

**สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง**

การชักนำและการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส  
เพื่อใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันจากสบู่ดำ



เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 83756  
วัน,เดือน,ปี..... 15 ก.ย. 2551

b. 11๙ ๙๗๔๔๑  
i.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์  
คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Induction and Selection of Mutant Fungi to Producing Lipase for  
Improvement Quality of *Jatropha curcas* Oil



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement  
for the Degree of Bachelor of science  
Department of Biotechnology  
Faculty of Science  
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**โครงการพิเศษเรื่อง** การชักนำและการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันจากสบู่ดำ

**นักศึกษา** นางสาวอรพรรณ หิรัญจรูญชัย รหัส 47050537

นางสาวอรุณศิริ วุฒิวิมล รหัส 47050538

**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์

**สาขาวิชา** จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์

**คณะวิทยาศาสตร์** สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.สุรีย์ นานาสสมบัติ	
กรรมการ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ อาจารย์คณิงกานต์ กลั่นบุศย์	



(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	การชักนำและการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันจากสบู่ดำ
นักศึกษา	น.ส.อรพรรณ หิรัญจรูญชัย น.ส.อรุณศิริ วุฒิวิมล
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์

### บทคัดย่อ

การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายจากการชักนำโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) และสารเคมีเอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-คลอนิติน (NTG) ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในปริมาณสูง พบว่าการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 12 นาที คัดเลือกได้ทั้งหมด 24 สายพันธุ์ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยน้ำมันสูงที่สุด คือสายพันธุ์ T5 และสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (BGG06) เท่ากับ 0.0634 ยูนิต/มล. และนำสายพันธุ์กลาย T5 มาทำการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที พบว่าได้สายพันธุ์กลายทั้งหมด 29 สายพันธุ์ ซึ่งวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยน้ำมัน พบว่ามีเชื้อราที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมจำนวน 17 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ CD23 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.1623 ยูนิต/มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Special Project</b>	Induction and selection of mutant fungi to producing lipase for improvement quality of <i>Jatropha curcas</i> oil
<b>Name</b>	Miss Orapan Hirunjaroonchai Miss Arunsiri Wutivimol
<b>Department</b>	Applied Biology
<b>Program</b>	Industrial Microbiology
<b>Academic Year</b>	2007
<b>Special Project Advisor</b>	Asst. Prof. Aree Rittiboon

### Abstract

Mutant fungi was induced by ultraviolet light (UV) and N-methyl-N-titro-N-nitroso guanidine (NTG), and 24 isolates (12-min exposing to UV-ray) with high lipase producing activity were selected. The activities of mutant strains were investigated in oil digestion process. The mutant strain T5 had the highest activity at 0.0634 U/ml and higher than that of wild type strain activity (BGG06, at 0.055U/ml). Then, the mutant strain were selected. The activities of 17 of 29 isolated strains were higher than that of wild type strain. The CD23 isolated strain showed highest enzyme activity at 0.1623 U/ml.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ซึ่งสำเร็จได้ด้วยการช่วยเหลือ และการสนับสนุนจากบุคคลผู้มีอุปการคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆ ในระหว่างการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษ ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ ที่เป็นประธานกรรมการ และขอขอบพระคุณ อาจารย์คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการในการตรวจสอบโครงการพิเศษที่ช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้การเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทดลอง และช่วยอำนวยความสะดวกด้านต่างๆ ทำให้โครงการพิเศษสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ ครอบครัว เพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจ และผู้ที่มีส่วนร่วมในโครงการพิเศษนี้ทุกท่านที่ให้การสนับสนุนในด้านต่างๆและเป็นส่วนหนึ่งในความสำเร็จครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ

นางสาวอรพรรณ หิรัญจรัญชัย

นางสาวอรุณศิริ วุฒิวิมล

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	2
2.1 สบู่ดำ	2
2.2 การปลูกสบู่ดำในประเทศไทย	2
2.3 ประโยชน์ของสบู่ดำ	3
2.4 การสกัดน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ	3
2.5 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันสบู่ดำ	3
2.6 ไบโอดีเซล	4
2.7 การผลิตไบโอดีเซล	4
2.8 การผลิตไบโอดีเซลจากสบู่ดำ	5
2.9 เอนไซม์ไลเปส	6
2.9.1 คุณสมบัติด้านเคมีและกายภาพของเอนไซม์ไลเปส	7
2.9.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	7
2.10 การคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์	9
2.10.1 การกลายพันธุ์	10
2.10.2 คอนจูเกชัน	11
2.11 สิ่งก่อกำเนิดการกลายพันธุ์	11
2.11.1 สารชักนำการกลายพันธุ์	11
2.11.2 รังสีก่อกำเนิดการกลายพันธุ์	14

เอกสารนี้เป็น 2.12 จุลินทรีย์ในดิน ทรัพยากรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.12.1 การสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรฟังไจ	15
2.13 ผลการศึกษา	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	18
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำโครงการงาน	18
3.2 การเตรียมอาหารที่ใช้คัดเลือกและเลี้ยงเชื้อรา	19
3.3 การชักนำและคัดเลือกเชื้อรา	19
3.3.1 การชักนำโดยฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 0, 8, 10 และ 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	19
3.3.2 การชักนำโดยใช้สารเคมีเอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซคลอนิติน (NTG) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 8, 10 และ 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	20
3.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม	21
3.5 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	21
3.6 วิธีวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ	22
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	23
4.1 ผลการชักนำและการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยวิธีฉายรังสีอัลตราไวโอเลต	23
4.1.1 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยวิธีฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (254 นาโนเมตร) เป็นเวลา 8, 10 และ 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	23
4.1.2 ผลของการเกิดวงใสของเชื้อราสายพันธุ์กลายในอาหาร Tributyrin agar และอาหาร CD-medium	24
4.1.3 ผลของการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย ที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (254 นาโนเมตร) เวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	25
4.2 ผลการชักนำและการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยใช้สารเคมี (NTG)	27
4.2.1 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยใช้สารเคมี(NTG) ความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.8 มก./มล. เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 4.2.2 ผลของการเกิดวงใสของเชื้อราสายพันธุ์กลายในอาหาร Tributyrin agar และอาหาร CD-medium ที่ใช้ประโยชน์ 28 การค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งที่ Tributyrin agar และอาหาร CD-medium ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.3 ผลของการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อรา สายพันธุ์กลาย ที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี (NTG) ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	30
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	33
ข้อเสนอแนะ	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	37
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร	38
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายสำหรับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	39
ภาคผนวก ค การหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	40



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ข้อดีของไบโอดีเซลทางด้านสิ่งแวดล้อม	5
4.1 ผลของการเกิดวงใส ของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ทำการชักนำ โดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต	24
4.2 ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยวิธี ฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (254 นาโนเมตร) เวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	26
4.3 ผลของการเกิดวงใส ของเชื้อราสายพันธุ์กลาย โดยการใช้สาร NTG	29
4.4 ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ทำการชักนำ โดยการใช้สาร NTG ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	31
<b>ตารางภาคผนวกที่</b>	
1. ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐาน <i>p</i> -nitrophenol	40
2. ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (254 นาโนเมตร) เป็นเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	41
3. ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยสารเคมี (NTG) ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	44
4. ค่าการคำนวณทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS ของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อราที่คัดเลือกด้วยสาร NTG	47
5. ค่าการคำนวณทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS ของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อราที่คัดเลือกด้วยด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต	50

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ปฏิกริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล โดยมีด่างเป็นตัวเร่ง	5
2.2 ปฏิกริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง	5
2.3 สูตรโครงสร้างของสารเคมีเอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-คลอนิดีน (NTG)	12
2.4 การเติมหมู่อัลคิลให้กับเบสควานีนซึ่งเกิดจากการชักนำด้วยสารเคมี NTG	12
2.5 สาร 5'-bromouracil ที่มีลักษณะคล้ายเบสไทมีน	13
2.6 การสูญเสียหมู่อะมิโนของอะดีนีน	13
2.7 การเกิดไทมีนไคเมอร์ที่เกิดจากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต	14
2.8 ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา	15
4.1 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อราสายพันธุ์กลายจากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต	23
4.2 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อราสายพันธุ์กลายจากการใช้สาร NTG	28
<b>รูปภาคผนวกที่</b>	
1 กราฟสารละลายมาตรฐาน <i>p</i> -nitrophenol	40

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ

ในปัจจุบันน้ำมันเชื้อเพลิงเป็นปัจจัยที่สำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์ เป็นผลจากการขยายตัวของเศรษฐกิจโลก ซึ่งทำให้น้ำมันมีราคาพุ่งสูงขึ้นและมีแนวโน้มว่าจะหมดไป จึงได้มีการหันมาสนใจพลังงานเชื้อเพลิงในรูปแบบอื่นๆเพื่อมาทดแทน เช่น การผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงจากสบู่ดำ ซึ่งเป็นพืชที่ได้รับความสนใจอย่างมากในขณะนี้ แต่เนื่องจากน้ำมันที่ได้จากสบู่ดำมีลักษณะสายโซ่ยาว จะทำให้มีความหนืดสูง ดังนั้นจึงต้องนำมาผ่านกระบวนการย่อยโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เพื่อเปลี่ยนน้ำมันจากสบู่ดำให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งความหนืดของน้ำมันจากสบู่ดำจะลดลงสามารถใช้เป็นไบโอดีเซลได้ ทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันจากสบู่ดำโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อรา ซึ่งเอนไซม์นี้ถูกผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (เชื้อรา ยีสต์ และ แบคทีเรีย) ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติมีปริมาณค่อนข้างน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ไลเปส และสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันจากสบู่ดำได้

### 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. ทำการชักนำและคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารที่มีสบู่ดำและ/หรือ Tributyltin agar เป็นแหล่งคาร์บอน
2. ทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกโดยใช้น้ำมันจากสบู่ดำ เป็นแหล่งคาร์บอน

### 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. ทำการเหนี่ยวนำให้เชื้อราที่คัดเลือกไว้เกิดการกลายพันธุ์โดยการใช้วิธีการฉายแสงอุลตราไวโอเล็ต (UV) และการใช้สารเคมี
2. คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่คงตัว และมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้ได้เชื้อราสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเพื่อเป็นแนวทางในการทดลองต่อไปการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### บทตรวจเอกสาร

#### 2.1 สบู่ดำ

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง น้ำมันที่ได้จากเมล็ดสบู่ดำ สามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลที่ เกษตรกรใช้อยู่ได้ โดยไม่ต้องใช้น้ำมันชนิดอื่นผสมอีก ใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค ใช้ปลูกเป็นแนว รั้ว เพื่อป้องกันสัตว์เลื้อยเข้าทำลายผลผลิต เนื่องจากมีสารพิษ Hydrocyanic มีกลิ่นเหม็นเขียว สบู่ดำ จึงเป็นพืชที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในสถานะที่ราคาน้ำมันดีเซลมีราคาสูงอย่างในปัจจุบัน สบู่ดำ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha Curcas* Linn. อยู่ในวงศ์ไม้ยางพารา ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของ ทวีปอเมริกาใต้ ชาวโปรตุเกสนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยในช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยา เพื่อนำมาบีบน้ำมันสำหรับทำสบู่ ปัจจุบันสบู่ดำมีปลูกอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น ภาคเหนือ เรียกว่ามะหุ้งฮั่ว ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียกว่ามะเขารหรือสีหลอด ภาคใต้ เรียกว่ามาเคาะ

การปลูกสบู่ดำผลผลิตที่สำคัญคือเมล็ด ซึ่งมีน้ำมันที่สามารถนำไปแปรรูปเป็นเอทิล(ethyl) หรือเมทิลเอสเตอร์(methyl ester) เพื่อผสมกับน้ำมันดีเซลเป็นไบโอดีเซล หรือใช้ทดแทนน้ำมัน ดีเซลกับเครื่องยนต์ดีเซลได้ทุกประเภท และสามารถใช้น้ำมันที่สกัดจากเมล็ด โดยตรงกับเครื่องยนต์ ทางด้านการเกษตรได้ดี (ระพีพันธ์ และคณะ, 2525)

#### 2.2 การปลูกสบู่ดำในประเทศไทย

การปลูกสบู่ดำในประเทศไทยนั้น ในอดีตส่วนใหญ่ปลูกตามหัวไร่ปลายนา หรือปลูกไว้ กันสัตว์อื่นเข้ามาทำลายเรียกสวนไร่นา แต่ในปัจจุบันมีปัญหาทางด้านวิกฤตการณ์ราคาน้ำมัน หลายหน่วยงานหาพลังงานอื่นๆ เพื่อมาทดแทนน้ำมัน สบู่ดำซึ่งเป็นพืชที่ปลูกง่ายและสามารถสกัด น้ำมันออกมาใช้กับเครื่องยนต์รอบตัวได้โดยตรง จึงได้รับความสนใจปลูกกันมากขึ้น รายงาน ผลผลิตของน้ำหนักรเมล็ดสบู่ดำพันธุ์ต่างๆ เช่น พันธุ์สตูลได้น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 102 กิโลกรัมต่อ ไร่ พันธุ์มุกดาหาร ในปีที่ 2 ให้ผลผลิตประมาณ 139 กิโลกรัมต่อไร่ และปีที่ 3 ให้ผลผลิตประมาณ 303 กิโลกรัมต่อไร่ ส่วนพันธุ์กาฬสินธุ์ ให้ผลผลิตเฉลี่ย 3 ปีแรก ประมาณ 116 กิโลกรัมต่อไร่ การ เพาะปลูกไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก เนื่องจากสบู่ดำเป็นพืชที่ขึ้นง่าย เมื่อดินมีความอุดมสมบูรณ์ และ สภาพแวดล้อมเหมาะสม แต่ถ้าจะให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นก็จำเป็นต้องมีการจัดการที่ดี เช่น มีการตัด แต่งกิ่ง ใส่ปุ๋ย และให้น้ำอย่างพอเพียง (ชำนาญ, 2547)

