สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การชักนำการกลายพันธุ์ราและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย ที่เพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน

นางสาววรรณธิดา ดวงแก้ว

นางสาววรวรรณ ชนะแก้ว

ปห.
ว12467
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83993
วัน,เดือน,ปี.....23 ก.ย. 2551

b.....11974813
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Induced mutation of fungi and selection of mutant for enhancing lipase production by Jatropa oil as carbon sources

Miss Wantida Duangkaew

Miss Worawan Chanakaew

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การชักนำการกลายพันธุ์ราและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย ที่เพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน

นักศึกษา วรรณธิดา ดวงแก้ว รหัสนักศึกษา 47050154
วรวรรณ ชนะแก้ว รหัสนักศึกษา 47050156

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ	ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ	ดร. จิดาภา ทิน้อย	

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การชักนำการกลายพันธุ์ราและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่เพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน

นักศึกษา วรรณธิดา ดวงแก้ว รหัสนักศึกษา 47050154

วรวรรณ ชนะแก้ว รหัสนักศึกษา 47050156

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการชักนำคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อราที่คัดแยกได้จากดิน เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยศึกษาการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตและสารเคมี *N*-methyl-*N'*-nitroso-*N*-nitroso-guanidine (NTG) พบว่าสายพันธุ์กลายที่แยกได้จากการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมมี 3 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือสายพันธุ์ UVC_2 มีค่าเท่ากับ 0.367 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.127 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นำสายพันธุ์ UVC_2 ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดมาศึกษาการกลายพันธุ์ซึ่งใช้สารเคมี NTG พบว่าสายพันธุ์กลายเพียง 1 สายพันธุ์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดคือ สายพันธุ์ NTT_9 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.136 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าค่ากิจกรรมที่ได้จากการใช้สารเคมี NTG มีค่าลดลงจากสายพันธุ์กลายดั้งเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Induce mutation of fungi and selection of mutant for enhancing lipase production by Jatropa oil as carbon sources
Name	Miss Wantida Duangkaew 47050154
	Miss Worawan Chanakaew 47050156
Department	Applied Biology
Academic Year	2007
Special Prlject Advisor	Assisst. Prof. Aree Rittiboon

ABSTRACT

Induced mutation of isolated fungi from soil were studied for enhancing lipase production. Isolated fungi were mutated by ultraviolet irradiation and treated by N-methyl-N'-nitroso-N-nitroso-guanidine(NTG). The results found that 3 mutants from UV mutation showed higher lipase activity than wild type. Mutant UVC_2 presented the highest lipase activity (0.317 U/mL), compared to wile type (0.127 U/mL). Then, mutant UVC_2 was treated with NTG and found that only one mutant, strain NTT_9 showed high lipase activity (0.136 U/mL). The resulted revealed that lipase activity of mutant NTT_9 decreased when compare to mutant UVC_2.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพซึ่งทำสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัยและให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง รวมถึงการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ และ ดร. จิดาภา ทิน้อย ที่เป็นคณะกรรมการในโครงงานพิเศษและช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่างๆสำหรับใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่ด้วยความเคารพอย่างยิ่ง ขอขอบคุณเพื่อนๆ และทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วยที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นางสาววรรณธิดา ดวงแก้ว
นางสาววรวรรณ ชนะแก้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตโครงงานพิเศษ	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์	3
2.2 การกลายพันธุ์ (mutation)	3
2.3 การจำแนกประเภทการกลายพันธุ์	4
2.3.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (spontaneous mutation)	4
2.3.2 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยการชักนำ (induced mutation)	4
2.4 การชักนำให้เกิดกลายพันธุ์โดยใช้มิวตาเจน (induced mutation)	4
2.4.1 มิวตาเจนทางกายภาพ	5
2.4.2 มิวตาเจนทางเคมี	6
2.5 การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	8
2.6 เอนไซม์ไลเปส	8
2.6.1 ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ไลเปส	9
2.6.2 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์	9
2.6.3 ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปส	9
2.7 แหล่งของเอนไซม์ในอุตสาหกรรม	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.8 ปัจจัยสำคัญในการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์	10
2.9 การใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซล	11
2.10 สบู่ดำ	11
2.11 การใช้น้ำมันสบู่ดำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	14
3.1 เชื้อจุลินทรีย์สารเคมีและปกรณ์	14
3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต	15
3.2.1 การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด	15
3.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตโดยคัดเลือกจากวงใสรอบโคโลนี	16
3.2.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์กลาย	16
3.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี เอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-กัวนิดีน (NTG)	16
3.3.1 การหาร้อยละการอยู่รอด	17
3.3.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ใช้สารเคมี NTG โดยคัดเลือกจากวงใสรอบโคโลนี	17
3.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์กลาย	17
3.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส	18
3.5 การเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยการวิเคราะห์ทางสถิติ	18
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	19
4.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 8, 10 และ12 นาที	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.1 ศึกษาหาร้อยละการอยู่รอดของสปอร์เชื้อราหลังจากผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 8, 10 และ12 นาที	19
4.1.2 การคัดเลือกวงใสของโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 10 นาที	20
4.1.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 10 นาที	21
4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีเอ็น-เมทิล-เอ็น- ไนโตรโซ-เอ็น-กัวนิดีน (NTG) ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	24
4.2.1 ศึกษาหาร้อยละการอยู่รอดของสปอร์เชื้อราหลังจากการใช้สารเคมีเอ็น-เมทิล-เอ็น- ไนโตรโซ-เอ็น-กัวนิดีน (NTG) ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที	24
4.2.2 การคัดเลือกวงใสของโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยการใช้สารเคมี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที	24
4.2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการชักนำโดยการใช้สารเคมี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที	25
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก ก	31
ภาคผนวก ข	32
ภาคผนวก ค	33
ภาคผนวก ง	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

2.1 การเกิดไทมีนไดเมอร์ จากการใช้รังสีในการเหนี่ยวนำ 5

2.2 โครงสร้างของ NTG 7

2.3 เปรียบเทียบลักษณะเส้นใยของเชื้อราหลังทำการกลายพันธุ์ 7

2.4 ลักษณะของต้นสบู่ดำ 12

2.5 ลักษณะเมล็ดสบู่ดำ 12

2.6 น้ำมันสบู่ดำ 13

4.1 ลักษณะของเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม S1649 ที่คัดแยกได้จากดิน 20

4.2 ลักษณะของวงใสที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายบนอาหาร tributyrin agar เป็นเวลา 2 วัน 21

4.3 ลักษณะการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลายเมื่อเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว CD-medium ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 3 วัน 21

รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายพารา-ไนโตรฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 5,10,15,20,25 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

4.1 ร้อยละการอยู่รอดของเชื้อราสายพันธุ์กลายหลังผ่านการชักนำ ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 8,10 และ 12 นาที 19

4.2 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสหลังผ่านการชักนำให้เชื้อรา เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 10 นาที 22

4.3 ร้อยละการอยู่รอดของเชื้อราสายพันธุ์กลายหลังผ่านการชักนำให้เกิดการ กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที 24

4.4 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสหลังผ่านการชักนำให้เชื้อราเกิดการ กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที 25

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 33

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่าน การชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่เวลา 8, 10 และ 12 นาที 36

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการ ชักนำด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที 39

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่ากิจกรรม ของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตรเป็นเวลา 10 นาที 43

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่ากิจกรรม ของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการชักนำด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เอนไซม์ไลเปส (lipase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล นอกจากนี้ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริ-ฟิเคชั่น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อย หรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย เอนไซม์นี้ถูกสกัดได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (เชื้อรา ยีสต์ และ แบคทีเรีย) อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์เป็นแหล่งเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญ เนื่องจากง่ายในการผลิต การเก็บเกี่ยว และการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ ด้วยคุณสมบัติที่มีความคงทนต่อค่าความเป็นกรด ด่าง อุณหภูมิสูง และมีความจำเพาะต่อสับสเทรตหลายชนิด จึงมีการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง น้ำยาซักล้าง เชื้อเพลิงชีวภาพ อาหาร เครื่องสำอาง และ ยา (ณกัญภัทร, 2545) โดยเฉพาะในปัจจุบัน น้ำมันที่เป็นแหล่งพลังงานมีแนวโน้มราคาสูงขึ้น จึงมีการนำวัตถุดิบจากธรรมชาติ เช่นน้ำมันจากสบู่ดำ มาใช้ทดแทนแหล่งพลังงานดังกล่าว โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทำหน้าที่ย่อยไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันให้มีความหนืดลดลง เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติ ตามปกติจะสร้างผลผลิตที่มีความสำคัญทางการค้าได้ในปริมาณค่อนข้างต่ำไม่เพียงพอที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรม จึงมีการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยการใช้อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตสูงสุดของจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณที่สูงขึ้น

การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ทำการชักนำโดยใช้มิวตาเจน (mutagen) เช่น สารเคมี หรือรังสี ช่วยให้เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูงมากขึ้น ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์รา เพื่อคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมโดยใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อราเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปส

2. ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการเลี้ยงสายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยใช้สบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ในแต่ละขั้นตอนกับสายพันธุ์แท้

1.3 ขอบเขตโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาวิธีการกลายพันธุ์ 2 วิธีคือ การใช้แสงอัลตราไวโอเลตและการใช้สารเคมี *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidine (NTG) และทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

2. ศึกษาเวลาและความเข้มข้นที่ใช้ทำการกลายพันธุ์เชื้อรา โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต สารเคมี

3. ทดสอบการใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อราที่ทำการคัดเลือกจากสายพันธุ์กลายโดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถหาสภาวะและวิธีทำการกลายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราโดยการใช้สบู่ดำหรือ Tributyrin agar เป็นแหล่งคาร์บอน

2. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในปริมาณที่สูงขึ้น

3. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการวิจัยขั้นสูงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ (สมใจ, 2547)

จุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติ ตามปกติแล้วจะสร้างผลผลิตที่มีความสำคัญทางการค้าได้ในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นก่อนที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมจึงต้องทำให้มีการสร้างผลผลิตที่สูงขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปทำได้โดยเลือกใช้อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ แต่การเพิ่มผลผลิตของจุลินทรีย์โดยวิธีนี้มักถูกจำกัดอันเป็นผลมาจากการถูกควบคุมโดยยีน ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มผลผลิตให้สูงมากขึ้นอีกจึงต้องมีการปรับปรุงยีนให้มีการเปลี่ยนแปลงไป จากนั้นจึงทำการคัดเลือกมิวแตนท์ (mutant) ที่สร้างผลผลิตได้สูงขึ้น รวมถึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ที่ปรับปรุงสายพันธุ์แล้วอีกครั้ง ตามปกติการปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมจะกระทำอย่างต่อเนื่อง (continual genetic modification) เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงมากยิ่งขึ้นตลอดเวลา

