การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 เพื่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้ง

PROTOPLAST FUSION BETWEEN *Aspergillus oryzae* NRRL 484 AND *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 FOR PRODUCTION OF KOJIC ACID IN STARCH MEDIUM

ฐิติมา ศรีสกุณี
THITIMA SRISAGUNEE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2543

ISBN 974-622-949-4

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 เพื่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้ง

PROTOPLAST FUSION BETWEEN *Aspergillus oryzae* NRRL 484 AND *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 FOR PRODUCTION OF KOJIC ACID IN STARCH MEDIUM

T038536

ฐิติมา ศรีสกุณี

THITIMA SRISAGUNEE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2543

ISBN 974-622-949-4

เบียน 38536
อน, ปี 5 ม.ค. 2544

ลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า กรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PROTOPLAST FUSION BETWEEN *Aspergillus oryzae* NRRL 484 AND *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 FOR PRODUCTION OF KOJIC ACID IN STARCH MEDIUM

THITIMA SRISAGUNEE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN APPLIED BIOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2000

ISBN 974-622-949-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า กรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2000

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง Aspergillus oryzae NRRL 484 และ Aspergillus oryzae TISTR 3086 เพื่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้ง

PROTOPLAST FUSION BETWEEN Aspergillus oryzae NRRL 484 AND Aspergillus oryzae TISTR 3086 FOR PRODUCTION OF KOJIC ACID IN STARCH MEDIUM

ชื่อนักศึกษา นางสาวฐิติมา ศรีสกุณี

รหัสประจำตัว 41065200

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.เนาวรัตน์	ปานแย้ม	
รศ.ดร.ดุษณี	ธนะบริพัฒน์	
ดร.บุญเทียม	พันธุ์เพ็ง	
ผศ.ดร.นวลพรรณ	ณ ระนอง	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 10 สิงหาคม 2543 **เวลา** 14.00 น. **เป็นต้นไป**

สถานที่สอบ ณ ห้อง 424 ห้องประชุม-สัมมนา

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.บุญวัฒน์ อัตชู)

รักษาราชการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 30 **เดือน** ส.ค. **พ.ศ.** 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 เพื่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้ง
ชื่อนักศึกษา	นางสาวฐิติมา ศรีสกุณี
รหัสประจำตัว	41065200
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2543
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

โปรโตพลาสต์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 เตรียมได้จากการบ่มสปอร์ที่กำลังงอกอายุ 12 ชั่วโมง ในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่ประกอบด้วยไลซิ่งเอนไซม์ 20 มก./มล. และ 0.6 M KCl ใน 0.01 M phosphate buffer pH 5.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ประมาณ 1.5 x 10^5 โปรโตพลาสต์/สายพันธุ์ ด้วยสารฟิวโซเจนท์ที่ประกอบด้วย 40% Polyethylene Glycol 6000 และ 50 mM $CaCl_2.2H_2O$ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาบ่มในอาหาร Regeneration medium เป็นเวลา 1-2 วัน ทำการคัดเลือกเชื้อลูกผสมในอาหาร Starch agar พบว่ามีเชื้อลูกผสม 3 สายพันธุ์จากเชื้อทั้งหมด 198 สายพันธุ์ที่แสดงลักษณะการผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด คือได้ 4.72 กรัม/ลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ในอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วยแป้งข้าวโพด 80 กรัม/ลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัม/ลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม/ลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม/ลิตร พีเอช 6.0 ทำการทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์เชื้อราลูกผสม พบว่าเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ยังสามารถผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้หลังจากถ่ายเชื้อครบ 5 ครั้งในอาหาร Starch agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	PROTOPLAST FUSION BETWEEN *Aspergillus oryzae* NRRL 484 AND *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 FOR PRODUCTION OF KOJIC ACID IN STARCH MEDIUM
Student	Miss Thitima Srisagunee
Student ID.	41065200
Degree	Master of Science
Programme	Master of Science in Biotechnology
Year	2000
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Nuanphan Naranong

ABSTRACT

Protoplasts of *Aspergillus oryzae* NRRL 484 and *A. oryzae* TISTR 3086 were prepared from 12 hr-germling spores by incubating in Lysing enzymes solution containing 20 mg/ml. Lysing enzymes and 0.6 M KCl in 0.01 M phosphate buffer pH 5.5 . Fusion of both protoplasts (1.5×10^5) were induced by the fusion solution (fusogen) containing 40% Polyethylene glycol 6000 (PEG) and 50 mM $CaCl_2.2H_2O$ for 20 min at room temperature. All fusants were regenerated in Regeneration medium and then incubated at room temperature for 1-2 days. Among 198 strains, 3 fusants were selected for kojic acid production in Starch agar. Optimum conditions for kojic acid production were also studied. An optimized medium contained corn starch, 80.0 g; yeast extract, 5.0 g; $MgSO_4.7\ H_2O$ 0.5 g; KH_2PO_4 1.0 g and pH 6.0. The highest kojic acid concentration of 4.72 g/l was produced by a fusant No. 49 on day 6. Stability of the fusant No. 49 was tested by subculturing 5 times in Starch agar. After the stability test was completed, the fusant No. 49 was still able to produce kojic acid in the optimized medium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดี ด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาเกี่ยวกับวิธีการทดลองและการวิเคราะห์ผลการวิจัย นอกจากนี้ยังรับความเมตตาช่วยอนุเคราะห์ค่าเดินทางและที่พักเพื่อให้มีประสบการณ์เสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จาก ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อจี้ ศรีสกุณี และคุณแม่กมลทิพย์ แซ่ตั้งที่ให้กำลังใจสูงสุดและให้คำปรึกษาในการศึกษาและการดำเนินชีวิตเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านซึ่งเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า อันได้แก่ รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม และ ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง

ขอขอบคุณ นายสมยศ เกียรติวนิชวิไล นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า สาขาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ช่วยให้คำปรึกษา เป็นกำลังใจ และเรียบเรียงจัดพิมพ์เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณศูนย์ทดสอบผลิตภัณฑ์ไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์ ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่พิมพ์รายงานวิจัย

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการศึกษา (ทุนงบประมาณประจำปีการศึกษา 2541) ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ และทุนเฉพาะค่าลงทะเบียนไปเสนอผลงานวิชาการที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

สุดท้ายขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์นี้ คุณค่า ประโยชน์ และกุศลอันพึงได้จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ฐิติมา ศรีสกุณี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญรูป.....VIII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 กรดโคจิก.....3

2.1.1 คุณสมบัติของกรดโคจิก.....3

2.2 การผลิตกรดโคจิก.....4

2.2.1 เชื้อจุลินทรีย์.....4

2.2.2 การสังเคราะห์กรดโคจิก.....6

2.2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก.....8

2.2.4 ประโยชน์ของกรดโคจิก.....11

2.3 โปรโตพลาสต์.....12

2.3.1 การเตรียมโปรโตพลาสต์.....13

2.3.2 ไลติกเอนไซม์.....15

2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างโปรโตพลาสต์.....16

2.4 เทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์.....19

2.4.1 การใช้สารเคมี.....20

2.4.2 การใช้กระแสไฟฟ้า.....21

2.5 การรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสต์.....23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 วิธีคัดเลือกลูกผสม.....23

2.6.1 การทำออโซโทรปมิวแตนท์.....23

2.6.2 การต้านทานยาปฏิชีวนะ.....24

2.6.3 การทำให้โปรโตพลาสต์ไม่แอคทีฟ.....24

2.6.4 การแยกนิวเคลียส.....24

2.6.5 การย้ายไมโตคอนเดรียและการรวมโปรโตพลาสต์ของไมโตคอนเดรีย.24

2.6.6 การดูสีของสปอร์.....24

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....26

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....26

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์.....26

3.1.2 สารเคมี.....26

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....27

3.2 วิธีการวิจัย.....27

3.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์และสารแขวนลอยสปอร์.....27

3.2.2 การเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์แบบเขย่า.....28

3.2.3 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086.....28

3.2.4 การเตรียมโปรโตพลาสต์จากเชื้อรา.....28

3.2.5 การรวมโปรโตพลาสต์.....30

3.2.6 การรีเจนเนอเรท.....31

3.2.7 การคัดเลือกเชื้อราลูกผสม.....31

3.2.8 การผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว.....32

3.2.9 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก.....32

3.2.10 การศึกษาความเสถียรของสายพันธุ์เชื้อลูกผสม.....32

3.3 วิธีการวิเคราะห์.....33

3.3.1 การวิเคราะห์กรดโคจิก.....33

3.3.2 การวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส.....33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง 34

4.1 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ในการผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลส 34

4.1.1 ความสามารถในการผลิตกรดโคจิก 34

4.1.2 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส 34

4.2 การเตรียมโปรโตพลาสต์.....37

4 .2.1 การศึกษาส่วนของเชื้อราที่เหมาะสมต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์.....37

4.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์ 38

4.3 การรวมโปรโตพลาสต์.....43

4.4 คัดเลือกเชื้อราลูกผสม 44

4.5 การผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว 48

4.6 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก 51

4.6.1 ศึกษาความเข้มข้นของแป้ง ผลของยีสต์สกัดและแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน.....51

4.6.2 ศึกษาชนิดของแป้ง 56

4.7 การศึกษาความเสถียรของสายพันธุ์เชื้อราลูกผสม 59

4.7.1 การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อรา 59

4.7.2 การผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว 61

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....65

5.1 สรุปผลการทดลอง.....65

5.2 ข้อเสนอแนะ.....66

บรรณานุกรม 67

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....71

ภาคผนวก ข สารเคมี.....74

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์.....76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ง องค์ประกอบแป้งชนิดต่างๆ.....80
ภาคผนวก จ ข้อมูลผลการทดลอง..... ...84
ภาคผนวก ฉ ตารางค่าทางสถิติ..... 93
ประวัติผู้เขียน 101

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิก 9

2.2 แสดงองค์ประกอบผนังเซลล์ของเชื้อรากลุ่มต่างๆ 14

2.3 แสดงองค์ประกอบหลักที่เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ของผนังเซลล์เชื้อรา.....14

2.4 แสดงสารละลายที่นิยมใช้เป็นสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์สำหรับเชื้อรา.....17

2.5 แสดงสภาวะที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเชื้อรา *Aspergillus* spp. 18

2.6 แสดงการรวมโปรโตพลาสต์แบบใช้สารเคมีและการใช้กระแสไฟฟ้าของเชื้อรา ชนิดต่างๆ...22

4.1 แสดงขนาดของสปอร์และโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus. oryzae* TISTR 3086 37

4.2 แสดงผลการทดสอบการผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสในอาหารแข็ง Starch medium ของเชื้อที่ได้จากการรีเจนเนอเรทจำนวน 198 สายพันธุ์.....45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์กับ เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086

1.3.2 ทำการคัดเลือกเชื้อราลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 โดยใช้คุณสมบัติการผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งในอาหารแข็ง

1.3.3 ศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้เชื้อราลูกผสมที่คัดเลือกได้ในระดับฟลาสก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