สำหรับประเทศไทย มีต้นทุนการผลิตเมล็ดสบู่ดำรวม 2,500 บาทต่อไร่ โดยได้ผลผลิต 800 กิโลกรัมต่อไร่ ดังนั้น ต้นทุนการผลิตเมล็ดสบู่ดำประมาณกิโลกรัมละ 3.1 บาท (สุรพงษ์, 2548) ส่วนคารอร์ (2548) รายงานต้นทุนการผลิตสบู่ดำในปีที่ 10 และ 25 เท่ากับ 2,640 บาทต่อไร่ต่อปี รายได้ต่อไร่ต่อปีเท่ากับ 3,594 และ 4,183 บาท ในปีที่ 10 และ 25 ตามลำดับ และวรรณวิภา (2546) รายงานว่า ต้นทุนการผลิตเมล็ดสบู่ดำต่อไร่ต่อปี ในปีที่ 1 และ 2 เท่ากับ 3,232 และ 1,018 บาท ตามลำดับ

### 2.3 ประโยชน์ของสบู่ดำ

1. ยางจากก้านใบ ใช้รักษาโรคปากนกกระจอก ห้ามเลือด แก้ปวดฟัน แก้กลิ่นเป็นฝ้าขาว โดยผสมกับน้ำมันมะพร้าว
2. ลำต้น ตัดเป็นท่อนค้ำน้ำให้เด็กกินแก้เซาะตาช โมข ตัดเป็นท่อนแช่น้ำอาบแก้โรคพุพอง ใช้เป็นแนวรั้วป้องกันสัตว์เลื้อย เช่น โค กระบือ ม้า แพะ เข้าทำลายผลผลิต
3. เมล็ด หีบเป็นน้ำมัน ใช้ทดแทนน้ำมันดีเซล ใช้บำรุงรากผม ใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้กากที่เหลือจากการหีบน้ำมัน ซึ่งมีธาตุอาหารหลัก มากกว่าปุ๋ยหมักและมูลสัตว์หลายชนิด ยกเว้น มูลไก่ที่มีฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม มากกว่า และยังมีสารพิษ Curcin มีฤทธิ์เหมือนสลอด เมื่อกินเข้าไปแล้วจะทำให้ท้องเดิน

### 2.4 การสกัดน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ

วิธีการสกัดแยกน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำที่นิยมทำกันมากคือ ใช้วิธีการบีบอัด (pressing) จะได้น้ำมันประมาณร้อยละ 25-30 มีน้ำมันตกค้างในกากร้อยละ 10-15 อาจใช้เครื่องอัดแบบไฮดรอลิก (hydraulic press) หรือเครื่องอัดแบบสกรู (screw press) การแยกด้วยวิธีนี้จะได้น้ำมันปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับแรงอัดที่ใช้ ถ้าใช้แรงอัดสูงจะได้น้ำมันมาก แต่น้ำมันที่ได้จะมีคุณภาพลดลงเนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นจะไปเร่งปฏิกิริยาเคมีบางอย่าง ทำให้น้ำมันเสื่อมสภาพได้เร็วขึ้น ดังนั้นการบีบอัดอาจทำได้ 2 แบบ คือ การบีบอัดโดยใช้แรงดันสูง เพื่อให้ได้น้ำมันมาก หรือการบีบอัดแบบ pre-press โดยบีบด้วยแรงดันต่ำก่อน แล้วจึงสกัดน้ำมันที่เหลือในกากต่อโดยใช้สารซึ่งเป็นตัวทำละลาย

### 2.5 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันสบู่ดำ

น้ำมันสบู่ดำจะมีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวปนเหลือง ใสและยังคงใสที่อุณหภูมิต่ำ และมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ และองค์ประกอบกรดไขมัน (ระพีพันธ์ และคณะ, 2525) ดังนี้

ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) ร้อยละของกรดโอเลอิก 4.80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าสaponification (Saponification value)	197.13
ค่าไอโอดีน (Iodine value, Wijs)	97.08
ดัชนีหักเห (Refractive index) ที่ 25 ° ซ	1.4670
ความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity) ที่ 25 ° ซ	0.9136
ความหนืด (Viscosity) ที่ 25 ° ซ (Gardner) (cp)	45.68
องค์ประกอบของกรดไขมัน	
Palmitic acid (C 16:0)	16.17
Stearic acid (C 18:0)	5.11
Total saturated fatty acid	21.28
Oleic acid (C 18:1)	44.88
Linoleic acid (C 18:2)	33.83
Total unsaturated fatty acid	78.71

## 2.6 ไบโอดีเซล

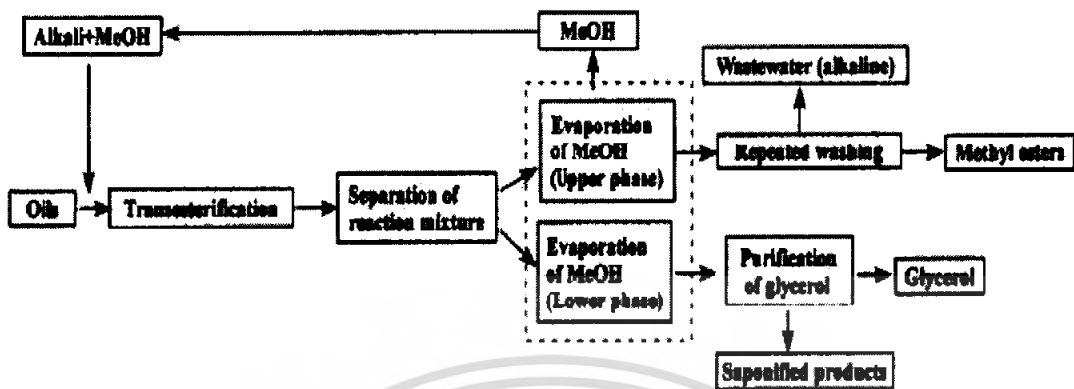
ไบโอดีเซล (Biodiesel) คือ น้ำมันที่ผลิตได้จากการนำน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ หรือน้ำมันที่ใช้ปรุงอาหาร แล้วมาแปรสภาพ โดยผ่านขบวนการเคมีกับแอลกอฮอล์ ได้เป็นน้ำมันชนิดใหม่อยู่ในรูปของ เมทิลเอสเทอร์ หรือเอทิลเอสเทอร์ หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า “ไบโอดีเซล” สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงแทนปิโตรเลียมดีเซลในสัดส่วนผสมต่างๆสำหรับเครื่องยนต์ได้ โดยไม่เกิดผลกระทบต่อระบบต่างๆ กับเครื่องยนต์ดีเซล แม้จะใช้เป็นระยะสั้นหรือระยะยาว โดยความแตกต่างขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดไขมันที่มีขนาดเล็ก-ใหญ่ และจำนวนพันธะคู่ที่ไม่เท่ากัน ซึ่งจะมีผลต่อค่าซีเทน (ค่าซีเทน เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพการจุดระเบิด คล้ายกับค่าอ็อกเทนในน้ำมันเบนซิน) การใช้ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงจะไม่เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ ทำให้เกิดมลพิษทางอากาศน้อยกว่าน้ำมันดีเซล

## 2.7 การผลิตไบโอดีเซล

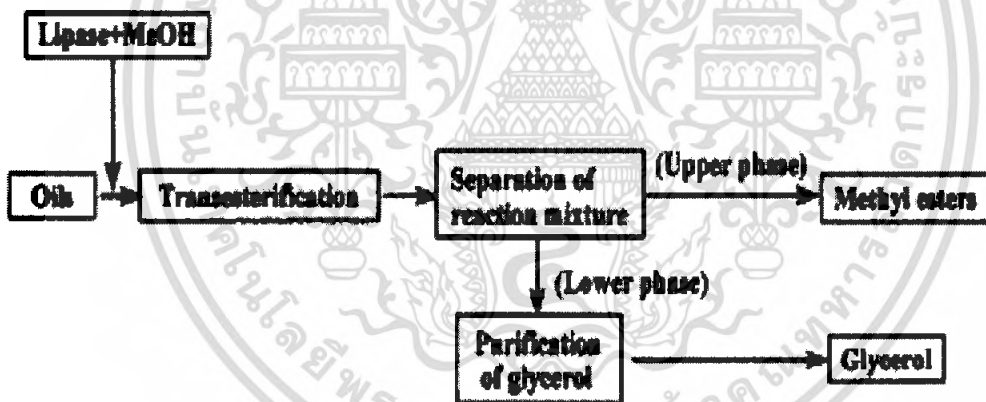
องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืชและไขมันสัตว์เป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งเป็นสารประกอบทางเคมีที่ประกอบด้วยกรดไขมัน (fatty acid) และกรีเซอริน (glycerin) เมื่อไตรกลีเซอไรด์นี้รวมตัวกับสารเร่งปฏิกิริยาชนิดที่เป็นด่าง (base catalyst) เช่น โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide; KOH) โดยมีปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกินพอ (excess alcohol) จะทำให้เกิดการรวมพันธะของกรดไขมันและแอลกอฮอล์เกิดเป็นไบโอดีเซล โดยได้กรีเซอรอล (glycerol) ซึ่งเป็นสารเคมีที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางเป็นผลพลอยได้ (by

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

product) ปฏิกิริยานี้เรียกว่า ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (trans-esterification) ดังรูปที่ 2.1 และ 2.2 โดยที่ R คือ คาร์บอน 16-18 อะตอม ซึ่งมีพันธะคู่ระหว่าง C = C ตั้งแต่ 1-3 คู่



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยมีด่างเป็นตัวเร่ง ในการผลิตไบโอดีเซล ที่มา Fukada และคณะ (2001)



รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง ในการผลิตไบโอดีเซล ที่มา Fukada และคณะ (2001)

## 2.8 การผลิตไบโอดีเซลจากสบูดำ

น้ำมันสบูดำเมื่อนำมาเข้ากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ( tranesterification ) จะได้ เมธิลเอสเทอร์ เอธิลเอสเทอร์ หรือบิวทิลเอสเทอร์(ขึ้นอยู่กับชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ไบโอดีเซล ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงแทนน้ำมันดีเซล โดยไม่เกิดผลกระทบต่อเครื่องยนต์ ไม่เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมสามารถย่อยสลายได้โดย

กระบวนการทางชีวภาพและเกิดมลพิษทางอากาศน้อยกว่าน้ำมันดีเซล ดังตารางที่ 2.1 ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ข้อดีของไบโอดีเซลทางด้านสิ่งแวดล้อมเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม

ชนิดของไบโอดีเซล	B 100	B 20
1. ไฮโดรคาร์บอนที่เผาไหม้ไม่หมด (ลดลง)	-93	-30
2. คาร์บอนมอนอกไซด์ (ลดลง)	-50	-20
3. ฝุ่นผง (ลดลง)	-30	-22
4. NO <sub>x</sub> (เพิ่มขึ้น)	+13	+2
5. กำมะถัน (ลดลง)	-100	-20
6. ไฮโดรคาร์บอน พอลิคลิลิก อโรมาติก (สารระเหย)	-80	-13
7. nPAH2-ไนโตรฟลูเรน, 1-ไนโตรพรีน (ลดลง)	-90	-50
8. แนวโน้มการสกัดโอโซน(หมอกควัน-smog)	-50	-10
9. คาร์บอนไดออกไซด์ออกไซด์(ลดลง)	-80	-
10. ซัลเฟอร์ไดออกไซด์(ลดลง)	-100	-

ที่มา : นิรนาม (2547)

น้ำมันสบู่ดำบริสุทธิ์ สามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลรอบต่ำได้ แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันจากสบู่ดำยังมีมาตรฐานบางอย่างที่ต่างจากมาตรฐานน้ำมันดีเซลหมุนเร็วค่อนข้างมาก ได้แก่ ค่าความหนืด ซึ่งถ้าใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นเชื้อเพลิง อาจจะทำให้การฉีดน้ำมันไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้เครื่องยนต์มีประสิทธิภาพต่ำและอาจเกิดความเสียหายต่อเครื่องยนต์ได้ ดังนั้นโดยหลักการแล้วถ้าจะใช้น้ำมันสบู่ดำต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ให้มีการอุ่นน้ำมันให้มีความหนืดลดลง และมีการดัดแปลงอื่นๆ เช่น เปลี่ยนกรองน้ำมันให้มีความละเอียดมากขึ้น

## 2.9 เอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์ในไขมันหรือน้ำมันในสถานะที่มีน้ำ มีชื่อสามัญว่า ไลเปส และมีชื่อตามระบบว่า กลีเซอรอล เอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) และมีชื่อตามรหัสคือ E.C. 3.1.1.3 โดยทั่วไปไลเปสพบในคนและสัตว์ ซึ่งเกี่ยวกับกระบวนการย่อยสลายสารอาหาร ในปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์และสามารถผลิตได้ปริมาณมาก เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ และยังสามารเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยได้โดยวิธีการปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ ทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้าได้หลายชนิด จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสถานะในการผลิต ยีสต์ที่นิยมนำมาผลิตคือ *Candida cylindracea* หรือ *Candida rugosa* สำหรับราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสอยู่ในกลุ่ม *Rhizomucor* และแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสทางการค้า ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* และ *Staphylococcus*