สำหรับวิธีที่ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาจแบ่งได้เป็น 3 วิธีใหญ่ๆ คือ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ใช้เทคนิคที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ต้องการข้อมูลเกี่ยวกับพันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของวิถีเมแทบอลิซึมในการสังเคราะห์สารที่ต้องการไม่มากนัก รวมถึงสามารถเพิ่มผลผลิตได้อย่างรวดเร็วถ้ามีวิธีการที่แม่นยำในการตรวจสอบปริมาณผลผลิตที่ได้ รีคอมบิเนชัน (recombination) เป็นวิธีการที่มีประโยชน์ในการรวบรวมสมบัติที่ดีต่างๆ ของจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กัน ให้มารวมอยู่ในเซลล์เดียวกัน ทำให้เหมาะสมต่อการใช้ในอุตสาหกรรมมากขึ้น จุลินทรีย์ที่จะนำมาผสมกันนี้อาจผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มาแล้ว แต่มีสมบัติที่ดีต่างกันอยู่ในสายพันธุ์ต่างกัน วิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลเกี่ยวกับพันธุศาสตร์และชีวเคมีของการสังเคราะห์ผลผลิตมากนัก และการโคลนยีน (gene cloning) เป็นวิธีที่ต้องเข้าใจปัจจัยต่างๆ ที่เป็นข้อจำกัดในการสร้างผลผลิตที่ต้องการเป็นอย่างดี ทั้งทางด้านพันธุศาสตร์และชีวเคมี แต่เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในกรปรับปรุงสายพันธุ์ที่สามารถให้ผลผลิตที่ต้องการสูง และสามารถตัดต่อยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นเข้าไปในจุลินทรีย์ที่เหมาะสม ทำให้จุลินทรีย์ผลิตสารชนิดที่ต้องการได้

2.2 การกลายพันธุ์ (mutation)

การกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงสภาพของสิ่งมีชีวิต ที่เกิดขึ้นกับสารพันธุกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงของยีน (ธีรวรรธน์, 2547) ในทางธรรมชาติมีการกลายพันธุ์เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขึ้นอยู่ตลอดเวลา ทำให้สิ่งมีชีวิตที่เกิดมาใหม่แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตกลุ่มเดิมซึ่งจะถูกคัดสรรโดยธรรมชาติ ก่อให้เกิดวิวัฒนาการขึ้นในสิ่งมีชีวิต

การกลายพันธุ์แบ่งได้เป็น 2 ระดับ ได้แก่ การกลายพันธุ์ระดับยีน (gene mutation หรือ point mutation) และการกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (chromosome mutation)

2.3 การจำแนกประเภทการกลายพันธุ์ (ธีรวรรธน์, 2547)

สามารถจำแนกประเภทการกลายพันธุ์ได้หลายแบบ ทั้งนี้ขึ้นกับหลักการพิจารณา ตัวอย่างเช่น หากอาศัยกลไกการกลายพันธุ์จะแบ่งการกลายพันธุ์ออกได้ ดังนี้

2.3.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (spontaneous mutation) หมายถึง การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้เอง การกลายพันธุ์แบบนี้เกิดจากการจับคู่เบสผิดในระหว่าง ดีเอ็นเอเรพลิเคชันแล้วไม่มีการแก้ไขซ่อมแซมความผิดพลาดนี้ให้ถูกต้อง ดีเอ็นเอสายที่สร้างขึ้นมาแบบผิดๆ จะทำหน้าที่เป็นต้นแบบของดีเอ็นเอรุ่นถัดไป ทำให้เซลล์รุ่นต่อไปมีข้อมูลทางพันธุกรรมที่แตกต่างไปจากเดิม การกลายพันธุ์แบบนี้มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมากในธรรมชาติ

2.3.2 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยการชักนำ (induced mutation) หมายถึง การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี รังสี หรือปัจจัยภายนอกอื่นๆ ที่ไม่ใช่ความผิดพลาดในการจำลองตัวของดีเอ็นเอเอง ทำให้เพิ่มอัตราการกลายพันธุ์ให้เกิดขึ้นมากกว่าที่จะปล่อยให้เป็นไปตามธรรมชาติ ถ้าแบ่งประเภทการกลายพันธุ์ออกตามชนิดของเซลล์ที่เกิด

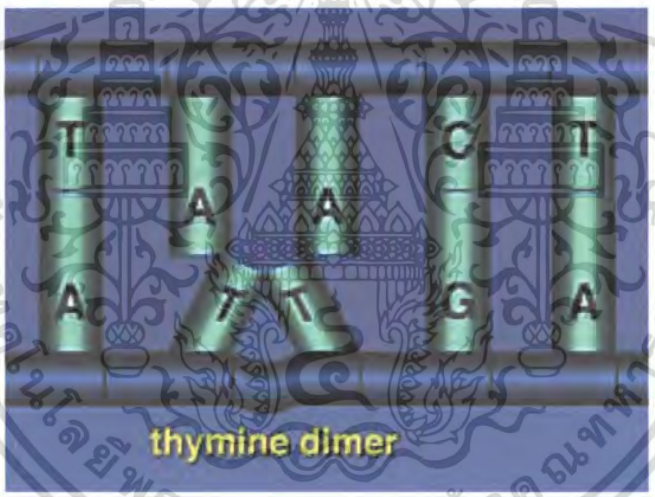
2.4 การชักนำให้เกิดกลายพันธุ์โดยใช้มิวตาเจน (induced mutation)

มิวตาเจน (mutagen) เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน มีทั้งทางกายภาพ เช่น รังสี และทางเคมี เช่น สารเคมี ซึ่งตามธรรมชาติแล้วการกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นได้เอง เนื่องจากความผิดพลาดในระหว่างการแบ่งเซลล์ และอาจเกิดจากปัจจัยบางอย่างที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อม แต่จะเกิดในอัตราที่ต่ำมากมีโอกาสเพียง 10^{-6} ถึง 10^{-10} หรือน้อยกว่านี้ เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนการกลายพันธุ์ จำเป็นต้องอาศัยมิวตาเจนช่วยชักนำ จึงจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูงขึ้นมากเป็นพันเท่า และทำให้มีโอกาสสูงขึ้นที่จะได้เชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามต้องการด้วย (ตะวัน, 2550)

หลักในการใช้สารมิวตาเจนนั้นอาจใช้สารเพียงชนิดเดียว หรือใช้วิธีการทั้งทางกายภาพร่วมกับสารเคมี ที่สำคัญต้องรู้จักเลือกชนิด ความเข้มข้น และเวลาในการที่เซลล์จะสัมผัสกับสารมิวตาเจนได้อย่างเหมาะสม และตลอดเวลาการทดลองไม่ว่าใช้แสงหรือสารเคมี และต้องมีการกวนอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้เซลล์ได้สัมผัสหรือรับมิวตาเจนได้อย่างทั่วถึง ตัวอย่างมิวตาเจนแบ่งได้ 2 แบบ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 มิวตาเจนทางกายภาพ เช่น รังสีอัลตราไวโอเลตและรังสีเอกซ์ โดยในรังสีอัลตราไวโอเลตจะมีพลังงานแสงที่ปล่อยออกมาส่วนใหญ่ที่ความยาวคลื่นระหว่าง 240-280 นาโนเมตร ส่วนดีเอ็นเอมีความสามารถดูดซับพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่นระหว่าง 250-260 นาโนเมตร (ธัญภัค, 2550) ดังนั้นดีเอ็นเอจึงสามารถดูดซับพลังงานแสงของรังสีอัลตราไวโอเลตได้ ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสพิวรีนและเบสไพริมิดีน โดยเฉพาะเบสไพริมิดีน เช่น รังสีอัลตราไวโอเลตทำให้ไทมีน 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันบนสายพอลินิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกัน ทำให้เกิดไทมีนคู่ (thymine dimer) ขึ้น ดังรูปที่ 2.1 ทำให้ไทมีนไม่สามารถจับคู่กับอะดีนีนในสายพอลินิวคลีโอไทด์ตรงข้ามได้ เป็นผลให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการแทนที่เบสแบบทรานซิชัน ทำให้กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไม่สามารถเกิดขึ้นตามปกติและเป็นผลให้เกิดการกลายพันธุ์ (ธีรวรรธน์, 2547)



รูปที่ 2.1 การเกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) จากการใช้รังสีในการเหนี่ยวนำ
ที่มา : http://www.thirawat.com/ge/mutation.html#radia

แสงอัลตราไวโอเลตหรือแสงยูวี (UV lamp หรือรังสีเหนือม่วง) นิยมใช้กันมากในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยปกติมักจะใช้วิธีการกระจายเซลล์หรือสปอร์บนผิวหน้าวุ้นวางใต้แสงอัลตราไวโอเลต และพยายามให้ทุกส่วนของเซลล์หรือสปอร์ได้รับแสงอัลตราไวโอเลตอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ แสงอัลตราไวโอเลตมีอำนาจในการทะลุทะลวงที่ต่ำมาก มักฉายแสงอัลตราไวโอเลตโดยการใช้ bactericidal lamp กำลัง 15 วัตต์ ที่กระจายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร เวลาที่ฉายแสงปกติใช้ 30 วินาทีถึง 20 นาที ขึ้นอยู่กับความไวแสงอัลตราไวโอเลตของเชื้อแต่ละชนิด อัตราการตายประมาณร้อยละ 90 ถึง 99.9 โดยเซลล์เริ่มต้นที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเชื้อปกติใช้ที่ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และระดับของการตายของเซลล์ขนาดต่ำและสูงคือ ร้อยละ 30 ถึง 70 และ ร้อยละ 90 ถึง 99 ตามลำดับ การใช้เวลาฉายแสงที่นานขึ้นบางครั้งอาจเกิดความร้อนสะสมจากหลอดไฟ ทำให้ระดับการตายเพิ่มขึ้นได้ ข้อควรระวังอีกประการหนึ่ง คือ มีอันตรายต่อมนุษย์และถ้าใช้แสงอัลตราไวโอเลตในที่ที่มีแสงธรรมชาติมากจะทำให้แสงอัลตราไวโอเลตมีประสิทธิภาพต่ำลง อาจไม่ได้สายพันธุ์กลายตามที่ต้องการ หากทดลองกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตแล้วไม่ได้ผล อาจต้องศึกษาวิธีอื่นต่อไป