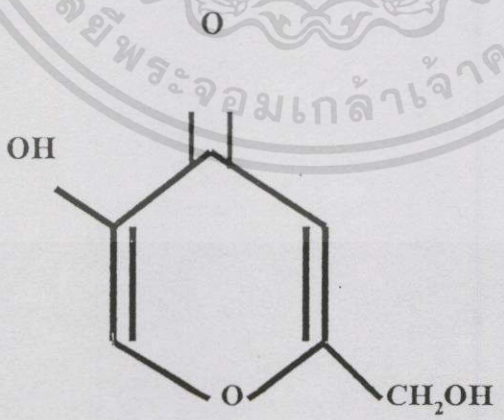
บทที่ 2
หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดโคจิก (Kojic acid)

กรดโคจิก (Kojic acid) มีชื่อทางเคมีว่า 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-γ-pyrone เป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายทุติยภูมิ (secondary metabolism) การค้นพบกรดโคจิกมีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1907 โดย Saito ซึ่งสามารถแยกสารที่มีลักษณะเป็นผลึกได้จากการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *Aspergillus oryzae* บนข้าวนึ่ง (steamed rice) สารนี้มีลักษณะคล้ายกรดเบต้ารีซอร์ซิลคาร์บ็อกซิลิก (β-resorcylcarboxylic acid) ต่อมาในปี ค.ศ. 1913 Yabuta ได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงองค์ประกอบของสารชนิดนี้แล้วจึงตั้งชื่อใหม่เป็น "กรดโคจิก" การสังเคราะห์กรดโคจิกทางเคมีจากน้ำตาลกลูโคสทำสำเร็จในปี ค.ศ. 1930 และได้มีการศึกษาการสังเคราะห์กรดโคจิก คุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพขึ้น (Bajpai *et al.* 1982)

2.1.1 คุณสมบัติของกรดโคจิก

กรดโคจิกเป็นสารประกอบของไพโรน (Pyrone) ที่ขาดกลุ่มคาร์บ็อกซิล โมเลกุลของกรดโคจิกประกอบขึ้นด้วย คาร์บอน 6 ตัว ไฮโดรเจน 6 ตัว และออกซิเจน 4 ตัว ดังนั้นกรดโคจิกมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_6O_4$ (Bajpai *et al.* 1982) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก
ที่มา : Bajpai *et al.* (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bentley (1957) รายงานว่าผลจากการศึกษาทาง X-ray investigation พบว่ากรดโคจิกบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกทรงปริซึมรูปเข็มไม่มีสี ผลึกละลายได้ง่ายในน้ำ (3.95 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส) เอทานอล และอะซีโทน กรดโคจิกมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 142.11 และมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 153-154 องศาเซลเซียส การทำให้กรดโคจิกบริสุทธิ์ทำได้โดยการตกผลึกซ้ำ (Recrystallization)ในอะซีโตน เอทานอล-อีเทอร์ เมทานอล และเอทิลอะซีเตต หรือการทำให้บริสุทธิ์ภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 150-200 องศาเซลเซียส

2.2 การผลิตกรดโคจิก

2.2.1 เชื้อจุลินทรีย์

Bajpai *et al.* (1982) รายงานว่ากรดโคจิกเริ่มผลิตครั้งแรกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* และต่อมาได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้เชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆดังนี้คือ *A. oryzae, A. gymnosardae, A. flavus, A. awamori, A. clavatus, A. fumigatus, A. giganteus, A. albus, A. nidulans, A. parasiticus, A. effusus, A. tamarii, A. luteovirescens, A. lutescens, A. wentii* และ *A. alliaceus* เป็นต้น

กรดโคจิกส่วนมากผลิตจากเชื้อราโดยใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน และเชื้อต้องการอากาศในการเจริญ (Bentley. 1957) ในปี ค.ศ. 1966 Parrish ทำการศึกษาการผลิตสารอะฟลาทอกซิน และกรดโคจิกจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* โดยทำการศึกษาสายพันธุ์ของ *Aspergillus* ได้แก่ *A. clavatus, A. effusus, A. flavus, A. fumigatus, A. nidulans, A. oryzae, A. parasiticus, A. tamarii,* และ *A. ustus* พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดโคจิก และมีเชื้อรา 2 สายพันธุ์ที่ผลิตอะฟลาทอกซิน คือ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ส่วนสายพันธุ์ของ *Penicillium* ที่ทำการศึกษาได้แก่ *P. citrinum, P. griseofulvum, P. purpruogenum* และ *P.rubrum* พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ผลิตกรดโคจิกได้ และไม่มีสายพันธุ์ใดที่ผลิตสารอะฟลาทอกซินเลย ดังนั้นจึงสรุปว่าทุกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกได้ไม่จำเป็นต้องผลิตสารอะฟลาทอกซินได้ทั้งหมด

Bassapa *et al.* (1970) พบว่าการสังเคราะห์กรดโคจิกและสารอะฟลาทอกซินมีวิถีการสังเคราะห์แยกออกจากกันและกรดโคจิกไม่เป็นสาร intermediate ที่เกิดขึ้นระหว่างการสังเคราะห์สารอะฟลาทอกซินโดยการทดลองได้ใช้เซลล์ระยะพักตัว(resting cells)ของเชื้อ *Aspergillus flavus* และได้ทำการทดสอบโดยใช้ ดี-ไซโลส และ เอทานอล เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกรดโคจิกเกิดขึ้นแต่ไม่มีสารอะฟลาทอกซินเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตกรดโคจิกและอะฟลาทอกซินนั้นขึ้นกับปัจจัยต่างๆได้แก่ อุณหภูมิ ค่าพีเอช อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวหน้าต่อปริมาตร (surface-volume ratio) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และองค์ประกอบของสารอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tadera *et al.* (1985) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *A. oryzae* K, *A. oryzae* IAM 2024, *A. oryzae* IFO 5239, *A. flavus* IAM 2001 และ *A. tamarii* IFO 4099 พบว่า *A. flavus* IAM 2001 สามารถผลิตกรดโคจิกได้มากที่สุดเท่ากับ 17.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เปปโทน 6 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 กรัมต่อลิตร เฟอริกคลอไรด์ 0.01 กรัมต่อลิตร และไซคาซิน 2 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.5

Kwak and Rhee (1992a) ได้ทำการปรับปรุงการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเส้นใยของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 30 ที่ประกอบด้วย แมงกานีสซัลเฟตร้อยละ 2 เฟอรัสซัลเฟตร้อยละ 2 และซิงค์ซัลเฟตร้อยละ 3 จากนั้นปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.0 ด้วย 2N NaOH พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 สามารถผลิตกรดโคจิกได้ นอกจากนี้พบว่าแหล่งไนโตรเจนและขนาดของเซลล์ที่ถูกตรึงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตกรดโคจิก ขนาดของเซลล์ที่ถูกตรึงมีผลต่อการผลิตกรดโคจิก โดยเซลล์ที่ถูกตรึงที่มีขนาดเล็กจะมีการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงที่มีขนาดใหญ่ และพบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน

ต่อมา Kwak and Rhee (1992b) ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยการเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจีเนต กับการเพาะเลี้ยงเส้นใยโดยตรงในอาหารเหลว พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบตรึงเซลล์สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเส้นใยโดยตรงในอาหารเหลว โดยการเพาะเลี้ยงแบบตรึงเซลล์จะผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 22 วัน ขณะที่การเพาะเลี้ยงเส้นใยโดยตรงในอาหารเหลวผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 25 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน

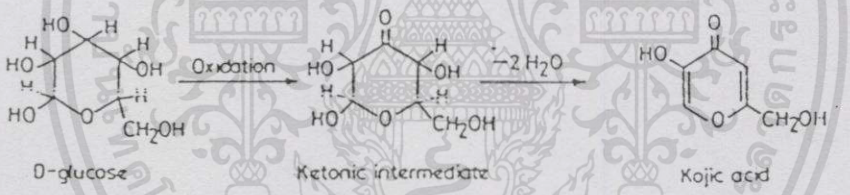
ในปี ค.ศ. 1995 Ogawa *et al.* ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเลี้ยงบนเมมเบรน (Membrane-Surface Liquid Culture : MSLC) ในอาหาร 1 ลิตร ที่มีองค์ประกอบคือ กลูโคส 100 กรัม ยีสต์สกัด 0.5-1.0 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัม และเฟอรัสซัลเฟต 0.01 กรัม ที่พีเอช 6.0 จากการทดลองเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยการเลี้ยงบนเมมเบรนกับการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า พบว่าการเลี้ยงบนเมมเบรนผลิตกรดโคจิกได้มากกว่าการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าโดยการเลี้ยงบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมมเบรนพบกรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าได้กรดโคจิกสูงสุดเพียง 20.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิก โดยเลี้ยงบนเมมเบรนที่มีกระบวนการหมักแตกต่างกัน 3 แบบคือ การหมักแบบแบตช์ (Batch MSLC) การหมักแบบกึ่งแบตช์ซึ่งมีการเติมสารอาหารลงไปโดยไม่มีการถ่ายออก (Fed batch MSLC) และการหมักแบบกึ่งแบตช์ที่มีการเติมอาหารซ้ำ (Repeated fed batch) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า พบว่าการหมักแบบกึ่งแบตช์ที่มีการเติมอาหารซ้ำให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 14.2 กรัมต่อลิตรต่อวัน และการเลี้ยงแบบเขย่าให้ปริมาณกรดโคจิกน้อยที่สุดเท่ากับ 1.6 กรัมต่อลิตร

2.2.2 การสังเคราะห์กรดโคจิก

กรดโคจิกมีโครงสร้างคล้ายกับสารโมโนแซ็กคาไรด์เนื่องจากสังเคราะห์ได้จากน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) การสังเคราะห์เริ่มจากกลูโคสถูกออกซิเดชันเป็นสารคีโตนิกอินเทอร์มิเดียด จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกโดยการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 2.2

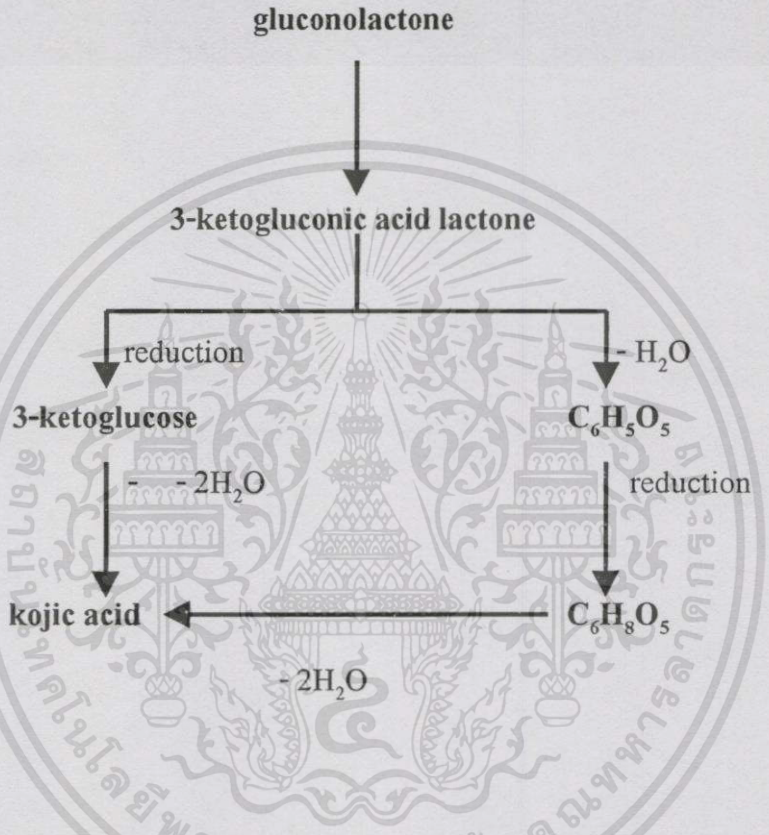


รูปที่ 2.2 แสดงการสังเคราะห์กรดโคจิกจากกลูโคส
ที่มา : Bajpai *et al.* (1982)

