสหินบด (grinding stone) ซึ่งผิวหน้าของหินบดมีลักษณะมีคม เช่นเดียวกับหินลับมีด ไม้จะถูกบดออกมาเป็นชิ้นเล็กๆ เครื่องจักรที่ผลิตเยื่อชนิดนี้ เรียกว่า เครื่องบด (grinder) เนื่องจากขณะที่ไม้ถูกฝนจะมีความร้อนจากการเสียดสีเกิดขึ้น อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส จึงจำเป็นต้องพ่นน้ำให้เป็นละอองตลอดเวลา และส่วนหนึ่งของหินบดจะหล่ออยู่ในอ่างน้ำ เยื่อที่ถูกบดออกมาจะอยู่ในอ่างนี้ และจะถูกระบายออกจากอ่างน้ำตลอดเวลา การผลิตโดยวิธีนี้ให้ผลผลิตสูงมากถึงร้อยละ 90-95 โดยน้ำหนักไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ แต่คุณสมบัติของกระดาษที่ได้จากการผลิตเยื่อกระดาษวิธีนี้มีคุณภาพต่ำ จึงใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตกระดาษบางชนิด จะให้คุณสมบัติด้านทึบแสง เส้นใยเดี่ยวซึ่งไม่ค่อยสมบูรณ์อาจมีการฉีกขาดและยังคงมีลิกนินตกค้างอยู่มาก ทำให้พันธะระหว่างเส้นใยต่ำไม่เหมาะสมที่จะนำไปทำกระดาษที่ต้องรับแรงดึงสูงแต่มีราคาถูก เช่น กระดาษห่อกล่อง ซึ่งไม่มีความจำเป็นต้องเก็บไว้นานๆ

2. กรรมวิธีทางเคมี (chemical process) วิธีนี้ใช้สารเคมีบางชนิดละลายลิกนินที่ทำหน้าที่เป็นการเชื่อมเซลล์เนื้อไม้เข้าด้วยกัน ทำให้แต่ละเซลล์ของไม้แยกหลุดออกจากกัน กรรมวิธีทางเคมีนี้แบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำยาที่ต้องการจึงจำเป็นต้องเลือกด่างที่เหมาะสม ในการย่อยกระดาษนั้นชิ้นไม้จะถูกลำเลียงลงไปสู่ถังย่อยพร้อมด้วยน้ำยาสำหรับย่อย จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง แล้วแต่ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ วิธีการต้มและชนิดของถังย่อย ลิกนินในไม้จะรวมกับไฮโดรเจนซัลไฟล์เกิดเป็นลิกโนซัลเฟอร์เนต ซึ่งละลายน้ำได้จึงทำให้ไฟเบอร์ของไม้หลุดออกจากกันเป็นชิ้นไม้ เมื่อถูกย่อยดีแล้วน้ำยาจะระบายออกจากถังย่อย และบางครั้งยังสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกสำหรับชิ้นไม้จะถูกระบายออกจากถังย่อย

การร่อนเยื่อ (screening)

ชิ้นไม้ที่ย่อยแล้วจะถูกล้างด้วยน้ำเพื่อล้างเอาน้ำยาออกและกรองด้วยตะแกรงแบบต่างๆ เพื่อเอาส่วนที่เป็นตาไม้ซึ่งไม้ถูกย่อย หรือสิ่งสกปรกต่างๆ ออก การกรองทำหลายขั้นตอนด้วยกัน เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสิ่งสกปรกเจือปนอยู่ เยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีซัลไฟล์มีสีค่อนข้างจางเกือบเป็นสีขาว สามารถนำไปทำเป็นกระดาษบางประเภทได้ เช่น กระดาษหนังสือพิมพ์รายวัน รายปักษ์ โดยเฉพาะเยื่อกระดาษที่ทำจากไม้ที่มียาง ได้แก่ ไม้สน สำหรับคุณสมบัติของเยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีอื่นก็คือ เมื่อนำไปทำกระดาษแล้วให้ความแข็งแรงกว่าเยื่อกระดาษที่ได้จากวิธีกล แต่ผลผลิตที่ได้ประมาณร้อยละ 50 โดยน้ำหนักไม้ที่นำมาใช้

2.2 กรรมวิธีซัลเฟต (sulphate process) หรือเรียกอีกอย่างว่า กรรมวิธีคราฟท์ (kraft process) การที่เรียกอย่างนี้เพราะว่ามีการนำโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำยาที่ใช้แล้วกลับมาใช้อีกจะต้องเติมโซเดียมซัลเฟตลงไป จึงเรียกกรรมวิธีนี้ว่า กรรมวิธีซัลเฟต หรือเนื่องจากว่าเยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีนี้มีลักษณะเหนียวและแข็งแรง สารเคมีที่ใช้ในกรรมวิธีนี้ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์กับโซเดียมซัลเฟตเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้อาจมีโซเดียมคาร์บอเนตและโซเดียมซัลเฟตบ้างเล็กน้อย การย่อยเยื่อกระดาษทำในถังย่อยเช่นเดียวกับกรรมวิธีซัลไฟต์ อุณหภูมิที่ใช้ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง กรรมวิธีนี้ใช้ได้กับเยื่อไม้ทุกชนิดทั้งไม้สนและไม้เนื้อแข็ง เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้จะมีลักษณะสีคล้ำ แต่เหนียว สามารถนำไปใช้ทำกระดาษที่ต้องการความแข็งแรงมากๆ ได้ดี เช่น ถุงกระดาษใส่ซีเมนต์ ปุ๋ย ถุงใส่ของ กล่องกระดาษ ส่วนสีสามารถทำให้ขาวได้ด้วยฟอกสี

2.3 กรรมวิธีโซดา (soda process) เป็นกรรมวิธีทางเคมีวิธีแรกที่ค้นพบและนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมโดยชาวอังกฤษ กรรมวิธีนี้ใช้สารเคมีที่สำคัญ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรรมวิธีนี้ย่อยไม้เนื้อแข็งได้ดีกว่าไม้เนื้ออ่อน เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้ให้ผลผลิตน้อย คือ ประมาณร้อยละ 50 โดยน้ำหนักของไม้ และความแข็งแรงของเยื่อเมื่อนำมาทำกระดาษค่อนข้างต่ำ ต่ำกว่าเยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีซัลเฟต และมีสีน้ำตาลคล้ำ แต่อาจทำให้ขาวได้โดยการฟอกสี การย่อยเยื่อกระดาษจะย่อยในถัง ปริมาณสารเคมีที่ใช้ คือโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 15-20 ต่อน้ำหนักแห้งของไม้ ที่ใช้ 160-170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้และผลผลิตที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กระบวนการฟอกสีกระดาษ

สำหรับขั้นตอนการฟอกสีกระดาษมีจุดประสงค์เพื่อกำจัดลิดนินออกไป ซึ่งเยื่อมีความขาวสว่างมากขึ้นโดยใช้สารเคมีทำปฏิกิริยากับลิกนินในเนื้อไม้ การฟอกสีเยื่อกระดาษประกอบด้วยหลายขั้นตอนมีชื่อเรียกตามสารเคมีที่ใช้ในการฟอกสีเรียกตามลำดับตัวอักษรตัวแรกของแต่ละขั้นตอนโดยสารเคมี สัญลักษณ์ และชื่อขั้นตอนการฟอกต่างๆ ดังนี้

สารเคมี	**สัญลักษณ์**	**ชื่อเรียกขั้นตอนการฟอก**
คลอรีน	C	ขั้นตอนคลอริเนชั่น (chlorination stage)
โซเดียมไฮดรอกไซด์	E	ขั้นแอกแทรกชั่น (extraction stage)
แคลเซียมไฮเปอร์คลอไรด์	H	ขั้นไฮเปอร์คลอไรด์ (hypochlorite stage)
คลอรีนออกไซด์	D	ขั้นคลอรีนออกไซด์ (chlorinedioxide stage)
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	P	ขั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide stage)
ออกซิเจน	O	ขั้นออกซิเจน (oxygen stage)
โอโซน	Z	ขั้นโอโซน (ozone stage)

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

เยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ฟอกจะมีสีคล้ำ โดยเฉพาะเยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีซัลเฟตและโซดา การนำไปใช้จำเป็นต้องฟอกสีก่อน เว้นแต่ในกระดาษบางชนิดที่ถือว่าสีมีความสำคัญเป็นอันดับรองๆ ลงมาจึงไม่จำเป็นต้องฟอกสีก่อน เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีซัลไฟต์ปกติสีจะจางค่อนข้างขาว และที่ได้จากวิธีกลเหมือนสีของไม้ แต่เนื่องจากว่าสารเคมีที่ใช้ต่างๆ ปนอยู่ เช่น แทนนิน ลิกนิน เรซิน ดังนั้นเมื่อทำเป็นกระดาษแล้ว เมื่อเก็บไว้นานๆ หรือถูกแสงแดดสีจะเปลี่ยนไป ซึ่งเยื่อกระดาษชนิดนี้เหมาะสำหรับใช้ทำกระดาษพิมพ์หนังสือคุณภาพต่ำหรือกระดาษห่อของ การฟอกสีเยื่อกระดาษมีหลักในการพิจารณาขั้นตอนใหญ่ๆ คือ ถ้าการฟอกนั้นต้องเอาลิกนินและสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67303

ให้สารต่างๆ ออกจากเยื่อกระดาษ ในกรณีนี้จะฟอกเยื่อกระดาษที่มีลิกนินออกจากไม้ทำได้โดยใช้เทคนิคการต้ม (cooking) ไม้ดีกว่าการฟอก (สำนักงานเลขานุการโครงานฉลากเขียว, 2540)

จากการศึกษาโดยนำจุลินทรีย์ 7 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาโดยเชื้อทั้ง 7 สายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลส (cellulose-free xylanase) โดยนำไปใช้ในขั้นตอนการบำบัดในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษซัลไฟต์ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ได้มีการแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ รำข้าวงสาลี แกนฝักข้าวโพด ไซแลนจากข้าวโอ๊ต และน้ำทิ้งจากโรงงานฟอกสี พบว่าการเจริญของเชื้อ *Aspergillus foetidus* ATCC 14916 บนแกนฝักข้าวโพดสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ปริมาณ 547.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่มีกิจกรรมของเซลลูเลสเท่ากับ 6.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 และ *Gliocladium viride* CBS 658.70 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสได้ในปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงบนไซแลนจากข้าวโอ๊ต และทำการคัดเลือกเชื้อที่ไม่มีการผลิตเซลลูเลสออกมาด้วย จากการศึกษาจึงใช้ที่แยกได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 และ *Gliocladium viride* CBS 658.70 มาหาคุณสมบัติของค่าพีเอชที่เหมาะสมและอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในเป็นมาตรฐานของสภาวะที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้กับเยื่อกระดาษ พบว่าความสามารถของไซลาเนสทั้ง 2 ชนิดทำให้มีค่าความสว่างมากขึ้น 1.4 จุด และสามารถกำจัดเฮมิเซลลูเลสจากเยื่อกระดาษได้ร้อยละ 7 (Christov และคณะ, 1999)

เนื่องจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษส่วนใหญ่ใช้สารคลอรีนในการฟอกสีกระดาษเพราะมีราคาถูกแต่มีผลข้างเคียงมากมาย โดยโรงงานที่ใช้สารคลอรีนฟอกสีกระดาษจะถ่ายเทสารไดออกซิน (dioxin) ซึ่งไดออกซินจะไปจับกับดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดอาการปวดตามข้อ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่ทำงานตามปกติทั้งยังมีผลให้ตัวอ่อนของสัตว์เป็นโรคบวม และยังมีการวิจัยพบสารไดออกซินในน้ำนมมารดาอีกด้วย ทั้งนี้ยังมีการใช้สารประกอบคลอรีนในรูปที่สลายตัวได้ง่าย คือ สารเคมีไดออกไซด์ (chlorine dioxide: ClO_2) เป็นก๊าซที่มีสีเหลืองแดง ซึ่งมีผลในการฟอกสีมากกว่า 2 เท่าของคลอรีน (Brady และคณะ, 1993) ปัจจุบันนี้เพื่อให้ได้เยื่อกระดาษที่ขาว และมีความบริสุทธิ์มากขึ้นจึงใช้สารเคมีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ คลอรีน โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไฮเปอร์คลอไรด์ คลอรีนไดออกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ขั้นตอนในการฟอกสีตลอดจนสภาวะต่างๆ ในการฟอกสีที่แตกต่างกันไป โดนคำนึงถึงความสะอาดของเยื่อกระดาษที่ได้ และเยื่อที่ได้รับความเสียหายเนื่องจากการฟอกน้อยที่สุด

การผลิตเยื่อกระดาษและการฟอกสีโดยกระบวนการทางเคมีนั้น ถึงแม้จะมีข้อดี คือได้เยื่อที่มีคุณภาพสูงภายในระยะเวลาสั้นๆ แต่ต้องอาศัยเงินทุนจำนวนมหาศาลในแง่ของเครื่องจักรและสารเคมี นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารเคมีพิษที่เกิดจากกกระบวนการทั้งกรรมวิธีทางกลและเคมี ออกมามาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากกระบวนการข้างต้นจะเห็นได้ว่าลิกนินถูกสกัดออกมาในรูปของ chloroligin และ chlorinated phenol สารดังกล่าวจะออกมากับน้ำทิ้งจากกระบวนฟอกเยื่อ สาร chlorinated phenol และ guariacol เป็นสารที่มีพิษจากกระบวนการผลิตเยื่อเช่นเดียวกัน เช่น ในน้ำทิ้งออกมาจากขั้นตอนแรกของวิธีการสกัดด้วยด่างจะสารพวกคลอรีนที่เป็นสารอินทรีย์มากมาย ซึ่งมี chlorinated phenol เป็นสารประกอบหลัก และมีความจำเป็นต้องมีการบำบัดก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำและอาจก่อให้เกิดมลภาวะทางน้ำตามมาอีกด้วย ปัญหาของสีในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษเป็นปัญหาที่สำคัญปัญหาหนึ่งซึ่งเกิดจาก 3 กระบวนการที่แตกต่าง คือการผลิตโดยกระบวนการทางเคมี การฟอกสีเยื่อกระดาษและการผลิตกระดาษสี กระบวนการฟอกสีจะผลิตสีออกมาปริมาณมากกว่ากระบวนการทำเยื่อกระดาษ โดยมีผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อน้ำ คือสีจะขัดขวางการผ่านของแสงอาทิตย์ ซึ่งมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงทำให้ลดปริมาณสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ เกิดปัญหากับกระบวนการต่างๆ ในอุตสาหกรรม ค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียสูง สีที่มีโลหะอิออนปน เช่น เหล็ก หรือทองแดงจะไปขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตในสายใยอาหาร

จากปัญหาข้างต้นอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษดังกล่าว อาจมีแนวโน้มทางใหม่ให้เลือก เช่น แนวทางการนำเทคโนโลยีการฟอกสีวิธีทางชีวภาพ เข้ามาเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการการฟอกเยื่อด้วยทางเคมี นับว่าเป็นประโยชน์มากเพราะสามารถลดต้นทุนการผลิตและไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ ในสมัยก่อนเอนไซม์จากจุลินทรีย์มาใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษมีข้อจำกัด เช่น ต้องมีการดัดแปลงแป้งดิบ อย่างไรก็ตามการประยุกต์เพื่อนำมาใช้ในอุสาหดกรรมผลิตเยื่อกระดาษยังมีการศึกษามากในปัจจุบัน

คุณลักษณะ 3 ประการที่มีการนำเอนไซม์ไซลาเนสที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมการฟอกสีกระดาษ

1. มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสูงและมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง สิ่งนี้จะช่วยประหยัดพลังงานและจะช่วยประหยัดได้มาก

2. มีพีเอชที่เหมาะสมสูง (สภาวะที่เป็นด่าง) และมีควาเสถียรที่พีเอชสูง จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและลดต้นทุนในการจัดหาเครื่องมือปรับค่าพีเอช ซึ่งสามารถช่วยแก้ปัญหาได้โดยการนำไปผสมกับเยื่อกระดาษและสามารถหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่ได้

3. มีค่า pI (isoelectric point) ที่เป็นด่างสูง เอนไซม์ไซลาเนสยังคงเกาะติดอยู่กับสารตั้งต้นเมื่อค่าพีเอชมีค่าต่ำกว่า pI ของเอนไซม์ การเกาะติดกับสารตั้งต้นแสดงให้เห็นว่าเป็นการช่วยส่งเสริมการย่อยสารตั้งต้น ดังนั้นเอนไซม์ไซลาเนสที่มีค่า pI เป็นด่างสูงจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นมาก อย่างไรก็ตามในสภาวะที่มีการนำเอนไซม์ไซลาเนสกลับมาใช้ใหม่ จะต้องมีการพิจารณาที่ค่า pI สูงๆ ซึ่งสิ่งนี้ก็เป็นอุปสรรคอย่างหนึ่งที่ต้องทำการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการปรับปรุงให้เชื้อที่มีความสามารถในการผลิตที่ต้องการ ในที่นี้หมายถึง เอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจากเอนไซม์เซลลูเลสอาจทำได้โดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์และทำการคัดเลือกสายพันธุ์เพราะว่าการคัดเลือกความต้านทานของสายพันธุ์กลายกับการควบคุมการสลายแหล่งคาร์บอนได้ประสบความสำเร็จในระบบของเชื้อราหลายๆ ชนิดรวมถึงระบบการผลิตเซลลูเลสของเชื้อ (Milagres และคณะ, 1993)

การฟอกเยื่อไม้เพื่อผลิตกระดาษมีปริมาณมากที่สุดถึง 160 ล้านเมตริตันต่อปี ทั่วโลก ในขณะเดียวกันก็เป็นการกำจัดลิกนินที่ก่อให้เกิดสีน้ำตาลเข้มในกระบวนการฟอกเยื่อไม้ ซึ่งมีการใช้สารเคมีพวกคลอรีนเบส (chlorine-based) ในการช่วยฟอกลิกนินที่ละลายน้ำที่เกิดจากการผลิตทำให้น้ำมีสีเข้มขึ้นและก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้นยังพบสารพิษไดออกซิน (dioxin) ในน้ำเสียที่เกิดจากการฟอกเยื่อไม้อีกด้วย จึงมีการคิดค้นหาวิธีที่จะลดปริมาณการใช้คลอรีนในการฟอกเยื่อไม้ลง

นักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่ใช้วิธีการไบโอบลีชชิ่ง (biobleaching) โดยใช้เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตเป็นทางการค้าจากเชื้อราและแบคทีเรีย เอนไซม์ไซลาเนสที่มีกิจกรรมสูงและมีความเสถียรเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ๆ ได้จากจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิสูง (Thermophilic microorganism) พวกแอคติโนไมสีท (Actinomyces) เป็นแหล่งเอนไซม์ไซลาเนสที่สำคัญและมีรายงานว่ามีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสจาก mesophilic *Streptomyces* เพื่อใช้ในการฟอกเยื่อไม้

การผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *Streptomyces thermoviolaceus* ในการทดสอบเอนไซม์ในการฟอกเยื่อไม้ โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึง 10 ปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณสับสเตรทเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด โดยใช้เยื่อไม้ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 5, 7 และ 10 กำหนดเอนไซม์ต่อสับสเตรตในสัดส่วน 10 ยูนิตต่อ 1 กรัมของเยื่อไม้ ที่เยื่อไม้ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) จะค่อนข้างคงที่ เมื่อเวลาเข้าใกล้ชั่วโมงที่ 6 อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส ส่วนความเข้มข้นอื่นๆ เอนไซม์จะหลั่งต่อไปเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 10 จะเริ่มคงที่ ความเข้มข้นของเยื่อไม้ที่ร้อยละ 5 จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 10 ยูนิตต่อกรัมของเยื่อไม้ ร้อยละความเข้มข้นของเยื่อไม้ตั้งแต่ 2 ขึ้นไปจะมีการหลั่งน้ำตาลรีดิวซ์อยู่เรื่อยๆ ขณะที่ความเข้มข้นเยื่อไม้ร้อยละ 1 จะพบน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณเท่าเดิมเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง การตรวจน้ำตาลรีดิวซ์นี้ แสดงให้เห็นว่าเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสระหว่างเอนไซม์และสับสเตรตได้ดีเพียงใด (Garg และคณะ, 1996)

2.8.2 การผลิตและการนำเซลลูโลไลติกเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในการไฮโดรไลซิสของเสียทางการเกษตร

ของเสียทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว รำข้าวสาลี ผงเซลลูโลส กระดาษหางนมและอื่นๆ อีกมากมายที่สามารถนำมาใช้เป็นสับสเตรตในการผลิตเอนไซม์ แต่มีปัญหาตรงที่ว่ากระบวนการแปรสภาพวัตถุดิบ ให้สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์นั้น ต้องใช้ต้นทุน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูง ดังนั้นจึงต้องใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก รำข้าวสาลีและฟางข้าวซึ่งเป็นวัตถุเหลือทิ้งที่ได้จากการเกษตรและปริมาณมาก สามารถนำมาใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส, บีต้า-ดี-กลูโคซิเดส และ ดี-ไซลาเนส โดยใช้จุลินทรีย์พวกเซลลูโลไลติกเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น *Aspergillu ustus, Trichoderma* sp.(a), *Trichoderma* sp.(b), *Botrytis* sp. และ *Sporotrichum pulverulentum* โดยเปรียบเทียบในสับสเตรตระหว่างฟางข้าว และรำข้าวสาลีใช้ในการหมักแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semi-solid fermentation)

การย่อยสลายมวลชีวภาพของพืชในธรรมชาติ เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ จากการศึกษาการใช้เชื้อผสมระหว่างจุลินทรีย์ 2 ชนิดเพื่อดูกิจกรรมของบีต้า-ดี-กลูโคซิเดส พบว่าไม่สามารถเหนียวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ได้ เพราะว่าผลผลิตจากการเมตาบอไลต์ของจุลินทรีย์ชนิดแรก จะยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ฟางข้าวเป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และดี-ไซลาเนส รูปแบบอื่นจากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส พบว่าโปรตีนที่ได้จากฟางข้าวเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 3 เป็นร้อยละ 7 ในขณะที่รำข้าวสาลีปริมาณโปรตีนจะลดลงจากร้อยละ 14 เหลือร้อยละ 10 เป็นไปได้ที่จุลินทรีย์ในรำข้าวสาลีเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโต โปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายนี้สามารถนำไปใช้เลี้ยงสัตว์ (Shamala และคณะ, 1987)

2.8.3 ใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสเพื่อแก้ปัญหาทางด้านพลังงานและการขาดแคลนอาหาร

การย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส เป็นกระบวนการทางชีวภาพกระบวนการหนึ่งทางเทคโนโลยีชีวภาพและสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล เพื่อใช้ผลิตสารชนิดต่างๆ เช่น เอทานอล หรือโปรตีนเซล์เดียว เพื่อเป็นการแก้ปัญหาทางด้านพลังงานและการขาดแคลนอาหาร โดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเพื่อเปลี่ยนของเสียทางการเกษตรให้เป็นสารละลายน้ำตาล (มาริสา และคณะ, 2540)

ของเสียทางการเกษตรสามารถเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาลได้ โดยเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสจากจุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ *Sporotrichum pruinosum* และ *Arthrographis* sp. โดย *Sporotrichum pruinosum* สามารถเกิดไฮโดรไลซิสสูงสุดประมาณร้อยละ 15.1 และ *Arthrographis* sp. ร้อยละ 7.5 โดยใช้เปลือกแตงโมเป็นสับสเตรต การทำสับสเตรตให้มีสภาพเป็นด่างสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่ละลายน้ำได้ใช้วิธี HPLC โดยจะพบกลูโคสมากที่สุดและไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ ส่วนไซโลโบโอสจะพบไซโลสและอะราบิโนสในปริมาณน้อย (Okeke และ Obi, 1995)

ได้ทำการทดลองศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ พบว่ามีปัญหาที่เกิดจากการใช้คลอรีน (chlorine) ในอุตสาหกรรมฟอกขาวของกระดาษคือคลอรีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนหนึ่งจะกลายเป็นก๊าซและบางส่วนจะกลายเป็นคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) ซึ่งเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมจึงได้นำเอนไซม์ไซลาเนสมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกขาวแทนคลอรีนซึ่งไม่เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เอนไซม์ไซลาเนสได้นำมาใช้ในการฟอกขาวของอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษเพื่อลดการใช้คลอรีน การทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสจะช่วยในการย้ายลิกนิน (Lignin) ออกจากเยื่อซึ่งทำให้การฟอกขาวง่ายขึ้น เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อราและแบคทีเรียจะทำงานที่พีเอช 10 และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Buchert และคณะ, 1994)

2.8.4 อุตสาหกรรมอื่นๆ

ได้มีการนำเอนไซม์ไซลาเนสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ นอกเหนือจากอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ เช่น อุตสาหกรรมการทำน้ำผลไม้โดยใช้เอนไซม์ทำให้น้ำผลไม้ใส อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ซึ่งเอนไซม์นี้จะช่วยในการย่อยอาหารสัตว์ เป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์ นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการเตรียมวัตถุดิบในการวิจัยวิทยาศาสตร์ เช่น ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของพอลิแซคคาไรด์ และผนังเซลล์ของพืช (Wong และคณะ, 1988) และมีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันปาล์ม เช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและ เพคติเนส (pectinase) ในอัตรา 200-1000 กรัมต่อตัน ที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เพื่อแปรสภาพเนื้อเยื่อพืชก่อนนำไปสกัด นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำมันและน้ำทิ้งโดยลดปริมาณเนื้อเยื่อของพืชที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงทำให้เกิดความหนืดและข้น เช่น กลูแคน เฮมิเซลลูโลส และเพคติน ซึ่งช่วยในการทำให้ใส ในกระบวนการแยกน้ำมัน (Godfrey และ Rreichelt, 1983)

2.10 มิวเตชั่น (mutation)

2.10.1 ประวัติการศึกษาเกี่ยวกับการมิวเตชั่น

มีความเชื่อว่าความแปรปรวนทั้งหลายที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตจนถึงกับได้พวกใหม่หรือพันธุ์ใหม่ อันเรียกว่า sport นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทีละเล็กทีละน้อยแบบค่อยเป็นค่อยไปจนกระทั่งถึงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 Hugo De Vries นักพฤษศาสตร์ชาวเนเธอร์แลนด์ได้พบความจริงซึ่งแตกต่างจากข้อเสนอของ Darwin ทั้งนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงในสิ่งมีชีวิตอาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลันทันทีและพืชหรือสัตว์อาจถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ เรียกการเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้ว่า มิวเตชั่น

2.10.2 มิวเตชั่น คืออะไร

มิวเตชั่น หมายถึง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับหน่วยควบคุมลักษณะเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ฉับพลัน และพืชหรือสัตว์อาจถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงอันนี้ จะรวมไปถึงการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม แต่คำว่ามิวเตชั่นในปัจจุบันมักจะหมายถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปยังอีกสภาพหนึ่ง ดังนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาจเรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า "gene หรือ point mutation" ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของดีเอ็นเอ คือ นิวคลีโอไทด์ (nuceotide) ชนิดหนึ่งเข้าไปแทนที่นิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่งนั้นเอง

การเปลี่ยนแปลงทางกรรมพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับลักษณะรูปร่างทั่วไปหรือเกี่ยวกับลักษณะทางสรีระหรือทางชีวเคมีหรือลักษณะทางพฤติกรรมของสปีชีส์ มิวเตชั่นเป็นสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิตและเป็นกลไกสำคัญอันดับแรกที่ทำให้เกิดความแตกต่างแปรผันในองค์ประกอบทางพันธุกรรม (genetic variation) อันเป็นพื้นฐานจำเป็นสำหรับกระบวนการวิวัฒนาการ

2.10.3 ชนิดของมิวเตชั่น

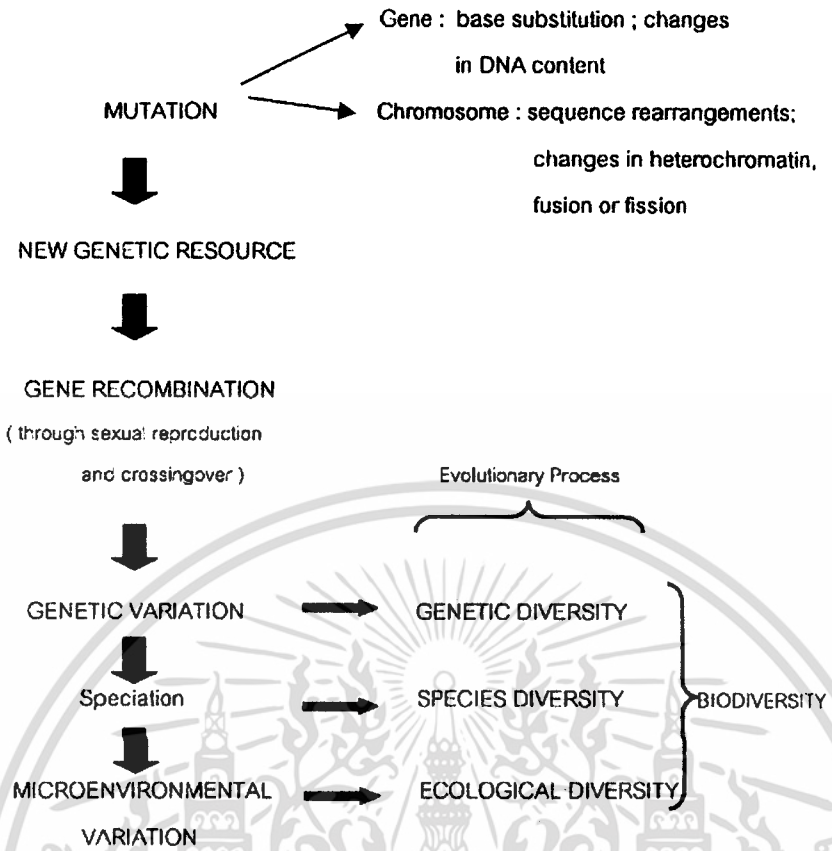
ชนิดของมิวเตชั่นที่ศึกษากันมักเป็นพวกที่แสดงออกมาให้เห็นในรูปลักษณะอย่างชัดเจน ตัวอย่างของมิวเตชั่นชนิดนี้ได้แก่ ลักษณะตาสีขาว ปีกสั้น ปีกกุด ฯลฯ ของแมลงหวี่ ดังนั้นเราจึงเรียกมิวเตชั่นดังกล่าวว่าเป็นพวก "สังเกตได้ (visible)" ซึ่งมีอยู่ราวร้อยละ 1 ของมิวเตชั่นทั้งหมด และไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตมากนัก แต่มิวเตชั่นส่วนใหญ่ราวๆ ร้อยละ 80 ได้แก่พวก "แสดงผลในทางเสื่อม (detrimental)" ซึ่งไม่อาจตรวจพบได้แน่ชัด แต่เข้าใจว่าจะกระทบกระเทือนต่อการเจริญเติบโตของพืชหรือสัตว์ได้อย่างมาก ในมิวเตชั่นชนิดนี้ยีนที่เปลี่ยนไปแต่ละยีนก่อผลเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อรวมผลของทุกยีนก็จะรุนแรงขึ้น มิวเตชั่นอีกพวกหนึ่งคือพวก "ก่อผลถึงตาย (lethal)" ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 19 ถ้าอยู่ในสภาพ homozygous มิวเตชั่นชนิดนี้จะกระทบกระเทือนต่อขบวนการทางสรีระจนพืชและสัตว์ไม่อาจจะมีชีวิตอยู่ได้

ในสิ่งมีชีวิตพวก haploid เช่นเชื้อรา recessive lethal จะก่อผลถึงตาย เราเรียกยีนนี้ว่า conditional lethal ตัวอย่างเช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิดของเชื้อรา *Neurospora* อาจเปลี่ยนไปจากเดิม เราเรียกยีนที่เปลี่ยนไปนี้ว่าเป็น conditional lethal ทั้งนี้เชื้อราที่มียีนนี้จะไม่เจริญหรือขยายพันธุ์ ใน minimal medium แต่กลับเจริญตามปกติเมื่อเสริมกรดอะมิโนบางชนิดลงไปใน selective medium

2.10.3.1 มิวเตชั่นที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

มิวเตชั่นชนิดนี้เป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทัวโทเมอริกชิฟท์ (tautomeric shift) หรือการก่อให้เกิดไอออน (ionization)ในโมเลกุลของเบสดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ มิวเตชั่นที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติมีอัตราต่ำมาก อัตราโดยเฉลี่ยประมาณ 10^{-5}-10^{-10} ต่อเซลล์ต่อรุ่นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมโดยแตกต่างกันออกไปตามแต่ละตำแหน่งชนิดของยีน และชนิดของสิ่งมีชีวิต (ตารางที่ 2) ยีนมิวเตชั่นอาจเกิดในทางไปข้างหน้า (forward mutation:A ⟶ a) คือลักษณะปกติเปลี่ยนไปเป็นลักษณะกลายหรืออาจเกิดขึ้นในทางกลับกัน (back mutation หรือ reverse mutation: a ⟶ A) คือจากมิวแตนต์ยีนเปลี่ยนกลับไปเป็นยีนปกติตามเดิม อย่างไรก็ดีนับว่าเป็นมิวเตชั่นที่มีความสำคัญและก่อให้เกิดวิวัฒนาการขึ้นในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่ายีนแทบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 มิวเตชั่นเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่ความแปรผันทางพันธุกรรมและความหลากหลายของสปีชีร์ในกระบวนการวิวัฒนาการ

ที่มา: วิสุทธิ์ (2533)

ทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ เคยผ่านการเปลี่ยนแปลงโดยมิวเตชั่นมาแล้วในอดีตจากการคัดเลือกอย่างเข้มงวดของธรรมชาติ ยีนซึ่งก่อผลในทางเสื่อมก็ค่อยๆ หายไปจากหมู่ประชากรของพืชและสัตว์ เมื่อปราศจากมิวเตชั่นในธรรมชาติแล้วก็แทบจะกล่าวได้ว่าสิ่งมีชีวิตไม่อาจดำรงเผ่าพันธุ์หรือมีวิวัฒนาการมาจนถึงทุกวันนี้

จากการศึกษาอัตราของมิวเตชั่นของยีนต่างๆของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนไปยังสภาพอื่นและการเปลี่ยนแปลงกลับสู่สภาพเดิมมีอัตราการเกิดไม่เท่ากัน นอกจากนั้นยีนของพืชและสัตว์ชั้นสูงมีอัตรามิวเตชั่นสูงกว่ายีนของแบคทีเรีย และไวรัส

2.10.3.2 มิวเตชั่นที่เกิดจากการกระตุ้น (induced mutation)

นอกจากจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแล้ว มิวเตชั่นก็อาจจะถูกทำให้เกิดขึ้นโดยใช้วิธีการกระตุ้น โดยได้เริ่มใช้รังสีเอกซ์ (X-rays) เพื่อให้เกิดการมิวเตชั่นในแมลงหวี่พบว่าอัตราของมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นจะสูงกว่าพวกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติถึงราว 150 เท่า ต่อมาพบว่ารังสีเอกซ์นี้ได้ก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) โดยการใช้รังสีเอกซ์มักจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก่อให้เกิดผลในทางเสื่อม และมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นก็คงมีสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซมบางยีนอาจถูกทำลายก็ได้หรือบางส่วนของโครโมโซมอาจขาดหายไป

ตารางที่ 2 อัตราการเกิดยีนมิวเตชั่นตามสภาพธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