ส่วนการใช้รังสีเอกซ์และรังแกมมา (X-rays และ γ-rays) ในการกลายพันธุ์นั้น จะทำให้เกิดการแตกตัวของสารต่างๆ ได้เป็นไอออนซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอเกิดความผิดปกติไปได้

การทดลองกลายพันธุ์ด้วยวิธีทางกายภาพเหล่านี้ ทุกวิธีต้องมิให้ถูกแสงเนื่องจากทำให้เกิดปฏิกิริยา photoreactivation ทำให้การทดลองไม่ได้ผล (ตะวัน, 2550)

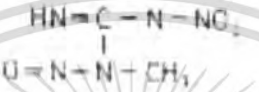
Maw และคณะ (2002) ได้ทำการทดลองกลายพันธุ์ *Gongronella butleri* ด้วยวิธีการใช้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อเพิ่มการผลิตไคโตซาน พบว่าจากเชื้อสปอร์เริ่มต้นทั้งหมด 18000 สปอร์ โดยประมาณ มีสปอร์ที่เหลือรอดอยู่ 2700 สปอร์ และเมื่อเจริญเป็นโคโลนีแล้ว สังเกตเห็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่ามีการเปลี่ยนแปลงไป เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

2.4.2 มิวตาเจนทางเคมี เช่น การใช้สารเคมี เป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับเบสในดีเอ็นเอทำให้เบสมีโครงสร้างผิดปกติ เป็นผลให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ โดยการนำเซลล์หรือสปอร์เติมในสารละลายบัฟเฟอร์และเติมสารเคมีที่เป็นมิวตาเจนลงไปเล็กน้อย นำสารละลายทั้งหมดเขย่าที่อุณหภูมิคงที่ ซึ่งปกติที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำเซลล์หรือสปอร์ไปเพาะในจานเลี้ยงเชื้อทันที สารเคมีเหล่านี้มีอันตรายต่อผิวหนังจึงต้องทำการทดลองด้วยความระมัดระวังโดยการใช้ถุงมือและปิดจมูกให้มิดชิด สารเคมีที่เป็นมิวตาเจนแต่ละชนิดจะละลายในตัวทำลายต่างชนิดกันและมีความคงตัวในสารละลายแต่ละชนิดต่างกันด้วย

สารเคมีที่เป็นมิวตาเจน เช่น สารที่ใช้ได้ดีเมื่อใช้ร่วมกับแสงอัลตราไวโอเลต คือ อะซิริดีน (aziridine) ซึ่งมักจะใช้เวลา 1 ถึง 4 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.5 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือการใช้โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulphate) ร่วมกับแสงอัลตราไวโอเลต การใช้กรดไนตรัส (HNO_3) ซึ่งสามารถกำจัดหมู่อะมิโนออกจากเบสพิวรีนและไพริมิดีนทำให้พันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลของเบสเกิดการกลายพันธุ์ได้ สารเคมีชนิดอื่นๆ ที่ใช้ เช่น ไดเอทิลซัลเฟต(diethylsulphate) ใช้ปริมาณ 1.0 ถึง 2.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร สารเคมีส่วนใหญ่ที่ใช้ทำให้สิ่งมีชีวิตเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสายพันธุ์กลายนั้น เป็นสารเคมีในกลุ่มแอลคิล (alkylating agent) เช่นเมทิลมีเทน ซัลโฟเนต (Methylmethane sulfonate, MMS) เอทิลมีเทนซัลโฟ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนต (Ethymethane sulfonate, EMS) ไนโตรเจน มัสตาร์ด (Nitrogen mustard) และเอ็นเมทิล-เอ็น ไนโตร-เอ็นไนโตรโซ-กัวนิดีน (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidine, NTG) ดังรูปที่ 2.2 (ธัญภัค, 2550) สารต่างๆ บางชนิดที่กล่าวมานี้มีพิษน้อยมาก แต่บางชนิดมีอันตรายมากบางชนิดเป็นสารก่อมะเร็งด้วย ปกติความเข้มข้นที่ใช้กันคือ 50 มิลลิโมลาร์ เวลาที่ใช้ผสมกับเซลล์หรือสปอร์ คือ 30 นาทีถึง 12 ชั่วโมง เวลาจะทดลองต้องใช้เวลาในการทดสอบชนิดสาร ความเข้มข้นของสารที่เหมาะสม เวลาในการผสม เป็นต้น



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ NTG

ผลของการกลายพันธุ์อาจสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นลักษณะ markers แต่จะมีผลโดยตรงต่อการผลิตสารที่ต้องการหรือไม่ อาจต้องใช้เวลาและวิธีพิสูจน์อีกมาก

Kava - Cordeiro และคณะ (1995) ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* โดยใช้รังสีแกมมา รังสีอัลตราไวโอเลต และกรดไนตรัส พบว่าทำให้เชื้อมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางลักษณะสัณฐานวิทยา และลักษณะการใช้อาหาร ดังรูปที่ 2.3

สายพันธุ์ดั้งเดิม สายพันธุ์กลาย

รูปที่ 2.3 เปรียบเทียบลักษณะเส้นใยของเชื้อราหลังทำการกลายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในทางปฏิบัติไม่สามารถบอกได้ว่ามิวตาเจนชนิดใดดีที่สุด จึงต้องทดลองในจุลินทรีย์แต่ละชนิด หากไม่ได้ผลจำเป็นต้องเปลี่ยนแปลงชนิดของมิวตาเจนที่ใช้จนกว่าจะได้ผลตามที่ต้องการ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการใช้มิวตาเจนจะมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากขึ้น แต่มิวแตนท์ส่วนใหญ่มักมีความสามารถในการผลิตสารที่ต้องการได้น้อยลง มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ผลิตสารได้มากขึ้น ดังนั้นจึงต้องมีวิธีการคัดเลือกมิวแตนท์ที่มีจำนวนน้อยมากนี้ออกมาให้ได้ การออกแบบวิธีการคัดเลือกมิวแตนท์ที่สร้างผลผลิตได้สูงขึ้น โดยทั่วไปจะใช้สมบัติที่ต้องการเป็นปัจจัยช่วยในการคัดเลือก สำหรับสาเหตุที่มิวแตนท์สร้างผลผลิตที่ต้องการได้สูงขึ้นนั้น ตามปกติเกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อกลไกการควบคุมปริมาณการสังเคราะห์ผลผลิต ซึ่งจากข้อมูลเหล่านี้สามารถช่วยให้ทำนายลักษณะของมิวแตนท์ที่ต้องการได้ด้วย เช่น การแยกและการคัดเลือกมิวแตนท์เพื่อใช้ผลิตกรดอะมิโน และเอนไซม์ต่างๆ เป็นต้น (สมใจ, 2547)

2.5 การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย (ตะวัน, 2550)

ภายหลังจากการผ่านวิธีการกลายพันธุ์ทั้งทางเคมีและทางกายภาพ หรือ 2 วิธีรวมกันแล้ว ต้องนำสารละลายที่มีเซลล์หรือสปอร์มาทำให้เจือจาง แล้วเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีส่วนประกอบของอาหารและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม ทำการบ่มเชื้อไปชั่วระยะหนึ่ง สังเกตสายพันธุ์กลายหรือมิวแตนท์ที่ได้จะมีการเปลี่ยนแปลงในด้านสี สัณฐานวิทยา อัตราการเจริญ การเกิดสปอร์ เป็นต้น สิ่งต่างๆ ที่เกิดขึ้นสะท้อนให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีการกลายพันธุ์ที่ใช้ แต่เมื่อนำไปเลี้ยงต่อในอาหารวุ้นเอียง บางครั้งคุณสมบัติดังกล่าวอาจหายไปได้ อย่างไรก็ตามต้องคอยตรวจกิจกรรมที่ต้องการ ได้แก่ การผลิตสาร เช่น เอนไซม์ วิตามิน สี ซึ่งอาจจะเป็นสารเกิดภายในเซลล์และขับออกมา หรือเป็นสารที่เกิดเฉพาะภายในเซลล์ ควรพิจารณาเลือกมิวแตนท์ที่สร้างสารพลอยได้อื่นๆ (by-product) น้อย เพื่อที่จะได้ไม่ยุ่งยากเวลานำสารที่ต้องการมาใช้ และหากเลือกไอโซเลตจากสายพันธุ์กลายมาน้อยอาจทำให้โอกาสที่จะได้สายพันธุ์ที่ผลิตสารที่ต้องการน้อยลงไปด้วย

การคัดเลือกสายพันธุ์กลายอย่างง่ายๆ จะพิจารณาจากคุณสมบัติของเชื้อหลังการกลายพันธุ์ ซึ่งจะพิจารณาจากการผลิตสารใหม่ๆ การให้กิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงขึ้น หรือการให้ปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นด้วย (Soumillion และ Fastrez, 2001)

2.6 เอนไซม์ไลเปส (อารี, 2550)

เอนไซม์ไลเปส (lipase , glycerol ester lipase ; E.C. 3.1.1.3) มีสับสเตรท คือ ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เป็นเส้นสายของกรดไขมัน (fatty acid) ซึ่งไม่ละลายน้ำ ลักษณะการทำงานของไลเปส คือจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเตอร์ของกรดไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ไลเปส

1. เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ ได้เป็นไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) กลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมัน

2. ไม่ละลายน้ำ เนื่องจากเอนไซม์ไม่ละลายน้ำแต่จะอยู่ในน้ำโดยไม่รวมตัวกับน้ำ เพราะฉะนั้นปฏิกิริยาจึงเกิดขึ้นระหว่างชั้นของสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble substrate) กับ เอเควียสเฟส (aqeous phase)

2.6.2 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ในแบคทีเรีย รา และยีสต์ ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักจะใช้เชื้อราเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ไลเปสกันอย่างกว้างขวาง (Falony และคณะ, 2006) เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Geotrichum, Pennicillium, Aspergillus, Mucor, Rhizopus* และ *Rhizomucor* เป็นต้น ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Candida* และ *Yarrowia lipolytica* เป็นต้น แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Psuedomonas, Bacillus* และ *Staphylococcus* เป็นต้น ซึ่งพบทั้งที่สร้างอยู่ในเซลล์และปลดปล่อยออกมานอกเซลล์

2.6.3 ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปส (สมใจ, 2547)

1. ใช้ในการผลิตชอคโกแลตนม และเนยแข็ง (ทำให้เกิดกลิ่นรสในระหว่างการเก็บรักษา)