ในปี ค.ศ. 1953 Arnteins and Bentley รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นสารเริ่มต้น ในกระบวนการผลิตกรดโคจิกจากการเปลี่ยนกลูโคสเป็นสาร 3-คีโทกลูโคส (3-ketoglucose) โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็นกรดโคจิกโดยเกิดการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุล นอกจากนั้นยังพบว่า กลูโคโนแล็กโทน (gluconolactone) เป็นสารเริ่มต้นในกระบวนการผลิตกรดโคจิกได้ โดยการเปลี่ยนไปเป็น 3-คีโตกลูโคนิกแอซิด แล็กโทน (3-ketogluconic acidlactone) แล้วจึงจะเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกได้ 2 ทางคือ วิถีที่ 1 เปลี่ยน 3-คีโตกลูโคนิกแอซิด -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

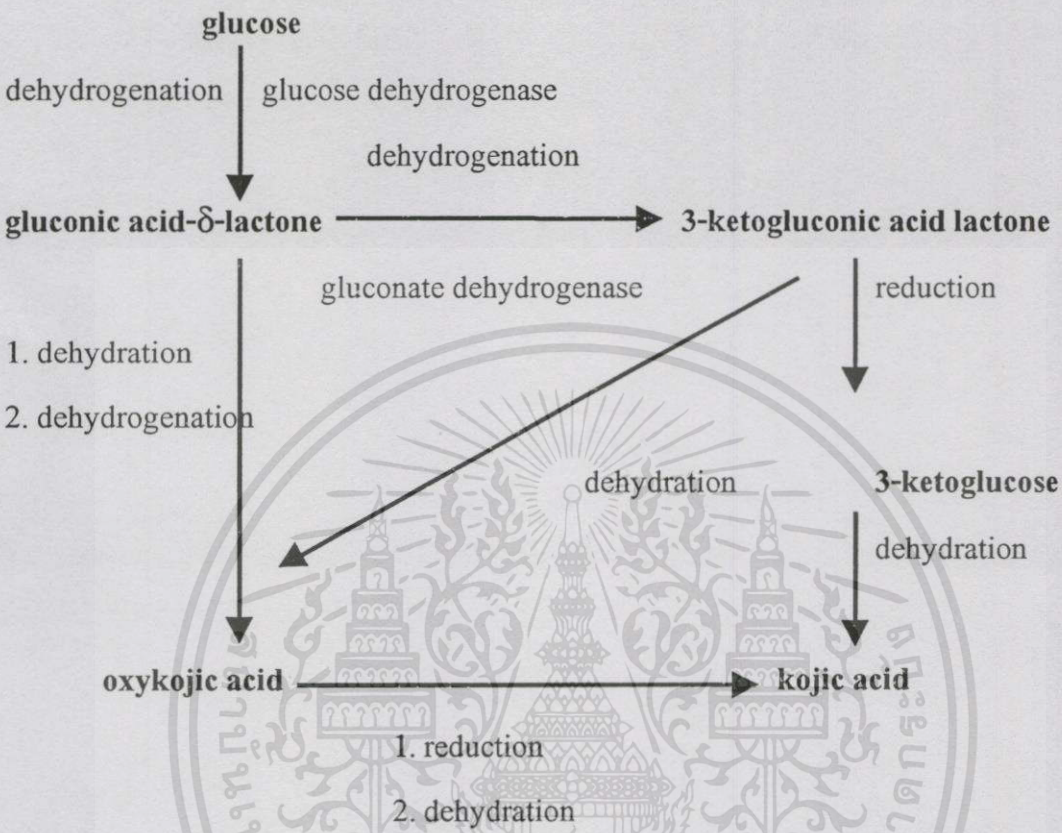
แล็กโทน เป็น 3-คีโตกลูโคส ก่อนแล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิก วิถีที่ 2 สาร 3-คีโตกลูโคนิกแอซิด แล็กโทน จะถูกกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 1โมเลกุล โดยการเกิดรีดักชันและเกิดการกำจัดโมเลกุลของน้ำอีก 1 โมเลกุล ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงแผนภาพกระบวนการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแล็กโทน
ที่มา : Arnteins and Bentley (1953)

ในปี ค.ศ. 1981 Bajpai *et al.* ได้ทำการศึกษาถึงวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นจากเชื้อ *Aspergillus flavus* สายพันธุ์บี ซึ่งพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการผลิตกรดโคจิก ได้แก่ เฮกโซไคเนส (hexokinase) กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 6-ฟอสเฟตกลูโคเนต ดีไฮโดรจีเนส (6-phosphategluconate dehydrogenase) กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) และกลูโคเนต ดีไฮโดรจีเนส (gluconate dehydrogenase) เอนไซม์ดังกล่าวสัมพันธ์กับกระบวนการผลิตกรดโคจิกดังแสดงในรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงแผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *A. flavus* สายพันธุ์บี

ที่มา : Bajpai *et al.* (1981)

2.2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก

2.2.3.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสังเคราะห์เซลล์ กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน และต้องเลือกใช้แหล่งคาร์บอนให้เหมาะสม (Stanbury *et al.* 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิก

จำนวนอะตอมคาร์บอน	สารประกอบ
2	เอทานอล ไกลซีน โซเดียมอะซีเตต
3	1,3-ไดไฮดร็อกซี-2-โพรพาโนน กลีเซอรัลดี-ไฮด์ กลีเซอรอล โซเดียมอะซีเตต โซเดียมไพรูเวต
4	กรดทาร์ทาริก
5	ไรบิทอล อะราบิโนส ไซโลส
6	2-ดีอ็อกซีกลูโคส ฟรักโทส กาแลกโทส กรดกลูโคนิก กลูโคโนแล็กโทน กลูโคส อิ-โนซิทอล ซอร์บิทอล
7	กรดคิวนิก กรดชิกิมิก
12	กรดแลกโตบิโนิก แล็กโทส มอลโทส ซูโครส ทรีฮาโลส
18	แรฟฟีโนส
6n	เด็กซ์ตริน อินูลิน เปปติน แป้ง

ที่มา : Bajpai *et al.* 1982

ในปี ค.ศ. 1929 Challenger *et al.* ได้ทำการศึกษาการใช้น้ำตาล 3 ชนิดคือ อะราบิโนส ไซโลส และกลูโคส ในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* โดยใช้ปริมาณร้อยละ 10 เป็นส่วนประกอบในอาหาร K (Kinoshita's basal salt medium : K medium) ประกอบด้วย โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมไนเตรต 0.4 กรัมต่อลิตร

May *et al.* (1931) ทำการศึกษาความเข้มข้นทางน้ำตาลเด็กซ์โทรสที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ดังนี้คือร้อยละ 10, 15, 20, 30 และ 40 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร และ แอมโมเนียมไนเตรต 1.125 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลเด็กซ์โทรสร้อยละ 20 ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดร้อยละ 48.2 Bentley (1957) ได้นำสูตรอาหารดัดแปลงของ Czapek-Dox liquid medium มาเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* เพื่อผลิตกรดโคจิกโดยมีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกรดโคจิกเกิดขึ้น 7-12 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี ค.ศ. 1991 Wei *et al.* ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus candidus* ATCC 44054 ในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ อาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek-Dox liquid medium ซึ่งใช้กลูโคสร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน อาหารของ Tadera ซึ่งใช้กลูโคสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน และอาหาร Yeast Extract Sucrose (YES) ซึ่งใช้ซูโครสร้อยละ 20 เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที พบว่าผลิตกรดโคจิกสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YES ได้ 57-59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7-9 วัน และไม่พบสารอะฟลาทอกซินเกิดขึ้น

Rosfarizan *et al.* (1998) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อราจากธรรมชาติที่สามารถผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยทำการทดลองคัดเลือกเชื้อราที่สามารถเจริญในอาหารที่มีแป้ง(*soluble starch*) จากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ดอกไม้ อาหารหมัก ผลไม้ น้ำพุร้อนและดิน แล้วจึงนำเชื้อที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงในอาหารสำหรับสร้างกรดโคจิก ผลการทดลองพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ S33-2 ซึ่งแยกจากดอกไม้ morning glory flower ซึ่งเป็นไม้เถาชนิดหนึ่งตระกูลผักบุ้งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bixa orellana* สามารถเจริญบนอาหารแป้งและสร้างกรดโคจิกได้เป็นปริมาณมาก เมื่อนำเชื้อ S33-2 ไปจัดจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็น *Aspergillus flavus* หลังจากทดลองเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆกันได้แก่ แป้งสาคู แป้งมันฝรั่ง และแป้งข้าวโพด พบว่าเชื้อ S33-2 สามารถเจริญได้ดีในแป้งทุกชนิดแต่สร้างกรดโคจิกได้ดีที่สุดในแป้งข้าวโพดซึ่งให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 12.8 กรัมต่อลิตรในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้แป้งข้าวโพด 75 กรัมต่อลิตร

2.2.3.2 แหล่งไนโตรเจน

ในการผลิตกรดโคจิกแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ มาจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ และอนินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ได้แก่ เปปโทน ยีสต์สกัด และทริปโทน ส่วนแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ได้แก่ เกลือแอมโมเนียม และเกลือไนเตรต เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรต เป็นต้น เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มีราคาสูง ดังนั้นจึงมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแทน จากการผลิตกรดโคจิกส่วนมากใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนหรือมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์อื่น ในการผลิตกรดโคจิกจากอาหารสูตรดัดแปลงของ Czapek-Dox liquid medium ซึ่งมีส่วนประกอบของยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 และแอมโมเนียมไนเตรตร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งไนโตรเจน (Bentley. 1957)

ในปี ค.ศ. 1931 May *et al.* ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ที่อุณหภูมิ 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.75 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรต 0.7 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือร้อยละ 18.6 จากนั้นทำการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต 7 ระดับ คือ 0.142, 0.281, 0.563, 0.75, 1.125, 2.250 และ 4.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตเข้มข้น 0.563 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดร้อยละ 30.2

ในปี ค.ศ. 1995 Ogawa *et al.* ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนเมมเบรนหรือวิธี MSLC เปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า เมื่อใช้ยีสต์สกัดที่มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้ คือร้อยละ 0.05, 0.10, 0.25, 0.5 และ 0.1 เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเลี้ยงเชื้อราบนเมมเบรนให้กรดโคจิกสูดสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 จากการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.05-1.0 พบว่าในอาหารที่มียีสต์สกัดร้อยละ 1.0 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 20.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 12 และใช้ยีสต์สกัดร้อยละ 0.25 ให้กรดโคจิกสูงสุด 20.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 9