สิ่งมีชีวิต	อัตราการเกิดยีนมิวเตชั่น
ฟาจก์ (T4)	
SM23	1×10^{-4}
SM37	3×10^{-5}
UV102	1×10^{-6}
SM32	2×10^{-7}
UV248	1×10^{-8}
UV237	1×10^{-9}
UV1	5×10^{-10}
แบคทีเรีย (*Escherichia coli*)	
ยีนดื้อต่อยาสเตรปโตมัยซิน	4×10^{-4}
ยีนที่ต้องการฮีสทิดีน	2×10^{-6}
ราขนมปัง (*Neurospora crassa*)	
ยีนที่ไม่ต้องการสารอิโนซิตอล	1.5×10^{-5}
ยีสต์ (*Saccharomyces cerivisiae*)	
ยีนที่ไม่ต้องการอาร์จีนีน	9.3×10^{-7}
ยีนที่ไม่ต้องการฮีสทิดีน	3×10^{-9}
ข้าวโพด (*Zea mays*)	
เมล็ดสีแดง	4.92×10^{-4}
เมล็ดสีม่วง	1.1×10^{-5}
เมล็ดสีน้ำตาลสูง	2.4×10^{-6}
แมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*)	
ตัวสีเหลือง	1.2×10^{-4}
ตัวสีขาว	2.9×10^{-5}
มนุษย์ (*Homo sapiens*)	
กระดูกเล็ก (เตี้ย-แคระ)	3×10^{-5}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สิ่งมีชีวิต	อัตราการเกิดยีนมิวเตชั่น
เป็นใบ้	1.1×10^{-5}
ตาบอดสี	2.8×10^{-5}
ผิวเผือก	3.4×10^{-5}
กล้ามเนื้อแขนขาลีบ	5×10^{-6}

ที่มา: วิสุทธิ์ (2533)

2.10.4 สิ่งที่ทำให้เกิดมิวเตชั่น (mutagens)

2.10.4.1 สิ่งที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ อุณหภูมิ และรังสีต่างๆ

อุณหภูมิ จากการทดลองเลี้ยงแมลงหวี่ในอุณหภูมิต่างๆกันพบว่ายีนด้อยที่ทำให้การตายบนโครโมโซม X (sex linked recessive lethal gene) ในอัตราที่แตกต่างกันดังนี้

อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เกิดร้อยละ 0.87

22 องศาเซลเซียส เกิดร้อยละ 0.188

28 องศาเซลเซียส เกิดร้อยละ 0.325

รังสีและแสง เป็นสิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ สามารถแบ่งแสงและรังสีตามช่วงความยาวคลื่นออกเป็นพวกๆดังนี้

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

คลื่นวิทยุ แสงและรังสี คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีช่วงคลื่นขนาดต่างๆ กัน คลื่นวิทยุมีช่วงคลื่นที่ยาวมาก คือมีความยาวระหว่าง 10^{-4} - 10^{-1} เซนติเมตร แสงที่เรามองเห็นมีช่วงคลื่น 10^{-4} เซนติเมตร (1 ไมครอน) คลื่นที่มีช่วงสั้นกว่านี้ เช่น แสงอัตราไวโอเลต รังสีเอกซ์ จัดว่าเป็นคลื่นที่มีพลังงานสูง ทั้งนี้เมื่อช่วงคลื่นยิ่งสั้นลงพลังงานก็ยิ่งสูงขึ้น การที่แสงบางอย่างและแสงมีพลังงานสูงขึ้นนี้เอง จึงสามารถแทรกซึมวัตถุและก่อให้เกิดมิวเตชั่นในสิ่งมีชีวิต เราอาจแยกคลื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แม่เหล็กไฟฟ้าและพลังงานในรูปมวล (จากสารที่อาจแผ่รังสี (radioactive isotope)) ออกเป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ

รังสี (ionizing radiation) คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า หรือพลังงานในรูปมวลที่มีพลังงานสูงเมื่อกระทบกับเป้าแล้วจะทำให้เกิดการผลิตอิออน (ions) และรังสีนี้เป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมสูง

แสง (nonionizing radiation) คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีพลังงานไม่สูงพอที่จะทำให้มีการผลิตอิออน และเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมต่ำ

1. รังสี (ionizing radiation)

รังสีมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน แต่ละชนิดอาจมีแหล่งที่เกิดและแรงแทรกซึมแตกต่างกัน รังสีเหล่านี้ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีคอสมิค รังสีแอลฟา รังสีเบตาและนิวตรอน รังสีบางชนิดในจำนวนนี้ ได้จากการแผ่รังสีของธาตุที่อาจแผ่รังสีได้ (radioactive elements) เช่น รังสีแอลฟาซึ่งประกอบด้วยโปรตอนและนิวตรอน และรังสีซึ่งประกอบด้วยอิเล็กตรอนเป็นต้น

รังสีทำให้เกิดมิวเตชั่นโดยวิธีการที่ทำให้เกิดอิออน ทั้งนี้เมื่อรังสีวิ่งไปกระทบกับอะตอมของวัตถุก็จะทำให้อะตอมนั้นยิงอิเล็กตรอนออกไป หลังจากสูญเสียอิเล็กตรอนไปแล้ว ทั้งนี้เพราะโปรตอนมีอิเล็กตรอนอยู่ 1 หน่วยนั้นเอง ดังนั้นอิเล็กตรอนที่ถูกยิงออกไปจะถูกจับไวโดยอะตอมข้างเคียงจึงทำให้อะตอมนั้นกลายเป็นอิออนที่มีประจุลบ โดยเหตุนี้เองอิออนจึงเกิดเป็นคู่ๆ เสมอ รังสีอาจก่อให้เกิดมิวเตชั่นได้หลายวิธี เช่น เมื่ออิออนอยู่ในส่วนของยีน การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดกับอิออนนั้นก็จะทำให้ยีนเปลี่ยนสภาพไป ส่วนอีกวิธีหนึ่งก็คือรังสีจะทำให้น้ำที่อยู่ภายในเซลล์ผลิตอิออนของไฮโดรเจน (H^+) และกลุ่มไฮดรอกซิล (OH^-) แล้วไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจนได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาคืออาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ โปรตีนหรือโครโมโซมก็ได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับโครโมโซมก็จะทำให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซมหรือเกิดมิวเตชั่นของยีนได้

$$H_2O \longrightarrow H^+ + OH^-$$

ในที่ที่มีออกซิเจนไฮโดรเจนอะตอมที่เกิดจากโมเลกุลของน้ำจะเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้ง่าย ดังปฏิกิริยา

$$H^+ + O_2 \longrightarrow H_2O$$

$$H_2O + H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

$$2\,H_2O \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

2. แสง (nonionizing radiation)

คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าช่วงยาวๆ ไม่ทำให้มีการผลิตอิออน ทั้งนี้เพราะพลังงานที่มีอยู่นั้นค่อนข้างต่ำ ดังนั้นเราเรียกคลื่นพวกนี้ว่าแสง แสงที่อาจก่อให้เกิดมิวเตชั่นได้แก่ แสงอัลตราไวโอเลต (UV) แสงชนิดนี้มีช่วงคลื่นยาวกว่ารังสีเอกซ์ และเนื่องจากมีพลังงานต่ำนี้เอง แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

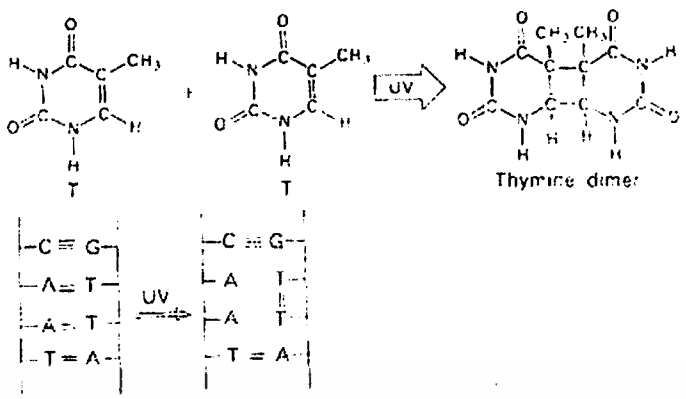
อัลตราไวโอเลต จึงมีแรงแทรกซึมน้อย และไม่อาจแทรกซึมผ่านส่วนของร่างกายที่มีความหนาแน่นสูงๆดังนั้นจึงมักกับส่วนเล็กๆของพืชเช่น อาจใช้กับอับละอองเกสร เป็นต้น หรืออาจใช้บางส่วนของไข่แมลงหวี่และมักใช้ได้ผลดีกับเชื้อรา แบคทีเรียและไวรัส แสงอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในส่วนของโพลาร์แคป (polar cap) ของไข่แมลงหวี่ รังสีอัลตราไวโอเลตอาจจะทำโครโมโซมผิดปกติแต่ประสิทธิภาพน้อยกว่ารังสีเอกซ์ (ประดิษฐ์, 2543)

เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลต ไม่ทำให้มีการผลิตอิออน ดังนั้นมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นก็เนื่องมาจากเซลล์ดูดแสงไปโดยตรง ส่วนของเซลล์ที่ดูดแสงได้ดีคือ กรดนิวคลีอิกหรืออาจกล่าวลงไปให้แน่ชัดได้อีกว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเบสโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ไพริมิดีน (pyrimidine) นั่นเอง เมื่อเบสกระทบกับแสงอัลตราไวโอเลต ก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับเกาะกับพันธะ (bond) เปลี่ยนไป คือทำให้มีการจับเกาะกับเบสชนิดเดียวกัน เบสที่จับเกาะกันนี้เรียกว่า เป็นไดเมอร์ (dimer) การจับเกาะที่เกิดขึ้นง่ายที่สุดคือการจับเกาะระหว่างไทมีน (thymine) ซึ่งทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนในเส้นนิวคลีโอไทด์ในเส้นเดียวกันจะขัดขวางไม่ให้ดีเอ็นเอแบ่งตัว ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนของเส้นตรงกันข้ามก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับคู่ของไทมีนกับอะดีนีน (thymine กับ adenine: T-A) เปลี่ยนไป ดังนั้นทำให้ไทมีนจับกับกัวนีนซึ่งจะยังผลให้ T-A เปลี่ยนไปเป็น C-G ซึ่งจัดเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบทรานสซิชั่น (transition) ส่วนไดเมอร์ชนิดอื่นที่พบ คือ ไซโตซีนไดเมอร์ (cytosine dimer: C-C) เกิดขึ้นน้อยกว่าพวกแรก ไดเมอร์ชนิดนี้ก่อให้เกิดมิวเตชั่นโดยที่ NH_2 ถูกขับออกไปจึงทำให้ได้ยูราซิลไดเมอร์ (uracil dimer: U-U) แต่ยูราซิลจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับไทมีน ดังนั้นจึงทำให้ G-C เปลี่ยนเป็น A-T

ผลของแสงอัลตราไวโอเลตที่มีต่อสิ่งมีชีวิต คือ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครโมโซมและยีน (gene mutation) เช่นเดียวกับการใช้รังสีเอกซ์ แต่มีรายงานว่าขนาดการใช้ที่อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนได้เท่านั้น รังสีเอกซ์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมได้มากกว่า คุณสมบัติอีกประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลต คือ แสงที่มีช่วงคลื่นต่างกันจะมีผลทางมิวเตชั่นไม่เท่ากัน ช่วงคลื่นที่มีผลในทางมิวเตชั่นดี คือ พวกที่ DNA สามารถดูดซับเอาไว้ได้มาก แสงอัลตราไวโอเลตไม่สามารถผ่านแก้วได้แต่สามารถทำลายตาได้

ผลของมิวเตชั่นจากการใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะไม่สอดคล้องกับทฤษฎีการกระทบเป้า (target theory) ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ (dosage) และอัตรามิวเตชั่นจะไม่เป็นแบบเส้นตรง แต่จากการทดลองกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ปรากฏว่าได้เส้นกราฟเป็นแบบเส้นโค้งหลายๆ แบบ เช่นนี้แล้วก็แสดงว่ามิวเตชั่นย่อมเกิดจากการกระทบเป้ากับเป้าหลายๆ ครั้ง ซึ่งการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นวิธีการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กับเชื้อรา ซึ่งความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์จะใกล้เคียงกับการแผ่รังสีอัลตราไวโอเลต ความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถคำนวณได้จากอัตราการอยู่รอดของจำนวนโคโลนีภายหลังการฉายแสง ถ้าให้แสงอัตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 การเกิดไทมีนไดเมอร์เนื่องจากผลของการฉายแสงอัลตราไวโอเลต การเกิดไดเมอร์แบบนี้จะขัดขวางการแบ่งตัวหรือการสร้างตัวแทนของ DNA และมีมิวเตชั่นเกิดขึ้นในที่สุด

ที่มา: ไพศาล (2535)

สูงขึ้นจะทำให้อัตราการกลายพันธุ์และอัตราการตายเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงให้อัตราการกลายพันธุ์สัมพันธ์กับร้อยละของการอยู่รอดของจุลินทรีย์ภายหลังได้รับแสงอัลตราไวโอเลต

ผลอันน่าสนใจประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลต คือ การเกิด photoreactivation คือ ผลของการใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะบรรเทาลงหรือหมดไป เมื่อให้เซลล์ถูกกับแสง (visible light) และได้มีการค้นพบถึงความผิดปกติที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายของแสงอัลตราไวโอเลต กล่าวคือแสงอัลตราไวโอเลตที่มองเห็นด้วยตาเปล่าสามารถทำให้เซลล์ถูกเปลี่ยนไปจากสภาพดีเอ็นเอเดิมได้ ปรากฏการณ์เช่นนี้ได้มีการพบในแบคทีเรียและไวรัส ทั้งนี้เกิดจากการที่มีเอนไซม์บางชนิดเข้าไปตัดไทมีนในไทมีนไดเมอร์ให้แยกจากกัน และทำให้ดีเอ็นเอกลับคืนสู่สภาพเดิม การซ่อมดีเอ็นเอหรือการทำให้มิวเตชั่นเปลี่ยนกลับโดยกระบวนการที่กล่าวมานี้จะเกิดได้ดีในแสงสีน้ำเงิน อย่างไรก็ดีมีการพบว่าใน *E. coli* นั้นอาจมีการขจัดไดเมอร์โดยวิธีการ dark reactivation ซึ่งหมายถึงว่า ปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นโดยไม่ต้องใช้แสง (visible light) การขจัดแบบนี้พบว่าเกิดจากการที่มีเอนไซม์บางชนิดตัดไดเมอร์จากดีเอ็นเอทิ้งแล้วจะมีนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าไปแทนที่ในส่วนนั้น (Gerald, 1973)

การแสดงออกของยีนที่เกิดความล่าช้า เนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ หลายปัจจัยที่มีดังต่อไปนี้

1. **การกลายพันธุ์ของยีนไม่สามารถเกิดขึ้นได้ทันทีหลังจากที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเลต**
2. **ยีนที่จะกลายพันธุ์ต้องการเวลามากกว่าปกติเพื่อให้เกิด metabolic activity ก่อนที่จะเกิดการกลายพันธุ์ต่อไป**
3. **การแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์จะเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.4.2 สิ่งก่อการกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen)

ระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามค้นคว้าเพื่อหาว่าสารเคมีชนิดใดก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชหรือสัตว์ จนพบว่าสารเคมีจำนวนมากที่เป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น กรดไนตรัส (nitrous acid) ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Aspergillus* spp. มีรายงานว่าพบสารไนโตรเจน มัสตาร์ดและซัลเฟอร์มัสตาร์ด สามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ได้ ทั้งนี้สารฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ไดเอธิลซัลเฟต (diethylsulfate) ไดอะโซมีเทน (diazomethane) และสารประกอบอื่นๆ ก็เป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และมีผลรุนแรงต่อผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีสารประกอบบางชนิดที่ก่อให้เกิดมะเร็ง

อย่างไรก็ตามสารเคมีบางชนิดอาจจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งแต่ไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง สารเคมีบางชนิดอาจจะมีผลในช่วงที่มีการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตหรือมีผลเฉพาะเพศใดเพศหนึ่งเท่านั้น เช่น สารฟอร์มัลดีไฮด์จะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ตัวผู้ระยะที่เป็นตัวหนอน แต่จะไม่มีผลต่อแมลงหวี่ตัวเมียในระยะที่เป็นตัวหนอน นอกจากนี้สารเคมีแต่ละชนิดก่อให้เกิดการการกลายพันธุ์ในยีนแต่ละตำแหน่งด้วยความถี่ที่แตกต่างกัน

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

2.10.5 วิธีตรวจสอบยีนมิวเตชั่น

2.10.5.1 วิธีเรพลิคาเพลติง (replica plating)

ได้มีการพัฒนาวิธีการศึกษาทดลองในแบคทีเรีย *E.coli* เพื่อแสดงว่ายีนมิวเตชั่นเกิดขึ้นเองเสมอตามสภาวการณ์ธรรมชาติ เรียกว่า เรพลิคาเพลติง โดยใช้หลักการง่ายๆ คือ การนำสารละลายเจือจางที่มีเซลล์แบคทีเรียจำนวนไม่มากนักใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงสายพันธุ์แท้และนำเอาเข้าตู้อบนานพอสมควรเพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแต่ละเซลล์เจริญและแบ่งตัวจนได้โคโลนี จากนั้นใช้แท่นกลมหรือจานแก้วสะอาดขนาดใกล้เคียงกับจานเพาะเชื้อโดยมีผ้ากำมะหยี่หุ้มอยู่ด้านหนึ่งเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวพิมพ์ ใช้แท่นผ้ากำมะหยี่แตะลงบนจานอาหารเพาะเชื้อใหม่หลายๆ จานซึ่งแต่ละจานจะทำเครื่องหมายตรงกับจานอาหารเพาะเชื้อต้นแบบเสมอ (รูปที่ 14) จานอาหารเพาะเชื้อบางจานมีอาหารปกติและบางจานเสริมด้วยยาสเตรปโตมัยซิน (streptromycin) โดยวิธีการนี้จานอาหารที่เสริมด้วยยาสเตรปโตมัยซินไม่ควรมีเชื้อแบคทีเรียเจริญเป็นโคโลนีได้ แต่พบว่าจานอาหารบางจานที่เสริมสเตรปโตมัยซินนี้มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเจริญได้ดี แสดงว่าโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นพันธุ์ที่มีความดื้อยาต่อสเตรปโตมัยซินทั้งๆ ที่ก่อนหน้านั้นเชื้อแบคทีเรียไม่เคยสัมผัสยานี้มาก่อนเลย กล่าวคือ แบคทีเรียมีมิแตนท์ยีนที่ดื้อยาต่อยาสเตรปโตมัยซินเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์แบคทีเรียที่กลายพันธุ์นี้มีโอกาสเจริญในสภาวะแวดล้อมของอาหารที่มียานี้อยู่รอดได้และปรับตัวเจริญแพร่พันธุ์ต่อไปดีกว่าพวกอื่นๆ ที่ผิดปกติในส่วนยีนดังกล่าว