2. ใช้ผสมอาหารสัตว์

3. ใช้ผสมผงซักฟอก โดยเฉพาะสำหรับผ้าฝ้ายและลินิน

4. ใช้เสริมการย่อยอาหารของมนุษย์

5. ใช้ทำลายไขมันตามท่อน้ำ เครื่องมือและอุปกรณ์

6. ใช้ผลิตกลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ

2.7 แหล่งของเอนไซม์ในอุตสาหกรรม

สิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ แต่แหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมในปัจจุบันได้แก่ จุลินทรีย์ เนื่องจากมีข้อดีหลายประการดังนี้คือ

1. จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ปริมาณมาก ๆ ได้ในระยะเวลาสั้น โดยใช้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการผลิตจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และมีขนาดเล็ก จึงใช้พื้นที่น้อย นอกจากนี้ยังสามารถเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก และผลิตได้ตลอดเวลาโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการ ทำได้โดยวิธีการง่าย ๆ และใช้เวลาไม่นานนัก

3. จุลินทรีย์หลายชนิดผลิตเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาชนิดเดียวกันได้ แต่มีสมบัติบางอย่างต่างกัน จึงสามารถเลือกใช้เอนไซม์ที่เหมาะสม ในสภาวะที่แตกต่างกันได้ตามต้องการ

4. การเพิ่มผลผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์โดยการปรับปรุงพันธุกรรม หรือโดยการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม สามารถทำได้ง่ายกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น

ปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสได้ถูกนำมาใช้งานอย่างกว้างขวางทั้งงานด้านทางเทคโนโลยีชีวภาพและใช้ในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้ในกระบวนการผลิตน้ำมัน การผลิตเป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactatnt) และใช้ในการเตรียมเป็นส่วนผสมของยาบางชนิด (Abbas และคณะ, 2002)

2.8 ปัจจัยสำคัญในการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์

1. การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ ปัจจัยสำคัญในการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ คือ ต้องเลือกใช้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตสูง และวิธีการที่ใช้คัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ควรทำได้ง่าย เพื่อให้สามารถคัดเลือกเชื้อจากธรรมชาติหรือจากศูนย์รวบรวมจุลินทรีย์ ซึ่งมีเป็นจำนวนมากได้ในเวลาอันรวดเร็ว

2. การปรับปรุงกระบวนการหมัก เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้แล้ว ตามปกติจะต้องศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต พารามิเตอร์ที่สำคัญโดยทั่วไปได้แก่ อุณหภูมิ pH ชนิดและปริมาณของสารอาหารต่างๆ (แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แร่ธาตุชนิดต่างๆ และวิตามิน) ในกรณีที่ต้องการผลิตเอนไซม์ภายนอกเซลล์ ควรศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ด้วย ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุมากกว่าชนิดที่มีประจุลบหรือบวก เนื่องจากไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์

3. การศึกษาระยะการเจริญของจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์สูงสุด การผลิตเอนไซม์โดยใช้กระบวนการหมักแบบกะจำเป็นต้องศึกษาหาข้อมูลว่าจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้สูงสุดในระยะใดของการเจริญ เพื่อจะได้เก็บเกี่ยวผลผลิตในเวลาที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด เพราะจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เมื่อหมักได้เอนไซม์ปริมาณสูงสุดแล้ว ถ้าไม่เก็บเกี่ยวเอนไซม์ออกมาทันทีแต่ยังคงให้การหมักดำเนินต่อไป ปริมาณเอนไซม์มักจะลดลงอย่างรวดเร็วในกรณีที่ต้องการผลิตเอนไซม์โดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (chemostat) จะมีประโยชน์มาก เนื่องจากสามารถควบคุมอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ให้คงที่อยู่ในระยะที่ต้องการ ซึ่งเป็นระยะที่ให้ผลผลิตเอนไซม์ปริมาณสูงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ระดับยีน ข้อมูลเกี่ยวกับการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในระดับยีนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมาก เพราะถ้าทราบกลไกเหล่านี้ก็จะเป็นแนวทางในการควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ และเป็นแนวทางในการปรับปรุงและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงมากกว่าปกติอีกด้วย (สมใจ, 2547)

2.9 การใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซล

การนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้น เป็นการนำจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *Psuedomonas* sp., *Geotrichum candidium*, *Pennicillium cyclopium*, *Aspergillus niger*, *Mucor hirmalis f.hiemalis*, *Rhizopus javanicus*, *Candida cyclindracea* และ *Streptomyces rimosus* โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาที่สำคัญ ซึ่งทำหน้าที่ย่อยเอสเทอร์ในน้ำมันให้เป็นสายสั้นลง (Tianwei และคณะ, 2003) มีผลให้ความหนืดลดลงตามต้องการ เป็นการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้แทนกรดหรือด่างในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิตไบโอดีเซล ทำให้ได้เมทิลเอสเทอร์หรือเอทิลเอสเทอร์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ให้คุณภาพที่ดีกว่า อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและสามารถแยกออกมาได้ง่ายในขั้นตอนสุดท้าย

เอนไซม์ไลเปสจะช่วยย่อยน้ำมัน โดยการเกิดปฏิกิริยาทรานสเอสเทอร์ริฟิเคชัน ทำให้น้ำมันที่ได้จากพืชนั้น มีมูลค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งปฏิกิริยาทรานสเอสเทอร์ริฟิเคชันจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำมัน ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจึงสามารถทำปฏิกิริยาได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงด้วย แต่ไม่ได้ต้องการให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงในสภาวะที่เลี้ยงเชื้อในอุณหภูมิสูง เพียงแต่ต้องการหาสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kohno และคณะ, 2001)

2.10 สบู่ดำ

ชื่อของสบู่ดำ

ชื่อสามัญ : Physic nut หรือ Purging nut

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Jatropha curcas* L.

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ยืนต้น ดังรูปที่ 2.4 อายุยืนไม่น้อยกว่า 20 ปี ทรงพุ่มขนาดกลาง สูงประมาณ 2-7 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยวคล้ายใบฝ้ายแต่หนากว่า ขอบใบมีหยักตื้นๆ 3-5 หยัก ดอกมีขนาดเล็กสีเหลือง จำนวน 70 – 120 ดอกต่อช่อ ออกดอกถึงติดผลใช้เวลาประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

60 วัน มี 7-15 ผลต่อช่อดอก ผลอ่อน สีเขียว ผลแก่มีสีเหลืองถึงดำ ทรงกลม เปลือกหนา ส่วนใหญ่มี 3 พู เมล็ดมีสีดำ เนื้อในมีสีขาว ดังรูปที่ 2.5

รูปที่ 2.4 ลักษณะของต้นสบู่ดำ

รูปที่ 2.5 ลักษณะของเมล็ดสบู่ดำ

2.11 การใช้น้ำมันสบู่ดำผลิตเป็นไบโอดีเซล

น้ำมันสบู่ดำ สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้เป็นอย่างดีเนื่องจากมีคุณสมบัติเชิงเชื้อเพลิงที่สำคัญใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลหลายประการ เช่น มีค่าคุณสมบัติในการจุดติดไฟ (Cetane No.) เท่ากับ 51 ในขณะที่มาตรฐานดีเซลกำหนดไม่ต่ำกว่า 47 ค่า combustion point เท่ากับ 191 ในขณะที่ดีเซลกำหนดไม่ต่ำกว่า 52 และค่าพลังงานเท่ากับ 41 เมกกะจูลต่อกิโลกรัม ในขณะที่ค่าพลังงานของดีเซลเท่ากับ 42.6 เมกกะจูลต่อกิโลกรัม เป็นต้น นอกจากนี้การหีบสกัดน้ำมันและกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำมีขั้นตอนที่ง่ายไม่สลับซับซ้อน ผลิตเพื่อใช้เองในชุมชนที่ห่างไกลได้ สามารถเกิดระบบการผลิตและใช้น้ำมันเชื้อเพลิงทดแทนดีเซลแบบพึ่งพาตนเองในชุมชนได้ในระดับหนึ่ง สบู่ดำจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะสร้างความยั่งยืนด้านพลังงานให้แก่ชุมชน และอาจเป็นวัตถุดิบหลักในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลในอนาคตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมันสบู่ดำนอกจากจะใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซลกับเครื่องยนต์เกษตรแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆอีก เช่น ใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับตะเกียงไส้ ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเตาหุงต้ม ใช้ทำสบู่ เป็นต้น ดังรูปที่ 2.6

รูปที่ 2.6 น้ำมันสบู่ดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ สารเคมีและอุปกรณ์

เชื้อราสายพันธุ์ 1649

สารเคมี

1. อาหาร PDA
2. อาหาร CD medium
3. อาหาร Tributyrin agar
4. ทวีน 80
5. สารละลายฟีนอลเรด (phenol red)
6. กลีเซอรอลทริบูไทเรต (Glyceroltributirate)
7. น้ำมันสบู่ดำ
8. เอ็นเมทิล-เอ็นไนโตร-เอ็นไนโตรโซ-กัวนิดีน (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidine; NTG)
9. พารา-ไนโตรฟีนิล ปาลมิเทต (*p*-nitrophenyl palmitate; *p*-NPP)
10. 2-โพรพานอล (2- propanol)
11. ไตรทอน เอ็กซ์ 100 (Triton X 100)
12. กัมอาราบิค
13. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์
14. โซเดียมคาร์บอเนต

อุปกรณ์

1. ตู้บ่มเชื้อ
2. กล้องจุลทรรศน์
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
4. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)
5. ตู้ฉายแสงอัลตราไวโอเลต
6. เครื่องชั่งสาร
7. เครื่องวัดค่าพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. เครื่องเขย่า

9. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

10. เครื่อง Sonicate

11. ตู้ปลอดเชื้อ

12. หลอดทดลอง

13. ฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

14. จานเพาะเชื้อ

15. ซินเตอร์กลาส (sinter glass)