2.2.4 ประโยชน์ของกรดโคจิก

2.2.4.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

Wei *et al.* (1991) พบว่ากรดโคจิกสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลหรือปฏิกิริยาบราวนิ่ง (browning reaction) ซึ่งเกิดขึ้นในผัก ผลไม้ที่มีรอยตำหนิเสียหายที่เกิดจากรอยช้ำ รอยปอกหั่นหรือแช่แข็งบริเวณที่เสียหายเมื่อถูกอากาศจะเกิดเป็นสีน้ำตาลขึ้น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลนี้เป็นกลุ่มของเอนไซม์ ซึ่งเรียกชื่อรวมว่าฟีนอลเลส (phenolase) ดังนั้นกรดโคจิกสามารถยับยั้งการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ฟีนอลเลสทำให้สีน้ำตาลเกิดขึ้นช้าลง

2.2.4.2 ใช้ในเครื่องสำอาง

Ohyama and Mishima (1990) รายงานว่า มีการนำกรดโคจิกมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง โดยกรดโคจิกทำหน้าที่ขัดผิวหรือทำให้ผิวขาวขึ้นและสามารถป้องกันแสงอัลตราไวโอเลตจากแสงแดด Nakagawa and Kawai (1995) รายงานว่ามีการทดลองนำกรดโคจิกร้อยละ 1 เป็นส่วนผสมลงในผลิตภัณฑ์บำรุงรักษาผิว (skin care product) เพื่อให้กรดโคจิกทำหน้าที่เป็นตัวเปลี่ยนเม็ดสีผิว (skin-depigmenting) พบว่าทำให้ผิวขาวขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4.3 ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

Bajpai *et al.* (1982) รายงานว่า กรดโคจิกมีคุณสมบัติคล้ายแทนนิน (tannin) ซึ่งมีอยู่ทั่วไปในพืชและส่วนใหญ่เป็นพวกไกลโคไซด์ (glycoside) มีมากในเปลือกต้นโอ๊กและต้นฝาง มีความสามารถในการฟอกหนังได้โดยทำหน้าที่ในการตกตะกอนโปรตีนและอัลคาลอยด์

2.2.4.4 มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

Kayahara *et al.* (1990) รายงานว่ากรดโคจิกสามารถต้านทานกิจกรรมของแบคทีเรียพวก *Staphylococcus aureus* 209 P ต่อมาพบว่า กรดโคจิกสามารถต้านการเจริญของราพวก *Pythium graminicola, Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำลายเมล็ดธัญพืช

2.2.4.5 มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ

ในปี ค.ศ. 1913 Yabuta รายงานว่ากรดโคจิกร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1945 Morton *et al.* ได้ทำการศึกษาการใช้กรดโคจิกความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบแบคทีเรีย 166 สายพันธุ์ พบว่ามีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus mycoides, Chromobacterium indicum, Clostridium novyi, Micrococcus roseus, Salmonella enteritidis* และ *Serratia marcescens* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ เมื่อใช้กรดโคจิกเข้มข้นในอัตราส่วน 1 ใน 500 ส่วน ต่อมามีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งเชื้อ *Leptospira canicola* อย่างสมบรูณ์เมื่อมีกรดโคจิกเพียง 1 ในล้านส่วน เป็นต้น ต่อมามีรายงานว่า กรดโคจิกสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแกรมบวก Minami. (1994) รายงานว่าการใช้กรดโคจิกเป็นส่วนผสมในสารทำลายแมลงพวก นิโคทีน (nicotine insecticides) โดยทำการทดสอบกับหนอน 2 ชนิด คือพวก *Diaphania hyalinata* L. และ *Prodenia eridania* Cram. โดยกรดโคจิกไม่เป็นสารพิษ และไม่เป็นอันตรายต่อพืช ในการทดลองจะใช้ร่วมกับสารพิษนิโคทีนโดยใช้ นิโคทีนซัลเฟตไพโรไฟไลด์ (Nicitine sulphate pyrophyllite) ร้อยละ 5 นิโคทีนเบนโทไนด์ (nicotine-bentonite) ร้อยละ 5 และกรดโคจิกร้อยละ 5 จากการศึกษาพบว่ายากำจัดแมลงสามารถควบคุมแมลงที่เป็นศัตรูพืชให้น้อยลง โดยทำให้แมลงตายหรือเป็นโรค

2.2.4.6 เป็นส่วนผสมในยาสลบ

ได้มีการนำกรดโคจิกมาใช้บรรเทาอาการปวดและป้องกันการอักเสบของแผล (Kayahara *et al.* 1990)

2.3 โปรโตพลาสต์ (Protoplast)

การสร้างโปรโตพลาสต์ของเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (filamentous fungi) มีรายงานครั้งแรกโดย Peberdy (1971) ในปี พ.ศ. 2536 สาวิตรี ลิ่มทอง รายงานว่าโปรโตพลาสต์ หมายถึง โครง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างที่ได้จากเซลล์พืชหรือจุลินทรีย์ซึ่งปราศจากผนังเซลล์ (cell wall) เนื่องจากได้แยกหรือทำลายผนังเซลล์โดยวิธีกลหรือการใช้เอนไซม์ โครงสร้างดังกล่าวจึงล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) โปรโตพลาสต์มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ปกติเมื่อศึกษาทางสรีรวิทยาพบว่าอัตราการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนเท่ากับในเซลล์ปกติ แต่การสังเคราะห์ DNA เท่ากับครึ่งหนึ่งของที่ตรวจพบในเซลล์ปกติ โปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ (cell wall regeneration) เป็นเซลล์ที่เจริญและแบ่งเซลล์ต่อไป

โปรโตพลาสต์ของจุลินทรีย์ใช้ประโยชน์สำหรับงานวิจัยหลายด้าน เช่น ใช้ในการศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ การเจริญของเยื่อหุ้มเซลล์ โครงสร้างละเอียดของออร์กาเนล (ultrastructure of organelles) และการสังเคราะห์ออร์กาเนลต่างๆ ต่อมามีการศึกษาโปรโตพลาสต์ของเชื้อราเพื่อใช้ในการศึกษาสรีรวิทยา (physiology) และใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการศึกษาพันธุกรรม (genetic tools) เช่น การปรับปรุงเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) นอกจากนี้ยังพัฒนาวิธีการถ่ายโอนยีน (genetic transformation) ของโปรโตพลาสต์โดยผ่านทาง DNA ด้วย (สาวิตรี ลิ่มทอง 2536 ; Arora *et al.* 1992)

นอกจากนี้ สาวิตรี ลิ่มทอง (2536) ยังรายงานว่าการส่งเสริมให้เกิดการรวมกันของยีน (genetic recombination) โดยนำโปรโตพลาสต์ของเซลล์เหล่านั้นมาเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกันเป็นผลให้สารพันธุกรรมทั้งหมดภายในโปรโตพลาสต์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ (parental strains) เข้ามาอยู่ในโปรโตพลาสต์เดียวกัน ทำให้ยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจจากสายพันธุ์ต่างๆ เข้าไปอยู่รวมกันในโปรโตพลาต์เดียวกันซึ่งสามารถเปลี่ยนกลับเป็นเซลล์และเพิ่มจำนวนตามปกติได้

2.3.1 การเตรียมโปรโตพลาสต์

เชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใยผนังเส้นใยประกอบด้วยองค์ประกอบหลายชนิด ได้แก่ ไคติน เซลลูโลส กลูแคน แมนแนนและโปรตีน เป็นต้น ชนิดและปริมาณองค์ประกอบแต่ละชนิดอาจแปรผันตามชนิดของเชื้อรา ดังแสดงในตารางที่ 2.2 การแยกโปรโตพลาสต์จากเชื้อราต้องมีการย่อยสลายองค์ประกอบส่วนที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมีปริมาณสูงคือมีประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ นอกจากนั้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในเชื้อราชนิดต่างๆยังมีชนิดและปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.3 ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายผนังเซลล์ (lytic enzyme) ที่ใช้จำเป็นต้องมีองค์ประกอบหลายชนิดที่สอดคล้องกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรากลุ่มต่างๆ

กลุ่มเชื้อรา (Taxonomy groups)	องค์ประกอบที่มีลักษณะเป็นเส้น (Fibrous polymers)	องค์ประกอบที่มีลักษณะคล้ายเจล (Gel-like polymers)
Basidiomycetes	Chitin	Xylomannoproteins
	β-(1-3), β-(1-6)-glucan	α-(1-3)-glucan
Ascomycetes	Chitin	Galactomannoproteins
	β-(1-3), β-(1-6)-glucan	α-(1-3)-glucan
Zygomycetes	Chitin	Polyglucuronic acid
	Chitosan	Glucuronomannoproteins
		Polyphosphate

ที่มา : Neil *et al.* (1995)

ตารางที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบหลักที่เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ของผนังเซลล์เชื้อรา

ชนิดของสารพอลิแซ็กคาไรด์	ชื่อสามัญ (Generic name)	หน่วยย่อย (Sugar units)	ชนิดของพันธะไกลโคซิดิก
Neutral	β-glucans	Glucose	β-(1-3), (1-6)
	Mannans	Mainly mannose	α-(1-2) , α-(1-3), α-(1-6), β-(1-2)
	Chitin	GlcNAc	β-(1-4)
	α-glucans	Glucose	α-(1-3)
	Cellulose	Glucose	β-(1-4)
	Hetero-polysaccharides	Several : mannose, glucose, galactse, fructose, rhamnose	Mainly α-bonds
	Nigeran	Glucose	α-(1-3), α-(1-4)
Acidic	Polyuronudes	Glucuronic acids, neutral sugars	α-(1-3), α-(1-4)
Basic	Chitosan	Glucosamine	β-(1-4)
	Polygalacto samono-glycan	Galactosamine	

ที่มา : Esser and Lemke (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมโปรโตพลาสต์เป็นการแยกหรือทำลายผนังเซลล์ออกไปโดยใช้วิธีกลหรือการใช้เอนไซม์

2.3.1.1 วิธีกล (mechanical method) หรือวิธีไม่ใช้เอนไซม์ (non-enzymatic method) เช่นการนำเซลล์ไปเขย่ากับลูกแก้วเพื่อทำลายผนังเซลล์ และการใช้เสียงที่มีความถี่สูง (ultrasonic) วิธีเหล่านี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากควบคุมยาก และโปรโตพลาสต์ถูกทำลาย (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536)

2.3.1.2 การใช้เอนไซม์ (enzyme method) เป็นการใช้เอนไซม์ที่เรียกว่า ไลติกเอนไซม์ (lytic enzyme) ย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายไป เรียกโครงสร้างที่ปราศจากผนังเซลล์ว่าโปรโตพลาสต์ (protoplast) เมื่อการย่อยผนังเซลล์สมบูรณ์ รูปร่างของเซลล์จะเปลี่ยนไป ในเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (filamentous fungi) โปรโตพลาสต์ที่หลุดออกจากเซลล์เส้นใยจะมีรูปร่างไม่แน่นอนเนื่องจากราเส้นใยมีแวคคิวโอล (vacuole)ใหญ่ แต่โดยทั่วไปโปรโตพลาสต์ที่ได้ค่อนข้างกลม (สุมาลี พิชญางกูร. 2541)