### 2.9.1 คุณสมบัติด้านเคมีและกายภาพของเอนไซม์ไลเปส

โดยทั่วไปเอนไซม์ไลเปสละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Barnwal, 2004) ส่วนใหญ่แล้วไลเปสที่ได้จากสัตว์มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงที่เป็นค่า (พีเอช 8-9) แต่ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น ปริมาณเกลือ และชนิดของอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เหมาะสมให้อยู่ในช่วงที่เป็นกรดได้ (Kurl, 2002) ในส่วนไลเปสที่ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชเป็นกรด พบมากในไลโซโซมในส่วนของเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.9-8.5 และจะมีความคงตัวสูงในพีเอชที่เป็นกลาง ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 30-40 องศาเซลเซียส และไลเปสจาก จุลินทรีย์ยังมีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าไลเปสที่ได้จากพืชและสัตว์ ซึ่งความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์ไลเปสจะเพิ่มสูงขึ้น ถ้าหากรวมอยู่กับสารตั้งต้น เป็นไปได้ว่าสารตั้งต้นทำหน้าที่ช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ได้ (Katsivela, 1995)

### 2.9.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีพบได้ทั้งในแบคทีเรีย รา และในสัตว์ ซึ่งมีการนำมาใช้ประโยชน์มากมาย วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยทั่วไป คือ การไทเทรตกรดไขมันด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) นอกจากนี้ยังมีวิธีวิเคราะห์อื่นๆอีก ได้แก่

#### 2.9.2.1 การวิเคราะห์ด้วยการดูดกลืนแสง

เป็นการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ *p*-nitrophenol ester และ aliphatic cycle ที่มีสายโซ่ยาว เช่น laurate palmitate หรือ oleate เริ่มจากการเตรียมสารละลาย *p*-nitrophenol ester ใน  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  100-250 มิลลิโมลาร์ โดยนำสารละลายที่ได้ 20 ไมโครลิตร มาเจือจางในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl (พีเอช 8.0) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ NaCl ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ และ Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร มาบ่มร่วมกับสารละลายสับสเตรต 0.2 มิลลิลิตร ในไมโครเพลต 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม *p*-nitrophenol และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เบลนค์ที่ปราศจากเอนไซม์ (Gilham และ Lehner, 2005)

การเตรียมสารละลายสำหรับการวัดการดูดกลืนแสง ประกอบด้วย สารละลายตั้งต้น

(สารละลาย A : สารละลาย B อัตราส่วน 1:9 ปริมาตร:ปริมาตร) 2.4 มิลลิลิตร และสารละลาย

เอกล้วนเป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนสิทธิ์ในการใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากผู้จัดทำเอกสารฉบับนี้ การนำข้อความหรือรูปภาพไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต ถือว่าผิดกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ โดยสารละลาย A คือ 30 มิลลิกรัม *p*-nitrophenolpalmitate; *p*-npp ในไอโซโพรพานอล 10 มิลลิลิตร และสารละลาย B คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  หรือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล พีเอช 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการบ่มสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของกิจกรรมเอนไซม์ คือ 1 ไมโครโมลของ *p*-nitrophenol อิศระที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ 1 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ต่อนาที (Katsivela และคณะ,1995)

#### 2.9.2.2 การวิเคราะห์ด้วยการไทเทรต

สารละลายที่ใช้ในการไทเทรตประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ 2 มิลลิลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  หรือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  พีเอชเท่ากับ 6.0) ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล 2 มิลลิลิตร และน้ำมัน 1 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทำการเขย่าที่ 240 รอบต่อนาที อย่างต่อเนื่องตลอดเวลา 30 นาทีของการบ่ม เมื่อครบ 30 นาทีหยุดการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติม 20 มิลลิลิตร ของเอทานอล:อะซิโตน อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นโดยการไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล จนกระทั่งมีค่าพีเอช 10.4 (Gilham และ Lehner,2005)

#### 2.9.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่นิยมใช้ คือ วิธีโครมาโตกราฟี ซึ่งเป็นวิธีวัดกรดไขมันที่เกิดขึ้นโดยตรงและสามารถทำได้หลายแบบ เช่น thin-layer chromatography เป็นการหาปริมาณกรดไขมันจากไตรกลีเซอไรด์ด้วยหลักการวัดความหนาแน่น การฉายรังสีและการเรืองแสง gas chromatography เป็นวิธีที่มีความไวสูงสามารถแยกชนิดของโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบ เช่น tridecanoylglycerols เหมาะสำหรับการทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ และ High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นการหาปริมาณของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ *p*-nitrophenolpalmitate เป็นสับสเตรต สามารถแยกสารผสมระหว่างกรดไขมันอิสระและไตรกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆ ได้ (Gilham และคณะ,2005)

#### 2.9.2.4 การวิเคราะห์การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์

เป็นการวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยการทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารชนิดต่างๆ เช่น 1,2-diol-eoyl-3-(1-pyren-1-yl) decanoyl-rac-glycerol และ 4 methylumbelli ferone เป็นต้น แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ อาจทำลายคุณสมบัติของตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (Gilham และคณะ,2005)

#### 2.9.2.5 การวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์

ทำการวิเคราะห์โดยวิธี Thin-layer chromatography โดยใช้แผ่นซิลิกาเจล 60 F<sub>254</sub> (type no. 5554; Merck, Darmstadt, Germany) ขนาด 0.02 มิลลิลิตร  $\text{CHCl}_3$  : อะซิโตน อัตราส่วน

94 : 4 (ปริมาตร:ปริมาตร) เป็นระบบ และแอลฟา-เนฟทอล : กรดซัลฟิวริก เป็นสารตรวจสอบ (Katsivela และคณะ,1995)

#### 2.9.2.6 การวิเคราะห์โครงสร้างทางโมเลกุล

ทำได้โดย  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance และการวิเคราะห์ร่วมกันของ gas chromatography และ mass spectrometry

#### 2.9.2.7 การหาน้ำหนักแห้ง

การหาน้ำหนักแห้งทำได้โดย นำเซลล์เปียกไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้เย็นลงในเดซิเคเตอร์ จากนั้นจึงทำการชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักแห้ง การหาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{\max}$ ) หาได้จาก

$$\mu_{\max} = \frac{\ln DW_1 - \ln DW_0}{t_1 - t_0}$$

DW คือ น้ำหนักแห้ง

$t_0$  คือ เวลาเริ่มต้นในการบ่ม (เวลาที่ 0)

$t_1$  คือ เวลาที่ใช้ในการบ่ม

## 2.10 การคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์

ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆทางอุตสาหกรรม กระทำโดยการคัดเลือก (screen) จากจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้ว หรือจากการแยก (isolate) เชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ซึ่งคุณสมบัติต่างๆของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการคัดเลือคนั้น ควรมีลักษณะต่างๆได้แก่

1. ต้องมีคุณสมบัติที่คือให้ผลผลิตที่คงที่สม่ำเสมอ ไม่เกิดการกลายเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตน้อย
2. ด้านทานการเกิดโรคได้
3. ไม่ทำให้เกิดฟองในระหว่างกระบวนการหมัก
4. ด้านทานสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี
5. ต้องมีรูปร่างเหมาะสม
6. ควรใช้ออกซิเจนน้อยในการผลิตสารที่ต้องการ เพื่อลดต้นทุนการผลิต
7. ต้องผลิตเฉพาะสารที่ต้องการเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้แล้วอาจนำมาปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ โดยคุณสมบัติต่างๆของจุลินทรีย์จะขึ้นกับยีน ซึ่งในทางธรรมชาติการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอของจุลินทรีย์สามารถเกิดขึ้นได้ 2 ทาง คือ

### 2.10.1 การกลายพันธุ์ (mutation)

หมายถึง การเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม หรือการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสภายในโมเลกุลของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต ที่ก่อให้เกิดลักษณะใหม่ ซึ่งต่างไปจากลักษณะเดิมที่มีอยู่ และลักษณะดังกล่าวยังสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ โดยส่วนใหญ่การเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นใน 3 ลักษณะ คือ การแทนที่ (substitution) การเพิ่มขึ้น (addition หรือ insertion) และการหลุดหายไป (deletion) ของลำดับบนสายดีเอ็นเอ (Alcemo, 1997) ซึ่งแบ่งได้ 2 แบบ คือ

#### 2.10.1.1 การกลายพันธุ์โดยธรรมชาติ (spontaneous mutation)

เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้เอง การกลายพันธุ์แบบนี้เกิดจากการจับคู่เบสผิดในระหว่าง DNA replication แล้วไม่มีการแก้ไขซ่อมแซมความผิดพลาดนี้ให้ถูกต้อง ดีเอ็นเอสายที่สร้างขึ้นแบบผิดๆจะทำหน้าที่เป็นต้นแบบของดีเอ็นเอรุ่นถัดไป ทำให้เซลล์รุ่นต่อไปได้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่แตกต่างไปจากเดิม การกลายพันธุ์แบบนี้มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมากในธรรมชาติ

#### 2.10.1.2 การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation)

เป็นการกลายที่ใช้สิ่งก่อการกลาย (mutagen) ในการชักนำให้เกิดการกลายขึ้น สิ่งก่อการกลายเหล่านี้ได้แก่ เอกซ์เรย์ แกมมาเรย์ แสงอัลตราไวโอเล็ต สารเคมี เช่น กรดไนตริก (NA) ไฮดรอกซีลามีน ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) ไคเมทิลซัลโฟเนต ไดเอทิลซัลโฟเนต เอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-กัวนิดีน (N-methyl-N-nitro-N-nitroso-guanidine, MNSG) สิ่งก่อการกลายพันธุ์เหล่านี้มักใช้กับเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ สารเคมีเหล่านี้มักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคู่เบสที่จุดใดจุดหนึ่งในโมเลกุลดีเอ็นเอในรูปแบบต่างๆกัน แล้วแต่สมบัติทางเคมีของสารชนิดนั้นๆ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการใส่สารเคมีหรือรังสีจะทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติต่างๆกัน ซึ่งส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติดีกว่าเซลล์เดิม โดยจะมีประมาณร้อยละ 1 ที่มีคุณสมบัติดีกว่าเชื้อสายเดิม

ถึงแม้ว่าการกลายพันธุ์จะสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ เนื่องจากความผิดพลาดในระหว่างการแบ่งเซลล์ และอาจเกิดจากปัจจัยบางอย่างที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อม แต่การกลายพันธุ์ในลักษณะนี้จะเกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำมาก ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียมีอัตราการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติเพียงหนึ่งในล้านเซลล์ถึงหนึ่งในหมื่นล้านเซลล์ ( $10^{-6}$ - $10^{-10}$ ) แต่ถ้ามีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ จะทำให้มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในอัตราที่เพิ่มขึ้นเป็นพันเท่า และยังทำให้มีโอกาสสูงขึ้นที่จะได้เชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลง (สมใจ, 2544) โดยการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำนั้น เป็นการกลายพันธุ์ที่มนุษย์ใช้สารเคมีหรือรังสี ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและเกิดลักษณะแปลกใหม่ไปจากเดิม สารเคมีหรือรังสีที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์นี้ เรียกว่า สิ่งก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) (ทิพย์มณี และคณะ, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.10.2 คอนจูเกชัน (conjugation)

เป็นการถ่ายทอดสารพันธุกรรมระหว่างจุลินทรีย์ที่เหมือนกันในขณะที่ผสมพันธุ์กัน สารพันธุกรรมที่ถ่ายโอนอาจเป็นส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอจากโครโมโซมหรือพลาสมิดก็ได้

## 2.11 สิ่งก่อการกลายพันธุ์ (mutagen)

สิ่งก่อการกลายพันธุ์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. physical mutagen ได้แก่ ความร้อน อุณหภูมิ รังสีต่างๆ โดย physical mutagen เหล่านี้จะ มีผลทำให้เกิด frameshift mutation

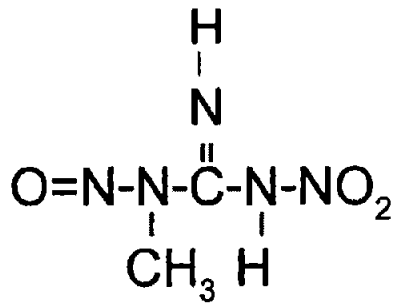
2. chemical mutagen เป็นสารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งมีมากมายหลายชนิด แต่ละชนิดมีผลต่อสารพันธุกรรมต่างกันไป

### 2.11.1 สารชักนำการกลายพันธุ์

สารเคมีที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เรียกว่า สารชักนำ (mutagens) สารเคมีเหล่านี้ แบ่งย่อยออกตามรูปร่างลักษณะและกลไกการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดังนี้