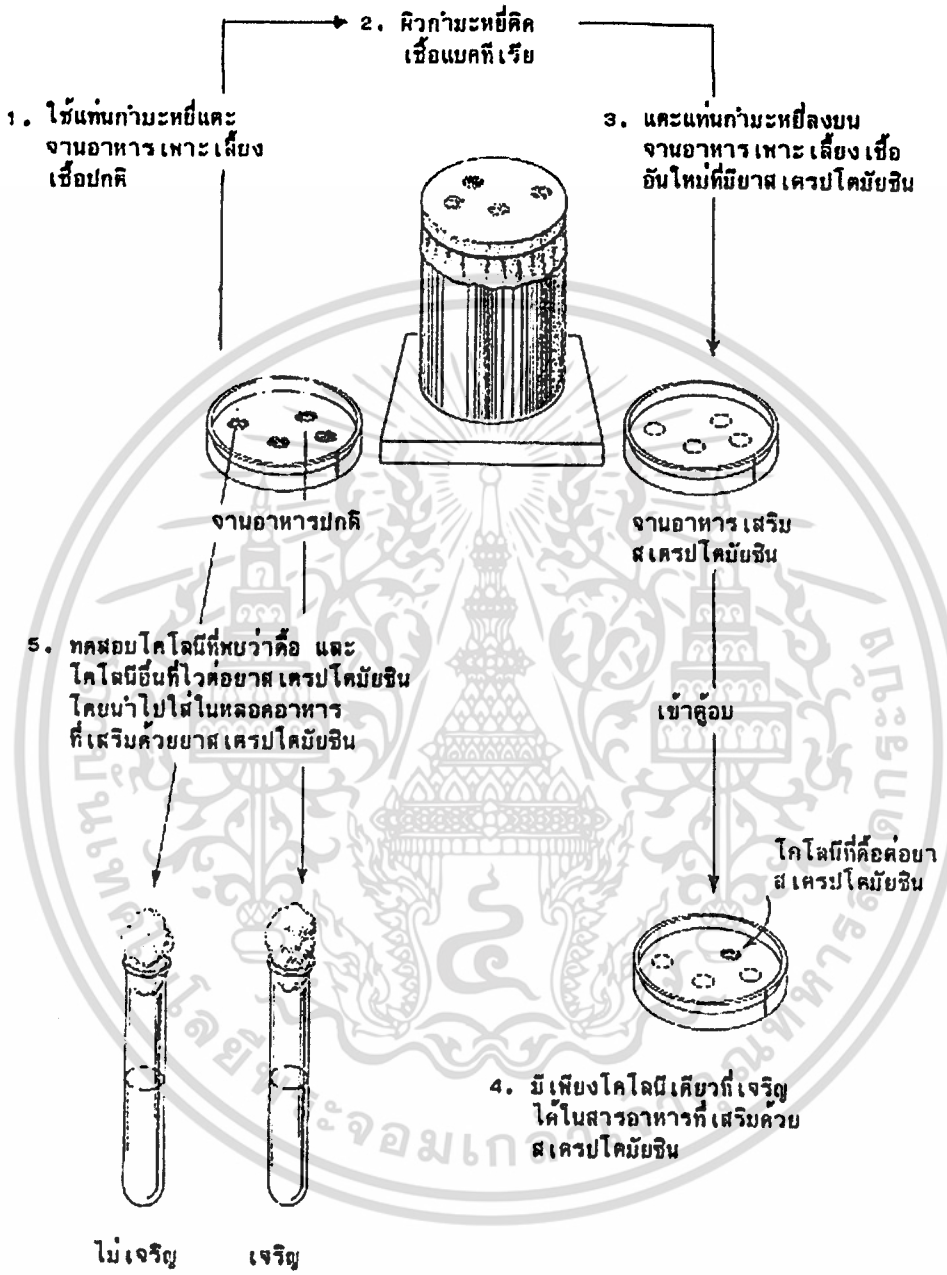
เมื่อต้องการทดสอบฟีโนไทป์ของโคโลนีเดี่ยวจากการทำให้สายพันธุ์บริสุทธิ์หรือจากทรานสฟอร์มแมนต์ว่ามียีน marker ที่ถูกต้องหรือไม่จะนิยมใช้เทคนิคนี้โดยการเพาะเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็งบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารแตกต่างกันไปโดยใช้ตำแหน่งที่ลงเชื้อบนอาหารแต่ละชนิดให้ตรงกันทุกๆ จานเลี้ยงเชื้อ วิธีการนี้มีจานตั้งต้น (master plate) เป็นอาหาร complete medium ที่คัดเลือกโคโลนีไว้แล้ว ส่วนจานอื่นๆ อาจเป็น complete medium ที่ผสมยาปฏิชีวนะในกรณีที่ต้องการตรวจสอบการดื้อยา หรือ minimal medium ที่ไม่มีสารอาหารที่จะเป็นในกรณีที่ต้องการตรวจคุณสมบัติของออโซโทรป เป็นต้น

<u>การตรวจสอบการกลายพันธุ์ใน *Neurospora*</u>

ในสิ่งมีชีวิตทุกๆ ยีนจะแสดงอาการข่ม คือ แสดงผลออกมาอย่างชัดเจนดังนั้นจึงเหมาะแก่การที่จะศึกษาถึงมิวเตชั่นเป็นอย่างยิ่ง อย่างไรก็ดีข้อยุ่งยากที่ต้องเผชิญ คือ การตรวจสอบมิเตชั่นนั่นเอง ต่อมาได้มีการคิดค้นวิธีการตรวจสอบมิวเตชั่นบางชนิดในเชื้อรา *Neurospora* ได้สำเร็จ ทั้งนี้โดยการตรวจสอบดูการเจริญหรือไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ นั่นเอง การทำให้เกิดการลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตหรือใช้สารเคมีจะทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่ต้องการเฉพาะ สายพันธุ์กลายที่ต้องการเฉพาะหมายถึงจุลินทรีย์สายพันธุ์กลายที่สูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์สารบางชนิด เช่น กรดอะมิโน เนื่องจากขาดเอนไซม์หนึ่งหรือหลายชนิดในกระบวนการสังเคราะห์นั้นๆ ดังนั้นต้องเติมสารอาหารหรือกรดอะมิโนชนิดที่ขาดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium จุลินทรีย์สายพันธุ์กลายนั้นจึงเจริญได้เป็นปกติ (ชื่นจิตต์, 2536)

รา *Neurospora crassa* สายพันธุ์แท้ สามารถเจริญได้ในอาหาร minimal medium คือ เพียงให้มีเกลืออินทรีย์บางชนิดหรือน้ำตาล เช่น ซูโครส (sucrose) หรือกลูโคส (glucose) วิตามินไบโอติน (biotin) และสารที่มีไนโตรเจน เช่น ammonium nitrate จากวัตถุดิบเหล่านี้ เชื้อราสายพันธุ์แท้ก็สามารถสังเคราะห์สารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต เช่น กรดอะมิโนต่างๆ วิตามินและเบส (purine และ pyrimidine) ได้เอง ในการสังเคราะห์สารแต่ละชนิดนั้นจำเป็นต้องมียีนเป็นตัวควบคุม ดังนั้นถ้าทำให้ยีนที่จำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์สารบางอย่างเกิดมิเตชั่น คือ เปลี่ยนสภาพไปจนทำหน้าที่ปกติไม่ได้แล้ว เชื้อราพวกนี้ที่มียีนเปลี่ยนไปนี้ (mutant หรือ auxotroph) ก็ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ขาดวิตามิน เบส หรือกรดอะมิโนบางอย่าง อย่างไรก็ดีเชื้อราสายพันธุ์แท้และสายพันธุ์กลายต่างก็เจริญได้ในอาหาร complete medium คือ เป็นอาหารที่มีกรดอะมิโน วิตามินและสารประกอบอินทรีย์ทุกอย่างครบ ในการตรวจสอบอาหารเหล่านี้เป็นอย่างๆ ไป ถ้าพบว่าเมื่อใส่อาหารชนิดใดลงไปแล้วเชื้อราสามารถเจริญได้ ก็แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับยีนซึ่งสังเคราะห์อาหารชนิดนั้น (รูปที่ 15)

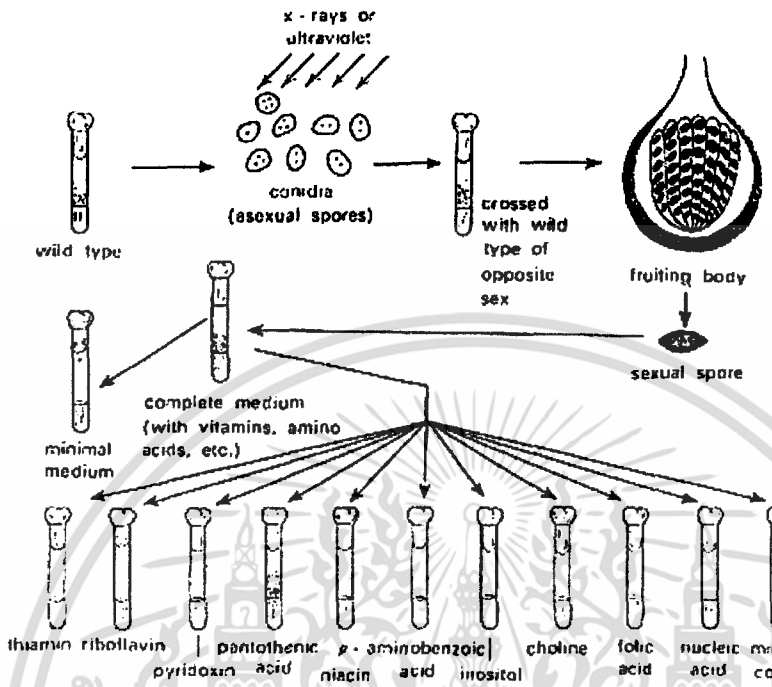
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 แผนภาพแสดงวิธีการทำเรพลิคาเพลติง เพื่อแสดงให้เห็นว่ายีนมิวเตชั่นเกิดขึ้นในสภาพธรรมชาติปกติ ในที่นี้แสดงให้เห็นเพียง 4 โคโลนีเท่านั้นเพื่อความสะดวก ความจริงแล้วในจานอาหารแต่ละจานจะมีโคโลนีของแบคทีเรียประมาณ 50-100 โคโลนี

ที่มา: วิสุทธิ์ (2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 15 วิธีการตรวจสอบมิวเตชั่นเกี่ยวกับความต้องการชนิดของอาหารใน *Neurospora crassa* เมื่อโคนิเดีย ได้รับการกระตุ้นให้เกิดมิวเตชั่นโดยใช้รังสีเอกซ์หรือแสงอัลตราไวโอเลตแล้วทำการผสมกับพวกสายพันธุ์แท้ที่มีเพศตรงข้าม แล้วแยกสปอร์ออกมาเลี้ยงใน complete medium คือ เป็นอาหารที่มีเกลืออินทรีย์ วิตามินและกรดอะมิโนทุกชนิดครบ ต่อจากนั้นก็นำไปเลี้ยงใน minimal medium ที่มีเฉพาะกรดอะมิโน หรือเฉพาะวิตามิน ถ้าพบว่าเจริญในอาหารที่มีวิตามินเท่านั้น ทดลองเลี้ยงต่อในอาหารที่ผสมวิตามินเป็นอย่างๆ ไป ถ้าพบว่าเจริญในอาหารที่มีกรด pantothenic (วิตามิน B_5) เท่านั้น ก็แสดงว่ายีนที่ควบคุมการสังเคราะห์วิตามินชนิดนี้เปลี่ยนแปลงไป

ที่มา: ไพศาล (2535)

2.10.5.2 การซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair)

โมเลกุลของดีเอ็นเออาจเกิดความเสียหายหรือชำรุดได้หลายทาง ถ้าเสียหายมากอาจเกิดมีผลต่อการดำรงชีวิต อย่างไรก็ตามในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีกลไกในการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เสียหายให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ รูปแบบของความเสียหายของโมเลกุลของดีเอ็นเอที่พบบ่อยๆ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. เกิดการแตกหักบนสายใดสายหนึ่งหรือทั้งสองสายของโมเลกุลของดีเอ็นเอ เนื่องจากการโค้งงอหรือบิด

2. เกิดการสูญเสียโมเลกุลของเบสไปจากโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสภายในเซลล์

3. เกิดจาดการเปลี่ยนแปลงของเบสตัวหนึ่งหรือหลายๆ ตัวในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เนื่องจากสารเคมีเป็นตัวกระตุ้นในให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว

4. สิ่งก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ เช่น รังสีเอ็กซ์ แสงอัลตราไวโอเลต รังสีแกรมมา สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติของเบสในนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอได้ เช่น แสงอัลตราไวโอเลตทำให้เกิดการจับของเบสไทมีนในสายเดียวกัน

สำหรับกลไกในการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอ มีหลายวิธีแตกต่างกันดังนี้

1. โฟโตรีแอคติเวชั่น (photoreactivation) เป็นการซ่อมแซมความผิดปกติของโมเลกุลของดีเอ็นเอ เช่น ในกรณีที่เกิดไทมีนไดเมอร์เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งเกิดการเกาะกันของเบส T ในสายเดียวกันเป็นไซโคลบิวเทนริง (cyclobutane ring)โดยใช้เอนไซม์โฟโตรีแอคติเวติง (photoreactivating enzyme) หรือเอนไซม์ดีเอ็นเอโฟโตไลเอส (DNA photolyase) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้เริ่มต้นด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโฟโตไลเอส จะเข้าไปเกาะที่ตำแหน่งที่เกิดไทมีนไดเมอร์และเอนไซม์นี้จะดูดซับแสงสว่าง (visible light) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เอนไซม์นี้เข้าทำลายไซโคลบิวเทนริงที่ยึดระหว่างเบสไทมีนด้วยกัน ทำให้เบสไทมีนสามารถไปเข้าคู่กับเบสอะดีนีนของสายกันตรงข้ามได้เหมือนเดิม หลังจากนั้นเอนไซม์นี้ก็จะหลุดจากตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ผิดปกติ ก็จะได้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปกติเหมือนเดิม (รูปที่ 16)

ในกรณีที่เกิดความผิดปกติของโมเลกุลของดีเอ็นเอเนื่องจากมีหมู่เมธิล (methyl group) เกินมาจากปกติที่ตำแหน่ง O^6 ของเบสกัวนิน (O^6 methylguanine) ก็จะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอเมธิลทรานสเฟอเรส (O^6 – mGUA DNA methyltransferrase: O^6 – mGUA) ทำหน้าที่กำจัดหมู่เมธิลที่เกินมาออกจากโมเลกุลของเบสกัวนิน ก็จะทำให้ได้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปกติเหมือนเดิม

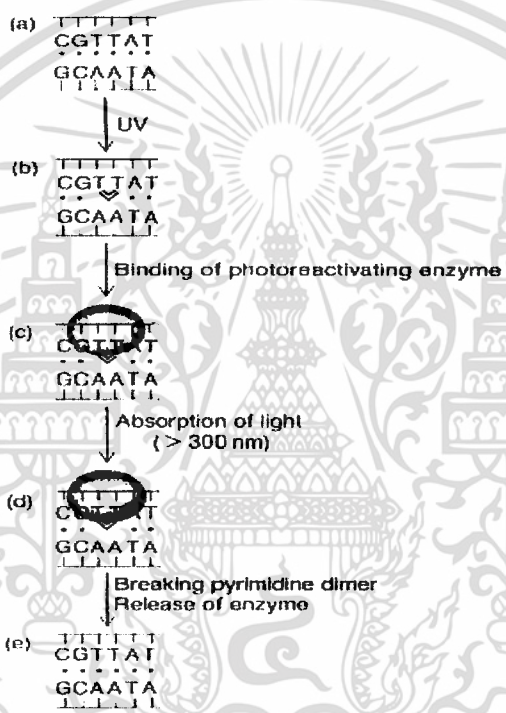
2. เอกซ์ซิชั่นรีแพร์ (excision repair) เป็นกระบวนการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ผิดปกติทั่วๆ ไป โดยจะมีการตัดส่วนของดีเอ็นเอที่เสียหายหรือผิดปกติออกไปโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ และจะมีการเติมส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกต้องแทนส่วนที่ถูกตัดออกไปนี้ การซ่อมแซมดีเอ็นเอดังกล่าวนี้มีหลายแบบด้วยกัน เช่น

<u>การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เสียหายจากแสงอัลตราไวโอเลต (UV damage repair)</u>

เมื่อโมเลกุลของดีเอ็นเอได้รับแสงอัลตราไวโดเลตโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเกิดไทมีนไดเมอร์ขึ้นภายใน 1-2 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่มีการซ่อมแซมโดยวิธีโฟโตรีแอคติเวชั่นแล้ว การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดไทมีนไดเมอร์จะเกิดขึ้นโดยมีเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (endonuclease) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ย่อยอีก 3 ชนิด คือ A, B และ C เอกซ์ซินิวคลีเอส (A, B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ C excinuclease) ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยยีน uvr A, uvr B และ uvr C เอนไซม์ย่อยเหล่านี้จะทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 8 นับจากปลาย 5′ ของบริเวณที่เกิดไทมีนไดเมอร์และตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 4 นับจากปลาย 3′ ของบริเวณที่เกิดไทมีนไดเมอร์ จากนั้นจะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอเฮลิเคส 2 (DNA helicase II) ซึ่งถูกสังเคราะห์จากยีน uvr D ทำหน้าที่แยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยเบส 12 เบส นั้นออกมาซึ่งชิ้นส่วนดังกล่าวจะถูกย่อยสลายไป ต่อจากนั้นจะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส I (DNA polymerase I) และไลเกส (ligase) ทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องตรงบริเวณช่องว่างที่ถูกตัดออกไปให้สมบูรณ์ (ประดิษฐ์, 2543)