16. บีกเกอร์

3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

วิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตมีวิธีการดังนี้

1. เลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ 1649 ซึ่งแยกได้จากดิน โดยถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหาร Potato Dextose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เกิดสปอร์เต็มที่ แล้วจึงทำให้เป็นสารละลายสปอร์ โดยใส่น้ำกลั่นที่มีทวีน 80 ร้อยละ 0.02 ลงไป จากนั้นกำจัดเส้นใยด้วยซินเตอร์กลาส No.1 (sinter glass) นับจำนวนสปอร์เริ่มต้นจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับจำนวนสปอร์จะใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ ดังแสดงในภาคผนวก ข. และหาปริมาณสปอร์โดยวิธี total plant count ลงบนอาหาร PDA โดยวิธีการ spread plate โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2. นำสารละลายสปอร์ที่ได้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ในจานเพาะเชื้อ เพื่อนำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยกวนสารละลายอยู่ตลอดเวลาบนเครื่องคนสาร (stirrer) เก็บตัวอย่างสารละลายที่เวลา 8, 10 และ12 นาที โดยที่ 0 นาทีเป็นชุดควบคุม ทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาทำการเจือจางสารละลายสปอร์ที่ 10 ถึง 10^{-2} และเกลี่ยเชื้อลงในอาหาร CD-medium ที่มีน้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน อาหาร Tributyrin agar และอาหาร PDA เพื่อนับจำนวนโคโลนีที่เหลือทั้งหมด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

3. หลังจากผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตแล้ว คัดเลือกโคโลนีที่ให้วงใสในอาหารที่มีสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนหรือในอาหาร Tributylin agar เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยดูจากการสร้างวงใส และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส หลังจากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด

3.2.1 การหาร้อยละการอยู่รอด

เกลี่ยเชื้อในอัตราการเจือจางที่เหมาะสม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 2 วัน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดและหาร้อยละการอยู่รอดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคัดเลือกเชื้อที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ให้มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 1-5 (Tan และคณะ, 2003)

3.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต โดยคัดเลือกจากวงใสรอบโคโลนี

คัดเลือกโคโลนีที่ให้วงใสของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตซึ่งเลี้ยงในอาหาร CD-medium ที่มีสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน หรือ Tributylin agar เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยดูจากการสร้างวงใส จากนั้นเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

3.2.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์กลาย

1. นำสารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่แยกได้ โดยเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารวุ้นเอียงจนท่วมเส้นใยรา ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขูดเส้นใยของเชื้อราให้สปอร์หลุดออกมา นำไปนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ให้ได้จำนวนสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2. ถ่ายสารละลายสปอร์ของเชื้อราลงในอาหารเหลว CD-medium ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 1 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน (Cardenas และคณะ, 2001) ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารอยู่ปริมาตร 70 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายสปอร์ 10 มิลลิลิตรเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนใส จากนั้นนำส่วนใส ที่ได้ไปวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของการย่อยน้ำมันโดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่อไป

3.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี เอ็นเมทิล-เอ็นไนโตร-เอ็นไนโตรโซ-กัวนิดีน (NTG)

วิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้สารเคมี เอ็นเมทิล-เอ็นไนโตร-เอ็นไนโตโซ-กัวนิดีน มีวิธีการดังนี้

1. เลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้หลังจากผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตในอาหาร PDA เพื่อให้เกิดสปอร์เต็มที่ นับจำนวนสปอร์ให้ได้10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และสุ่มตัวอย่างสปอร์ทำ total plate countใน PDA โดยวิธีการเกลี่ยเชื้อและนำสารละลายสปอร์ที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารเคมี NTG ให้ได้ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (Tan และคณะ, 2003)

2. นำสารละลายสปอร์ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มาล้าง 2 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และเจือจางสปอร์ที่ 10^{-1} ถึง 10^{-4} และนำมาเกลี่ยเชื้อในอาหารแข็ง CD-medium ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนและTributylin agar และทำ total plate count ใน PDA ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3. หลังจากผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีแล้ว คัดเลือกโคโลนีที่ให้วงใสในอาหาร CD-medium ที่มีสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนหรือในอาหาร Tributylin agar เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยดูจากการสร้างวงใส และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส หลังจากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด

3.3.1 การหาร้อยละการอยู่รอด

เกลี่ยเชื้อในอัตราการเจือจางที่เหมาะสม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดและหาร้อยละการอยู่รอดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคัดเลือกเชื้อที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ให้มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 1-5 (Tan และคณะ, 2003)

3.3.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ใช้สารเคมี NTG โดยคัดเลือกจากวงใสรอบโคโลนี

คัดเลือกโคโลนีที่ให้วงใสของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ใช้สารเคมี NTG ซึ่งเลี้ยงในอาหาร CD-medium ที่มีสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน หรือ Tributylin agar เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยดูจากการสร้างวงใส จากนั้นเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

3.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์กลาย

1. นำสารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่แยกได้ โดยเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารวุ้นเอียงจนท่วมเส้นใยรา ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขูดเส้นใยของเชื้อราให้สปอร์หลุดออกมา นำไปนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ให้ได้จำนวนสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2. ถ่ายสารละลายสปอร์ของเชื้อราลงในอาหารเหลว CD-medium ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 1 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน (Cardenas และคณะ, 2001) ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารอยู่ปริมาตร 70 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายสปอร์ 10 มิลลิลิตรเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน นำไปปั่นเหวี่ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

83993

ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนใส จากนั้นนำส่วนใส ที่ได้ไปวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของการย่อยน้ำมันโดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่อไป

3.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (lipase activity)

นำส่วนใส (สารละลายเอนไซม์) ที่ได้มาศึกษาหาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในเชิงปริมาณ โดยการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธีการวิเคราะห์การดูดกลืนแสง สามารถเตรียมสารละลายได้ดังนี้

สารละลาย A : ละลาย พารา-ไนโตรฟีนิล ปาลมิเทต 30 มิลลิกรัม ใน 2- โพรพานอลให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

สารละลาย B : ละลาย ไตรทอน เอ็กซ์ 100 400 มิลลิกรัม และกัมอาราบิค 100 มิลลิกรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ให้ได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

สารละลาย C : ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 211.8 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย D (เตรียมโดยผสมสารละลาย A 10 มิลลิลิตร กับสารละลาย B 90 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร(เตรียมใหม่ก่อนใช้) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย C ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร แล้วจึงไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร คำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนิล

กำหนด : ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนิล ปาลมิเทต ให้เป็น พารา-ไนโตรฟีนิล 1ไมโครโมลในสภาวะที่ทดสอบ

3.5 การเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยการวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 11.5 และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธีการ Duncans New Multiple Range Test (DNMR)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 8, 10 และ12 นาที

4.1.1 ศึกษาหาร้อยละการอยู่รอดของสปอร์เชื้อราหลังจากผ่านรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 8, 10 และ12 นาที

เมื่อผ่านการฉายแสงสปอร์ราด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 8, 10 และ12 นาที พบว่าเมื่อเชื้อราสายพันธุ์กลายผ่านแสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 8 นาที จะมีร้อยละการอยู่รอดมากกว่าเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต 10 และ 12 นาที และเมื่อทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 10 นาที จะให้ร้อยละการอยู่รอดเท่ากับ 2.53 แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ร้อยละการอยู่รอดของเชื้อราสายพันธุ์กลายหลังผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 8,10 และ 12 นาที

เวลาในการใช้แสงอัลตราไวโอเลต (นาที)	ค่าเฉลี่ยโคโลนี	ร้อยละการอยู่รอด
0	180	100
8	12.40	6.89
10	4.55	2.53
12	1.20	0.67

ในการทดลองนี้จะเลือกระยะเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่ทำให้เชื้อรามีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 1-5 (Tan และคณะ, 2003) ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ของการฉายแสงอัลตราไวโอเลตอยู่ที่ระยะเวลา 10 นาที

Tan และคณะ (2003) ศึกษาร้อยละการอยู่รอดของเชื้อ *Candida lipolytica* ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลา 20 ถึง 80 วินาที ร่วมกับการใช้สารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที พบว่าการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 80 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 5 และเมื่อทำการชักนำต่อด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีร้อยละการอยู่รอดเท่ากับ 1 ซึ่งจากการทดลองจะใช้ร้อยละการอยู่รอดน้อยกว่า 10 เพราะเป็นช่วงที่เชื้อมีอัตราการตายมากกว่าร้อยละ 90 ทำให้เชื้อที่อยู่รอดเป็นเชื้อสายพันธุ์กลายที่ต้องการ

Bapiraju และคณะ (2004) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มการผลิตของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Rhizopus* sp. BTS-24 โดยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลา 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที คัดเลือกเฉพาะเชื้อที่มีร้อยละการอยู่รอดน้อยกว่า 1 เพื่อชักนำให้กลายพันธุ์ต่อด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีร้อยละการอยู่รอดน้อยกว่า 1 แสดงว่าจากการทดลองจะใช้เชื้อที่มีร้อยละการอยู่รอดน้อยกว่า 1 หรือคัดเลือกเชื้อที่มีอัตราการตายมากกว่าร้อยละ 99 ซึ่งเชื้อดังกล่าวมีโอกาสเป็นเชื้อสายพันธุ์กลายที่ต้องการศึกษาต่อไป

4.1.2 การคัดเลือกวงใสของโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 10 นาที

หลังจากทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้ว ได้คัดเลือกโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ให้วงใสในอาหาร CD-medium ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนหรือใน Tributylin agar จากนั้นนำแต่ละสายพันธุ์กลายที่ได้ เลี้ยงต่อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทำการเก็บเชื้อไปปั่นเหวี่ยง เก็บเฉพาะส่วนใส (สารละลายเอนไซม์) เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในขั้นต่อไป จากผลการทดลองพบว่าลักษณะของเชื้อราสายพันธุ์ S1649 ที่แยกได้จากดิน ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสและคัดเลือกมาจากสภาพธรรมชาติ ดังรูปที่ 4.1 และเมื่อนำเชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวไปผ่านการชักนำการกลายพันธุ์โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าเชื้อราสายพันธุ์กลายบางสายพันธุ์จะเจริญได้และให้วงใสใน Tributylin agar แต่บางสายพันธุ์จะให้วงใสใน CD-medium ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน ดังรูปที่ 4.2

รูปที่ 4.1 ลักษณะของเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม S1649 ที่คัดแยกได้จากดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 ลักษณะของวงใสที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายบนอาหาร tributyrin agar เป็นเวลา 2 วัน

4.1.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 10 นาที

จากการทดลองเมื่อนำเชื้อราสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากเชื้อที่เจริญและเกิดวงใสรอบโคโลนีในอาหาร Tributylin agar และใน CD-medium ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้เชื้อราที่มีการเจริญแสดงดังรูปที่ 4.3

รูปที่ 4.3 ลักษณะการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลายเมื่อเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว CD-medium ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 3 วัน

หลังจากคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตมี 3 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์เปสที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม S1649 คือสายพันธุ์ UVT_{14} , UVT_{16} และ UVC_2 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.128, 0.219, 0.367 ตามลำดับ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์กลายสูงสุดเท่ากับ 0.367 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.2

เมื่อนำสารละลายส่วนใสของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตมาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสภาวะอาหารเหลว CD-medium ที่มีสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้น จะได้ลักษณะของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่มีความแตกต่างกันจำนวนมาก บางสายพันธุ์อาจมีการเปลี่ยนแปลงโดยสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณมากขึ้น บางสายพันธุ์กลายอาจผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ปริมาณน้อยลง หรือบางสายพันธุ์กลายอาจผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ปริมาณใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายนั้น จะคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากขึ้น แต่จะผลิตได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมมากน้อยเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแต่ละครั้ง จะสามารถคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณมากหรือไม่ จากการทดลองนี้จึงควรทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของการของฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 10 นาที โดยทำการทดลองซ้ำ เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีอัตราการกลายพันธุ์ออกมาให้ได้จำนวนเชื้อมากที่สุด และเพื่อให้ได้เชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์หลังผ่านการชักนำให้ได้มากที่สุด ก่อนที่จะทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสหลังผ่านการชักนำให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 10 นาที

รหัสไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
S1649	0.127^{c}
UVT_1	0.020^{kl}
UVT_2	0.103^{d}
UVT_3	0.101^{d}
UVT_4	0.072^{f}
UVT_5	0.064^{g}
UVT_6	0.026^{jk}
UVT_7	0.054^{h}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสหลังผ่านการชักนำให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 10 นาที

รหัสไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิตร)
UVT_8	0.122^{o}
UVT_9	0.026^{jk}
UVT_{10}	0.053^{h}
UVT_{11}	0.090^{no}
UVT_{12}	0.015^{lmn}
UVT_{13}	0.017^{lm}
UVT_{14}	0.128^{c}
UVT_{15}	0.086^{e}
UVT_{16}	0.219^{b}
UVT_{17}	0.127^{c}
UVT_{18}	0.007^{no}
UVC_1	0.031^{j}
UVC_2	0.367^{a}
UVC_3	0.050^{o}
UVC_4	0.011^{nmo}
UVC_5	0.043^{i}
UVC_6	0.060^{o}

หมายเหตุ

UVT คือ สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากวิธีการรังสีอัลตราไวโอเลตในอาหาร Tributyrin agar

UVC คือ สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากวิธีการรังสีอัลตราไวโอเลตในอาหาร CD-medium

ตัวอักษรหลังตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีเอ็นเมทิล-เอ็น ไนโตรโซ-เอ็นกัวนิดีน (NTG) ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.1 ศึกษาหาร้อยละการอยู่รอดของสปอร์เชื้อราหลังจากการใช้สารเคมี เอ็นเมทิล-เอ็น ไนโตรโซ-เอ็นกัวนิดีน (NTG) ความเข้มข้น 0.1และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที

เมื่อเปรียบเทียบการหาความเข้มข้นที่เหมาะสม NTG และร้อยละการอยู่รอดของเชื้อราสายพันธุ์กลายหลังผ่านการทรีตด้วยสารเคมี NTG พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร มีร้อยละการอยู่รอดมากกว่าความเข้มข้นที่ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร คือมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 3.09 ซึ่งการทดลองนี้จะเลือกใช้สารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรเป็นเวลา 30 นาที ที่ทำให้เชื้อรามีร้อยละการอยู่รอดเท่ากับ 1-5 (Kava - Cordeiro และคณะ, 1995) แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ร้อยละการอยู่รอดของเชื้อราสายพันธุ์กลายหลังผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที

ความเข้มข้น NTG (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าเฉลี่ยโคโลนี	ร้อยละการอยู่รอด
0	270	100
0.1	8.33	3.09
0.2	2.00	0.74

4.2.2 การคัดเลือกวงใสของโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยการใช้สารเคมี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที

หลังจากคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดมาทำการศึกษาต่อโดยทำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG และเลี้ยงในอาหาร Tributylin agar และ CD-medium ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน คัดเลือกโคโลนีที่สามารถสร้างวงใส จากนั้นนำเชื้อราสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากอาหาร Tributylin agar หรือ CD-medium ที่เกิดวงใสรอบโคโลนี ไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวที่มีสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและทำการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการชักนำโดยการใช้สารเคมี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที

เมื่อนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์กลาย UVC_2 ที่ผ่านการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าจากการศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อราสายพันธุ์กลาย UVC_2 โดยการใช้สารเคมี NTG จะได้สายพันธุ์กลายที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อราสายพันธุ์กลายสูงสุดคือสายพันธุ์ NTT_9 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.136 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่น้อยกว่าสายพันธุ์กลายที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสหลังผ่านการชักนำให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที

รหัสไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
NTC_1	0.039^{ij}
NTC_2	0.038^{j}
NTC_3	0.010^{o}
NTC_4	0.053^{f}
NTC_5	0.064^{d}
NTC_6	0.029^{k}
NTC_7	0.014^{n}
NTC_8	0.016^{mn}
NTC_9	0.017^{m}
NTC_{10}	0.049^{g}
NTC_{11}	0.045^{h}
NTC_{12}	0.075^{c}
NTT_1	0.030^{k}
NTT_2	0.042^{i}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสหลังผ่านการชักนำให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที

รหัสไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
NTT_3	0.046^{gh}
NTT_4	0.005^{f}
NTT_5	0.025^{l}
NTT_6	0.005^{p}
NTT_7	0.093^{b}
NTT_8	0.022^{l}
NTT_9	0.136^{a}
NTT_{10}	0.063^{de}
NTT_{11}	0.060^{e}
NTT_{12}	0.022^{l}
NTT_{13}	0.064^{d}

หมายเหตุ

NTC หมายถึง สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากวิธีการใช้สารเคมี NTG ในอาหาร Tributyrin agar

NTT หมายถึง สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากวิธีการใช้สารเคมี NTG ในอาหาร CD-medium

ตัวอักษรหลังตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมี นัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Gao และคณะ(2000) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์ *Pseudomonas* 2106 ที่ผ่านการชักนำให้เกิดสายพันธุ์กลายด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับการใช้สารเคมี NTG ซึ่งสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส โดยฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลา 15 วินาที ถึง 32 นาที และหาเปอร์เซ็นต์การตายของเชื้อมากกว่า 99 จะได้เชื้อสายพันธุ์กลาย 2 สายพันธุ์คือ A14 และA18 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 54.7 และ 52.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และนำเชื้อ A14 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดมาชักนำต่อด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 ถึง 60 นาที หาร้อยละการตายของเชื้อมากกว่า 90 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย *Pseudomonas* sp. H18 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 64.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย *Pseudomonas* sp. H18 มีปริมาณเอนไซม์สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม *Pseudomonas* # 2106 และสูงกว่าสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตด้วย ซึ่งทางผู้วิจัยได้เลือกใช้ร้อยละการอยู่รอดเท่ากับ 1 เพราะเป็นช่วงที่เชื้อมีอัตราการตายมากกว่าร้อยละ 99 ทำให้เชื้อที่อยู่รอดมีโอกาสเป็นเชื้อสายพันธุ์กลาย

Mahadik และคณะ (2003) ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ของ *Aspergillus niger* NCIM 1207 โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตภายใต้การเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็ง ที่มีเมทไทโอนีน พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสลดลงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึงร้อยละ 80 จะพบเพียง 1 สายพันธุ์กลายที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 3.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ดังจะเห็นได้ว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มีโอกาสที่จะทำให้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีขึ้นหรือลดลงก็ได้ ทั้งนี้เนื่องจากการใช้มิวตาเจนจะให้อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากขึ้น แต่มิวแตนท์ส่วนใหญ่มักมีความสามารถในการผลิตสารที่ต้องการได้น้อยลง มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ผลิตสารได้มากขึ้น ดังนั้นจึงต้องมีวิธีการคัดเลือกมิวแตนท์ที่มีจำนวนน้อยมากนี้ออกมาให้ได้ ดังนั้นวิธีการกลายพันธุ์ทั้งทางกายภาพร่วมกับสารเคมีจึงจำเป็นต้องเลือกชนิด ความเข้มข้น และเวลาในการที่เซลล์จะสัมผัสกับสารมิวตาเจนได้อย่างเหมาะสม ซึ่งในทางปฏิบัติไม่สามารถบอกได้ว่ามิวตาเจนชนิดใดดีที่สุดจึงต้องทำการทดลองในจุลินทรีย์แต่ละชนิด หากไม่ได้ผลจำเป็นต้องเปลี่ยนแปลงชนิดของมิวตาเจนที่ใช้จนกว่าจะได้ผลตามที่ต้องการ(สมใจ, 2547) โดยในการทดลองนี้ควรจะทำการทดลองซ้ำในส่วนของการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 10 นาที เพื่อคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากขึ้นและทนต่อสภาวะการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 10 นาที ออกมาให้ได้จำนวนเชื้อกลายพันธุ์มากที่สุด หลังจากนั้นจึงทำการกลายพันธุ์ต่อด้วยสารเคมี NTG ต่อไป เพราะหากคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์เพียงครั้งเดียวแล้วทำการกลายพันธุ์ต่อ อาจทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ไม่แข็งแรงพอหรือไม่มีประสิทธิภาพมากพอในการกลายพันธุ์ต่อด้วยสารเคมี NTG เพราะสารเคมี NTG มีผลชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเบสของเชื้อสายพันธุ์กลายให้เกิดการกลายพันธุ์ที่รุนแรงขึ้น หากเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ข้างต้นไม่แข็งแรงพอ อาจเป็นสาเหตุทำให้ได้เชื้อกลายพันธุ์ที่ไม่มีประสิทธิภาพหรือมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงตามไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม S1649 เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทำการเหนี่ยวนำเชื้อราให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีฉายแสงอัลตราไวโอเลต ทำการคัดเลือกโคโลนีที่สร้างวงใส แล้วเลี้ยงในอาหาร CD-medium ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะอาหารเหลว เมื่อนำส่วนใสมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (การวิเคราะห์เชิงปริมาณ) และนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อราสายพันธุ์กลาย UVC_2 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด เท่ากับ 0.367 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่าสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม S1649

เมื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อ โดยนำเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตมาทำการกลายพันธุ์ต่อด้วยสารเคมี NTG และคัดเลือกโคโลนีที่สร้างวงใส แล้วเลี้ยงในอาหาร CD-medium ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะอาหารเหลว เมื่อนำส่วนใสมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบเชื้อราสายพันธุ์กลาย NTT_9 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด เท่ากับ 0.136 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม S1649 แต่น้อยกว่าสายพันธุ์กลายที่ผ่านการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