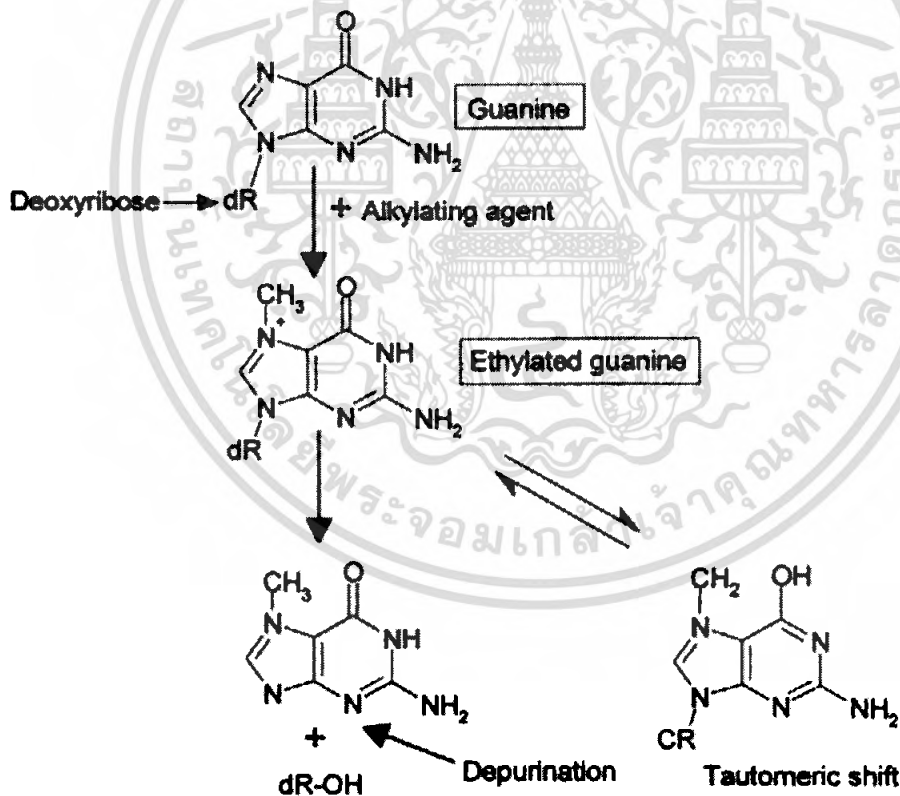
1. Alkylating agent เป็นสารที่สามารถเติมหมู่อัลคิลเข้าที่หมู่อะมิโนหรือดีโของเบสได้และเป็น chemical mutagen กลุ่มที่ใหญ่และมีประสิทธิภาพสูง เช่น เอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-คลอนิดีน (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine), เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate), อะครีดีนออร์เรนจ์ (acridine orange, AO), Mustard gas เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะเข้าทำปฏิกิริยา Alkylation ที่ N-7 ของ guanidine เป็นส่วนใหญ่ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ Transition, Transversion และ Frameshift mutation ได้ (Carlton, 1981)

N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) เป็นสารประกอบทางเคมี มีลักษณะเป็นผลึกเล็กๆ สีเหลืองอ่อนออกชมพู และเมื่อถูกแสงจะกลายเป็นสีเขียวหรือส้ม NTG จะละลายได้เพียงเล็กน้อยในน้ำ และสารละลายที่เป็นตัวทำละลายพวก polar organic แต่อย่างไรก็ตาม มันจะสลายตัวได้ในตัวทำละลาย สูตรโมเลกุลของ NTG คือ  $C_2H_5N_5O_3$  มีน้ำหนักโมเลกุล 147.1 มีสูตรโครงสร้าง ดังรูปที่ 2.3 ละลายน้ำได้สูงสุด 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จุดหลอมเหลว 116-118 องศาเซลเซียส สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 6-9



รูปที่ 2.3 สูตร โครงสร้างของ N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)

ที่มา : Artsimovitch, 2004



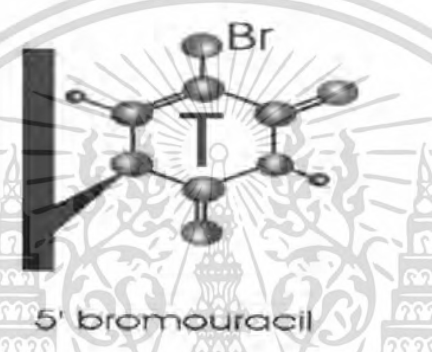
รูปที่ 2.4 การเติมหมู่อัลคิลให้กับเบสกวานีนซึ่งเกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายด้วยสารเคมี NTG

ที่มา : Sikyta, 1983

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

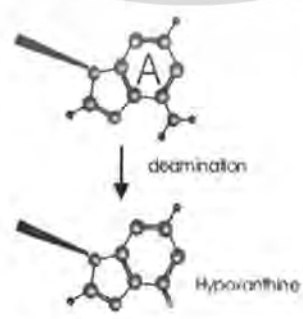
2. Interclalating agent สีย้อมบางชนิดเช่นสีกลุ่มอะครีดินมีขนาดโมเลกุลเหมาะสมสามารถแทรกตัวเข้าไปในระหว่างคู่เบส (interclalate) ในดีเอ็นเอแล้วทำให้รูปร่างของดีเอ็นเอผิดปกติกเกิด frame shift mutation ได้

3. Base analogues หมายถึงสารที่มีรูปร่างลักษณะคล้ายเบส จนสามารถหลอกเอนไซม์ DNA polymerase ให้เอนไซม์นำเข้าไปแทนที่ deoxyribonucleotide ปกติในระหว่างการจำลองตัวเองของ ดีเอ็นเอได้ เมื่อ base analogue เข้าไปเป็นส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอแล้ว ในกระบวนการ DNA replication ครั้งต่อไป สายดีเอ็นเอที่มี base analogue อยู่จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์มากขึ้น เนื่องจาก base analoge ไม่ใช่เบสปกติ จึงจับคู่เบสผิดไปจากเดิม ตัวอย่างของ base analogue คือ 5' - bromouracil ซึ่งมีรูปร่างลักษณะคล้าย ไทมีน ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงสาร 5' - bromouracil ที่มีลักษณะคล้ายเบส ไทมีน  
ที่มา : <http://www.thirawat.com/ge/mutation.html>

4. สารที่ทำให้เกิด deamination ของเบส สารบางชนิดได้แก่กรดไนตริก เมื่อทำปฏิกิริยากับเบสแล้วทำให้เบสสูญเสียหมู่อะมิโนไป (deamination) เช่น อะดีนีน ซึ่งจับคู่เบสกับไทมีนเมื่อเกิดการสูญเสียหมู่อะมิโนเป็นไฮโปแซนทีน จะจับคู่เบสกับไซโทซีนแทน ดังรูปที่ 2.6 จึงทำให้เกิดการแทนที่เบสแบบ ทรานซิชั่นได้



รูปที่ 2.6 แสดงการสูญเสียหมู่อะมิโนของอะดีนีน  
ที่มา <http://www.thirawat.com/ge/mutation.html>

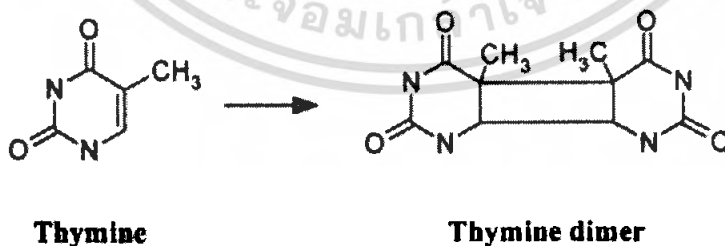
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.11.2 รังสีก่อการกลายพันธุ์

รังสีเป็นสิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) ที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ รังสีที่ทำให้เกิดไอออน (ionizing radiation) ได้แก่ รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา รังสีคอสมิก ฯลฯ และรังสีที่ไม่ทำให้เกิดไอออน (nonionizing radiation) ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเล็ต ถึงแม้ว่ารังสีในกลุ่มแรก จะเป็นรังสีที่มีอำนาจทะลุทะลวงสูงมากทำลายเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ดี แต่ในทางจุลชีววิทยามักไม่นิยมใช้ เพราะควบคุมได้ยากและลงทุนสูง จากการศึกษาที่ผ่านมาจะนิยมใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต ทำให้เกิดเป็นไทมีนไดเมอร์ในโมเลกุลของโพลีนิวคลีโอไทด์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบสุ่ม เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA replication) ทำให้ดีเอ็นเอมีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม จึงมีรหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป (ประคิษฐ์, 2541) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 และสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียก้นอย่างกว้างขวาง เนื่องจากง่ายและสะดวกในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี (Martinko และคณะ, 1997)

การกลายพันธุ์เนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตนั้นมาจากสาเหตุที่ดีเอ็นเอ (DNA) เปลี่ยนไปอยู่ในสถานะที่สามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้สูง จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโมเลกุลได้ (ชัยฤกษ์, 2534) แต่สิ่งมีชีวิตไม่สามารถหลีกเลี่ยงเพื่อไปอาศัยอยู่ในที่ปราศจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ เพื่อความอยู่รอดเซลล์จึงมีต้องกลไกกำจัดไทมีน ไดเมอร์ ดังนี้

1. Photoactivation repair คือการที่โปรตีนกลุ่ม photoreactivation enzymes ถูกกระตุ้นด้วยแสง 300-500 นาโนเมตร แล้วไปทำลายไทมีน ไดเมอร์โดยตรง
2. Excision repair คือการใช้โปรตีนจำเพาะชื่อ uvr มาจับใกล้ไทมีน ไดเมอร์ แล้วตัดออกก่อนที่จะซ่อมดีเอ็นเอด้วย DNA pol II



รูปที่ 2.7 การเกิดไทมีน ไดเมอร์ที่เกิดจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ที่มา : Davies, 1964

## 2.12 จุลินทรีย์ในดิน

สิ่งมีชีวิตที่อยู่ในอาณาจักรฟังไจ ประกอบด้วย รา เห็ด และยีสต์ ลักษณะของสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรฟังไจ

1. เซลล์เป็นแบบ Eucaryotic cell มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส
2. ไม่มีคลอโรพลาสต์ ดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เน่าเปื่อย
3. ผนังเซลล์เป็นสารไคตินกับเซลลูโลส
4. มีทั้งเซลล์เดี่ยวและเป็นเส้นใยเล็ก เรียกว่าไฮฟา (Hypha) รวมกลุ่ม เรียกว่าขุ้มรา

(mycelium) ลักษณะของเส้นใยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

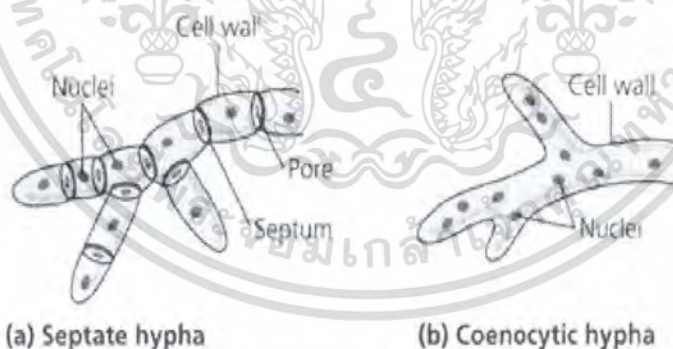
4.1 เส้นใยมีผนังกัน (Septate hypha)

4.2 เส้นใยที่ไม่มีผนังกัน (Nonseptate hypha or coenocytic hypha)

เส้นใยของฟังไจอาจเปลี่ยนแปลงแปลงรูปร่างเพื่อทำหน้าที่พิเศษ ได้แก่ Haustorium เป็นเส้นใยที่ยื่นเข้าเซลล์โฮสต์ เพื่อดูดอาหารจากโฮสต์ พบในราที่เป็นปรสิต และ Rhizoid ซึ่งมีลักษณะคล้ายรากยื่นจากไมซีเลียม เพื่อยึดติดกับผิวอาหารและดูดซับอาหาร เช่น ราขนมปัง

### 2.12.1 การสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรฟังไจ

1. Fragmentation เกิดจากเส้นใยหักเป็นส่วน ๆ แต่ละส่วนเรียก oidia สามารถเจริญเป็นเส้นใยใหม่ได้



รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อรา

ที่มา : <http://www.snr.ac.th/m4html/w4html/fungi.htm>

2. Budding การแตกหน่อ เป็นการที่เซลล์แบ่งออกเป็นหน่อขนาดเล็กและนิวเคลียสของเซลล์แม่แบ่งออกเป็นสองนิวเคลียส นิวเคลียสอันหนึ่งจะเคลื่อนย้ายไปเป็นนิวเคลียสของหน่อ เมื่อหน่อเจริญเต็มที่จะคอดเว้าขาดจากกัน หน่อที่หลุดออกมาจะเจริญต่อไปได้ เรียกหน่อ

ที่ได้ชื่อว่า Blastospore พบการสืบพันธุ์แบบนี้ในยีสต์ทั่วไป ไม่นานญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Fission การแบ่งตัวออกเป็น 2 ส่วน แต่ละเซลล์จะคอดเว้าตรงกลางและหลุดออกจากกันเป็น 2 เซลล์พบในยีสต์บางชนิดเท่านั้น

4. การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เป็นการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศที่พบมากที่สุด สปอร์แต่ละชนิดจะมีชื่อและวิธีสร้างที่แตกต่างกันไป เช่น conidiospore หรือ conidia เป็นสปอร์ที่ไม่มีสิ่งหุ้ม เกิดที่ปลายเส้นใยที่ทำหน้าที่ชูสปอร์ (conidiophore) ที่ปลายของเส้นใยจะมีเซลล์ที่เรียกว่า sterigma ทำหน้าที่สร้าง conidia เช่น *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. และ sporangiospore เป็นสปอร์ที่เกิดจากปลายเส้นใยพองออกเป็นกระเปาะ แล้วต่อมามีผนังกันเกิดขึ้น ภายใน กระเปาะจะมีผนังหนาและเจริญเป็นอับสปอร์ (sporangium) นิวเคลียสภายในอับสปอร์จะมีการแบ่งตัวหลาย ๆ ครั้งโดยมีส่วนของโปรโตพลาสซึมและผนังหนามาหุ้มกลายเป็นสปอร์ที่เรียกว่า sporangiospore จำนวนมากมาย

5. การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ มีการผสมกันระหว่างเซลล์สืบพันธุ์และมีการรวมตัวของนิวเคลียส ซึ่งรวมแล้วเป็น diploid (2n) และมีการแบ่งตัวในขั้นคอนสตุทท้ายแบบ meiosis เพื่อลดจำนวนโครโมโซมลงเป็น haploid (n) ตามเดิม

## 2.13 ผลการศึกษา

Gratzner และคณะ (1969) ศึกษาเชื้อรา *Neurospora crassa* ซึ่งผลิตเอนไซม์อะไมเลสและอินเวอร์เทสในอาหารที่มีมอลโตสหรือแป้ง แต่เจริญในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส การผลิตเอนไซม์ดังกล่าวจะลดลง จึงทำการกลายพันธุ์เชื้อรา *Neurospora crassa* ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต และคัดเลือกโดยใช้อาหารชนิด Vogel's minimal medium ที่เติมน้ำตาลซูโครส ทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างวงใสบนอาหาร พบว่าสายพันธุ์กลายสามารถสร้างวงใสได้กว้างกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ทำให้ได้สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ทั้งสองสูงขึ้น

Ishikawa และคณะ (1998) ได้นำ *A. xylinum* subsp. *Nonacetoxidans* 757 มาทำการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG และสามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างเซลลูโลสได้สูงขึ้น ร้อยละ 40 และมีความต้านทานต่อ 5-Fluorouridine เพราะสายพันธุ์กลายที่ได้สามารถสร้าง UTP และ UDP-glucose ที่เป็น precursor ของการสังเคราะห์เซลลูโลสได้สูงขึ้น

Jogeswar และคณะ (2005) ได้ทำการทดลองปรับปรุงการผลิตเอนไซม์แทนเนสจากกรเพาะเลี้ยงแบบผสมระหว่าง *Aspergillus foetidus* และ *Rhizopus oryzae* โดยใช้สารชักนำ (เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-คลอนิดีน, NTG) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์แทนเนสลดลงแต่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสเพิ่มสูงขึ้น

Lin และคณะ (1982) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. Nov.F-2 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตและ NTG ทำให้ได้สายพันธุ์กลายคือ *Monascus* R10847 ซึ่งให้การสร้างสีสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ดั้งเดิม แต่พบว่าการสร้างโคนิเดีย peithecium และ ascospore น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยการสร้างสปอร์ของสายพันธุ์กลายนี้ จะเพิ่มขึ้นจากเดิม เนื่องจากคุณสมบัติของสารบางอย่างช่วยให้การหลั่งสารออกมานอกเซลล์ได้ดีขึ้น หรือเป็นเพราะผลจากการกลายพันธุ์ทำให้โครงสร้างของเซลล์มีรูพรุนมากขึ้น จึงทำให้การหลั่งสารออกจากเซลล์เป็นไปได้มากขึ้น

Maccormick และคณะ (1993) ได้ศึกษาคุณลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ acetan ที่ผลิตโดยสายพันธุ์กลายพบว่า ในการชักนำให้ *A. xylinum* NRRL B42 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตทั้งเซลลูโลสและ acetan โดยใช้สาร NTG คัดแยกสายพันธุ์กลาย *A. xylinum* CRI/4 ซึ่งผลิต polysaccharides ที่มีโครงสร้าง acetan เปลี่ยนแปลงไป

Park และคณะ (1977) โดยใช้การชักนำให้ *Aspergillus awamori* NRRL3112 ทำการกลายพันธุ์โดยใช้สาร NTG ความเข้มข้น 4 มก./มล. นาน 10 นาที พบว่าสายพันธุ์กลายของ *Aspergillus awamori* NRRL3112 สร้างเอนไซม์กลูโคสไมเลสมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึงร้อยละ 100

Walid และคณะ (2006) ได้ทดลองผลิตกรดซิตริกจาก *Aspergillus niger* โดยทำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี (EMS, AO) และรังสีอัลตราไวโอเล็ตพบว่า สายพันธุ์กลายของเชื้อ *Aspergillus niger* สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงขึ้น

83756

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำโครงการงาน

**เชื้อจุลินทรีย์** - เชื้อรา BGG 06 (ณัฐพงศ์, 2549) ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างดินในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

#### อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งมาเชื้อ
2. ตู้อบแห้ง
3. กล้องจุลทรรศน์
4. ตู้เย็นเชื้อ
5. เครื่องเขย่าขวดรูปชมพู่
6. เครื่องแก้ว
7. เครื่องชั่ง
8. เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต
9. ตู้เย็น
10. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
11. เข็มเขี่ยเชื้อ
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์
13. เครื่องอัลตราโซนิเคต
14. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

#### สารเคมี

1. ฟีนอลเรด
2. โบแคสเขียวโคไฮโดรเจนฟอสเฟต
3. แมกนีเซียมซัลเฟต
4. โซเดียมไนเตรต
5. น้ำมันสบู่ดำ
6. ไคโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
7. แอมโมเนียมซัลเฟต
8. พาราไนโตรฟีนอลปาล์มมีเตด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. โพรพานอล
11. ไตรตอน เอ็กซ์-100
12. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์
13. โซเดียมคาร์บอเนต
14. เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-กลอนิติน

### 3.2 การเตรียมอาหารที่ใช้คัดเลือกและเลี้ยงเชื้อรา

3.2.1 การเตรียมอิมัลชันของน้ำมัน โดยการผสม Tween 80 ลงไปร้อยละ 10 ของปริมาณน้ำมันที่เตรียม และนำไปทำโฮโมจีไนส์โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.2.2 การเตรียมอาหารที่ใช้คัดเลือกและเพาะเลี้ยงเชื้อรา อาหารที่ใช้ในการทดสอบมี 3 สูตรดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราคือ อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เตรียมอาหารแล้วนำมาทิ้งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทอาหารลงในจานเพาะเชื้อ ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

สูตรที่ 2 อาหารเหลวที่ประกอบด้วย ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 เบคโท-เปปโตน (bactopeptone) ร้อยละ 3  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ร้อยละ 0.1  $\text{NaNO}_3$  ร้อยละ 0.1  $\text{MgSO}_4$  ร้อยละ 0.05 และน้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 1 โดยปริมาตร เตรียมอาหารใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 70 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สูตรที่ 3 Tributyrin agar สำเร็จรูปประกอบด้วย เปปโตน ยีสต์สกัด เลซีน วุ้น และกลีเซอรอล ไตรบิวไทเรต เตรียมได้โดย ชั่งอาหารมา 20 กรัม ผสมน้ำ 1000 มิลลิลิตร และเติมกลีเซอรอล ไตรบิวไทเรตลงไป 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วยกรดหรือด่าง ให้อยู่ในช่วง  $7.5 \pm 0.2$  ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทิ้งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 3.3 การชักนำและคัดเลือกเชื้อรา

3.3.1 การชักนำโดยฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต

1. เลี้ยงเชื้อราลงใน PDA เป็นเวลา 3-4 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะได้สปอร์ของเชื้อรา จากนั้นใส่น้ำกลั่นที่มีทวิน 80 ร้อยละ 0.02 ลงไปได้เป็นสารละลายสปอร์

2. กำจัดเส้นใยโดยกรองผ่านแผ่นกรองซินเตอร์กลาส ทำการเจือจางให้ได้  $10^6$  สปอร์/มล. โดยการนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer) และนำสารละลายสปอร์ 1.0 มิลลิลิตร มาเจือจางสปอร์ตั้งแต่  $10^1$ - $10^5$  และนำสารละลายสปอร์ที่ความเจือจาง  $10^3$  ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  มา 0.1 มล. ทำการ spread plate บนอาหาร PDA เพื่อหาปริมาณโคโลนีของเชื้อเริ่มต้น ก่อนทำการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต

3. ใส่สารละลายสปอร์ ( $10^6$  สปอร์ต่อมล.) ลงในถ้วยตัดที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้เวลา 0, 8, 10 และ 12 นาที และใช้ magnetic stirrer ช่วยในการผสมสารละลายสปอร์ให้เข้ากัน แล้วเก็บในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยให้เวลาที่ 0 นาที เป็นชุดควบคุม

4. เมื่อนำไปไว้ในที่มืดครบ 2 ชั่วโมง นำสารละลายสปอร์มาทำการเจือจางที่  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  และ  $10^{-3}$  และทำการ spread plate ในอาหาร tributyrin agar และอาหาร CD-medium ที่มีสปูดำเป็นแหล่งคาร์บอนและใส่ฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน และทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วที่ความเจือจาง  $10^{-1}$ -  $10^{-3}$  และทำการ spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อนับจำนวนโคโลนีที่เหลือ (อัตราการตายประมาณร้อยละ 90 ) โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทุกความเข้มข้นทำการ spread plate 3 ซ้ำ

5. ทำการคัดเลือกโคโลนีที่เกิดวงใสขึ้น ในอาหาร tributyrin agar และอาหาร CD-medium ที่มีสปูดำเป็นแหล่งคาร์บอน เก็บรวบรวมเชื้อไว้ในอาหาร PDA

6. ทำการเลี้ยงเชื้อที่เกิดวงใสในอาหาร CD-medium ที่มีสปูดำเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะอาหารเหลว โดยปริมาตรของอาหารที่ใช้ 70 มล. และสารละลายสปอร์ 10 มล. ในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ในเชิงปริมาณโดยการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส แล้วคัดเลือกโคโลนีที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

### 3.3.2 การชักนำโดยใช้สาร เอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตร โซ-คลอนิดีน (NTG)

1. ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดจากข้อ 3.3.1 มาเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 3-4 วัน

2. ทำสารละลายสปอร์ของเชื้อในน้ำกลั่นที่มีทวิน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ทำการกำจัดเส้นใยโดยกรองผ่านแผ่นกรองซินเตอร์กลาส จากนั้นนับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ ให้ได้จำนวนสปอร์  $10^6$  สปอร์ต่อมล. และนำสารละลายสปอร์มาเจือจางในน้ำกลั่นที่ผ่านฆ่าเชื้อแล้วตั้งแต่  $10^{-1}$ -  $10^{-5}$  โดยนำสารละลายสปอร์ปริมาตร 0.1 มล. มา spread plate ลงในอาหาร PDA จากนั้นนำไปป่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนโคโลนีเพื่อคำนวณหาจำนวนโคโลนีเริ่มต้น

3. เตรียมสารละลายเอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตร โซ-คลอนิดีน (NTG) 2, 4 และ 8 มก. ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร

ปริมาตร 10 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.8 มก./มล. (Tianwei Tan และคณะ, 2003)

4. นำสารละลายสปอร์จากข้อที่ 1 ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มล. ฟลาสก์ละ 10 มล. เติมสารละลาย NTG ปริมาตร 1 มล. ในแต่ละฟลาสก์ ซึ่งมีความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.8 มก./มล. ทำการเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

5. ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งไป แล้วทำการล้างสปอร์ด้วยน้ำเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง

6. นำสปอร์ที่ได้มาทำสารละลายสปอร์โดยใส่น้ำกลั่นลงไป 10 มล. แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว  $10^{-1}$  -  $10^{-3}$  และทำการ spread plate โดยใช้สารละลายสปอร์ปริมาตร 0.1 มล. ในอาหาร tributyrin agar และอาหาร CD medium ที่มีสปูดำเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อสังเกตการเกิดวงใส และในอาหาร PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เพื่อบันทึกและทำการคำนวณจำนวนโคโลนีที่เหลืออยู่ (อัตราการตาย ประมาณร้อยละ 90)

7. ทำการคัดเลือกโคโลนีที่เกิดวงใสในอาหาร Tributyrin agar และอาหาร CD-medium ที่มีสปูดำเป็นแหล่งคาร์บอน เก็บรักษาไว้ในอาหาร PDA

8. ทำการทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ โดยนำเชื้อที่คัดเลือกได้ในข้อ 7. มาทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอาหารเหลวที่มีสปูดำเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วันและทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด

### 3.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม

ทำการเลี้ยงเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารเหลว เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (Tianwei Tan และคณะ, 2003) และทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Sevgi และคณะ, 2007)

สูตรอาหารที่ใช้ประกอบด้วยน้ำมันจากสปูดำร้อยละ 2.5 ,  $K_2HPO_4$  ร้อยละ 0.1 (น้ำหนัก/ปริมาตร),  $(NH_4)_2SO_4$  ร้อยละ 0.1,  $MgSO_4$  ร้อยละ 0.05 ปรับพีเอชเท่ากับ 6.0 (ดัดแปลงจาก Tianwei Tan และคณะ, 2003)

### 3.5 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

#### การเตรียมสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย ก. : ละลาย *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) ปริมาณ 30 มก. ใน 2 โพลีฟอสเฟตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ให้ได้ปริมาตร 10 มล.

สารละลาย ข. : ละลาย Triton X-100 400 มก. และกัมอาราบิก 100 มก. ในฟอสเฟตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ให้ได้ปริมาตร 90 มล.