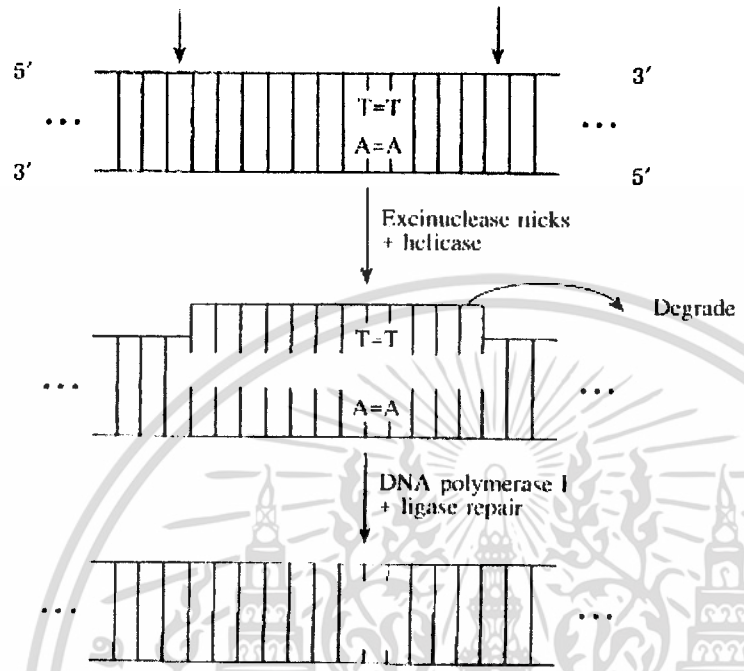
รูปที่ 16 การซ่อมแซมโมเลกุลของ DNA โดยวิธีโฟโตรีแอคติเวชั่น
ที่มา: ประดิษฐ์ (2543)

2.10.6 มิวเตชั่นกับการนำไปใช้

นอกจากมิวเตชั่นจะเป็นกลไกสำคัญ ทำให้เกิดความแปรผันทางพันธุกรรมและเป็นรากฐานสำคัญของกระบวนการวิวัฒนาการแล้ว มิวเตชั่นยังเป็นปัจจัยสำคัญในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์และการผสมพันธุ์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สัตว์และพันธุ์พืชที่ประโยชน์ทางการเกษตรทั้งพวกพืชสวน พืชไร่และพวกไม้ประดับต่างๆ ซึ่งเป็นที่นิยมกันอยู่โดยทั่วไปในปัจจุบัน การชักนำทำให้เกิดยีนมิวเตชั่นในสัตว์ โดยเฉพาะแมลงที่เป็นพาหะนำโรคหรือแมลงศัตรูพืชนับว่าเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์อย่างมากในการคัดเลือกพันธุ์แมลงเพื่อผลประโยชน์ทางการควบคุมหรือกำจัดแมลงพาหะหรือแมลงศัตรูพืชนั้นๆ โดยวิธีทางพันธุศาสตร์



รูปที่ 17 การซ่อมแซมโมเลกุลของ DNA ที่ถูกทำลายโดยแสงอัตราไวโอเลต
ที่มา: ประดิษฐ์ (2543)

การศึกษามิวเตชั่นควบคู่กับการคัดเลือกพันธุ์ ในพวกจุลินทรีย์มีประโยชน์อย่างยิ่งในทางอุตสาหกรรมบางประเภทที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของพวกจุลินทรีย์ อันได้แก่การผลิตยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลิน (Penicillin) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) การคัดเลือกพันธุ์ไรโซเบียมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน เหล่านี้เป็นต้น

แล้วเนื่องจากในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษต้องทำในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและพีเอชสูงๆ ที่ประมาณ 10-11 ดังนั้นในการประยุกต์โดยนำเอนไซม์ไซลาเนสมาใช้ในกระบวนการจึงต้องการไซลาเนสที่มีคุณสมบัติที่ทนความร้อนสูงและพีเอชในสภาวะที่เป็นด่างมากๆ ซึ่งอาจทำได้โดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ และในบางกรณีมีการปรับปรุงให้เชื้อมีความสามารถต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและอาจต้องการให้เชื้อผลิตผลิตภัณฑ์ให้ได้มากๆ ที่อาจมากกว่าเชื้อสายพันธุ์แท้ (ภัทราพร และคณะ, 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาพบว่า *Aspergillus niger* GCBMX-45 ที่ทำการกลายพันธุ์เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงที่สุดโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 1800 ยูนิตต่อกรัม ใช้น้ำกลั่นในการทำการเจือจาง ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 1825 ยูนิตต่อกรัม ซึ่งสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารอื่นๆที่ใช้ในการทำการเจือจาง (HCl ความเข้มข้น 0.1 นอมอล์, HCl ความเข้มข้น 0.01 นอมอล์, น้ำประปา, สารละลายเกลือแร่) *A. niger* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเมื่อเทียบกับเวลาอื่นๆ (Waseen และคณะ, 2002)

จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Fusarium oxysporum* เมื่อนำมาทำการกลายพันธุ์โดยใช้ UV-11 และ NTG-19 นำมาเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนหลายๆ ชนิด พบว่าจะให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่า 2-3 เท่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ปกติและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากที่สุดในไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 และรำข้าวสาลีความเข้มข้นร้อยละ 5 ตามลำดับโดยใช้เวลาในการบ่ม 120 ชั่วโมง และน้ำมันมะกอกสามารถช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงถึงร้อยละ 25 (Singh และคณะ, 1995)

จากการศึกษาทำการกลายพันธุ์โดยใช้เชื้อ *Penicillium purpurogenum* โดยใช้สปอร์ 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาทำเป็นสารละลายสปอร์ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.5 แล้วทำการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 75 วินาที โดยให้ห่างจากแสงอัลตราไวโอเลต 18 เซนติเมตร และให้มีร้อยละของการอยู่รอดเท่ากับร้อยละ 1 จากนั้นนำสปอร์ที่ฉายรังสีอัลตราไวโอเลตมา spread บนจานอาหาร PDA ที่มี triton x-100 ร้อยละ 1 และ Treated ด้วย N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidine (NTG) 2 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ UV-64 ผลิตได้ 67.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังบ่มได้ 5 วันเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์แท้ผลิตได้ 37.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังบ่มได้ 7 วัน ในอาหาร Mและels′ medium ที่มีฟางข้าวสาลี ร้อยละ 1 และ NTG-737 ให้กิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 1,249 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังบ่มได้ 3 วันเมื่อเปรียบเทียบกับ UV-64 หลังบ่มได้ 5 วัน ในอาหารที่ฟางข้าวสาลี ร้อยละ 1 ซึ่งมีทวีน 80 ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ และการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสที่ UV-64 ผลิตได้ 4.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์แท้ผลิตได้ 2.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยใช้ brichwood xylan ร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน (Steiner และคณะ, 1998)

ความเจริญก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อเอื้ออำนวยความสะดวกสบายในรูปแบบต่างๆ แก่มนุษย์โดยไม่ใช้ความระมัดระวังให้ดีและจะส่งผลกระทบย้อนกลับมาให้โทษแก่มนุษย์อย่างไม่มีทางหลีกเลี่ยง ดังที่จะเห็นได้ว่าโครงงานปฏิรูปปรมาณู รังสีเอ็กซ์ และแสงอัลตราไวโอเลต ที่ใช้ในโรงงงานอุตสาหกรรมและทางการแพทย์ เครื่องโทรทัศน์สี สารกัมมันตรังสี รวมทั้งพวกสารเคมีกันบูดในอาหาร สีย้อมผ้า ใยพลาสติก เป็นต้น ซึ่งล้วนแล้วแต่ให้คุณอนันต์แต่อาจเป็นโทษมหันต์ได้ ถ้าหากใช้ไม่ถูกต้องตามหลักวิชาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นปัจจัยที่มีผลชักนำให้เกิดมิวเตชั่นในสิ่งมีชีวิตทั่วไปรวมทั้งในคนจึงมีบทบาทอย่างยิ่งต่อคนในสังคมมนุษย์ทั้งในปัจจุบันและอนาคต เพราะมิวแตนท์ยีนที่เกิดขึ้นส่วนมากเป็นยีนที่ไม่ดีและบางกรณีอาจเป็นอันตรายต่อชีวิตไม่ว่ายีนนั้นมีคุณสมบัติเด่นหรือด้อยก็ตาม หรืออาจเป็นยีนที่เป็นต้นเหตุของโรคทางกรรมพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถถ่ายทอดกระจายไปในกลุ่มยีนของมนุษย์ต่อไปอย่างไม่หยุดยั้ง อันจะเป็นภาระต่อเศรษฐกิจและสังคมมนุษย์ชาติที่มีราคาแพงและหลีกเลี่ยงไม่พ้น ยิ่งไปกว่านั้นนักวิทยาศาสตร์ยังพบข้อมูลที่แสดงว่าปัจจัยต่างๆ ดังกล่าว นอกจากจะสามารถชักนำให้เกิดมิวเตชั่นได้แล้วก็ยังอาจเป็นต้นเหตุของโรคมะเร็งอีกด้วย กระนั้นก็ตามโทษที่อาจเกิดจากปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ ถ้ารุนแรงขนาดถึงแก่ชีวิตก็ยังคงไม่โหดร้ายไปกว่าตัวการที่ทำให้เกิดมิวแตนท์ยีนที่เลวซึ่งอาจถ่ายทอดต่อไปในกลุ่มประชากรและสร้างปัญหาให้แก่สังคมมนุษย์ในระยะยาว

2.11 การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลน

การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลน เนื่องจากไซแลนสำเร็จรูปมีราคาแพง เพื่อลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจึงได้มีการศึกษาเพื่อนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลน เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด รำข้าวและอื่นๆ

จากการศึกษาการย่อยวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรและเยื่อกระดาษชนิดต่างๆ ที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าไซลาเนสสามารถย่อยไซแลนในวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรและเยื่อกระดาษต่างๆ ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ โดยการย่อยไซแลนในเปลือกข้าวโพดสูงสุด รองลงมาคือ ชายอ้อย ฟางข้าว ซังขาวโพด และรำข้าว ตามลำดับ ขณะที่อัตราการย่อยในเยื่อกระดาษ พบว่าเยื่อชานอ้อยถูกย่อยได้มากที่สุด โดยปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อสน 2.7 และ 7.5 เท่า ตามลำดับ (จักรกฤษณ์ และคณะ, 2546)

จากการศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรต่างๆ ได้แก่ เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย และรำข้าว มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลนที่มีราคาแพง พบว่าเปลือกข้าวโพดร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลาเนส (ชนิดา และคณะ, 2545)

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus AR1* เลี้ยงในอาหารสำหรับการหมัก ในสภาพอาหารเหลว ที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ไซโลสให้กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุด 38.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือฟางข้าว 30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไซแลน 24.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และซังข้าวโพด 19.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Anthony และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

แท่งแก้วกวนสารแม่เหล็ก
เครื่องกวนสาร
แผ่นกรองซินเทอร์กลาส
ฮีมาไซโตมิเตอร์
ตู้อบแห้ง
ตู้บ่มเชื้อ
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
ตู้ฉายแสงอัลตราไวโอเลต
จานเลี้ยงเชื้อ
ที่เขี่ยเชื้อ
คอร์กบอยเลอร์
เครื่องวัดพีเอช
เครื่องเขย่า
ตู้ปลอดเชื้อ
กล้องจุลทรรศน์
ตู้เย็น
เครื่องชั่งสาร
เครื่องแก้ว
ตะเกียงแอลกอฮอล์
ฟลาสก์

สารเคมี

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85
ทวีน (Tween) 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.01
ไฮดรอคลอลิก (HCL) ความเข้มข้น 5 นอมอล์
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 5 นอมอล์
คองโก เรด (Congo red) ความเข้มข้นร้อยละ 1
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์
สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic Acid Reagent: DNS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมสารละลายสปอร์

เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ลงใน Potato Dextrose Agar (PDA) Slant เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Anthony และคณะ, 2003) เพื่อให้เกิดสปอร์เต็มที่ จากนั้นเติมน้ำกลั่น ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และ ทวีน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 (Singh และคณะ, 1995) จากนั้นกำจัดเส้นใยของเชื้อราออกด้วยแผ่นกรองซินเทอร์กลาส และนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

3.2.2.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อหาร้อยละการอยู่รอด

เตรียมสารละลายสปอร์ 10 มิลลิลิตรใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ (plate) ที่อบฆ่าเชื้อสำหรับฉายแสงอัลตราไวโอเลตและไม่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต (ชุดควบคุม) อย่างละ 1 ชุด จากนั้นเตรียมอุปกรณ์สำหรับการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ภายในตู้ปลอดเชื้อ แล้วทำการประกอบเครื่องมือสำหรับทำการกลายพันธุ์ โดยวางตู้ฉายแสงบน magnetic stirrer จากนั้นวางจานเลี้ยงเชื้อสำหรับทำการกลายพันธุ์บน magnetic stirrer ให้ห่างจากหลอดกำเนิดแสงแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 15 เซนติเมตร และใส่ magnetic bar ที่อบฆ่าเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อปรับความเร็วในการหมุนของ magnetic bar ช้าๆ (ทุกขั้นตอนหลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต พยายามอย่าให้สปอร์โดนแสง) จากนั้นใช้นาฬิกาจับเวลาเป็นระยะ เพื่อเก็บตัวอย่างสารละลายสปอร์ทั้ง 2 ชุด ที่เวลา 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ โดยดูดเชื้อมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บไว้ในที่มืด 3 ชั่วโมง แล้วนำมาทำการเจือจางสารละลายสปอร์ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1},10^{-2},10^{-3},10^{-4} และ 10^{-5} ทำการ Spread Plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน หลังจากนั้นนับจำนวนโคโลนีและคำนวณร้อยละการอยู่รอดเทียบกับเวลาเริ่มต้น 0 นาที แล้วนำมาเขียนกราฟระหว่างเวลากับร้อยละการอยู่รอด (killing curve) เพื่อใช้ในการคัดเลือกร้อยละการอยู่รอดเท่ากับร้อยละ 5 (Singh และคณะ, 1995)

3.2.2.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อหาสายพันธุ์กลายที่ทนต่อสภาวะที่เป็นด่าง

ทำการกลายพันธุ์เชื้อราโดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาที่ทำให้ร้อยละการอยู่รอดเท่ากับร้อยละ 5 และนำสารละลายสปอร์ทั้งหมดเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายสปอร์มาทำการเจือจางสารละลายสปอร์ที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นทำการ Spread Plate โดยใช้ตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร บนอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อ CD-Medium (Anthony และคณะ, 2003) ที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 8, 9, 10 และ 11 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน คัดเลือกเชื้อที่ให้วงใสรอบโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหาร CD-Medium ที่มีไซแลน โดยรวบรวมเชื้อที่เจริญในสภาพที่เป็นด่าง เก็บรักษาไว้ในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) Slant

3.2.3 การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

นำเชื้อราสายพันธุ์กลายทั้งหมดที่เก็บรักษาไว้ในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) Slant มาเลี้ยงในอาหาร CD-Medium ในสภาพอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ ที่ปรับพีเอชในสภาวะเป็นด่างสูงสุด และมีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการทำสารละลายสปอร์ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปเติมในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตรปริมาณ 1 มิลลิลิตร สายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ จากนั้นวางบนเครื่องเขย่า บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างอาหารเหลวทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายส่วนใสไปวัดพีเอช และแบ่งส่วนใสใส่ภาชนะขนาดเล็กเก็บไว้และนำมาคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างเอนไซม์ในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

3.2.3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างเอนไซม์ในเชิงปริมาณ

เตรียมอาหาร CD-medium ที่เติมไซแลนร้อยละ 1 และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสร้อยละ 1 ปรับพีเอชในสภาวะเป็นด่างสูงสุด ในสภาพอาหารแข็งสำหรับการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส จากนั้นนำคอร์กบอยเลอร์เจาะรูอาหารเป็นวงกลมและนำสารละลายส่วนใสที่เก็บไว้มาหยดลงในหลุมๆ ละ 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง และทำการย้อมสีด้วยคองโกเรดความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที วัดขนาดวงใสของเชื้อ แล้วทำการเปรียบเทียบขนาดของวงใสที่เกิดจากสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์แท้ สายพันธุ์ใดที่ให้ขนาดของวงใสในอาหาร CD-medium ที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนสูงกว่าสายพันธุ์แท้แต่ไม่ให้วงใสในอาหาร CD-medium ที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนหรือให้น้อยกว่าสายพันธุ์แท้ โดยการคำนวณความแตกต่างทางสถิติ

3.2.3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างเอนไซม์ในเชิงคุณภาพ

นำสารละลายส่วนใสของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการคัดเลือกเชิงปริมาณมาแล้วนำมาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (Tang และคณะ, 1987) โดยการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์โดยใช้ Dinitrosalicylic Acid Reagent (DNS) (Miller, 1959) และนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมาคำนวณความแตกต่างทางสถิติ และเพื่อหาสายพันธุ์กลายที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดและไม่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสหรือมีน้อยมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลน

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลน คือ ซังข้าวโพด โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1 ใช้เลี้ยงสายพันธุ์กลายที่ผ่านการคัดเลือกเชิงปริมาณมาแล้วมาเลี้ยงในอาหาร CD-Medium ในสภาพอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ ที่ปรับพีเอชในสภาวะเป็นด่างสูงสุด และมีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการทำสารละลายสปอร์ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปเติมในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร สายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ จากนั้นวางบนเครื่องเขย่า บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างอาหารเหลวทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายส่วนใสไปวัดพีเอช และแบ่งส่วนใสใส่ภาชนะขนาดเล็กเก็บไว้ และนำมาคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างเอนไซม์ในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพต่อไป และนำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสมาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีไซแลนและซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