ข้อเสนอแนะ

ในขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลาย สามารถเหนี่ยวนำร่วมกันระหว่างการฉายแสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับการใช้สารเคมี *N*-methyl-*N'*-nitroso-*N*-nitroso-guanidine (NTG) หรือสารเคมี *N*-nitroso-*N*-methylurea (NMU) ได้ เพื่อทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการหรือเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ซึ่งจุลินทรีย์สามารถผลิตได้แต่เดิมอยู่แล้ว

นอกจากนี้ในขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต หลังจากที่ฉายแสงอัลตาไวโอเลตแล้ว ไม่ควรให้สารละลายสปอร์โดนแสงเนื่องจากจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ Photoreactivity หรือ Reverse mutation คือทำให้สายพันธุ์กลายนั้นเกิดการเปลี่ยนกลับเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม (ธีรวรรธน์, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ตะวัน ฉัตรสูงเนิน. 2550. การคัดแยก การเก็บรักษาและปรับปรุงจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม. [Online].Available : http://coursewares.mju.ac.th/bi480/Lecture/3isolation.pdf

ณกัญภัทร จินดา. 2545. เอนไซม์ไลเปสแหล่งและการผลิตระดับอุตสาหกรรม [Online].Available : http://utcc2.utcc.ac.th/www/divisions/academicaffairs/journals.htm

ธัญภัค สังฆมานนท์. 2550. การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมเนื่องจากการกลาย. [Online].Available : http://www.rmuti.ac.th/user/thanyaphak/contacts/Heredity/Chapter5.1.pdf)

ธีรวรรธน์ ขันทอง. 2547. การกลายพันธุ์. [Online].Available : http://www.thirawat.com/ge/mutation.html#radia

วชิราภรณ์ ผิวล่อง,จิตติมา บ่างวิรุฬรักษ์, สุจิตรา แสนสาคร และฉานินทร์ พันธรักษ์ราชเดช . 2549. การปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Phaffia rhodozyma* โดยการฉายรังสี โครงการวิจัยรังสีเพื่อการเกษตร. [Online].Available : http://www.oaep.go.th/nstkc/content/view/.htm

สมใจ ศิริโภค. 2547. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2550. เทคโนโลยีของเอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ:โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Abbas, H., Hiol, A., Deyris, V., Comeau, L., 2002. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. Stain isolated from palm fruit. Enzyme and Microbial Technology. 31:986-975.

Bapiraju, K.,V.,V.,S.,N., Sujatha P., Ellaiah P. and Ramana T . 2004. Mutation induced enhanced biosynthesis of lipase. Journal of Biotechnology. 3(11):618-621.

Cardenas, F., de Castro, M.S, Sanchez-montero, J.V., Valmaseda, M., Elson, S.W. and Alvarez, E. 2001 Novel microbial lipase : catalytic activity in reaction in organic media. Enzyme and Microbial Technology. 30:90-94.

Falony, G., Janny Coca Armas, Julio C. Dustet Mendoza and Jose L. Martinez Hernandez. 2006. Production of Exrtacellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. Food Technology. Biotechnology. 44(2):235-240.

Gao, X., Cao, S., Zhang, Ke., 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated Pseudomonas strain. Enzyme and Microbial Technology. 27:74-82.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kava – Cordeiro,V., Luna-Alves –Lima, E.A.,. Azevedo, J.L. 1995. Survival and mutant production iduced by mutagenic Agents in *Metarhizium anisopliae*. Science Agriculture. 52(3):548-554. http://www.thirawat.com/ge/mutation.html#radia

Kohno, M., Enatsu, M., Funatsu, J., Yoshiizumi, M. and Kujimiya, W. 2001. Improvement of the optimum temperature of lipase activity for *Rhizopus niveus* by random mutagenesis and its structural interpretation. Journal of Biotechnology. 87(3): 203-210.

Mahadik, Nutan D., Bastawde, Kulbhushan B., Puntambekar, Ulka S., Khire, Jayant M. and Gokhale, Digambar V. 2003. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. Process Biochemistry. 39(12):2031-2034.

Soumillion, P. and Fastrez, J. 2001. Novel concepts for selection of catalytic activity. Current Opinion in Biotechnology. 12(4):387-394.

Maw, T., Teck Koon Tan, Eugene Khor and Sek Man Wong. 2002. Selection of *Gongronella butleri* strains for enchanced chitosan yield with UV mutagenis. Journal of Biotechnology. 95(2):189-193.

Tan, T., Zhang, Mu., Wang, B., Ying,Ch., Li deng. 2003. Screening of high lipase production *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. Process Biochemistry. 39:459-465.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร CD medium

- ยีสต์สกัด 0.5%
- แบคโตเปปโตน 3%
- K_2PO_4 0.1%
- $NaNO_3$ 0.1%
- $MgSO_4$ 0.05%
- สบู่ดำ 1%
- วุ้น 1.5%

ปรับพีเอชให้ได้ 7.3 ± 0.2

สูตรอาหาร Tributyrin agar

- Phenol red 0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร
- Glyceroltributirate 10 มิลลิลิตรต่อลิตร

การเตรียมอิมัลชันของน้ำมันสบู่ดำ

- ผสม Tween 80 ลงไปร้อยละ 1 ในน้ำมันสบู่ดำ แล้วนำไปทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องแตกเซลล์

การเตรียมฟีนอลเรดความเข้มข้น 0.01

- โดยละลายฟีนอลเรดในแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การตรวจนับสปอร์ของเชื้อราโดยใช้ Haemacytometer (Petreoff-Hausserchamber)

วิธีการตรวจนับสปอร์ของเชื้อรา

เตรียมตัวอย่างที่จะทำการตรวจนับ ถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมานับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรที่ต้องการก่อน เช่น ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร (จะได้ความเจือจางเป็น 10^{-1}) หรืออาจต้องทำการเจือจางมากขึ้นในกรณีที่มีสปอร์จำนวนมาก เช่น เจือจาง 10^{-2} หรือ 10^{-3} เป็นต้น

ปีเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงใน Haemacytometer (Petreoff-Hausserchamber) ซึ่งปิดทับด้วย cover slip โดยใช้ปีเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วดูดตัวอย่างนำมาหยดลงด้านข้างของแผ่น cover slip

ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัว objective กำลังขยาย 10 เท่า นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก หรือนับช่องใหญ่แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับ แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณสปอร์ทั้งหมด

วิธีการคำนวณหาค่าสปอร์

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในช่องใหญ่มีค่า = 0.0025 ตารางมิลลิลิตร

ความลึกระหว่าง cover slip และช่อง = 0.1 มิลลิเมตร

ดังนั้น ปริมาตร 1 ช่องเล็กจะมีค่า = 0.0025 x 0.1 = 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิลิตร

ปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิลิตร จะมีจุลินทรีย์ = Z สปอร์

ปริมาตร 1000 ลูกบาศก์มิลลิลิตร จะมีจุลินทรีย์ $= \frac{z \times 1000}{0.00025}$ สปอร์

$= Z \times 4 \times 10^{6}$ สปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารละลายสำหรับการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

การเตรียมสารละลาย พารา-ไนโตรฟีนิล ปาลมิเทต (*p*-NPP) (สารละลาย A) ทำโดยการชั่งสาร พารา-ไนโตรฟีนิล ปาลมิเทต (*p*-NPP) 30 มิลลิลิตร ละลายใน 2-โพรพานอล 10 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (สารละลาย B)

A : 0.2 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $NaH_2PO_4.12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม X มิลลิลิตร ของ A กับ Y มิลลิลิตร ของ B ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

X มล.	Y มล.	พีเอช
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.3	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

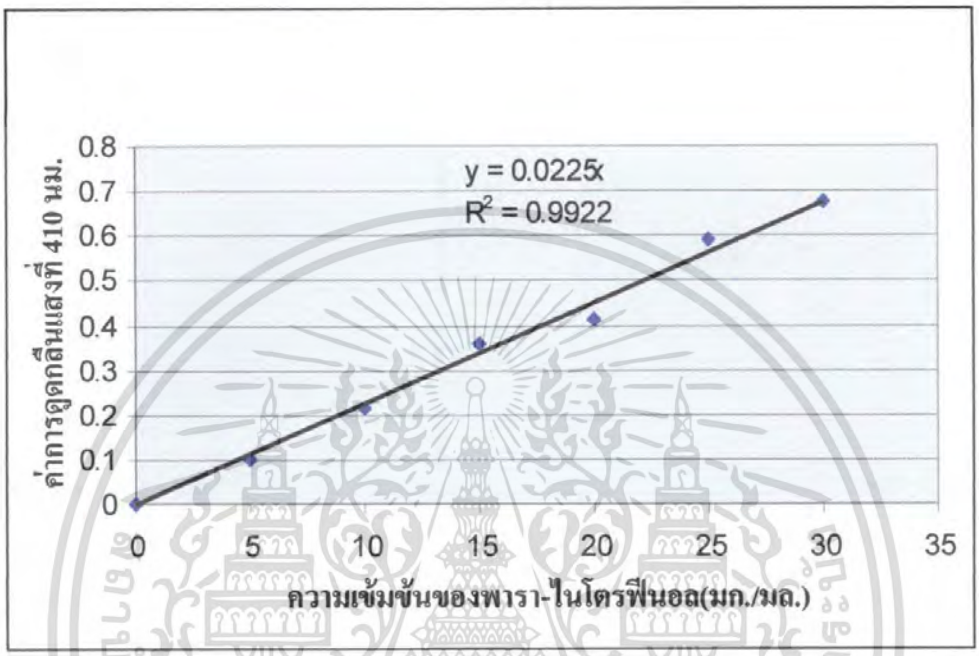
X มล.	Y มล.	พีเอช
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
13.0	87.0	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7.5	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0

การเตรียมสารละลาย พารา-ไนโตรฟีนอล เพื่อทำกราฟสารละลายพารา-ไนโตรฟีนอล มาตรฐาน

เตรียมจากสารละลายพารา-ไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งพารา-ไนโตรฟีนอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาณ 0.10526 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายพารา-ไนโตรฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 5,10,15,20,25 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

การหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิต/มล.)} = \frac{\text{ไมโครกรัมของ } p\text{-nitrophenol} \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของ } p\text{-nitrophenol} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาณเอนไซม์ (มล.)}}$$