สารละลาย ค. : ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 211.8 มก. ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล. นำสารละลาย ก. ปริมาตร 0.1 มล. เติมในสารละลาย ง. (เตรียมโดยผสมสารละลาย ก. ปริมาตร 10 มล. กับสารละลาย ข. ปริมาตร 90 มล.) ปริมาตร 2 มล. (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง) นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย ค. ปริมาตร 2.9 มล. และนำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenyl

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาย่อยสลาย *p*-nitrophenyl palmitate ให้ *p*-nitrophenyl 1 ไมโคร โมล ในสภาวะที่ทดสอบ

### 3.6 วิธีวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 15 ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 โดยทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

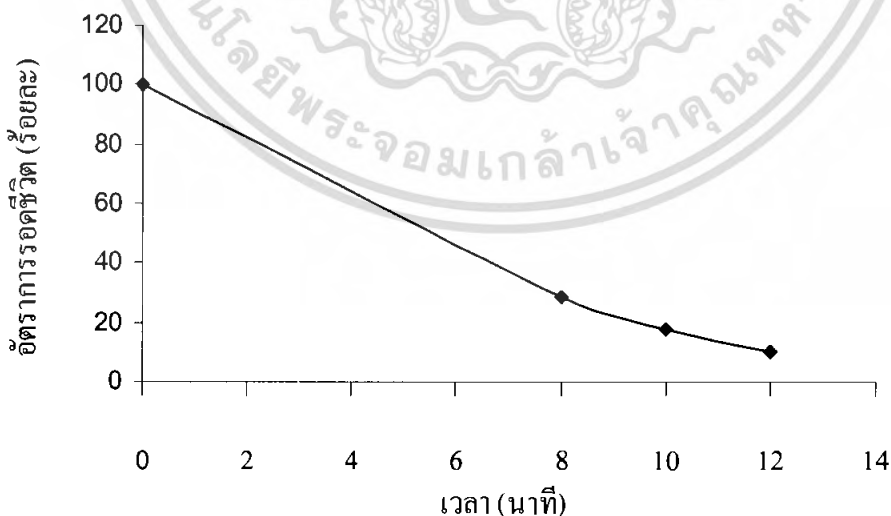
## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการชักนำและการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยวิธีฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต

##### 4.1.1 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อราสายพันธุ์กลายจากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV)

การกลายพันธุ์ของเชื้อรา (BGG06) โดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 0, 8, 10 และ 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเชื้อราสายพันธุ์กลายนั้นจะมีค่าลดลง เมื่อใช้เวลารังสีมากขึ้น ดังแสดงกราฟที่ 4.1 จากกราฟจะเห็นว่า เมื่อพิจารณาอัตราการรอดชีวิตในช่วงประมาณร้อยละ 10 ซึ่งเป็นระยะเวลาการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่เวลา 12 นาที เหลือเซลล์ที่รอดชีวิตร้อยละ 10.4 แสดงให้เห็นว่า การเหนี่ยวนำจากรังสีUV ทำให้เกิดเป็นไทมีนไคเมอร์ในโมเลกุลของโพลีนิวคลีโอไทด์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบสุ่ม เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA replication) ทำให้ดีเอ็นเอมีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม จึงมีรหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป (ประดิษฐ์, 2541) หากรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงนั้นอยู่ตรงบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เราต้องการ จะทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์นั้นเปลี่ยนแปลงไป แต่หากรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงนั้น อยู่ตรงบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ จะทำให้เซลล์นั้นไม่สามารถเจริญได้ (อาทิตย์, 2539)



กราฟที่ 4.1 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อราสายพันธุ์กลาย จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 0, 8, 10 และ 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.2 ผลของการเกิดวงใสในอาหาร Tributyrin agar และอาหาร CD-medium

ผลของการเกิดวงใสในอาหาร Tributyrin agar และอาหาร CD-medium ที่ใช้คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ระยะเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าโคโลนีของสายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถเกิดวงใสได้ในอาหาร Tributyrin agar ส่วนในสายพันธุ์กลายนั้น มี 4 สายพันธุ์ที่สามารถเกิดวงใสรอบโคโลนีในอาหาร CD-medium และอีก 19 สายพันธุ์ที่เกิดวงใสรอบโคโลนีในอาหาร Tributyrin agar ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลของการเกิดวงใสในอาหาร Tributyrin agar และอาหาร CD-medium ของเชื้อราสายพันธุ์กลาย ชักนำโดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

เชื้อราสายพันธุ์กลาย	การเกิดวงใสในอาหาร	
	CD-medium	Tributyrin agar
wt	-	+
C1	+	-
C2	+	-
C3	+	-
C4	+	-
T1	-	+
T2	-	+
T3	-	+
T5	-	+
T6	-	+
T8	-	+
T9	-	+
T10	-	+
T11	-	+
T12	-	+
T13	-	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอนไซม์ของ *Candida sp.* ดั้งเดิมมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูง เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราที่เราทำการศึกษา ซึ่งเชื้อดั้งเดิมนั้นมีค่ากิจกรรมเพียง 0.055 ยูนิต/มล. และเวลาในการฉายรังสีอาจมีผลต่อการกลายพันธุ์

**ตารางที่ 4.2** ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยวิธีฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

เชื้อราที่ทดสอบ	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์(ยูนิต/มล.)
Wild type	0.0550 <sup>bc</sup> ± 0.0031
C1	0.0124 <sup>ijk</sup> ± 0.0012
C2	0.0131 <sup>hijk</sup> ± 0.0010
C3	0.0144 <sup>ghijk</sup> ± 0.0025
C4	0.0168 <sup>s</sup> ± 0.0010
T1	0.0170 <sup>s</sup> ± 0.0006
T2	0.0523 <sup>c</sup> ± 0.0031
T3	0.0171 <sup>s</sup> ± 0.0010
T5	0.0634 <sup>a</sup> ± 0.0035
T6	0.0118 <sup>k</sup> ± 0.0000
T8	0.0164 <sup>gh</sup> ± 0.0015
T9	0.0165 <sup>gh</sup> ± 0.0015
T10	0.0521 <sup>c</sup> ± 0.0015
T11	0.0217 <sup>f</sup> ± 0.0000
T12	0.0285 <sup>c</sup> ± 0.0021
T13	0.0166 <sup>gh</sup> ± 0.0015
T19	0.0436 <sup>d</sup> ± 0.0015
T20	0.0156 <sup>ghij</sup> ± 0.0006
T21	0.0157 <sup>ghi</sup> ± 0.0015
T22	0.0174 <sup>s</sup> ± 0.0006
T24	0.0207 <sup>f</sup> ± 0.0010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ของเชื้อราสายพันธุ์กลาย ด้วยวิธีฉายรังสี อัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง**

เชื้อราที่ทดสอบ	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
T26	$0.0143^{bijk} \pm 0.0006$
T27	$0.0121^k \pm 0.0015$
T29	$0.0567^b \pm 0.0025$
T30	$0.0214^f \pm 0.0015$

หมายเหตุ: T หมายถึง โคโลนีที่เกิดวงใสในอาหาร Tributyrin agar และเป็นสายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต

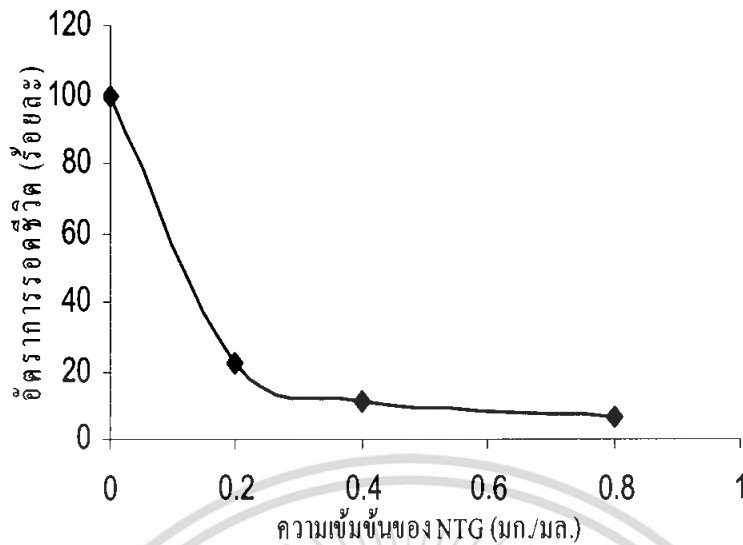
C หมายถึง โคโลนีที่เกิดวงใสในอาหาร CD-medium และเป็นสายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต

## 4.2 ผลการชักนำและการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลาย โดยใช้สารเคมีเอ็น-เมซิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-กลอนิติน (NTG)

### 4.2.1 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อราสายพันธุ์กลาย จากการใช้สารเคมีเอ็น-เมซิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-กลอนิติน (NTG)

การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้สารเคมีเอ็น-เมซิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-กลอนิติน (NTG) พบว่ามักจะคัดเลือกโคโลนีในอัตราการรอดชีวิตประมาณร้อยละ 0-30 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการกลายได้ดีที่สุด (Carlton, 1981) การกลายพันธุ์ของเชื้อราสายพันธุ์กลาย T5 โดยการ ใช้สารเคมี (NTG) ที่มีความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.8 มก./มล. เวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเชื้อราสายพันธุ์กลายนั้นจะมีค่าลดลง เมื่อความเข้มข้นของสาร NTG มากขึ้น ดังแสดงในกราฟที่ 4.2 ซึ่งจะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นของสาร NTG เท่ากับ 0.4 มก./มล. มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 10 แสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำจากสาร NTG ซึ่งเป็นสารที่สามารถเติมหมู่ซัลฟิไรต์ให้กับเบส ทำให้เกิดการจับคู่เบส ผิดปกติ เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลของโพลีนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอมีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไป (Goodenough, 1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**กราฟที่ 4.2** แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อราสายพันธุ์กลายจากการใช้สารเอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-คลอนิดีน (NTG) ความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.8 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

#### 4.2.2 ผลของการเกิดวงใสในอาหาร Tributyrin agar และอาหาร CD-medium

ผลของการเกิดวงใสในอาหาร Tributyrin agar และอาหาร CD-medium ที่ใช้คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ จากการใช้สารเคมีเอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-คลอนิดีน (NTG) ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าโคโลนีของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายไอโซเลต T5 สามารถเกิดวงใสได้ในอาหาร Tributyrin agar ส่วนในสายพันธุ์กลายนั้น มี 10 สายพันธุ์ ที่สามารถเกิดวงใสรอบโคโลนีในอาหาร CD-medium และอีก 19 สายพันธุ์ที่เกิดวงใสรอบโคโลนีในอาหาร Tributyrin agar ดังแสดงในตารางที่ 4.3 การที่เชื้อราสายพันธุ์กลายสามารถทำให้เกิดวงใสบนอาหารได้นั้น แสดงว่าเชื้อราสายพันธุ์กลายสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ และสายพันธุ์กลายที่เกิดวงใสในอาหาร CD-medium ที่เติมน้ำมันสบู่อำเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงว่าสายพันธุ์กลายนั้นสามารถย่อยน้ำมันสบู่อำเพื่อนำคาร์บอนที่ย่อยได้ไปใช้ในกิจกรรมของเซลล์ต่อไป

ตารางที่ 4.3 ผลของการเกิดวงใสในอาหาร Tributyrin agar และอาหาร CD-medium ของเชื้อราสายพันธุ์กลาย โดยการใช้สาร NTG ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

เชื้อราสายพันธุ์กลาย	การเกิดวงใสในอาหาร	
	CD-medium	Tributyrin agar
Wild type	-	+
T5	-	+
TB1	-	+
TB2	-	+
TB3	-	+
TB4	-	+
TB6	-	+
TB7	-	+
TB8	-	+
TB11	-	+
TB12	-	+
TB13	-	+
TB16	-	+
TB19	-	+
TB20	-	+
TB21	-	+
TB22	-	+
TB23	-	+
TB25	-	+
CD6	+	-
CD10	+	-
CD12	+	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ผลของการเกิดวงใสในอาหาร Tributyrin agar และอาหาร CD-medium ของเชื้อราสายพันธุ์กลาย โดยการใช้สาร NTG ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง**

เชื้อราสายพันธุ์กลาย	การเกิดวงใสในอาหาร	
	CD-medium	Tributyrin agar
CD14	+	-
CD17	+	-
CD18	+	-
CD20	+	-
CD22	+	-
CD23	+	-
CD25	+	-

หมายเหตุ : เครื่องหมาย + หมายถึง เกิดวงใสรอบโคโลนี  
เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่เกิดวงใสรอบโคโลนี

#### 4.2.3 ผลของการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยสารเคมี เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-กลอนิติน (NTG)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากการทดลองการชักนำการกลายพันธุ์ โดยการใช้สารเคมีเอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-กลอนิติน (NTG) ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร (Sevgi และคณะ, 2007) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด คือไอโซเลต CD23 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.1623 ยูนิต/มล. ซึ่งให้ค่ากิจกรรมที่สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายไอโซเลต T5 และยังสามารถเกิดวงใสในอาหาร CD-medium ที่มีสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนไอโซเลตที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์รองลงมาคือไอโซเลต TB4 และ TB7 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.1363 และ 0.1187 ยูนิต/มล. ตามลำดับ จากการศึกษาเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียเซลลูโลสโดยใช้รังสี UV และ สาร NTG พบว่าสาร NTG ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีผลทำให้ได้แบคทีเรียเซลลูโลสเพิ่มขึ้นร้อยละ 154.64 ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เอกดั้งเดิมร้อยละ 44.63 (ชวลีกร, 2547) ารใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยการใส่สาร NTG ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