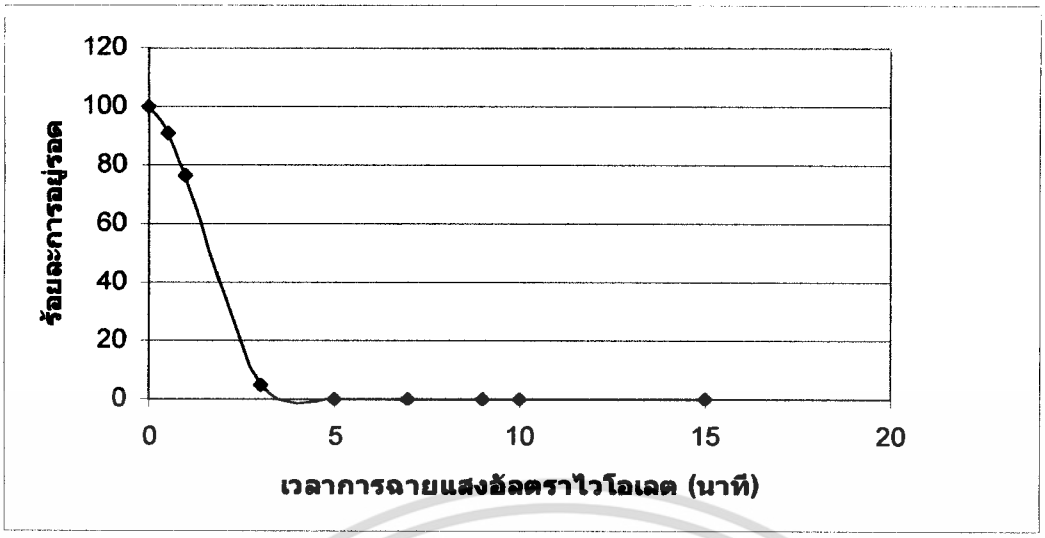
4.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อหาร้อยละการอยู่รอด

จากผลการทดลองการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เวลา 0 นาที เชื้อที่ไม่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (ตัวควบคุม) ได้ 1.1×10^{4} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาคำนวณหาร้อยละการอยู่รอดโดยเปรียบเทียบกับโคโลนีของเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (ตัวทดลอง) ที่เวลา 3 นาที จะมีร้อยละการอยู่รอดประมาณร้อยละ 4.54 ที่คัดเลือกได้จากกราฟ killing curve ซึ่งใกล้เคียงกับร้อยละการอยู่รอดที่ต้องการร้อยละ 5 (Singh และคณะ, 1995) ขั้นตอนต่อไปจึงทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่เวลา 3 นาที

ตารางที่ 3 จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรและร้อยละการอยู่รอดของเชื้อ *A. fumigatus* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ ในระดับความเจือจาง 10^{-1}

เวลา (นาที)	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร	ร้อยละการอยู่รอด
0	1.1×10^{4}	100
0.5	1.0×10^{4}	90.91
1	8.4×10^{3}	76.36
3	5.0×10^{2}	4.54
5	0	0
7	0	0
9	0	0
10	0	0
15	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 ร้อยละการอยู่รอดของเชื้อ *A. fumigatus* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}

4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อหาสายพันธุ์กลายที่ทนต่อสภาวะที่เป็นด่าง

จากผลการทดลองการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อ *A. fumigatus* ที่ทนต่อสภาวะที่เป็นด่าง โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-Medium ที่มีไซแลนร้อยละ 1 ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 8, 9, 10 และ 11 พบว่ามีสายพันธุ์กลายสามารถเจริญได้ในอาหารที่พีเอช 8, 9, 10 และ 11 ได้ทั้งหมด ซึ่งโดยปกติสายพันธุ์แท้สามารถเจริญได้ในอาหารที่พีเอช 4-10 (Anthony และคณะ, 2003) จากนั้นจึงทำการคัดเลือกโคโลนีที่ให้วงใสรอบโคโลนีในอาหารที่พีเอช 11 ซึ่งเป็นพีเอชที่มีความเป็นด่างสูงสุดจำนวน 100 สายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์กลายทั้งหมดนี้จะนำมาคัดเลือกในเชิงปริมาณและคุณภาพต่อไป

4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณ

จากผลการทดลองการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อ *A. fumigatus* เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในอาหาร CD-medium ในสภาพอาหารเหลวโดยปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 11 ซึ่งเมื่อพีเอชสุดท้ายหลังการเลี้ยงเชื้อลดลง และทำการเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายในเชิงปริมาณทั้งหมดจำนวน 100 สายพันธุ์กับเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์แท้ต่อการใช้ไซแลน และคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส พบว่ามีสายพันธุ์กลายจำนวน 10 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 18, 27 และ 28 ที่ให้ขนาดของวงใสในอาหาร CD-medium ที่มีไซแลนสูงกว่าสายพันธุ์แท้แต่ไม่ให้วงใสในอาหารที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสหรือให้น้อยมากซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ขนาดวงใสของเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายในอาหารที่มีไซแลน และคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 11 และพีเอชสุดท้ายของแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์กลาย	ขนาดวงใสในอาหารที่มีไซแลน	ขนาดวงใสในอาหารที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส	พีเอชสุดท้าย
สายพันธุ์แท้	2.5^{cde}	1.4^{hij}	8.30
1	2.1^{g}	1.4^{hij}	8.57
2	3.9^{a}	3.8^{a}	8.35
3	2.4^{ef}	3.2^{b}	8.30
4	2.9^{b}	1.7^{ef}	8.19
5	2.5^{cde}	0^{y}	8.49
6	2.6^{c}	0^{y}	8.46
7	2.8^{b}	0.9^{pqrstu}	7.94
8	2.0^{jk}	1.2^{jklnmo}	8.29
9	2.9^{b}	1.5^{fgh}	7.84
10	2.7^{b}	1.3^{ij}	8.20
11	1.6^{m}	0.9^{pqrstu}	8.72
12	2.1^{hi}	0.9^{pqrstu}	8.42
13	2.6^{c}	1.7^{ef}	7.89
14	0^{u}	$1.0^{opqrstu}$	9.02
15	2.0^{ij}	$1.0^{opqrstu}$	8.28
16	1.9^{kl}	0.9^{rstuvw}	8.36
17	1.1^{pq}	0^{y}	8.87
18	2.6^{cd}	0^{y}	8.09
19	2.0^{hij}	$1.0^{nmopqrs}$	8.15
20	2.1^{gh}	0.9^{qrstuv}	8.76
21	0^{u}	0^{y}	8.85
22	2.2^{g}	$1.0^{opqrstu}$	8.16
23	2.2^{g}	0.9^{rstuvw}	8.11
24	2.1^{hi}	$1.0^{nmopqrs}$	8.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สายพันธุ์กลาย	ขนาดวงใสในอาหารที่มีไซแลน	ขนาดวงใสในอาหารที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส	พีเอชสุดท้าย
25	1.1^{pqr}	$1.1^{lnmopqr}$	8.55
26	0^{u}	1.1^{klnmop}	8.49
27	2.7^{b}	0^{y}	8.44
28	2.6^{de}	0^{y}	8.40
29	1.1^{p}	0^{y}	8.46
30	1.5^{no}	0^{y}	8.64
31	0^{u}	0^{y}	8.64
32	0^{u}	0^{y}	8.53
33	1.6^{mn}	0^{y}	9.04
34	1.6^{mn}	0^{y}	8.53
35	1.4^{o}	0^{y}	8.70
36	0^{u}	0^{y}	8.97
37	1.6^{mn}	0^{y}	8.45
38	1.5^{mno}	0^{y}	8.88
39	2.2^{f}	1.7^{ef}	7.89
40	0^{u}	0^{y}	9.33
41	2.4^{de}	1.3^{jkl}	8.15
42	0^{u}	1.5^{ghi}	8.84
43	1.8^{l}	1.5^{ghi}	8.89
44	0^{u}	1.6^{efg}	9.02
45	0^{u}	1.3^{jkl}	9.01
46	0^{u}	$1.1^{lnmopqr}$	9.03
47	0^{u}	$1.0^{nopqrst}$	8.91
48	0^{u}	1.2^{jklmn}	8.82
49	0^{u}	0.9^{pqrstu}	9.05
50	0^{u}	0.9^{qrstuv}	8.98
51	0^{u}	$1.0^{nopqrst}$	8.95
52	0^{u}	0^{y}	8.87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สายพันธุ์กลาย	ขนาดวงใสในอาหารที่มีไซแลน	ขนาดวงใสในอาหารที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส	พีเอชสุดท้าย
53	0^{u}	0^{y}	8.97
54	1.0^{rs}	0^{y}	8.80
55	0^{u}	0^{y}	8.76
56	0.8^{t}	0.9^{pqrstu}	9.02
57	1.0^{qrs}	2.1^{d}	8.30
58	1.2^{p}	3.0^{c}	8.19
59	0^{u}	$1.0^{nopqrst}$	8.30
60	0^{u}	1.8^{e}	9.05
61	0^{u}	1.8^{e}	9.06
62	0^{u}	$1.0^{nopqrst}$	8.69
63	0^{u}	$1.1^{lnmopqr}$	9.23
64	0^{u}	1.2^{jklm}	9.19
65	0^{u}	0^{y}	9.04
66	0^{u}	$1.1^{lnmopqr}$	9.00
67	0^{u}	0^{y}	8.41
68	0^{u}	0^{y}	9.09
69	0^{u}	0^{y}	9.49
70	0^{u}	1.2^{jklmn}	9.11
71	0^{u}	0.8^{tuvwx}	9.41
72	0^{u}	1.3^{ijk}	9.45
73	0^{u}	$1.0^{nopqrst}$	9.37
74	0^{u}	0.9^{pqrstu}	9.20
75	0^{u}	0.9^{qrstuv}	9.11
76	0^{u}	1.4^{hij}	8.99
77	0^{u}	1.3^{ijk}	9.12
78	0^{u}	1.7^{e}	8.69
79	0^{u}	0^{y}	9.21
80	0^{u}	$1.1^{lnmopqr}$	8.98

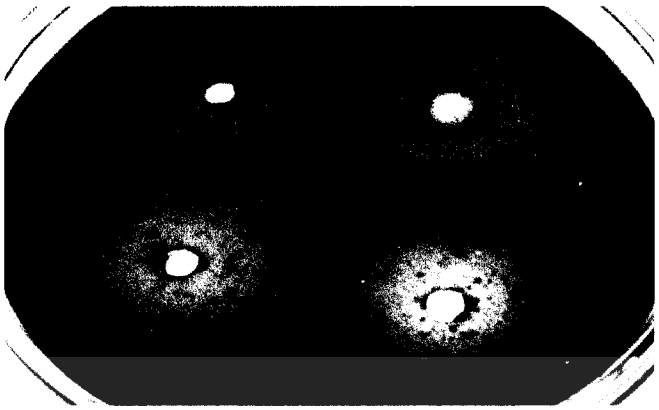
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สายพันธุ์กลาย	ขนาดวงใสในอาหารที่มีไซแลน	ขนาดวงใสในอาหารที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส	พีเอชสุดท้าย
81	0^{u}	0^{y}	8.92
82	0^{u}	0.9^{pqrstu}	8.78
83	0^{u}	0.9^{rstuvw}	9.13
84	0^{u}	1.1^{lnmopq}	8.96
85	0^{u}	$1.1^{lnmopqr}$	8.58
86	0^{u}	$1.1^{lnmopqr}$	9.13
87	0^{u}	$1.1^{lnmopqr}$	8.76
88	0^{u}	0.9^{rstuvw}	8.94
89	0^{u}	1.3^{ijk}	9.34
90	0^{u}	0.8^{tuvwx}	9.98
91	0^{u}	0.6^{x}	8.84
92	0^{u}	0.8^{tuvwx}	9.05
93	0^{u}	0.8^{stuvw}	9.01
94	0^{u}	0.8^{tuvwx}	8.95
95	0^{u}	0^{y}	9.49
96	0^{u}	0.7^{vwx}	9.22
97	0^{u}	0.7^{wx}	9.10
98	0^{u}	0.8^{uvwx}	9.07
99	0^{u}	0.9^{rstuvw}	9.81
100	0.9^{s}	0.8^{stuvw}	8.89

หมายเหตุ : ตัวอักษรหลังตัวเลขถ้าแตกต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



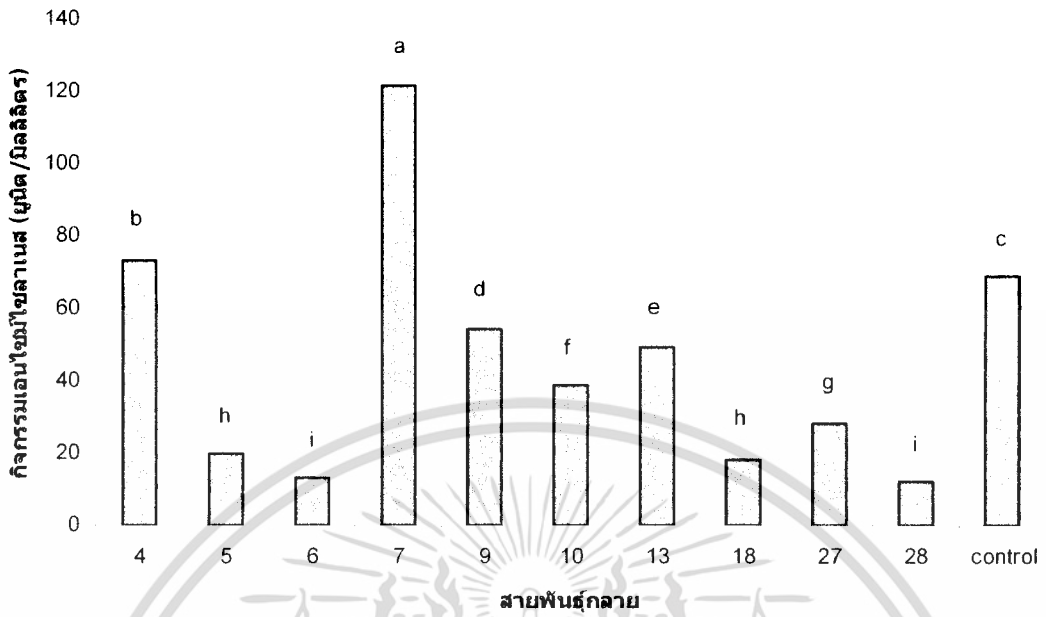
รูปที่ 19 ลักษณะวงใสของการย่อยไซแลนที่เกิดจากเอนไซม์ไซลาเนส

รูปที่ 20 การเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* ในอาหาร CD-medium ที่พีเอช 11 ซึ่งมีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

4.4 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างเอนไซม์ในเชิงคุณภาพ

จากการทดลองการคัดเลือกสายพันธุ์กลายสร้างเอนไซม์ในเชิงคุณภาพ โดยนำสารละลายส่วนใสของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการคัดเลือกเชิงปริมาณมาแล้วซึ่งมีทั้งหมด 10 สายพันธุ์มาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าสายพันธุ์ที่ 7 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุด เท่ากับ 121.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์แท้ที่พีเอช 11 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 68.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่ Anthony และคณะ, 2003 ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* AR1 สายพันธุ์แท้ในอาหาร CD-medium ปรับพีเอชที่ 4-10 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่พีเอช 5, 9 และ 10 เท่ากับ 135, 24 และ 11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยใช้ฟางข้าวความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หมายเหตุ : ตัวอักษรหลังตัวเลขถ้าแตกต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

รูปที่ 21 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *A. fumigatus* แต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนและพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 11

รูปที่ 22 ลักษณะโคโนิดิโอฟอร์และโคนิเดียของเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลน

จากผลการทดลองการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลน คือ ซังข้าวโพด เลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายทั้งหมด 10 สายพันธุ์ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ โดยสายพันธุ์กลายที่ 10 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุด เท่ากับ 7.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับไซแลนจะให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่น้อยกว่า และ Anthony และคณะ, 2003 ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* AR1 สายพันธุ์แท้ในอาหาร CD-medium ปรับพีเอช 9 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60-84 ชั่วโมง สามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสในแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ ไซแลน ไซโลส ซังข้าวโพด และฟางข้าว ในพีเอช 9 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส เท่ากับ 24, 38, 19.3 และ 30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

รูปที่ 23 การเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* ในอาหาร CD-medium ที่พีเอช 11 ซึ่งมีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 5 ขนาดวงใสของเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายในอาหารที่มีไซแลนและคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 11 และพีเอชสุดท้ายของแต่ละสายพันธุ์

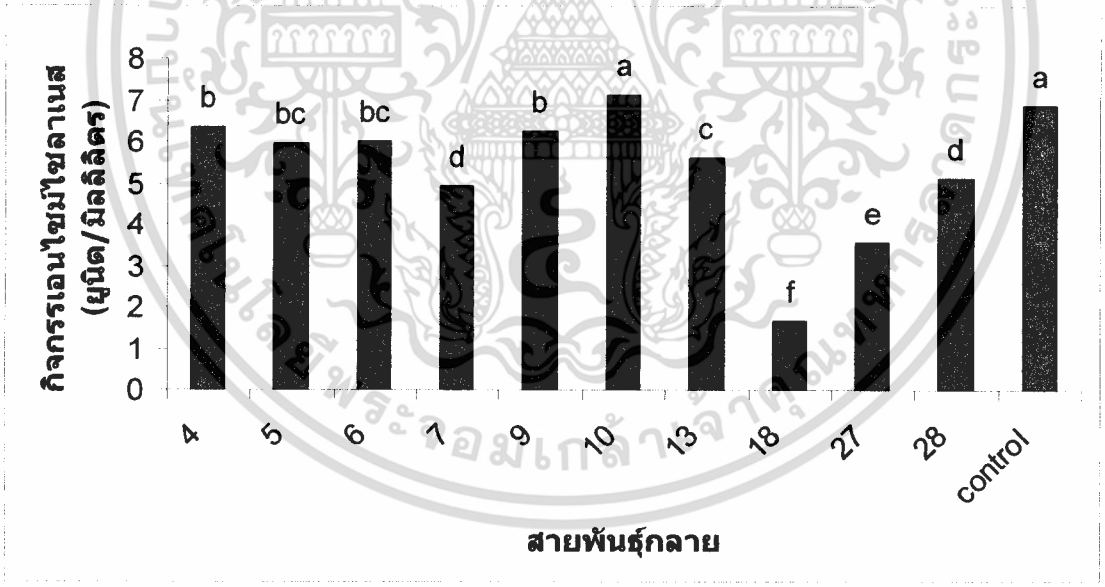
สายพันธุ์กลาย	ขนาดวงใสในอาหารที่มีไซแลน	ขนาดวงใสในอาหารที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส	พีเอชสุดท้าย
สายพันธุ์แท้	1.4^{ab}	1.4^{a}	9.21
4	0.9^{c}	1.2^{c}	9.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สายพันธุ์กลาย	ขนาดวงใสในอาหารที่มีไซแลน	ขนาดวงใสในอาหารที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส	พีเอชสุดท้าย
5	1.3^{a}	0^{e}	9.18
6	1.1^{d}	0^{e}	9.19
7	1.2^{cd}	1.0^{d}	9.20
9	1.4^{a}	1.3^{bc}	9.21
10	1.2^{cd}	1.2^{c}	9.20
13	1.4^{ab}	1.1^{d}	9.19
18	1.1^{d}	0^{e}	9.25
27	1.2^{bc}	0^{e}	9.16
28	1.3^{abc}	1.4^{ab}	9.20