ราเส้นใยสามารถสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศได้จำนวนมาก การแยกโปรโตพลาสต์จะยุ่งยากกว่าจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นสปอร์เดี่ยว การแยกโปรโตพลาสต์ อาจทำได้จากส่วนต่างๆดังนี้ (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536)

(1) เส้นใย (mycelium) โดยอาจใช้เส้นใยทั้งเส้นโปรโตพลาสต์จะถูกปล่อยออกมาจากส่วนปลายของเส้นใย (hyphal tip) เส้นใยที่ใช้ควรมีอายุน้อยเนื่องจากผนังเซลล์ยังไม่แข็งแรง และทำให้ ไลติก เอนไซม์ สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

(2) สปอร์แบบไม่มีเพศ (asexual spores) สปอร์ชนิดนี้สามารถเจริญเป็นเส้นใยได้ โดยควรใช้ สปอร์ที่ยังอ่อนอยู่ (immature spores) หรือสปอร์ที่กำลังงอก (germling spores) ซึ่งมีผนังเซลล์ถูกย่อยสลายผนังเซลล์ได้ค่อนข้างง่าย

2.3.2 ไลติกเอนไซม์ (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536 ; สุมาลี พิชญางกูร. 2541)

ไลติก เอนไซม์ ที่นิยมใช้โดยทั่วไปสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของจุลินทรีย์ มีหลายชนิดดังนี้

2.3.2.1 เอนไซม์จากหอยทาก (Snail enzyme) เป็นเอนไซม์จากน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (gastric juice) ของหอยทาก *Helix pomatia* เมื่อวิเคราะห์พบว่ามีองค์ประกอบเป็น endo-β (1-3) glucanase, endo-β (1-6) glucanase ซึ่งสามารถย่อยสลายกลูแคน เอนไซม์ชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูงกับผนังเซลล์ของยีสต์เกือบทุกชนิด และมีชื่อทางการค้าหลายอย่างได้แก่ helicase, glucanase, sulfatase, และ cytohelicase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.2 เอนไซม์จากแบคทีเรีย ซึ่งเป็นเอนไซม์จาก *Arthrobactor luteus* มีองค์ประกอบเป็น β (1-3) glucanase และ protease

2.3.2.3 เอนไซม์จากเชื้อรา ซึ่งเป็นเอนไซม์จากเชื้อ *Trichoderma harzianum* ประกอบด้วย เอนไซม์หลายชนิดได้แก่ α (1-3) glucan glucanohydrolase, β (1-3) glucan glucanohydrolase, cellulase, xylanase, และ neutral protease เอนไซม์ชนิดนี้มีชื่อทางการค้าหลายชื่อได้แก่ *Trichoderma* enzyme, Mutanase, และ Novozyme 234 เป็นต้น

2.3.2.4 เอนไซม์ผสม เช่น เอนไซม์ผสมระหว่าง chitinase, zymolase และ hemicellulase หรือผสมระหว่าง chitinase, zymolase, และ Novozyme 234 หรือผสมระหว่าง chitinase, zymolase, หรือระหว่าง chitinase กับเอนไซม์จากหอยทาก

2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างโปรโตพลาสต์ (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536 ; สุมาลี พิชญางกูร. 2541)

2.3.3.1 อายุของเชื้อ สำหรับราเส้นใยส่วนใหญ่ใช้เส้นใยที่มีอายุน้อยซึ่งได้มาจากการเลี้ยงในอาหารเหลวและบ่มบนเครื่องเขย่า เนื่องจากผนังเซลล์ของเส้นใยที่อยู่ในระยะ early-exponential phase หรือ mid-exponential phase ซึ่งมีความไวต่อการทำงานของไลติกเอนไซม์มากกว่าเส้นใยของเชื้อราที่มีอายุมาก

2.3.3.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเติมสารบางอย่างลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ทำให้ได้ผนังเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้ผนังเซลล์ถูกย่อยด้วยไลติกเอนไซม์ได้ง่ายขึ้น เช่น การเติมกรดอะมิโนบางชนิด เช่น DL-threonine และ glycine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536) การแยกโปรโตพลาสต์จาก *Aspergillus niger* ที่เลี้ยงใน defined medium ให้ผลผลิตสูงกว่าเมื่อเลี้ยงใน complex medium (Peberdy. 1971)

2.3.3.3 การทำพรีทรีทเมนท์เซลล์ก่อนแยก (pretreatment) การใช้สารบางอย่าง เช่นสารประกอบ thiol ได้แก่ β-Mercaptoethanol, diyhiothreitol และ glutathione ทั้งนี้สารประกอบที่มีกลุ่ม SH ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ในโปรตีนที่ผนังเซลล์ทำให้ ไลติกเอนไซม์ เข้าไปย่อยผนังเซลล์ได้ง่ายขึ้น (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536) นอกจากนี้การใช้ Triton X-100 ผ่านเส้นใยของ *Pythium* ก่อนใช้ไลติกเอนไซม์ ทำให้การแยกโปรโตพลาสต์ทำได้ง่ายขึ้น ทั้งนี้เชื่อว่า triton X-100 ซึ่งเป็นสารซักฟอกชนิดหนึ่ง ไปแยกเอาชั้นของไขมันที่ผนังเซลล์ออกก่อนทำให้เอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยาได้ขึ้น (Peberdy. 1971)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3.4 สารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ (osmotic stabilizer) เมื่อเซลล์เปลี่ยนเป็นโปรโตพลาสต์แล้ว จำเป็นต้องรักษาโปรโตพลาสต์ในสารละลายที่รักษาแรงดันออสโมซีส เนื่องจากโปรโตพลาสต์เป็นโครงสร้างที่แตกง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมซีส สารละลายที่รักษาแรงดันออสโมซีสที่ใช้เก็บรักษาโปรโตพลาสต์มักใช้สารละลายไอโซทอนิก (isotonic solution) หรือสารละลายไฮเปอร์ทอนิก (hypertonic solution) ซึ่งโปรโตพลาสต์จะมีรูปร่างกลมโดยมีลักษณะเด่นในสารละลายไอโซทอนิก และจะเหี่ยวเล็กน้อยในสารละลายไฮเปอร์ทอนิกเนื่องจากมีการเสียน้ำออกจากเซลล์ แต่ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่เปลี่ยนแปลง โดยสารละลายที่ใช้สำหรับรักษาให้โปรโตพลาสต์คงตัวเรียกว่า ออสโมติกสเตบิไลเซอร์ ออสโมติคัม (osmoticum) หรือ ออสโมติแคนท์ (osmoticant) เป็นต้น (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536)

ออสโมติกสเตบิไลเซอร์ มีคุณสมบัติสองประการที่สำคัญ คือไม่เป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์และไม่ลดกิจกรรมของไลติกเอนไซม์ สารที่นิยมนำมาใช้เป็น ออสโมติกสเตบิไลเซอร์ มีหลายชนิด ได้แก่ สารละลายเกลืออนินทรีย์ เช่น NaCl, $MgSO_4$ เป็นต้น และสารละลายของน้ำตาลและสารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น sucrose, glucose, mannitol, sorbitol เป็นต้น (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536) ความเข้มข้นสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ ที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ โดยมากอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.4-0.8 M (Arora *et al.* 1992) สารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่นิยมใช้แสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงสารละลายที่นิยมใช้เป็นสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ สำหรับเชื้อรา

ความเข้มข้นและชนิดของสาร ออสโมติกสเตบิไลเซอร์	เชื้อจุลินทรีย์
0.5 M KCl	*Aspergillus niger*
0.5 M KCl	*Aspergillus* sp.
0.6 M NaCl	*Trichoderma harzianum*
0.6 M NaCl	*Aspergillus awamori* var *kawachi*
0.7 M NaCl	*Penicillium chrysogenum*
0.6 M Sucrose	*Trichoderma harzianum*

ที่มา : สาวิตรี ลิ่มทอง (2536)

2.2.3.5 ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ อุณหภูมิและ พีเอช ซึ่งมีผลต่อกิจกรรมของ ไลติกเอนไซม์ และออสโมติกสเตบิไลเซอร์ การแยกโปรโตพลาสต์จากเชื้อราโดยทั่วไปจะประสบผลสำเร็จเมื่อมี พีเอช อยู่ในช่วง 4.0-8.0 (Arora *et al.* 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 แสดงสภาวะที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเชื้อรา *Aspergillus* spp.

สายพันธุ์จุลินทรีย์	สภาวะในการเลี้ยงจุลินทรีย์ก่อนแยกโปรโตพลาสต์	ไลติกเอนไซม์	ออสโมติกสเตบิไลเซอร์	ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อ การแยกโปร-โตพลาสต์
A. niger	Czapek-Dox medium, 28° C, 24 hrs, shaking	Snail gut enzyme	0.7 M NaCl	31°C, 3-4 hrs, shaking
A. nidulans	SM medium, 29°C,7 days, aeration	Streptomyces lytic enzyme	0.8M NH_4Cl	pH 6.0, 28° C, 2 hrs, shaking
A. nidulans	Vogel's medium N salt, 30°C, 21 hrs., shaking	Streptomyces lytic enzyme	0.4-0.6M NH_4Cl หรือ KCl	0.2 M phosphate buffer, pH 6.4
A. nidulans	Glucose-salts medium	*T. harzianum* lytic enzyme	0.6 M KCl, $MgSO_4$, NH_4Cl	-
A. flavus	Mineral salts medium N + glucose, 30° C,48 hrs, shaking	Streptomyces S4 lytic enzyme	0.8 M NH_4Cl	0.2 M phosphate buffer, 30° C, 2-3 hrs, shaking
A. niger	Potato glucose agar, 27° C	*Trichoderma viride* lytic enzyme +chitinase	0.4 M $MgCl_2$	TES หรือ HEPES buffer, pH 7.0, 40° C, 4-5 hrs.
A. nidulans	Czapek-Dox broth, 30° C, 12-14 hrs.	Trichoderma lytic enzyme + snail gut enzyme	0.5 M $MgSO_4$	0.05 M sodium malate buffer, pH 5.8, 1-2 hrs, shaking
A. nidulans	37° C, 3 days, Pretreatment 2-deoxy-D-glucose	Oerskovai lytic enzyme	0.4 M $(NH_4)_2SO_4$	30° C, 3-4 hrs.
A. nidulans	Yeast extract and Casamino acid, 28° C,	Novozyme 234 + Cellulase CP	0.6 M KCl	0.2 M phosphate buffer, pH 5.8, 28° C, 3 hrs, shaking

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	สภาวะในการเลี้ยงจุลินทรีย์ก่อนแยกโปรโตพลาสต์	ไลติก เอนไซม์	ออสโมติกสเตบิไลเซอร์	ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อ การแยกโปรโตพลาสต์
A. niger	-	Novozyme 234 + Cellulase CP + cereflo	0.6 M KCl	-
A. rugulosus	-	Novozyme 234 + Cellulase CP	0.6 M KCl	-
A. ochraceus	-	Novozyme 234 + Cellulase CP + cereflo	0.6 M KCl	-
A. parasiticus	Glucose-peptone agar medium, 5-6 d, pretreatment β-mercaptoethanal	β-glucuronidase	1.0 M NaCl	0.02 M potassium phosphate buffer, pH 6.2
A. nidulans	0.1 M phosphate buffer, 18° h	Chitinase + β-glucoronidase	0.6 M KCl	pH 5.8, 48 hrs.
A. awamori	Glucose salt medium, 24° C, 12 h	β-glucoronjdase,	0.6 M KCl	18-24 hrs, shaking, PPM medium
A. oryzae	-	*Trichoderma viride* enzyme	1.2 M $MgSO_4$	-