เชื้อราที่ทดสอบ	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
WT	0.0550 <sup>kl</sup> ± 0.0010
T5	0.0627 <sup>j</sup> ± 0.0021
TB1	0.0463 <sup>mn</sup> ± 0.0031
TB2	0.0633 <sup>j</sup> ± 0.0050
TB3	0.0357 <sup>p</sup> ± 0.0038
TB4	0.1363 <sup>b</sup> ± 0.0040
TB6	0.0807 <sup>f</sup> ± 0.0031
TB7	0.1187 <sup>c</sup> ± 0.0006
TB8	0.0757 <sup>b</sup> ± 0.0031
TB9	0.0520 <sup>kl</sup> ± 0.0060
TB10	0.0320 <sup>p</sup> ± 0.0017
TB11	0.0517 <sup>klm</sup> ± 0.0015
TB12	0.0670 <sup>hij</sup> ± 0.0010
TB13	0.0750 <sup>g</sup> ± 0.0030
TB16	0.0533 <sup>kl</sup> ± 0.0015
TB19	0.0523 <sup>kl</sup> ± 0.0006
TB20	0.0713 <sup>gh</sup> ± 0.0006
TB21	0.0633 <sup>j</sup> ± 0.0021
TB22	0.0513 <sup>klm</sup> ± 0.0031
TB23	0.0687 <sup>hi</sup> ± 0.0032
TB25	0.0437 <sup>o</sup> ± 0.0023
CD6	0.0447 <sup>o</sup> ± 0.0015
CD10	0.0897 <sup>c</sup> ± 0.0025
CD12	0.0653 <sup>ij</sup> ± 0.0038
CD14	0.1087 <sup>d</sup> ± 0.0006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย โดยการใส่สาร NTG ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

เชื้อราที่ทดสอบ	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
CD17	$0.0673^{hi} \pm 0.0012$
CD18	$0.0470^{mno} \pm 0.0020$
CD20	$0.0563^k \pm 0.0006$
CD22	$0.0503^{lmn} \pm 0.0006$
CD23	$0.1623^a \pm 0.0006$
CD25	$0.0687^{hi} \pm 0.0049$

หมายเหตุ : TB หมายถึง โคโลนีที่เกิดวงใสในอาหาร Tributyrin agar และเป็นสายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำโดยใช้สารเคมี NTG  
 CD หมายถึง โคโลนีที่เกิดวงใสในอาหาร CD-medium และเป็นสายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำโดยใช้สารเคมี NTG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผล

จากผลการทดลอง การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง โดยวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากการย่อยน้ำมันนั้น พบว่าเมื่อทำการชักนำโดยใช้การฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 12 นาที เชื้อราสายพันธุ์กลายที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือไอโซเลต T5 เป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดวงใสในอาหาร Tributyrin agar มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.0634 ยูนิต/มล. ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมเล็กน้อย และจากการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด (ไอโซเลต T5) เมื่อนำมาทำการชักนำการกลายพันธุ์ ด้วยสารเคมีเอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซ-คลอนิดีน (NTG) ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที พบว่าเชื้อราสายพันธุ์กลายไอโซเลต CD23 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ซึ่งสูงกว่าไอโซเลต T5 และสายพันธุ์ดั้งเดิม (BGG06) คือ 0.1623 ยูนิต/มล. ซึ่งสายพันธุ์กลายไอโซเลต CD23 นั้นสามารถทำให้เกิดวงใสในอาหาร CD-medium ที่มีสบู่อำเป็นแหล่งคาร์บอน

## ข้อเสนอแนะ

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย ไม่ว่าจะเป็นการฉายรังสี UV หรือการใช้สารเคมี (NTG) ส่วนเป็นแนวทางหนึ่งในการศึกษาเพื่อค้นหาวิธีคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ปริมาณสูง โดยเฉพาะใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันจากสบู่ดำ และใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- ชวลีกร ศรีสวัสดิ์. 2547. การปรับปรุง *Acetobacter* sp. ที่คัดแยกได้โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อเพิ่มผลผลิตแบคทีเรียเซตูลูโลส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยามหาวิทยาลัยมหาวชิราลงกร.
- ชัยฤกษ์ มณีพงษ์. 2534. พันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ. โอเดียนสโตร์.
- ชำนาญ ฉัตรแก้ว. 2547. โครงการปลูกสวนป่า “สมุนไพร” เพื่อพัฒนาพลังงานทดแทน โครงการเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถ 72 พรรษา. วารสารวิทยาศาสตร์ประจำเดือน มีนาคม – เมษายน. หน้า 74 – 75.
- ณัฐพงษ์ ชนะไพรินทร์, รุ่งนภา วิมลทรัพย์, สวรรส ทับทิมดี. 2549. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากอุตสาหกรรมน้ำมันพืช. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ดาเรศน์ กิตติโยภาส. 2548. สถานภาพปัจจุบันสมุนไพร. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาจัดทำแผนและวิจัยส่งเสริมการปลูกสมุนไพรเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน. 6 พฤษภาคม 2548.
- ทิพย์มณี ภาระตะศิลาปิน. (ไม่ปรากฏวันที่ เดือน ปีที่เผยแพร่). พันธุศาสตร์ 1. สืบค้นเมื่อวันที่ 2 มีนาคม พ.ศ. 2551.
- นิรนาม 2547. น้ำมันสมุนไพรกับเครื่องยนต์ดีเซล. น.ส.พ.กสิกร. 77(3) : 74-78.
- บุษบา ยงสมิทธิ. 2540. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2541. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ระพีพันธ์ ภาสบุตร, สุขสันต์ สุทธิผลไพบุลย์, ไพจิตร จันทร์วงศ์, วีระศักดิ์ อนันบุตร, มาลี ประภาวัต, วิไล กาญจนภูมิและ อรวรรณ หวังดีธรรม. 2525. ผลการวิจัยค้นคว้าการใช้ไขมันสมุนไพรเป็นพลังงานทดแทนเครื่องยนต์ดีเซล และผลการศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์-เคมีของไขมันสมุนไพรเพื่อใช้เป็นพลังงาน. กองเกษตรเคมี และกองเกษตรวิศวกรรม กรมวิชาการเกษตร. เอกสารโรเนียว 43 หน้า.
- วรรณวิภา พ่วงเจริญ. 2546. การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในเชิงเศรษฐกิจของการผลิตไขมันสมุนไพรเพื่อเป็นพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซล. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาเศรษฐศาสตร์เกษตรและทรัพยากร คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมใจ ศิริโชค. 2544. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุรพงษ์ เจริญรัต. 2548. เอกสารประกอบการบรรยายพิเศษในการประชุมเสนอกิจกรรมวิจัยสู่คำกรณวิชาการเกษตร. 29 มิถุนายน 2548 ห้องประชุม 107 สถาบันวิจัยพืชไร่ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ.

อาทิตย์ ปุษยะนาวิน. 2539. การคัดเลือกมิวแทนท์ของ *Pachysolen tanophilus* ที่หมักไซโลส โดย การชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Alcamo, I. E. 1997. Bacterial Genetics. Fundamentals of microbiology. pp. 159-165.

Artsimovitch, I. 2004. DNA structure and mechanism of mutation. Micro 581 handouts.

Barnwal, B.K., Sharma, M.P. 2004. Prospects of biodiesel production from vegetable oil in India. Indian Institute of Technology. Uttaranchal, India.

Carlton, B.C., and Brown, B.J. 1981. Gene Mutation Nester, E.W. (ed) Manual of methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp. 221-227.

Davies, O. L. 1964. Screening for improved mutants in antibiotic reasearch. Biometrics. 20 : 576-591.

Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Division of Molecular Science. Kobe University. Japan. 92 : 405-416.

Gilham, D. and Lehner, R. 2005. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. Method. Department of Cell Biology. University of Alberta. 36 : 139-147.

Goodenough, U. 1978. Genetic. 2<sup>nd</sup> edition. London : Holt, Rinchart and Winston.

Gratzner, H., Sheenan, D. N. 1969. *Neurospora* mutant exhibiting hyperproduction of amylase and invertase. Bacteriol. 97 : 544-549.

Ishikawa, A. N., et al. 1998. Breeding of a 5- fluorouridine-resistant mutant with increased cellulose production from *Acetobacter xylinum* subsp. Nonacetoxidans. Bioscience. Biotechnology. 62 : 1388-1391.

Jogeswar, S. P., Jayati, R. D., Ranjan, K. N., Rintu, B. 2005. Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. Microbial Biotechnology and Downstream Processing Laboratory. Indian Institute of Technology. India. 97 : 795-801.

Katsivela, E., Kleppe, F., Lang S., Wagner, F. 1995. *Ustilago maydis* lipase I. Hydrolysis and ester synthesis activities of crude enzyme preparation. Technical University of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แจ้งไว้ในเว็บไซต์ของศูนย์เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรนำไปใช้

- Kurl-Erich, J. and Thorsten, E. 2002. Lipase for biotechnology. Institute for Molecular Enzyme Technology. Germany. 13 : 390-397.
- Lin, C. F., Lizuka, H. 1982. Production of extracellular by a mutant of *Monascus kaoling* sp. Environmental. Microbiology. 43 : 671-676.
- Maccormick, C. A., et al. 1993. Charecterization of a variant of the polysaccharide acetan produced by a mutant of *Acetobacter xylinum* strain CR1/4. J. Applied Bacteriology. 74 : 196-199.
- Martinko, J. M., Madigan, M. T., Parker, J. 1997. Biology of Microorganisms. Pretice Hall International. London.
- Park, Y. K., Santi, M. S. S. 1977. Induction of high amyloglucosidase-producing mutant from *Aspergillus awamori*. Fermentation. Tecnology. 55 : 193-195.
- Sevgi, E., Gönül D., Serpil, T. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. Faculty of Science. Department of Biology. Ankara University. Turkey.
- Sikyta, B. 1983. Methods in Industrial Microbiology. John wiley & sons, New York. pp. 214-249.
- Tianwei, T., Mu, Z., Bingwu, W., Chunhua, Y., Li, D. 2003. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase fermentation. Process Biochemistry. 39 : 459-465.
- Walid A. L., Khaled M. G., Ehab R. El-Helow. 2006. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate I. Mutagenesis and cost reduction studies. Bioresource Technology. 98 : 3464–3469.
- <http://www.snr.ac.th/m4html/w4html/fungi.htm>
- <http://www.thirawat.com/ge/mutation.html>
- <http://www.osumicrobiology.org/forms/581-2.pdf>

## ภาคผนวก ก.

### สูตรอาหาร

#### สูตรที่ 1

-Potato Dextrose Agar (PDA) สำเร็จรูป

#### สูตรที่ 2 CD-medium

- ประกอบด้วย - ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5
- เบคโท-เปปโตน (bacto-peptone) ร้อยละ 3
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ร้อยละ 0.1
  - $\text{NaNO}_3$  ร้อยละ 0.1
  - $\text{MgSO}_4$  ร้อยละ 0.05
  - น้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 1
  - tween 80 ร้อยละ 0.01
  - สารละลายฟีนอลเรด

#### สูตรที่ 3 Tributyrin Agar ชนิดสำเร็จรูป

ประกอบด้วย - เปปโตน ยีสต์สกัด เคซีน ไขมัน และกลีเซอรอลไตรบิวไทเรต เตรียมได้โดยชั่งอาหารมา 20 กรัม ผสมน้ำ 1000 มิลลิลิตร และเติมกลีเซอรอลไตรบิวไทเรต ลงไป 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ด้วยกรดหรือด่าง ให้อยู่ในช่วง  $7.5 \pm 0.2$  ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำไปฆ่าเชื้อ โดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

#### วิธีเตรียมอิมัลชันของน้ำมัน

การเตรียมอิมัลชันของน้ำมัน โดยการผสม Tween 80 ลงไปร้อยละ 0.01 ของปริมาตรน้ำมันที่เตรียม และนำไปทำโฮโมจีไนซ์โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

#### วิธีเตรียมสารละลายฟีนอลเรด

-ละลายฟีนอลเรด 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

## ภาคผนวก ข.

## การเตรียมสารละลายสำหรับการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

การเตรียมสารละลาย *p*-nitronylpalmitate (*p*-npp)

- ชั่งสารละลาย *p*-nitronylpalmitate (*p*-npp) 30 มิลลิกรัม ละลายในไอโซโพรพานอล 10 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย *p*-nitrophenol เพื่อทำการฟอสฟอรัสละลาย *p*-nitrophenol มาตรฐาน

การเตรียมสารละลาย *p*-nitrophenol เข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- ชั่งสาร *p*-nitrophenol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.10526 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

## การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

A : 0.2 M monobasic sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  53.65 กรัม หรือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