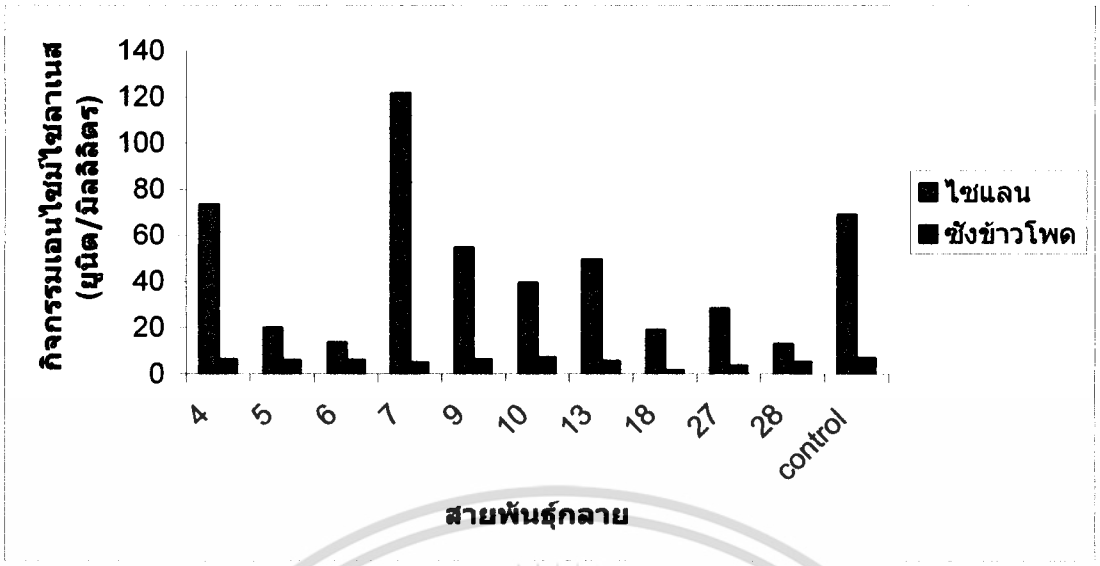
หมายเหตุ : ตัวอักษรหลังตัวเลขถ้าแตกต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



หมายเหตุ : ตัวอักษรหลังตัวเลขถ้าแตกต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

รูปที่ 24 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *A. fumigatus* แต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 25 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *A. fumigatus* แต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนและซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการคัดเลือกเชื้อ *A. fumigatus* ที่ทำการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 3 นาทีพบว่าเชื้อ *A. fumigatus* สามารถเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์ได้ที่พีเอช 8, 9, 10 และ 11 จึงสามารถคัดเลือกเชื้อ *A. fumigatus* ที่เจริญและสร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่พีเอช 11 ซึ่งเป็นพีเอชที่สูงที่สุดและคัดเลือกได้เชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายเชื้อที่ 7 ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด 121.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งให้เอนไซม์มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

ข้อเสนอแนะจากผลการวิจัย

1. เนื่องจากเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ จะมีความจำเพาะกับแหล่งคาร์บอนซึ่งใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนมีราคาแพงจึงควรศึกษาแหล่งคาร์บอนแหล่งอื่นๆ โดยการสกัดไซแลนออกมาเพื่อที่จะให้ต้นทุนการผลิตลดลง
2. ปรับปรุงสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้นและหาเทคนิคในการผลิตเพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่มาก
3. นำสายพันธุ์ที่ไม่ถูกคัดเลือกที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมาศึกษาเพื่อหาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
4. ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสควบคู่กันกับเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้
5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทั้งแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จักรกฤษณ์ เดชะอภัยคุณ, กนก รัตนะชัย และคิน เลย์ คู. 2546. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต cellulase-free xylanase จาก Alkaliphilic thermotolerrant *Bacillus halodurans* สายพันธุ์ C-1 ต่อการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และเยื่อกระดาษคราฟท์ต่างๆ. *วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ.* 26(2): 3-13 .

ชนัญญา ทิพย์มงคลศิลป์, นัฐวัฒน์ ชินะโยธิน และอภิวัฒน์ ถึกคุ้ม. 2545. การชักนำการกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อราเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชนิดา เลิศศลารักษ์, กนก รัตนะกนกชัย และคิน เลย์ คู. 2545. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต cellulase-free xylanase จาก *Bacillus firmus* K-1. *วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ.* 26(2): 201-207.

ชื่นจิตต์ บุญเถิด. 2536. การทำ Replica plating, ในวัฒนาลัย ปานบ้านปากเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์, บรรณาธิการ. เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย. 1 (1) : 14-16.

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

พิไลพรรณ พงษ์พูล. 2525. ราวิทยาเบื้องต้น. กรุงเทพฯ. โอเดียนสโตร์. น. 141-143.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2535. พันธุศาสตร์. ไทยวัฒนาพาณิชย์. กรุงเทพฯ. น. 212-241.

ภัทราพร แสงสว่าง, พัชรี จารุวัฒนชัยกุล และอธิพงษ์ สายหยุด. 2543. การชักนำให้เกิดสายพันธุ์กลายออกโซโทรปจากเชื้อ *Penicillium* sp. เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2533. พันธุศาสตร์. เจ้าพระยาการพิมพ์. กรุงเทพฯ. น. 127-135.

สำนักงานเลขานุการโครงการฉลากเขียว. 2540. สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย. ข้อกำหนดของกระดาษแปรรูป. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ.

Anthony, T., Chandra R., Rajendran, K.A. and Gunasekaran, P. 2003. High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. *Enzyme and Microbial Technology*. 32:647-654.

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

Brady, S., George, C., Henry, R. and McGraw-Hill. 1993. Material Handbook. 13th ed., Tokyo. p.733.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Buchert, J., Tenkanen, M., Kantelinen, A. and Viikari. 1994. Application of xylanases in the pulp and paper industry. *Bioresource Technology*. 50:65-72.

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

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

Garg, A.P., McCarthy, A.J. and Roberts, J.C. 1996. Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparations on birchwood kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology*. 18:261-267.

Gerald, J.S. 1973. Laboratory exercise in genetics. Macmillan. New York. pp.183-198.

Godfrey, T. and Rreichelt, J. eds. 1983. Edible Oils. *In* Industrial Enzymology: The application of enzyme in Industry. New York. The Nature Press. pp. 424-427.

Okeke, B.C. and Obi, S.K.C. 1995. Saccharification of agro-waste materials by fungal sugar. *Analytical Chemistry*. 31:426-428.

Ikram, U.H., Amna, E., Waseem, A.B. and Sikander, A. 2002. Studies on the biosynthesis of enzyme xylanase by submerged fermentation from *Aspergillus niger* GCBCX-45. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 5(12): 1309-1310.

Ikram, U.H., Maaiedah, T., Koukab, R., Ayesha, K., Hamid, M. and Mohsin, J. 2004. Optimization of cultural condition for the production of xylanase by chemically mutated strain of *Aspergillus niger* GCBCX-20. *International Journal of Agriculture & Biology*. 6(6):1115-1118.

Kuhad, R.C., Manchanda, M. and Singh, A. 1998. Optimization of xylanase production by a hyperxylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*. *Process Biochemistry*. 33(6):641-647.

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

Milagres, A.M.F., Lacis, L.S. and Prade, R.A. 1993. Characteristerization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 15: 248-253.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Myburgh, J., Prior, B. and Kilian, S.G. 1991. The temperature and pH properties of the extracellular hemicellulose-degrading enzymes of *Aureobasidium pullulans* NRRLY 2311-1. *Process Biochemistry*. 26:343-348.

Okeke, B.C. and Obi, S.K.C. 1995. Saccharification of agro-waste materials by fungal cellulases and hemicellulases. *Bioresource Technology*. 54:23-27.

Samson, R.A. and Ellen, S.R.H. 1988. Introduction to food-borne fungi (third edition). Natherlands.

Shamala, T.R. and Sreekantiah, K.R.1987. Successive cultivation of selected cellulolytic fungi on rice straw and wheat bran for economic production of cellulose and D-xylanas. *Enzyme and Microbial Technology*. 9:97-101.

Siedenberg, D., Gerlach, S.R., Schugerl, K., Giuseppin, M.L.F. and Hunik, J. 1998. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures. *Process Biochemistry*. 33:429-433.

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

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

Steiner, R.J., Carmorna, P., Ponce C., Berti, M. and Eyzaguirre, J. 1998. Isolation of mutant of *Penicillium purpurogenum* with enhanced xylanase and ß-xylosidase production. *World Jounal of Microbiology and Biotechnology*. 14: 589-590.

Waseem, A.B., Ikram, U.H. and Javed, L. 2002. Biosynthesis of xylanase by UV-Treated Mutant strain of *Aspergillus niger* GCBMX-45. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 1(1):10-14.

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

Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. 1988. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganism: Function and application. *Microbial Reviews*. 52(3):305-317.

http://helios.bto.ed.ac.uk/btomicrobes/thermo.htm

http://www.lsbu.ac.uk/water/hyara.html

www.cid.csic.es/homes/xgricri/prtease.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

www.nakamura.bio.titech.ac.jp/ xyn/xyn.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ส่วนประกอบของอาหาร CD-Medium มีดังต่อไปนี้

ส่วนที่ 1 แร่ธาตุหลัก

$NaNO_3$	3.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4$	0.5	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4$	0.01	กรัมต่อลิตร
Yeast extracts	5.0	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	15	กรัมต่อลิตร

ส่วนที่ 2 แร่ธาตุเสริม

Carboxymethyl cellulose	10	กรัมต่อลิตร
Oat spent xylan	10	กรัมต่อลิตร
Corn cob	10	กรัมต่อลิตร

<u>วิธีการเตรียมอาหารในการคัดเลือกจุลินทรีย์</u>

1. ชั่งส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 1 ในสัดส่วนให้ได้ปริมาตรตามต้องการ ยกเว้น $MgSO_4$ (ป้องกันการตกตะกอน) จากนั้นละลายส่วนที่ 1 เข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. แยกเติมไซแลน ซังข้าวโพด หรือคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสที่ 1 % ลงในอาหารที่แบ่งไว้คนละส่วน
3. ใส่วุ้นลงไป ต้มวุ้นให้ละลายและเติม $MgSO_4$ ที่ละลายไว้ตามสัดส่วนคนให้เข้ากัน
4. ปรับพีเอช โดยใช้ NaOH 5 N หรือ HCl 5 N ให้ได้พีเอชตามต้องการ
4. บรรจุลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ส่วนประกอบของอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
เด็กโทส (dextrose)	20	กรัมต่อลิตร
วุ้น	15	กรัมต่อลิตร

<u>วิธีการเตรียมอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) สำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์</u>

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

3. การตรวจนับสปอร์โดยของเชื้อราโดยใช้ haemacytometer

1. เตรียมตัวอย่างที่จะตรวจนับ ถ้าเป็นของเหลวสามารถนับมาตรวจนับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ละลายในน้ำกลั่นในปริมาณที่ต้องการก่อน เช่น ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร (จะได้ความเจือจางเป็น 1:10) หรืออาจต้องทำการเจือจางมากขึ้นในกรณีที่มีสปอร์จำนวนมาก เช่น เจือจางเป็น 1:100 หรือ 1:1000 เท่า เป็นต้น
2. ปิเปตต์ตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงใน haemacytometer (ที่ปิดด้วย cover slip แล้ว) โดยใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อดูดตัวอย่างมา 1-2 หยด หยดลงด้านข้างของแผ่น cover slip
3. ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ หัว objective กำลังขยาย 40 เท่า
4. นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก หรือถ้านับช่องใหญ่ให้หาค่าเฉลี่ยและนำมาคูณด้วย 4×10^6 จะได้เป็นปริมาณสปอร์ต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตร

<u>วิธีคำนวณหาปริมาณสปอร์</u>

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในตารางใหญ่ มีค่า เท่ากับ $0.05 \times 0.05 = 0.0025$ ตารางมิลลิเมตร

ความลึกระหว่าง Cover slip และตาราง (ผู้ผลิตจะกำหนดไว้) = 0.1 มิลลิเมตร

ดังนั้นปริมาณ 1 ช่องเล็ก จะมีค่า $0.0025 \times 0.1 = 0.00025$ ลูกบาศก์เซนติเมตร

ปริมาณ 0.00025 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีจุลินทรีย์ Z เซลล์ (สปอร์)

" 1 " " $= \frac{Zx1000}{0.00025}$

$= Z \times 4 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรหรือเซลล์ต่อกรัม (สปอร์ต่อมิลลิลิตรหรือสปอร์ต่อกรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การนับจำนวนโคโลนี

1. จานอาหารที่มีเชื้อปกติซึ่งมีจำนวนโคโลนีในช่วง 25-250 (สำหรับการนับจำนวนโคโลนีทั้งหมด)ให้นับทุกโคโลนี ส่วนการนับโคโลนีบน selective media และ differential media ให้นับโคโลนีบนจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนีในช่วง 15-150 โคโลนี
2. จานอาหารที่มีเชื้อเจริญหนาแน่น ซึ่งมีจำนวนโคโลนีมากกว่า 250 โคโลนี
   2.1 ถ้ามีจำนวนโคโลนีมากกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ไม่ต้องนับให้บันทึกว่า " TNTC " (Too Numerous to Count)
   2.2 ถ้ามีจำนวนโคโลนี 4-10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้นับ 12 ตารางเซนติเมตร (12 ช่องสี่เหลี่ยม) โดยนับติดต่อกัน 6 ช่องในแนวนอน และ 6 ช่องในแนวตั้ง จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีต่อ 1 ตารางเซนติเมตรแล้วคูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ (ตารางเซนติเมตร)
   2.3 ถ้ามีจำนวนโคโลนีมากกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร แต่ดูไม่หนาแน่นจนเกินไปสามารถนับได้ ให้นับเพียง 4 ตารางเซนติเมตร (4 ช่อง) เท่านั้น คำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีต่อ 1 ตารางเซนติเมตร แล้วคูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ (ตารางเซนติเมตร)
3. ถ้าโคโลนีแผ่ไปทั่วผิวอาหาร ไม่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ให้บันทึกว่า " SPR" (Spreader)
4. ถ้าจานอาหารนั้นปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น ให้บันทึกว่า " LA " (Laboratory Accident)
5. ถ้าไม่มีจานใดที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี ให้นับจานที่มีจำนวนโคโลนีใกล้เคียง 250 โคโลนี มากที่สุด และเขียน " ESPC " (Estimate Standard plate Count) กำกับไว้ด้วย แต่ถ้าทุกจานมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 25 โคโลนี ให้ใช้จานที่มีระดับความเจือจางต่ำสุดในการนับจำนวน และคำนวณหา CFU ต่อมิลลิลิตร หรือ CFU ต่อกรัม

<u>การคำนวณ</u>

ในการคำนวณหา CFU ต่อมิลลิลิตร หรือ CFU ต่อกรัม ให้คูณจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นับได้ หรือจำนวนโคโลนีเฉลี่ย (ถ้าทำซ้ำ 2 จานที่แต่ละระดับความเจือจาง) กับส่วนกลับของ dilution factor

Dilution factor = ระดับความเจือจางเริ่มต้น × ระดับความเจือจางต่อมา × ปริมาณตัวออย่างที่เติมลงในจานอาหาร

จำนวนจุลินทรีย์ต่อมิลลิลิตร หรือต่อกรัม = ส่วนกลับของ Dilution factor × จำนวนโคโลนีที่นับได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การรายงานผล

ในการรายงานค่า CFUต่อกรัม นิยมรายงานโดยเขียนเป็นเลขทศนิยม 1 ตำแหน่ง (เขียนเฉพาะตัวเลข 2 ตัวแรก) ส่วนตัวเลขตัวที่ 3 ให้ปัดขึ้นหรือลง ถ้าตัวเลขตัวที่ 3 เป็น 6, 7, 8 หรือ 9 ให้ปัดขึ้น ถ้าเป็น 1, 2, 3, 4 ให้ปัดลง แต่ถ้าเป็นเลข 5 ให้ปัดขึ้นถ้าตัวเลขตัวที่ 2 เป็นเลขคี่ แต่ถ้าเป็นเลขคู่ให้ปัดลง

5. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของจุลินทรีย์หลังการฉายแสงอัตราไวโอเลต

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

โดยกำหนดให้

X = จำนวนจุลินทรีย์สายพันธุ์แท้ที่ไม่ผ่านแสงอัตราไวโอเลต (ตัวควบคุม)ในแต่ละเวลาและความเจือจาง

S = จำนวนจุลินทรีย์ที่ผ่านแสงอัตราไวโอเลตในแต่ละเวลาและความเจือจาง

6. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส และการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์โดย DNS reagent ของ Miller (1959)

สารเคมี

DNS regent ประกอบด้วย

1. Dinitrosalicylic (DNS) acid	10	กรัมต่อลิตร
2. Phenol	0.2	กรัมต่อลิตร
3. Sodium potassium tartrate (Rochelle salt)	200	กรัมต่อลิตร
4. Na_2SO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
5. NaOH	10	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม DNS reagent