ที่มา : Teruyoshi. (1992) ; Peberdy. (1971)

2.4 เทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion)

การรวมโปรโตพลาสต์เป็นขั้นตอนที่มีการเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์มาหลอมรวมกัน เพื่อนำสารพันธุกรรมจากโปรโตพลาสต์ตั้งแต่ 2 โปรโตพลาสต์ เข้ามาอยู่ด้วยกันทำให้ยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจจากสายพันธุ์ต่างๆเข้าไปอยู่รวมกันในโปรโตพลาสต์เดียว ซึ่งสามารถเปลี่ยนกลับเป็นเซลล์ที่เจริญและเพิ่มจำนวนตามปกติได้ เทคนิคนี้เหมาะสำหรับการสร้างเชื้อลูกผสมของจุลินทรีย์ที่ขาดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่ไม่มีประสิทธิภาพ เนื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการรวมตัวของโปรโตพลาสต์เกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องอาศัย mating type ของคู่เชื้อที่จะนำมาผสมพันธุ์กัน เชื้อลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์อาจเรียกว่า รีคอมบิแนนท์ลูกผสมจากการทำฟิวชั่น (fusion hybrid) ผลผลิตจากการทำฟิวชั่น (fusion product) หรือ ฟิวแซนท์ (fusant) (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536)

การรวมโปรโตพลาสต์ทำได้ 2 วิธี ได้แก่

2.4.1 การใช้สารเคมี (chemical method) เป็นการใช้สารโพลีเอทิลีน ไกลคอล (Polyethylene Glycol: PEG)ร่วมกับการใช้แคลเซียมไอออน (Ca^{++}) ความเข้มข้นต่ำ Kao and Michayluk (1974) พบว่า PEG มีคุณสมบัติเป็น fusing agent คือสารที่ทำให้เกิดการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ Kao and Michayluk (1974) ยังรายงานอีกว่า PEG เป็นสารพอลิเมอร์ที่มีสูตรโครงสร้างเป็น CH_2OH-(CH_2-OCH_2)-CH_2OH มีประจุเป็นลบเล็กน้อย เนื่องจากมีพันธะอีเทอร์ (ether linkage) ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับประจุบวกของน้ำ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และสารอื่นๆ ที่อยู่บนผิวของโปรโตพลาสต์ได้ ดังนั้นจึงตั้งสมมติฐานว่า PEG เป็นตัวเชื่อมโปรโตพลาสต์ให้ติดกัน ส่วน Ca^{++} ทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมระหว่างกลุ่มของโปรตีนที่ผิวของโปรโตพลาสต์ (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536 ; Anne and Peberdy. 1976)

สิ่งที่ควรคำนึงถึงในการใช้ PEG ให้ผลสูงสุดได้แก่ เวลาที่ใช้ PEG ความเข้มข้นที่เหมาะสมและน้ำหนักโมเลกุล สำหรับน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่เหมาะสมสำหรับการเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์ของเชื้อรารวมกันอย่างมีประสิทธิภาพมักใช้ความเข้มข้น 25-30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีประสิทธิภาพสูง และยังพบว่าถ้าความเข้มข้นของ PEG ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ โปรโตพลาสต์ของเชื้อรามักแตก เนื่องจากมีสภาพเป็นสารละลายไฮเปอร์ทอนิก (Anne and Peberdy. 1976)

Stasz *et al.* (1988) ทำการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่างสายพันธุ์ โดยผสมโปรโตพลาสต์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ๆละ 10^4 โปรโตพลาสต์เข้าด้วยกัน และเติม 60% PEG 3350 ที่มี $CaCl_2$ 10 มิลลิโมล ใน Tris HCl 10 มิลลิลิตร พีเอช 7.5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมโดยการหมุนหลอดเบาๆ แล้วเติมอีก 500 ไมโครลิตร และผสมโดยการหมุนหลอดดังกล่าวอีก 2 ครั้งพบว่าทำให้ความถี่ของการรวมโปรโตพลาสต์มีค่าสูงขึ้น 10 เปอร์เซ็นต์

Kirimura *et al.* (1986) ทำการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของ *Aspergillus niger* ต่างสายพันธุ์เมื่อทำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้ 30 PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 และ 6000 ที่มี 0.01 M $CaCl_2$ และ 0.5 M KCl ใน 0.05 M glycine-NaOH buffer พบว่า PEG 6000 มีประสิทธิภาพเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมของโปรโตพลาสต์ได้ดีกว่า

บุษกร สพช่อง และคณะ (2538) ทำการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา *Monasus* sp. สายพันธุ์ KB11304, KB 20M1, KB10M10.2 และ KB10M16 โดยทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมโปรโตพลาสต์โดยใช้ 30 เปอร์เซ็นต์ PEG 6000 พบว่าเกิดการรวมโปรโตพลาสต์อยู่ในช่วง 57-60 เปอร์เซ็นต์

2.4.2 การใช้กระแสไฟฟ้า (Electrofusion) (Rahm *et al.* 1992) เป็นการอาศัยหลักการของ Dielectrophoresis โดยใช้สนามไฟฟ้ากระแสสลับ (non-monogeneous AC electric field) ทำให้โปรโตพลาสต์ที่อยู่ใกล้กันเข้ามาติดกันและต่อกันเป็นสายคล้ายสายไข่มุก (pearl chaining) เมื่อเยื่อหุ้มโปรโตพลาสต์แตะกันแล้ว จึงใช้ไฟฟ้ากระแสตรง (DC voltage) ที่เหมาะสมผ่านเข้าไปเป็นจังหวะๆ ซึ่งจะมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลที่อยู่ทั้งสองด้านของเยื่อหุ้มเซลล์ช่วยทำให้เกิดช่องที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โปรโตพลาสซึมหลอมรวมกันได้ยีโนมของโปรโตพลาสต์ที่หลอมรวมกันจะเข้ามาอยู่ด้วยกัน

ปี ค.ศ. 1993 Rehm *et al.* ได้ศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้ไฟฟ้าเป็นการทำงานร่วมกันของหลักการ Dielectrophoresis และการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าเป็นจังหวะ (transient change) ที่มีต่อความสามารถในการเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane permeability) เมื่อได้รับกระแสไฟฟ้าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์เกิดจากอิทธิพลของกระแสฟฟ้า Zimmermann (1986) ได้ใช้อิทธิพลของกระแสไฟฟ้าที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ชักนำให้เกิดการรวมกันของโปรโตพลาสต์ การศึกษาต่อมาพบว่าการรวมกันจะเกิดขึ้นขณะที่เกิดแยกของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ผันกลับได้ (reversible breakdown) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของชั้นไขมัน(lipid bilayer) ในเยื่อหุ้มเซลล์ การศึกษาใน *Escherichia coli* พบว่าการเปลี่ยนแปลงของขนาดกระแสไฟฟ้ามีปริมาตรเล็กกว่าเมื่อใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าที่มากเกินไป ซึ่งอธิบายได้ว่าการเปลี่ยนแปลงนี้เป็นการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งทำให้เซลล์ตาย แต่เมื่อป้อนไฟฟ้ากระแสตรง (DC pulse) โดยเพิ่มความแรงของ กระแสไฟฟ้าที่พอเหมาะในช่วงเวลา 2-20 ไมโครวินาที เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกเปิดออกโดยไฟฟ้ากระแสตรง (DC pulse) ความเข้มของสนามไฟฟ้าสูง (high intensity) แต่มีช่วงเวลาในการป้อนสนามไฟฟ้าสั้นๆ ก็จะทำให้เกิดการแตกของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ผันกลับได้

Zimmermann. (1986) อธิบายว่าการรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้ PEG มีข้อจำกัดหลายประการดังนี้ สภาวะที่เหมาะสมผันแปรตามสปีชีส์ของเชื้อที่นำหลอมรวมกัน กระบวนการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ ไม่สามารถตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ จำนวนโปรโต-พลาสต์ที่หลอมรวมกันไม่สามารถเลือกได้ ใช้เวลานาน ถูกผสมมีชีวิตรอดลดลง เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงภายใน สารที่ใช้ในการรวม (fusing agent) มีผลต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ และได้ลูกผสมน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 แสดงการรวมโปรโตพลาสต์แบบใช้สารเคมีและการใช้กระแสไฟฟ้าของเชื้อราชนิดต่างๆ

Species	Fusogenic agent	Year
Interspecies		
Candida fennica	PEG	1992
Candida sp.	PEG	1992
Phaffia rhozozyma	PEG	1992
Saccharomyces carlsbergensis	Electrofusion	1992
Saccharomyces cerevisiae	PEG	1992
Alternaria alternata	PEG	1992
Aspergillus niger	PEG	1992
Clavipes purpurea	PEG	1993
Gibberella fujikuroi	PEG	1992
Nectria haematococca	PEG	1992
Penicillium chrysogenum	Electrofusion	1987
Penicillium chrysogenum	PEG	1993
Phytophora megasporma	PEG	1988
Schizophyllum commune	Electrofusion	1987
Trichoderma pseudokoningii	PEG	1992
Endomycopsis fibuligera x *Saccharomyces cerevisiae*	PEG	1993
Saccharomyces uvarum x *Saccharomyces cerevisiae*	PEG	1988
Aspergillus oryzae x *Aspergillus niger*	PEG	1990
Aspergillus niger x *Trichoderma viride*	PEG	1989
Trichoderma longibraniatum x *Phanerchaete chrysosporium*	PEG	1991
Trichoderma reesei x *Trichoderma koningii*	PEG	1984

ที่มา : Esser and Lemke (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสต์ (protoplast regeneration)

โปรโตพลาสต์เป็นโครงสร้างที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้แต่สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ (cell wall regeneration) และกลับกลายเป็นเซลล์ปกติซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้ ดังนั้นหากต้องการนำโปรโตพลาสต์ที่หลอมรวมกันแล้ว (fused protoplast)ไปศึกษาและนำไปใช้ประโยชน์จำเป็นต้องเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ซึ่งปกติทำโดยนำมาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมและบ่มในสภาวะที่เหมาะสม

การอธิบายโอกาสที่โปรโตพลาสต์เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ได้มากหรือน้อยนั้น กำหนดเป็นค่าความถี่ของการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ (Protoplast regeneration frequency) ซึ่งหาได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ความถี่การรีเจนเนอเรท} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ได้}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดหรือจำนวนเซลล์เริ่มต้น}}$$

โปรโตพลาสต์จากเชื้อราจะเปลี่ยนกลับไปเป็นเส้นใยปกติได้ต้องเลี้ยงบนอาหารแข็งและพบว่าอุณหภูมิที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์และอุณหภูมิระหว่างการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์ไปเป็นเซลล์ด้วยเช่นกัน (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536)

2.6 วิธีการคัดเลือกลูกผสม (screen of protoplast fusion product) (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536 ; Rehm *et al.* 1993)