จากสมการของกราฟมาตรฐาน $y = 0.0225x$ เมื่อแทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อราสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟีนอล (ไมโครกรัม/มล.) และนำมาคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่เวลา10 นาที

รหัสไอโซเลต	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร)	ค่าการเจือจาง	ความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
S1649	1	0.597	1	26.533	0.127
	2	0.597	1	26.533	0.127
	3	0.596	1	26.489	0.127
UVT_1	1	0.100	1	4.444	0.021
	2	0.085	1	3.778	0.018
	3	0.101	1	4.489	0.022
UVT_2	1	0.467	1	20.756	0.100
	2	0.491	1	21.822	0.105
	3	0.491	1	21.822	0.105
UVT_3	1	0.445	1	19.778	0.095
	2	0.490	1	21.778	0.104
	3	0.489	1	21.733	0.104
UVT_4	1	0.325	1	14.444	0.069
	2	0.348	1	15.467	0.074
	3	0.345	1	15.333	0.073
UVT_5	1	0.319	1	14.178	0.068
	2	0.275	1	12.222	0.059
	3	0.312	1	13.867	0.066
UVT_6	1	0.129	1	5.733	0.027
	2	0.115	1	5.111	0.024
	3	0.128	1	5.689	0.027
UVT_7	1	0.275	1	12.222	0.059
	2	0.226	1	10.044	0.048
	3	0.255	1	11.333	0.054

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่เวลา 10 นาที

รหัสไอโซเลต	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร)	ค่าการเจือจาง	ความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
UVT_8	1	0.601	1	26.711	0.128
	2	0.553	1	24.578	0.118
	3	0.558	1	24.800	0.119
UVT_9	1	0.127	1	5.644	0.027
	2	0.118	1	5.244	0.025
	3	0.125	1	5.556	0.027
UVT_{10}	1	0.244	1	10.844	0.052
	2	0.259	1	11.511	0.055
	3	0.247	1	10.978	0.053
UVT_{11}	1	0.042	1	1.867	0.009
	2	0.041	1	1.822	0.009
	3	0.043	1	1.911	0.009
UVT_{12}	1	0.070	1	3.111	0.015
	2	0.070	1	3.111	0.015
	3	0.070	1	3.111	0.015
UVT_{13}	1	0.080	1	3.556	0.017
	2	0.082	1	3.644	0.017
	3	0.085	1	3.778	0.018
UVT_{14}	1	0.604	1	26.844	0.129
	2	0.602	1	26.756	0.128
	3	0.602	1	26.756	0.128
UVT_{15}	1	0.408	1	18.133	0.087
	2	0.402	1	17.867	0.086
	3	0.403	1	17.911	0.086

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่าการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่เวลา 10 นาที

รหัสไอโซเลต	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร)	ค่าการเจือจาง	ความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
UVT_{16}	1	0.206	5	9.156	0.220
	2	0.202	5	8.9778	0.215
	3	0.205	5	9.111	0.221
UVT_{17}	1	0.628	1	27.911	0.134
	2	0.582	1	25.867	0.124
	3	0.580	1	25.778	0.124
UVC_1	1	0.143	1	6.356	0.030
	2	0.146	1	6.489	0.031
	3	0.146	1	6.489	0.031
UVC_2	1	0.365	5	16.222	0.389
	2	0.332	5	14.756	0.354
	3	0.338	5	15.022	0.360
UVC_3	1	0.029	1	1.289	0.006
	2	0.026	1	1.156	0.006
	3	0.020	1	0.089	0.004
UVC_4	1	0.046	1	2.044	0.010
	2	0.054	1	2.400	0.012
	3	0.045	1	2.000	0.010
UVC_5	1	0.207	1	9.200	0.044
	2	0.200	1	8.889	0.043
	3	0.201	1	8.933	0.043
UVC_6	1	0.030	1	1.333	0.006
	2	0.027	1	1.200	0.006
	3	0.029	1	1.289	0.006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่าการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่เวลา 10 นาที

รหัสไอโซเลต	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร)	ค่าการเจือจาง	ความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
UVC_7	1	0.041	1	1.822	0.009
	2	0.030	1	1.333	0.006
	3	0.039	1	1.733	0.008
UVC_8	1	0.018	1	0.800	0.004
	2	0.018	1	0.800	0.004
	3	0.015	1	0.667	0.003

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการชักนำด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที

รหัสไอโซเลต	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร)	ค่าการเจือจาง	ความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
NTC_1	1	0.192	1	8.533	0.041
	2	0.173	1	7.689	0.037
	3	0.189	1	8.400	0.040
NTC_2	1	0.190	1	8.444	0.040
	2	0.167	1	7.422	0.036
	3	0.188	1	8.000	0.038
NTC_3	1	0.050	1	2.222	0.011
	2	0.045	1	2.000	0.010
	3	0.045	1	2.000	0.010
NTC_4	1	0.253	1	11.244	0.054
	2	0.243	1	10.800	0.052
	3	0.252	1	11.244	0.054

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการชักนำด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที

รหัสไอโซเลต	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร)	ค่าการเจือจาง	ความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
NTC_4	1	0.253	1	11.244	0.054
	2	0.243	1	10.800	0.052
	3	0.252	1	11.244	0.054
NTC_5	1	0.301	1	13.378	0.064
	2	0.297	1	13.200	0.063
	3	0.301	1	13.378	0.064
NTC_6	1	0.130	1	5.778	0.028
	2	0.136	1	6.044	0.029
	3	0.135	1	6.000	0.029
NTC_7	1	0.067	1	2.978	0.014
	2	0.067	1	2.978	0.014
	3	0.065	1	2.889	0.014
NTC_8	1	0.080	1	3.556	0.017
	2	0.075	1	3.333	0.016
	3	0.078	1	3.467	0.016
NTC_9	1	0.080	1	3.556	0.017
	2	0.078	1	3.467	0.017
	3	0.080	1	3.556	0.017
NTC_{10}	1	0.226	1	10.044	0.048
	2	0.232	1	10.311	0.049
	3	0.232	1	10.311	0.049
NTC_{11}	1	0.209	1	9.289	0.045
	2	0.195	1	8.667	0.045
	3	0.205	1	9.111	0.044

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการชักนำด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที

รหัสไอโซเลต	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร)	ค่าการเจือจาง	ความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
NTC_{12}	1	0.353	1	15.689	0.075
	2	0.353	1	15.689	0.075
	3	0.349	1	15.511	0.074
NTT_1	1	0.133	1	5.911	0.028
	2	0.154	1	6.844	0.033
	3	0.135	1	6.000	0.029
NTT_2	1	0.192	1	8.533	0.041
	2	0.198	1	8.800	0.042
	3	0.199	1	8.844	0.042
NTT_3	1	0.213	1	9.467	0.045
	2	0.220	1	9.778	0.047
	3	0.219	1	9.733	0.047
NTT_4	1	0.253	1	11.244	0.054
	2	0.265	1	11.778	0.056
	3	0.265	1	11.778	0.056
NTT_5	1	0.116	1	5.156	0.025
	2	0.116	1	5.156	0.025
	3	0.114	1	5.067	0.024
NTT_6	1	0.020	1	0.889	0.004
	2	0.027	1	1.200	0.006
	3	0.027	1	1.200	0.006
NTT_7	1	0.439	1	19.511	0.094
	2	0.429	1	19.067	0.091
	3	0.439	1	19.511	0.094

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการชักนำด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที

รหัสไอโซเลต	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร)	ค่าการเจือจาง	ความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
NTT_7	1	0.439	1	19.511	0.094
	2	0.429	1	19.067	0.091
	3	0.439	1	19.511	0.094
NTT_8	1	0.091	1	4.044	0.019
	2	0.111	1	4.933	0.024
	3	0.109	1	4.844	0.023
NTT_9	1	0.637	1	28.311	0.136
	2	0.639	1	28.400	0.136
	3	0.640	1	28.444	0.136
NTT_{10}	1	0.266	1	11.822	0.057
	2	0.312	1	13.867	0.067
	3	0.300	1	13.333	0.064
NTT_{11}	1	0.289	1	12.844	0.062
	2	0.289	1	12.844	0.062
	3	0.265	1	11.778	0.056
NTT_{12}	1	0.108	1	4.800	0.023
	2	0.105	1	4.667	0.022
	3	0.105	1	4.667	0.022
NTT_{13}	1	0.301	1	13.378	0.064
	2	0.296	1	13.156	0.063
	3	0.300	1	13.333	0.064

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่ากิจกรรรของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่ 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 10 นาที

Duncan

MUTANT	N	Subset for alpha = .05														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
UVC8	3	.00367														
UVC3	3	.00533														
UVC6	3	.00600														
UVT18	3	.00700	.00700													
UVC7	3	.00767	.00767													
UVT11	3	.00900	.00900													
UVC4	3	.01067	.01067	.01067												
UVT12	3		.01500	.01500	.01500											
UVT13	3			.01733	.01733											
UVT1	3				.02033	.02033										
UVT6	3					.02600	.02600									
UVT9	3					.02633	.02633									
UVC1	3						.03067									
UVC5	3							.04333								
UVT10	3								.05333							
UVT7	3								.05367							
UVT5	3									.06433						
UVT4	3										.07200					
UVT15	3											.08633				
UVT3	3												.10100			
UVT2	3												.10333			
UVT8	3													.12167		
S1649	3													.12700		
UVT17	3													.12733		
UVT14	3													.12833		
UVT16	3														.21867	
UVC2	3															.36767
Sig.		.103	.054	.090	.174	.126	.234	1.000	.928	1.000	1.000	1.000	.526	.101	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการชักนำด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที

Duncan

MUTANT	N	Subset for alpha = .05															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
NTT6	3	.00533															
NTC3	3		.01033														
NTC7	3			.01400													
NTC8	3			.01633	.01633												
NTC9	3				.01700												
NTT8	3					.02200											
NTT12	3					.02233											
NTT5	3					.02467											
NTC6	3						.02867										
NTT1	3						.03000										
NTC2	3							.03800									
NTC1	3							.03933	.03933								
NTT2	3								.04167								
NTC11	3									.04467							
NTT3	3									.04633	.04633						
NTC10	3										.04867						
NTC4	3											.05333					
NTT4	3											.05503					
NTT11	3												.06000				
NTT10	3												.06267	.06267			
NTC5	3													.06367			
NTT13	3													.06367			
NTC12	3														.07467		
NTT7	3															.09300	
NTT9	3																.13600
Sig.		1.000	1.000	.097	.631	.073	.338	.338	.097	.233	.097	.233	.059	.500	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000