ละลาย NaOH 10 กรัม ในน้ำกลั่นตามปริมาณหนึ่ง (ไม่เกิน 600 มิลลิลิตร) และจึงค่อยๆ เติม DNS 10 กรัม, Sodium potassium tartrate 200 กรัม, Phenol 0.2 กรัม และ Na_2SO_4 0.5 กรัม โดยค่อยๆ ละลายสารเคมีแต่ละตัวจนหมด จึงค่อยเติมสารเคมีตัวต่อไปตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร แล้วเทใส่ลงขวดสีชาเก็บไว้ในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลสสำหรับการวิเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนส

1.1.1 เตรียมสารละลายของน้ำตาลไซโลสให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.1.2 ปิเปตสารละลายข้อ 2.1 ความเข้มข้นร้อยละ 1 มิลลิลิตร (Blank ใช้น้ำกลั่นแทน)

1.1.3 เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร

1.1.4 นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบนำมาทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อก

1.1.5 เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลไซโลส (ดังรูปผนวกที่ ก26)

1 ยูนิต ของเอนไซม์ไซลาเนส หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไซแลน และให้น้ำตาลรีดิวซ์ เทียบกับน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครกรัม ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

<u>การคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส</u>

$$\text{ยูนิต/มิลลิลิตรของอาหารเหลวเอนไซม์} = \frac{\text{มก.ของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของไซโลส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลาย}}$$

1.2 การวิเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้

1.2.1 สารละลายไซแลนร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8

1.2.2 เติมสารละลายเอนไซม์เจือจางที่เหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร (Blank ใช้น้ำกลั่น)

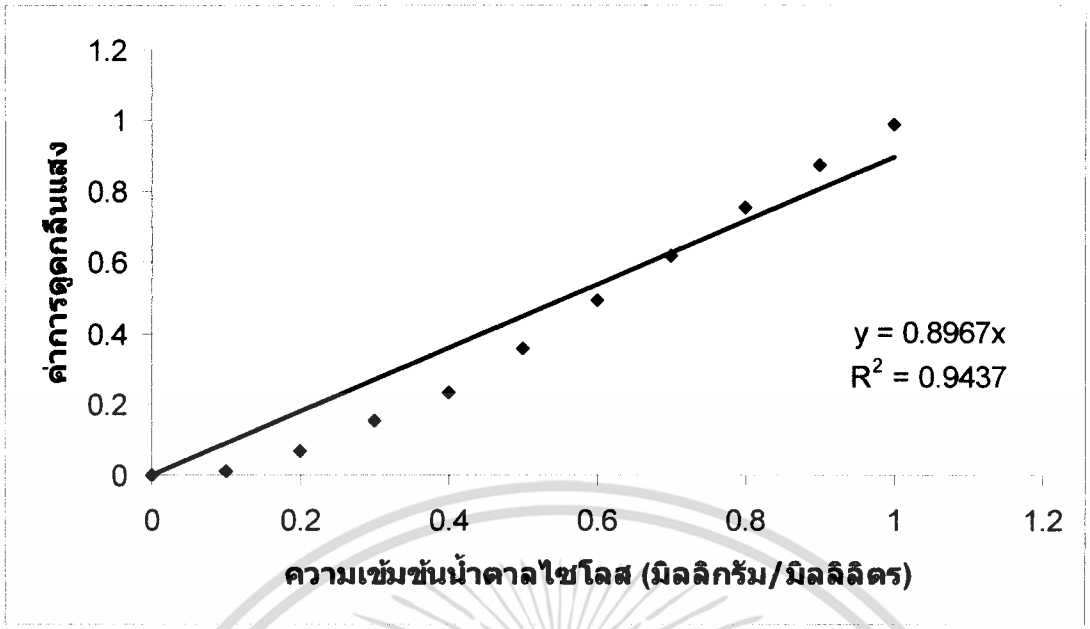
1.2.3 บ่มที่ 50 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.2.4 หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS regent ลงไป 3 มิลลิลิตร

1.2.5 นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบนำมาทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อก

1.2.6 เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ ก26 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสกับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์แบบ DUNCAN

ตารางภาคผนวกที่ ข6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสายพันธุ์ของเชื้อราจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ซ้ำยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติการแจกแจงของตัวแปรแบบสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	348.585[a]	100	3.486	690.335	.000
จุดตัด	199.885	1	199.885	39858.105	.000
สายพันธุ์	348.585	100	3.486	690.335	.000
ค่าความคลาดเคลื่อน	1.020	202	.005		
ผลรวม	549.490	303			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	349.605	302			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข7 การคำนวณทางสถิติของขนาดวงใสของเชื้อสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																							
		y	x	w	v	u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
5	3	.000																							
6	3	.000																							
17	3	.000																							
18	3	.000																							
21	3	.000																							
27	3	.000																							
28	3	.000																							
29	3	.000																							
30	3	.000																							
31	3	.000																							
32	3	.000																							
33	3	.000																							
34	3	.000																							
35	3	.000																							
36	3	.000																							

ตารางภาคผนวกที่ ข7 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																							
		y	x	w	v	u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
37	3	.000																								
38	3	.000																								
40	3	.000																								
52	3	.000																								
53	3	.000																								
54	3	.000																								
55	3	.000																								
65	3	.000																								
67	3	.000																								
68	3	.000																								
69	3	.000																								
79	3	.000																								
81	3	.000																								
95	3	.000																								
91	3		.633																							
97			.667	.667																						
96			.700	.700	.700																					

ตารางภาคผนวกที่ ข7 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																								
		y	x	w	v	u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
98			.767	.767	.767	.767																				
90	3		.800	.800	.800	.800	.800																			
71	3		.800	.800	.800	.800	.800																			
92	3		.800	.800	.800	.800	.800																			
94	3		.800	.800	.800	.800	.800																			
93	3			.833	.833	.833	.833	.833																		
100	3			.833	.833	.833	.833	.833																		
16	3			.867	.867	.867	.867	.867	.867																	
23	3			.867	.867	.867	.867	.867	.867																	
83	3			.867	.867	.867	.867	.867	.867																	
88	3			.867	.867	.867	.867	.867	.867																	
99	3			.867	.867	.867	.867	.867	.867																	
20	3				.900	.900	.900	.900	.900	.900																
50	3				.900	.900	.900	.900	.900	.900																
75	3				.900	.900	.900	.900	.900	.900																
7	3					.933	.933	.933	.933	.933	.933															
11	3					.933	.933	.933	.933	.933	.933															

ตารางภาคผนวกที่ ข7 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																							
		y	x	w	v	u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
12	3					.933	.933	.933	.933	.933	.933															
49	3					.933	.933	.933	.933	.933	.933															
56	3					.933	.933	.933	.933	.933	.933															
74	3					.933	.933	.933	.933	.933	.933															
82	3					.933	.933	.933	.933	.933	.933															
14	3					.967	.967	.967	.967	.967	.967	.967														
15	3					.967	.967	.967	.967	.967	.967	.967														
22	3					.967	.967	.967	.967	.967	.967	.967														
47	3						1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000													
51	3						1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000													
59	3						1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000													
62	3						1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000													
73	3						1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000													
19	3							1.033	1.033	1.033	1.033	1.033	1.033	1.033												
24	3							1.033	1.033	1.033	1.033	1.033	1.033	1.033												
25	3								1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067											
46	3								1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067											

ตารางภาคผนวกที่ ข7 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																							
		y	x	w	v	u	t	s	r	q	p	o	n	m	L	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
63	3								1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067											
66	3								1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067											
80	3								1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067											
85	3								1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067											
86	3								1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067											
87	3								1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067	1.067											
84	3									1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100											
26	3										1.133	1.133	1.133	1.133	1.133	1.133										
8	3											1.167	1.167	1.167	1.167	1.167	1.167									
48	3												1.200	1.200	1.200	1.200	1.200									
70	3												1.200	1.200	1.200	1.200	1.200									
64	3													1.233	1.233	1.233	1.233									
41	3														1.267	1.267	1.267									
45	3														1.267	1.267	1.267									
72	3															1.300	1.300	1.300								
77	3															1.300	1.300	1.300								
89	3															1.300	1.300	1.300								

ตารางภาคผนวกที่ ข7 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																							
		y	x	w	v	u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
10	3																1.333	1.333								
0*	3																1.367	1.367	1.367							
1	3																1.367	1.367	1.367							
76	3																1.367	1.367	1.367							
42	3																	1.467	1.467	1.467						
43	3																	1.467	1.467	1.467						
9	3																		1.533	1.533	1.533					
44	3																			1.633	1.633	1.633				
4	3																				1.667	1.667				
39	3																				1.700	1.700				
13	3																				1.700	1.700				
78	3																					1.767				
60	3																					1.767				
61	3																					1.767				
57	3																						2.100			
58	3																							2.967		
3	3																								3.233	

ตารางภาคผนวกที่ ข7 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																							
		y	x	w	v	u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
2	3																									3.767
Sig.		1.00	.094	.052	.055	.062	0.63	.063	.065	.063	.063	.059	.058	.055	.055	.101	.051	.098	.085	.072	.079	.179	1.000	1.000	1.000	1.000

* สายพันธุ์แท้

Means for groups in homogeneous subset are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (error) = .011

ตารางภาคผนวกที่ ข8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสายพันธุ์ของเชื้อราจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีไซแลนร้อยละ 1

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ซ้ำยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติการแจกแจงของตัวแปรแบบสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	152.938[a]	100	1.529	143.468	.000
จุดตัด	225.339	1	225.339	21138.604	.000
สายพันธุ์	152.938	100	1.529	143.468	.000
ค่าความคลาดเคลื่อน	2.153	202	.011		
ผลรวม	380.430	303			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	155.092	302			

a. R Squared = .986 (Adjusted R Squared = .979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข9 การคำนวณทางสถิติของขนาดวงใสของเชื้อสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																				
		u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
14	3	.000																				
21	3	.000																				
26	3	.000																				
31	3	.000																				
32	3	.000																				
36	3	.000																				
40	3	.000																				
42	3	.000																				
44	3	.000																				
45	3	.000																				
46	3	.000																				
47	3	.000																				
48	3	.000																				
49	3	.000																				
50	3	.000																				

ตารางภาคผนวกที่ ข9 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																			
		u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
51	3	.000																				
52	3	.000																				
53	3	.000																				
55	3	.000																				
59	3	.000																				
60	3	.000																				
61	3	.000																				
62	3	.000																				
63	3	.000																				
65	3	.000																				
66	3	.000																				
67	3	.000																				
68	3	.000																				
69	3	.000																				
70	3	.000																				
71	3	.000																				

ตารางภาคผนวกที่ ข9 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																			
		u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
72	3	.000																				
73	3	.000																				
74	3	.000																				
75	3	.000																				
76	3	.000																				
77	3	.000																				
78	3	.000																				
79	3	.000																				
80	3	.000																				
81	3	.000																				
82	3	.000																				
83	3	.000																				
84	3	.000																				
85	3	.000																				
86	3	.000																				
87	3	.000																				

ตารางภาคผนวกที่ ข9 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																				
		u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
88	3	.000																				
89	3	.000																				
90	3	.000																				
91	3	.000																				
92	3	.000																				
93	3	.000																				
94	3	.000																				
95	3	.000																				
96	3	.000																				
97	3	.000																				
98	3	.000																				
99	3	.000																				
56	3		.800																			
100	3			.933																		
54	3			.967	.967																	
57	3			1.000	1.000	1.000																

ตารางภาคผนวกที่ ข9 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																			
		u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
25	3				1.067	1.067	1.067															
17	3					1.100	1.100															
29	3						1.133															
58	3						1.167															
35	3							1.433														
30	3							1.500	1.500													
38	3							1.533	1.533	1.533												
33	3								1.567	1.567												
34	3								1.567	1.567												
37	3								1.600	1.600												
11	3									1.633												
43	3										1.833											
16	3										1.867	1.867										
8	3											1.967	1.967									
15	3												2.000	2.000								
19	3												2.033	2.033	2.033							

ตารางภาคผนวกที่ ข9 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																			
		u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
12	3													2.100	2.100							
24	3													2.100	2.100							
20	3														2.133	2.133						
1	3														2.133	2.133						
22	3															2.233						
23	3															2.233						
39	3															2.233						
3	3																2.400					
41	3																2.400					
0*	3																2.500	2.500				
5	3																	2.533	2.533			
18	3																	2.600	2.600	2.600		
28	3																	2.600	2.600	2.600		
6	3																		2.633	2.633		
13	3																		2.633	2.633		
10	3																			2.677		

ตารางภาคผนวกที่ ข9 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α=.05																			
		u	t	s	r	q	p	o	n	m	l	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
27	3																			2.677		
7	3																				2.833	
9	3																				2.833	
4	3																				2.933	
2	3																					3.900
Sig.		1.000	1.000	.282	.105	.105	.118	.105	.128	.128	.566	.086	.282	.118	.128	.128	.105	.118	.128	.325	.105	1.000

* สายพันธุ์แท้

Means for groups in homogeneous subset are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (error) = .005

a. Use Harmonic Mean Sample Size = 3.000

b. Alpha = .05

ตารางภาคผนวกที่ ข10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในเชิงปริมาณและเชื้อสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ซ้ำยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติการแจกแจงของตัวแปรแบบสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	152.938[a]	100	1.529	143.468	.000
จุดตัด	225.339	1	225.339	21138.604	.000
สายพันธุ์	152.938	100	1.529	143.468	.000
ค่าความคลาดเคลื่อน	2.153	202	.011		
ผลรวม	380.430	303			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	155.092	302			

a. R Squared = .986 (Adjusted R Squared = .979)

ตางรางภาคผนวกที่ ข11 การคำนวณทางสถิติค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในเชิงปริมาณและเชื้อสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α =.05								
		i	h	g	f	e	d	c	b	a
28	3	12.9100								
6	3	13.5067								
18	3		18.8633							
25	3		19.9433							
27	3			28.2106						
10	3				39.4467					
13	3					49.5767				
5	3						54.5767			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข11 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α =.05								
		i	h	g	f	e	d	c	b	a
0*	3							68.8400		
4	3								73.7033	
7	3									121.4967
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

* สายพันธุ์แท้

Means for groups in homogeneous subset are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (error) = .011

ตารางภาคผนวกที่ ข12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเชื้อราสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในเชิงปริมาณและเชื้อสายพันธุ์แท้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีไซแลนร้อยละ 1

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ซ้ำยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติการแจกแจงของตัวแปรแบบสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	.862[a]	10	.086	13.552	.000
จุดตัด	48.728	1	48.728	7657.190	.000
สายพันธุ์	.862	10	.086	13.552	.000
ค่าความคลาดเคลื่อน	.140	22	.006		
ผลรวม	49.730	33			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	1.002	32			

a. R Squared = .860 (Adjusted R Squared = .797)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข13 การคำนวณทางสถิติของขนาดวงใสของเชื้อสายพันธุ์กลายในเชิงปริมาณและสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีไซแลนร้อยละ 1 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α =.05				
		e	d	c	b	a
4	3	.867				
6	3		1.067			
18	3		1.067			
7	3		1.167	1.167		
10	3		1.167	1.167		
27	3			1.233	1.233	
28	3			1.267	1.267	1.267
0*	3				1.367	1.367
13	3				1.367	1.367
5	3					1.400
9	3					1.400
Sig.		1.000	.173	.173	.072	.078

* สายพันธุ์แท้

Means for groups in homogeneous subset are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (error) = .006

a. Use Harmonic Mean Sample Size = 3.000

b. Alpha = .05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเชื้อราสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในเชิงปริมาณและเชื้อสายพันธุ์แท้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ซ้ำยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติการแจกแจงของตัวแปรแบบสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	12.095[a]	10	1.210	665.233	.000
จุดตัด	20.485	1	20.485	11266.667	.000
สายพันธุ์	12.095	10	1.210	665.233	.000
ค่าความคลาดเคลื่อน	.040	22	.002		
ผลรวม	32.620	33			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	12.135	32			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .995)

ตางรางภาคผนวกที่ ข15 การคำนวณทางสถิติของขนาดวงใสของเชื้อสายพันธุ์กลายในเชิงปริมาณและสายพันธุ์แท้การเลี้ยงเชื้อในอาหาร CD-medium ที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α =.05				
		e	d	c	b	a
5	3	.000				
6	3	.000				
18	3	.000				
27	3	.000				
7	3		1.033			
13	3		1.067			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข15 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α =.05				
		e	d	c	b	a
4	3			1.233		
10	3			1.233		
9	3			1.300	1.300	
28	3				1.367	1.367
0*	3					1.433
Sig.		1.000	.349	.082	.069	.069

* สายพันธุ์แท้

Means for groups in homogeneous subset are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (error) = .002

a. Use Harmonic Mean Sample Size = 3.000

b. Alpha = .05

ตารางภาคผนวกที่ ข16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในเชิงปริมาณและเชื้อสายพันธุ์แท้ในอาหาร CD-medium ที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ซ้ำยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติการแจกแจงของตัวแปรแบบสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	79.051[a]	10	7.905	130.886	.000
จุดตัด	652.370	1	952.370	15768.501	.000
สายพันธุ์	79.051	10	7.905	130.889	.000
ค่าความคลาดเคลื่อน	1.329	22	.060		
ผลรวม	1032.749	33			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	80.380	32			

a. R Squared = .983 (Adjusted R Squared = .976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข17 การคำนวณทางสถิติค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในเชิงปริมาณและเชื้อสายพันธุ์แท้ที่ทำการเลี้ยงเชื้ออาหาร CD-medium ที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for α =.05					
		f	e	d	c	b	a
18	3	1.4667					
27	3		3.5667				
7	3			4.9267			
28	3			5.1067			
13	3				5.6000		
5	3				5.9300	5.9300	
6	3				5.9900	5.9900	
9	3					6.2200	
4	3					6.3300	
0*	3						6.8600
10	3						7.0967
Sig		1.000	1.000	.379	.078	.080	.251

* สายพันธุ์แท้

Means for groups in homogeneous subset are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (error) = .060

a. Use Harmonic Mean Sample Size = 3.000

b. Alpha = .05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้