เมื่อนำโปรโตพลาสต์สองชนิดมาทำการรวมกัน โดยการผสมโปรโตพลาสต์ของเชื้อราทั้งสองชนิดจำนวนมาก การรวมกันของโปรโตพลาสต์ไม่สามารถที่จะกำหนดได้ว่าต้องเกิดขึ้นระหว่างโปรโตพลาสต์ต่างชนิดกันเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจมีการรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ของเชื้อต่างชนิดกัน เชื้อชนิดเดียวกัน ดังนั้นจึงต้องมีวิธีการที่เหมาะสมสำหรับแยกโปรโตพลาสต์ที่รวมกันแล้ว (fused protoplast) ประเภทที่เราต้องการแยกออกมาจากโปรโตพลาสต์ประเภทอื่นๆ ได้แก่

2.6.1 การทำออโซโทรปมิวแตนท์ (auxotroph mutants)

เนื่องจากปัญหาสำคัญในการคัดเลือกลูกผสมที่แท้จริงคือการผสมกันเองในสายพันธุ์เดียวกัน วิธีการคัดเลือกจะใช้ minimal medium เป็นอาหารที่ใช้สำหรับคัดเลือก (selective medium) บน minimal medium สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ทั้งสองฝ่ายจะเป็นออโซโทรป (auxotroph) ซึ่งเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อกลายพันธุ์ที่ขาดความสามารถในการสร้างสารอาหารบางอย่าง เช่นกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก วิตามินบางชนิด เป็นต้น จะไม่สามารถเจริญได้แต่ถ้าโปรโตพลาสต์ที่รวมกันแล้วยีนจะเกิดรวมกันได้เป็นสายพันธุ์ prototroph ซึ่งสามารถเจริญได้บน minimal medium

2.6.2 การต้านทานยาปฏิชีวนะ (drug resistance and antibiotic marker)

วิธีนี้จะยอมให้เชื้อลูกผสมอย่างน้อยหนึ่งคู่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม(wild type) เพื่อให้สายพันธุ์ wild type มีความว่องไวต่อสารปฏิชีวนะหรือยาในอาหาร อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการรีเจนเนอเรท ของลูกผสมที่แท้จริงจะประกอบด้วย minimal medium ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะให้เพียงพอเพื่อป้องกันการเจริญของลูกผสมที่ไม่ผสมข้าม (wild type fusion partner)

2.6.3 การทำให้โปรโตพลาสต์ไม่แอคทีฟ (inactive protoplast)

วิธีการนี้มักใช้กับการรวมกันของโปรโตพลาสต์ของแบคทีเรียเป็นการใช้ inactive protoplast เป็นหนึ่งในคู่ที่รวมกันแล้วจากนั้นโครงสร้างหนึ่งในคู่ลูกผสมจะสามารถถูกทำให้ไม่ทำงานหรือถูกทำให้ตายโดยการให้ความร้อนในระยะเวลาสั้นๆ หรือการฉายแสงอัลตร้าไวโอเลต

2.6.4 การแยกนิวเคลียส (isolated nuclei)

เป็นการใช้นิวเคลียสที่แยกได้ แล้วนำไปหลอมรวมกับโปรโตพลาสต์ของสายพันธุ์ออโซโทรปที่ต้องการฮีสติดีน ลิวซีนและยูราซิล ผลที่ได้จากการหลอมรวมกัน คือได้ลูกผสมที่เป็น Heterokaryon และเป็นสายพันธุ์ดิพลอยด์ diploid ที่เสถียร

2.6.5 การย้ายไมโตคอนเดรียและการรวมโปรโตพลาสต์ของไมโตคอนเดรีย

วิธีการนี้ใช้กันอย่างกว้างขวางในการรวมโปรโตพลาสต์ของยีสต์ ทั้งในยีสต์ที่อยู่ภายในสปีชีส์ เดียวกันและภายในสกุลเดียวกัน

2.6.6 การดูสีของสปอร์ (spore color)

มักใช้ในกรณีการหลอมรวมกันของ *Aspergillus* และ *Penicilium* ซึ่งช่วยในการตรวจหาลูกผสมที่แท้จริง แต่วิธีนี้มักมีการใช้ร่วมกับ auxotroph marker ควบคู่กันด้วย

การที่จะระบุว่าโปรโตพลาสต์ของคู่ที่นำมารวมกันนั้นสามารถรวมกันได้มากหรือน้อยนั้นทำโดยหาค่าความถี่ของการรวมกันของโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion frequency) ซึ่งหาได้จากสูตร

$$\text{ความถี่ของการรวมโปรโตพลาสต์} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่รวมกัน}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการคำนวณจากการนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่รวมกันแล้ว หารด้วยจำนวนโปรโต-พลาส์ทั้งหมด วิธีการนี้ต้องทำการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นอกจากนี้สามารถคำนวณความถี่ของการรวมโปรโตพลาสต์ได้อีกวิธีหนึ่ง โดยอาศัยคุณสมบัติของเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ และ เชื้อลูกผสมเอง

$$\text{ความถี่ของการรวมกัน} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบน selective regeneration medium}}{\text{จำนวนโคโลนีบน complete regeneration medium}}$$

การหาความถี่ของการรวมโปรโตพลาสต์วิธีนี้นั้น หาได้จากการคำนวณโดยนับจำนวนโค-โลนีของเชื้อที่ได้จากการทำรีเจนเนอเรทสารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการรวมกันแล้ว บนอาหาร selective regeneration medium ซึ่งโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากการรวมกันของเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่เท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหารนี้ได้ แล้วหารด้วยจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ได้จากการทำรี-เจนเนอเรทสารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการรวมกันแล้ว บนอาหาร complete regeneration medium ซึ่งโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากการรวมกันแล้ว หรือไม่ได้ผ่านการรวมกันก็ตาม สามารถเจริญบนอาหารนี้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยได้แก่ เชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบัน Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกาและเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.)

3.1.2 สารเคมี ได้แก่

กรดโคจิก ของบริษัท Sigma

ทวีน 80 (tween 80) ของบริษัท Fluka

ยีสต์สกัด (yeast extract) ของบริษัท Difco

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท Merck

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท J.B. Baker

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Merck

โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)ของบริษัท Merck

ไลซิ่ง เอนไซม์ (Lysing enzymes) ของบริษัท Sigma

แป้งละลายน้ำได้ (soluble starch) ของบริษัท Fluka

แมกกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Fluka

เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Fluka

ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Fluka

เปปโตน (peptone) ของบริษัท Pronadisa

เด็กซ์ทริน (dextrin) ของบริษัท Merck

แอมโมเนียมไนเตรต ($(NH_4)_2 NO_3$) ของบริษัท Fluka

ไดไฮโดรเจนแอมโมเนียมฟอสเฟต ($H_2NaPO_4.2H_2O$) ของบริษัท Fluka

โมโนไฮโดรเจนแอมโมเนียมฟอสเฟต ($HNa_2PO_4.12H_2O$) ของบริษัท Fluka

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Merck

ซอร์บิทอล (sorbitol) ของบริษัท Merck

เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท Merck

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มอลต์สกัด (malt extract) ของบริษัท Merck

วุ้น (agar)

โพลีเอทิลลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุล 6000 (PEG 6000) ของบริษัท Fluka

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดโคจิก (ภาคผนวก ค)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ค)

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator skaker) ของบริษัท New Brunswick scientific รุ่น INNOVA 4230

เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ของบริษัท Shimadzu รุ่น UV-1601

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettler Toledo รุ่น PG 5002

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettler Toledo รุ่น PG 803

เครื่องวัดพีเอช ของบริษัท Denver Instrument รุ่น 215

เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ของบริษัท Sanyo รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดัน ของบริษัท Harvey รุ่น Hydroclave MC 10

ตู้เขี่ยเชื้อ ของบริษัท ISSCO Larminar flow รุ่น BVT 123

กล้องจุลทรรศน์ ของบริษัท Olympus รุ่น CHS

ไมโครปิเปตต์ ขนาด 5 ml ของบริษัท Gilson

เครื่องผสมสาร (mixer) ของบริษัท Vortex

เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex

Haemacytometer ของ Boeco (Improved Neubauer)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Memmert

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์และสารแขวนลอยสปอร์

เขี่ยเชื้อราจาก stock culture ลงในอาหาร PDA (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันเพื่อให้เชื้อเจริญเป็นเส้นใยเต็มที่และสร้างสปอร์ เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยเติมน้ำกลั่นที่มี Tween 80 ร้อยละ 0.1 ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในฟลาสก์ซึ่งมีเชื้อราอยู่ แล้วใช้ช้อนสแตนเลสด้ามยาวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขูดและตีให้สปอร์หลุดออกมาจากเส้นใย ทำการกรองเส้นใยออกไป โดยกรองผ่านสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำส่วนที่เป็นของเหลวที่กรองได้ซึ่งมีสปอร์แขวนลอยอยู่มานับจำนวน โดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Haemacytometer ทำการปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ให้อยู่ในช่วง 1.0×10^{7} สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อและใช้เตรียมโปรโตพลาสต์

3.2.2 การเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์แบบเขย่า

ถ่ายสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่ได้จากข้อ 3.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 75 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์หลุม (Baffle flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การทดลองแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ การเก็บตัวอย่างน้ำหมัก ทำโดยใช้ปิเปตต์ตัดปลายขนาด 10 มิลลิลิตรดูดตัวอย่างน้ำหมักมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์หนึ่ง แล้วนำน้ำหมักที่กรองได้ไปวัดค่าพีเอชและนำมาวิเคราะห์ต่อไป

3.2.3 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086

3.2.3.1 ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโคจิก

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ในฟลาสก์ ตามวิธีการในข้อ 3.2.2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Kwak and Rhee (ภาคผนวก ก.2) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 2 วัน นำน้ำหมักมาวัดค่าพีเอชและวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก (ภาคผนวก ค.1)

3.2.3.2 ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ในฟลาสก์ ตามวิธีการในข้อ 3.2.2 โดยใช้อาหาร Starch medium (ภาคผนวก ก) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวัน นำน้ำหมักมาวัดค่าพีเอชและนำมาวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ค.2)

3.2.4 การเตรียมโปรโตพลาสต์จากเชื้อรา

3.2.4.1 การศึกษาส่วนของเชื้อราที่เหมาะสมต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์

ทำการศึกษาการเตรียมโปรโตพลาสต์จากส่วนต่างๆของเชื้อรา ได้แก่ สปอร์ที่กำลังงอก (germling spores) เส้นใย (mycelium) และสปอร์ เพื่อคัดเลือกส่วนที่เหมาะสมที่สุด ดังมีรายละเอียดดังนี้

(1) การเตรียมสปอร์งอก

ทำโดยถ่ายสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่ได้จากข้อ 3.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PD medium (ภาคผนวก ก.4) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะได้สปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเชื้อราที่กำลังงอก ทำการหมุนเหวี่ยงแยกสปอร์งอกที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำใสด้านบนทิ้งแล้วล้างสปอร์งอกด้วยสารละลาย 0.01 M phosphate buffer pH 5.5 (ภาคผนวก ข.1) 1 ครั้ง และ สารละลาย 0.6 M KCl (ภาคผนวก ข.2) อีกครั้ง โดยทำการหมุนเหวี่ยงที่สภาวะเดิม จากนั้นแขวนลอยสปอร์งอกใน 0.6 M KCl