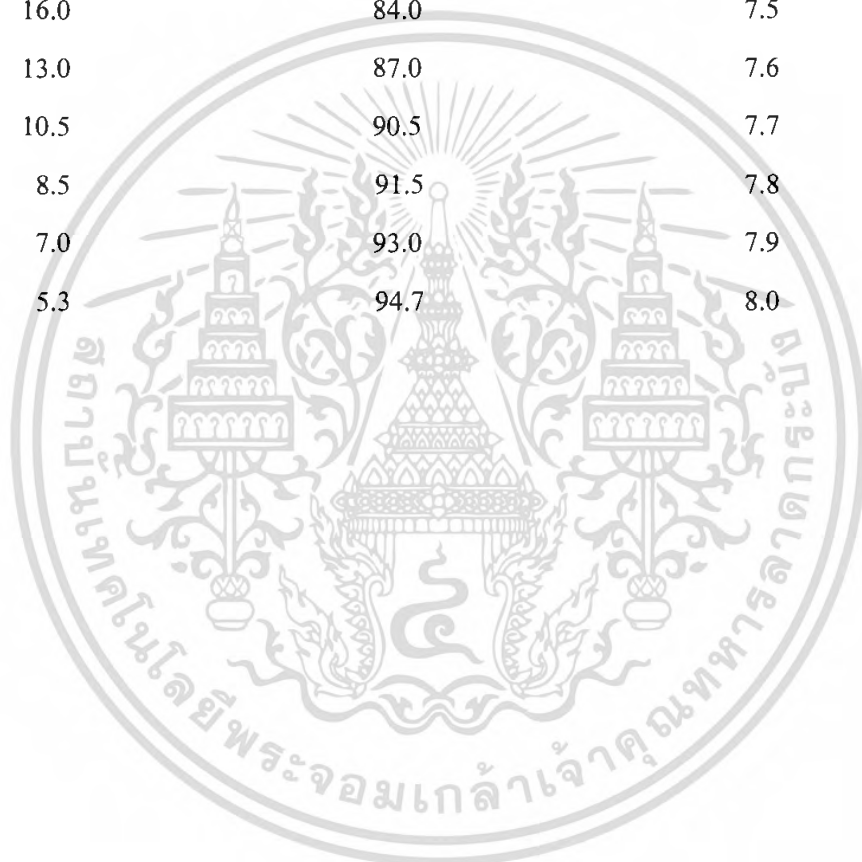
ผสม X มล. ของ A กับ Y มล. ของ B ปริมาตรเป็น 200.0 มล.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ต่อ)**

X (มล.)	Y(มล.)	พีเอช
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
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
7.0	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

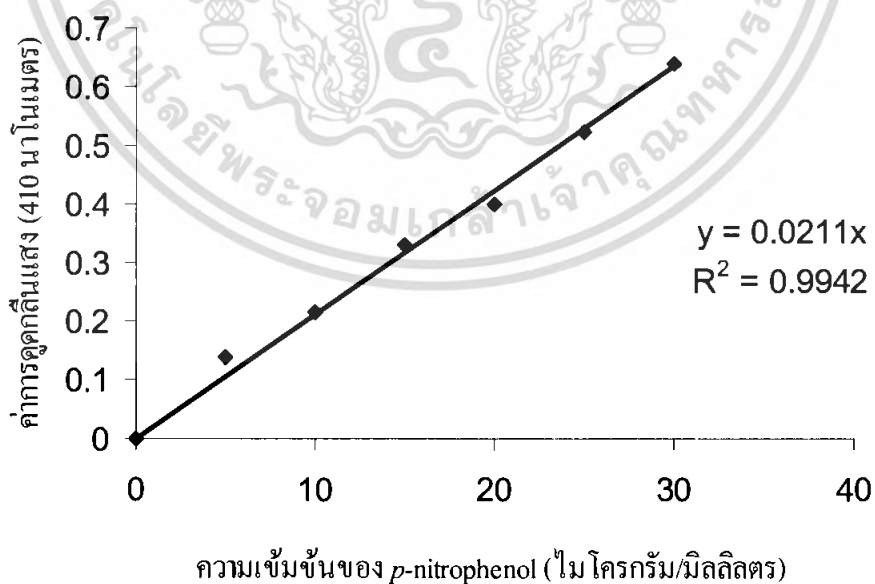
## ภาคผนวก ค.

## การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ของสารละลาย

มาตรฐาน *p*-nitrophenol

ความเข้มข้น <i>p</i> -nitrophenol	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
0	0	0	0	0
5	0.141	0.139	0.131	0.137
10	0.233	0.204	0.211	0.216
15	0.302	0.321	0.367	0.330
20	0.415	0.398	0.387	0.400
25	0.545	0.499	0.524	0.523
30	0.621	0.658	0.635	0.638

รูปภาพผนวกที่ 1 กราฟสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การหากิจกรรมของเอนไซม์

$$\begin{aligned} \text{กิจกรรมของเอนไซม์} &= \frac{\text{ไมโครกรัมของ p-nitrophenol} \times 10^6 \times \text{ค่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของ p-nitrophenol} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาณเอนไซม์(มล.)}} \\ &= \frac{\text{ไมโครกรัมของ p-nitrophenol} \times 10^6 \times \text{ค่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์}}{139.11 \text{ g/mol} \times 15 \text{ นาที} \times 0.1 \text{ มล.}} \end{aligned}$$

จากสมการของกราฟมาตรฐาน  $y = 0.0205x$  เมื่อแทนค่า  $x$  ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของ p-nitrophenol ( $\mu\text{g/ml}$ ) และนำมาคำนวณหา กิจกรรมของเอนไซม์ได้ดังนี้

**ตารางภาคผนวกที่ 2** ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยรังสี UV (254 นาโนเมตร) เป็นเวลา 12 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง

ตัวอย่าง	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าการเจือจาง	ค่ากิจกรรม
wt	1	0.238	1	0.056
	2	0.221		0.052
	3	0.247		0.058
C1	1	0.049	1	0.012
	2	0.052		0.012
	3	0.058		0.014
C2	1	0.06	1	0.014
	2	0.05		0.012
	3	0.058		0.013
C3	1	0.071	1	0.017
	2	0.049		0.012
	3	0.065		0.015
C4	1	0.075	1	0.018
	2	0.073		0.017
	3	0.067		0.016
T5	1	0.049	1	0.067
	2	0.052		0.060

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยรังสีUV (254 นาโนเมตร) เป็นเวลา 12 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง

ตัวอย่างที่	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าการเจือจาง	ค่ากิจกรรม
T5	1	0.049	1	0.067
	2	0.052		0.060
	3	0.058		0.063
T6	1	0.063	1	0.015
	2	0.039		0.009
	3	0.05		0.012
T8	1	0.076	1	0.018
	2	0.065		0.015
	3	0.07		0.016
T9	1	0.079	1	0.018
	2	0.065		0.015
	3	0.068		0.016
T10	1	0.23	1	0.053
	2	0.218		0.050
	3	0.221		0.052
T11	1	0.094	1	0.022
	2	0.092		0.022
	3	0.093		0.022
T12	1	0.213	1	0.050
	2	0.232		0.054
	3	0.226		0.053
T13	1	0.063	1	0.015
	2	0.072		0.017
	3	0.078		0.018
T19	1	0.192	1	0.045
	2	0.179		0.042
	3	0.189		0.044

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยรังสีUV (254 นาโนเมตร) เป็นเวลา 12 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง

ตัวอย่าง	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าการเจือจาง	ค่ากิจกรรม
T20	1	0.062	1	0.015
	2	0.068		0.015
	3	0.07		0.016
T21	1	0.06	1	0.014
	2	0.073		0.017
	3	0.068		0.016
T22	1	0.072	1	0.017
	2	0.073		0.017
	3	0.078		0.018
T24	1	0.084	1	0.020
	2	0.09		0.021
	3	0.092		0.022
T26	1	0.058	1	0.014
	2	0.064		0.015
	3	0.061		0.014
T27	1	0.045	1	0.011
	2	0.052		0.012
	3	0.058		0.014
T29	1	0.252	1	0.059
	2	0.231		0.054
	3	0.245		0.057
T30	1	0.084	1	0.020
	2	0.099		0.023
	3	0.091		0.021

หมายเหตุ: T หมายถึง โคโลนีที่เกิดวงใสในอาหาร tributyrin agar

C หมายถึง โคโลนีที่เกิดวงใสในอาหาร CD-medium  
เอกสารนี้เป็นเอกสารทรัพย์สินทางปัญญาของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มีอนุญาตนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยสารเคมี (NTG) ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ตัวอย่าง	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าการเจือจาง	ค่ากิจกรรม
TB1	1	0.216	1	0.049
	2	0.206		0.047
	3	0.212		0.043
TB2	1	0.254	1	0.058
	2	0.298		0.068
	3	0.280		0.064
TB3	1	0.147	1	0.033
	2	0.176		0.040
	3	0.151		0.034
TB4	1	0.589	1	0.134
	2	0.617		0.141
	3	0.585		0.134
TB6	1	0.369	1	0.084
	2	0.343		0.078
	3	0.350		0.080
TB7	1	0.524	1	0.119
	2	0.520		0.119
	3	0.518		0.118
TB8	1	0.345	1	0.079
	2	0.320		0.073
	3	0.329		0.075
TB9	1	0.254	1	0.058
	2	0.220		0.046
	3	0.228		0.052
TB10	1	0.148	1	0.034
	2	0.134		0.031
	3	0.135		0.031

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยสารเคมี (NTG) ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที และปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง**

ตัวอย่าง	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าการเจือจาง	ค่ากิจกรรม
TB11	1	0.233	1	0.053
	2	0.221		0.050
	3	0.228		0.052
TB12	1	0.209	1	0.066
	2	0.294		0.067
	3	0.298		0.068
TB13	1	0.342	1	0.078
	2	0.317		0.075
	3	0.327		0.072
TB16	1	0.239	1	0.055
	2	0.247		0.052
	3	0.245		0.053
TB19	1	0.231	1	0.053
	2	0.228		0.052
	3	0.230		0.052
TB20	1	0.339	1	0.071
	2	0.417		0.072
	3	0.409		0.071
TB21	1	0.284	1	0.065
	2	0.266		0.061
	3	0.280		0.064
TB22	1	0.212	1	0.048
	2	0.237		0.054
	3	0.229		0.052
TB23	1	0.306	1	0.070
	2	0.312		0.071
	3	0.286		0.065

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่สามารถตีพิมพ์, กระจาย, หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยสารเคมี (NTG) ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที และปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ตัวอย่าง	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าการเจือจาง	ค่ากิจกรรม
TB25	1	0.199	1	0.045
	2	0.180		0.041
	3	0.197		0.045
WT	1	0.239	1	0.054
	2	0.247		0.056
	3	0.235		0.055
T5	1	0.283	1	0.065
	2	0.269		0.061
	3	0.271		0.062
CD6	1	0.201	1	0.046
	2	0.195		0.045
	3	0.187		0.043
CD10	1	0.383	1	0.087
	2	0.394		0.090
	3	0.402		0.092
CD12	1	0.298	1	0.068
	2	0.268		0.061
	3	0.293		0.067
CD14	1	0.481	1	0.109
	2	0.475		0.108
	3	0.477		0.109
CD17	1	0.297	1	0.068
	2	0.288		0.066
	3	0.300		0.068

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อราสายพันธุ์กลายด้วยสารเคมี (NTG) ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง

ตัวอย่าง	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าการเจือจาง	ค่ากิจกรรม
CD18	1	0.198	1	0.045
	2	0.208		0.047
	3	0.216		0.049
CD20	1	0.244	1	0.056
	2	0.244		0.056
	3	0.251		0.057
CD22	1	0.219	1	0.050
	2	0.220		0.051
	3	0.222		0.050
CD23	1	0.711	1	0.162
	2	0.718		0.163
	3	0.709		0.162
CD25	1	0.277	1	0.063
	2	0.309		0.071
	3	0.315		0.072

หมายเหตุ: TB หมายถึง โคโลนีที่เกิดวงใสในอาหาร tributyrin agar

CD หมายถึง โคโลนีที่เกิดวงใสในอาหาร CD-medium

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าการคำนวณทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS ของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจาก เชื้อราที่คัดเลือกด้วยสาร NTG

#### ANOVA

activity NTG

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.020	24	.001	235.401	.000
Within Groups	.000	50	.000		
Total	.020	74			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในงานวิชาการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ) ค่าการคำนวณทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS ของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจาก  
เชื้อราที่คัดเลือกว่าด้วยสาร NTG  
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

Duncan

isolate	N	Subset for alpha = .05															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
9.0	3	.032															
3.0	3	.036															
19.0	3		.044														
22.0	3		.045														
1.0	3		.046	.046													
27.0	3		.047	.047	.047												
29.0	3			.050	.050	.050											
17.0	3				.051	.051	.051										
10.0	3				.052	.052	.052										
8.0	3					.052	.052										
14.0	3						.052	.052									
13.0	3							.053	.053								
20.0	3								.055	.055							
28.0	3									.056							
21.0	3										.063						
2.0	3											.063					
16.0	3												.063				
24.0	3													.065	.065		
11.0	3														.067	.067	.067
26.0	3															.067	.067
18.0	3																.069
31.0	3																
15.0	3																
12.0	3																
7.0	3																
5.0	3																
23.0	3																
25.0	3																
6.0	3																
4.0	3																
30.0	3																
Sig.		.102	.175	.092	.057	.072	.053	.068	.186	.085	.068	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค่าการคำนวณทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS ของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจาก  
เชื้อราที่คัดเลือกด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

## ANOVA

Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.020	24	.001	235.401	.000
Within Groups	.000	50	.000		
Total	.020	74			

## ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

Duncan

isolate	N	Subset for alpha = .05												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
10.0	3	.0118												
23.0	3	.0121	.0121											
2.0	3	.0124	.0124	.0124										
3.0	3	.0130	.0131	.0130	.0130									
22.0	3	.0143	.0143	.0143	.0143	.0143								
4.0	3	.0144	.0144	.0144	.0144	.0144								
18.0	3		.0156	.0156	.0156	.0156								
19.0	3			.0157	.0157	.0157								
11.0	3				.0164	.0164								
12.0	3				.0165	.0165								
16.0	3				.0166	.0166								
5.0	3					.0168								
8.0	3					.0171								
6.0	3					.0171								
20.0	3					.0174								
21.0	3						.0207							
25.0	3						.0214							
14.0	3						.0217							
7.0	3							.0285						
17.0	3								.0436					
13.0	3									.0521				
15.0	3									.0523				
1.0	3									.0550	.0550			
24.0	3										.0567			
9.0	3													.0634
Sig.		.153	.050	.068	.056	.097	.542	1.00	1.00	.084	.273			1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้