(2) การเตรียมเส้นใยและสปอร์

สำหรับส่วนที่เป็นเส้นใยจะใช้เส้นใยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในจานอาหารแข็ง PDA ซึ่งบ่มเชื้อเป็นเวลา 6-7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยนำเส้นใยที่บริเวณขอบโคโลนีมาเตรียมโปรโตพลาสต์เพื่อให้ได้เส้นใยที่มีอายุน้อย และง่ายต่อการย่อยสลายผนังเซลล์ด้วยไลติก เอนไซม์ สำหรับสปอร์จะใช้สปอร์ในรูปของสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้จากข้อ 3.2.1 การเตรียมโปรโตพลาสต์จากส่วนที่เป็นเส้นใยและสปอร์ เริ่มต้นที่นำส่วนทั้งสองมาล้างโดยดำเนินการตามขั้นตอนเช่นเดียวกับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากสปอร์งอกในข้อ 3.2.4.1 (1)

3.2.4.2 วิธีการเตรียมโปรโตพลาสต์

ในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อราในงานวิจัยนี้ เลือกใช้ไลซิ่งเอนไซม์ (Lysing enzymes) ซึ่งเป็นไลติกเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดได้แก่ proteinase, chitinase และ cellulase นำเซลล์ที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.4.1 ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ (Lysing enzymes) ที่ละลายในสารละลาย 0.6 M KCl ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กระจายเซลล์โดยใช้ pasture pipette ดูดขึ้นลงหลายๆครั้ง แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างมานับจำนวนโปรโตพลาสต์ด้วย Haemacytometer

3.2.4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดโปรโตพลาสต์

นำส่วนของเชื้อราที่เหมาะสมต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์ที่ได้จากข้อ 3.2.4.2 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม โดยการทดลองแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำเพื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) (สุรพล อุปดิสสกุล 2528) การศึกษามีขั้นตอนดังต่อไปนี้

(1) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไลซิ่งเอนไซม์

เตรียมสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นดังนี้คือ 10, 20, 30 และ 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยละลายไลซิ่งเอนไซม์ในสารละลาย 0.6 M KCl (ภาคผนวก ข) นำส่วนของเชื้อราที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.4.2 ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มโดยการเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาทีดำเนินการทดลองเหมือนวิธีการที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.2.4.2 เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเกิดโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดโปรโตพลาสต์

เตรียมสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4.3 (1) มาดำเนินการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการเหมือนเช่นข้อ 3.2.4.2 โดยแปรผันระยะเวลาในการบ่มดังนี้ คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเกิดโปรโตพลาสต์

(3) ศึกษาชนิดของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์

นำไลซิ่งเอนไซม์มาละลายในสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ชนิดต่างๆ ได้แก่ KCl, sorbitol, sucrose และ $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.6 M โดยเตรียมสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4.3 (1) จากนั้นดำเนินการตามวิธีในข้อ 3.2.4.2 สำหรับระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม จะใช้ตามผลการทดลองจากข้อ 3.2.4.3 (2) เพื่อหาสารออสโมติกเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมในการเกิดโปรโตพลาสต์

(4) ศึกษาความถี่ของการรีเจนเนอเรท

นำปิเปตต์ขนาด 0.1 มิลลิลิตร ดูดสารแขวนลอยโปรโตพลาสต์ที่ระดับความเจือจางต่างๆ ซึ่งใช้ 0.6 M KCl และ น้ำกลั่น เป็นสารเจือจาง มา 0.1 มิลลิลิตรแล้วหยดบนอาหาร Regeneration medium จากนั้นเท Soft agar ที่อุ่น 45 องศาเซลเซียส (ภาคผนวก ก) ทับสารแขวนลอยโปรโตพลาสต์ทันที เอียงจานเพาะเชื้อไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจนกว่าจะเกิดโคโลนี (1-2 วัน) นับโคโลนีที่เกิดขึ้น ทั้งในจานเพาะเชื้อที่ใช้ 0.6 M KCl และ น้ำกลั่น เป็นสารเจือจางนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าความถี่ของการรีเจนเนอเรท

คำนวณค่าความถี่ของการรีเจเนอเรทโดย

$$\text{ความถี่ของรีเจนเนอเรท} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เจริญบน Complete medium}^1}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่นับด้วยวิธี direct count}^2}$$

[1] หมายถึง จำนวนโคโลนีที่นับได้จากการรีเจเนอเรทที่ใช้ 0.6 M KCl เป็นสารเจือจาง –จำนวนโคโลนีที่นับได้จากการรีเจเนอเรทที่ใช้น้ำกลั่นเป็นสารเจือจาง

[2] หมายถึง จำนวนเซลล์และโปรโตพลาสต์ที่นับได้จากการใช้ 0.6 M KCl เป็นสารเจือจาง – จำนวนเซลล์ที่นับได้จากการที่ใช้น้ำกลั่นเป็นสารเจือจาง

3.2.5 การรวมโปรโตพลาสต์ (Protoplast fusion)

การรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ในงานวิจัยนี้ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Ushijima *et al.* (1991) โดยนำโปรโต-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสต์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ซึ่งเตรียมได้การทดลองในข้อ 3.2.4.3 มากรองแยกโปรโตพลาสต์ออกจากเส้นใยด้วย Sinter Glass Filter เบอร์ 1 นำไปหมุนเหวี่ยงให้โปรโตพลาสต์ตกตะกอนที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลาย 1.1 M sorbitol 1 ครั้งเพื่อกำจัดเศษเซลล์ แล้วจึงล้างด้วยสารละลาย 0.6 M KCl อีกครั้งหนึ่ง นำสารแขวนลอยโปรโตพลาสต์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ซึ่งอยู่ในหลอดเซนตริฟิวจ์มาผสมกัน นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรโตพลาสต์ที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทน้ำใสด้านบนทิ้งไป แล้วเติมสารละลาย 40% PEG 6000 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในโปรโตพลาสต์ที่ผสมแล้ว ใช้ฝ่ามือสองข้างหมุนหลอดไปมา เพื่อผสมโปรโตพลาสต์ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เขย่าหลอดเบาๆทุก 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วจึงเติมสารละลาย 0.6 M KCl ลงไป 1 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางสารละลาย PEG

3.2.6 การรีเจนเนอเรท (Regeneration)

การทำให้โปรโตพลาสต์กลับเป็นเซลล์ หรือเรียกว่าการรีเจเนอเรท ในงานวิจัยนี้ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Ushijima *et al.*(1991) มีขั้นตอนดังนี้ นำสารแขวนลอยโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการรวมด้วยสารละลาย 40% PEG 6000 จากข้อ 3.2.4 มาเจือจางเป็นลำดับส่วนด้วยสารละลาย 0.6 M KCl แล้วหยดสารแขวนลอยโปรโตพลาสต์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรบนอาหาร Regeneration medium จากนั้นเททับด้วยอาหาร Soft agar ทันที เอียงจานวุ้นไปมาเพื่อกระจายเชื้อ ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) จนกว่าจะเกิดโคโลนี (ประมาณ 1-2 วัน) เก็บโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้น ไว้ในอาหารผิวเอียงสำหรับเก็บรักษาสายพันธุ์ (ภาคผนวก ก.6) เพื่อบ่มให้เชื้อเจริญและรอการทดสอบต่อไป

3.2.7 การคัดเลือกเชื้อราลูกผสม (Fusant)

นำเชื้อที่ได้จากการรีเจเนอเรทในข้อ 3.2.6 มาทดสอบลักษณะสำคัญของเชื้อที่ผลิตกรดโค-จิก (*Aspergillus oryzae* NRRL 484) และลักษณะสำคัญของเชื้อผลิตเอนไซม์อะไมเลส (*Aspergillus oryzae* TISTR 3086) โดยเขี่ยเชื้อจากอาหารผิวเอียงจากข้อ 3.2.6 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch medium ที่เติมวุ้น (ภาคผนวก ก.3) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6-7วัน ทำการทดสอบการผลิตกรดโคจิกโดยราดสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค.1) รอบๆโคโลนี คัดเลือกเชื้อที่ปรากฏสีแดงรอบโคโลนีแยกไว้ จากนั้นทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยราดสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข) รอบๆโคโลนีเช่นกัน คัดเลือกเชื้อที่ปรากฏวงใส (clear zone) รอบโคโลนี นับจำนวนเชื้อที่เกิดสีแดงและเกิดวงใสรอบโคโลนี ทำการทดลอง 2 ซ้ำ แล้วนำไปคำนวณค่าความถี่ของการเกิดเชื้อลูกผสม (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536) มีสูตรดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.8 การผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว

นำเชื้อลูกผสมที่ผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.7 มาเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ด้วยวิธีการในข้อ 3.2.1 ถ่ายสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อลูกผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch medium และดำเนินการเลี้ยงเชื้อในฟลากส์แบบเขย่าตามข้อ 3.2.2 โดยบ่มเป็นเวลา 8 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อนำมาวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์กรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส ทำการคัดเลือกเชื้อลูกผสมที่ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดไปศึกษาต่อไป

3.2.9 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

3.2.9.1 ความเข้มข้นของแป้งและชนิดของแหล่งไนโตเจน

นำเชื้อราลูกผสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.8 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Starch medium (ภาคผนวก ก) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังแทนแป้งละลายน้ำ (soluble starch) โดยแปรผันความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังดังนี้ คือ 1, 5 และ 8 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกับแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนสำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เปรียบเทียบกับยีสต์สกัดได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าตามข้อ 3.2.2 เป็นเวลา 8 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อนำมาวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์กรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลส โดยการทดลองแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำเพื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) (สุรพล อุปดิสสกุล. 2528)

3.2.9.2 ศึกษาชนิดแป้ง

นำเชื้อลูกผสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.8 และนำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.9 มาใช้ในการศึกษาชนิดแป้ง โดยแปรผันชนิดแป้งเป็น 3 ชนิด ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และแป้งข้าวเจ้า การเพาะเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์แบบเขย่าทำตามข้อ 3.2.2 เป็นเวลา 8 วันเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวันเพื่อนำมาวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์กรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลส โดยการทดลองแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำเพื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) (สุรพล อุปดิสสกุล. 2528)

3.2.10 การศึกษาความเสถียรของสายพันธุ์เชื้อลูกผสม

นำเชื้อราลูกผสมที่ได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการผลิตกรดโคจิก นำโคโลนีของเชื้ออายุ 6-7 วัน มาตัดปลายเส้นใยด้วย cock boror เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางลงบนอาหารแข็ง Starch medium ที่เตรียมใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-7 วัน โดยทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 7 วัน จนครบ 5 ครั้ง การทดลองจะทำ 4 ซ้ำ สังเกตดูลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นในการถ่ายเชื้อแต่ละครั้ง นำเชื้อที่ถ่ายครั้งที่ 5 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจากข้อ 3.2.9.2 เพื่อศึกษาปริมาณการผลิตกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส ที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การถ่ายเชื้อแต่ละครั้ง นำเชื้อที่ถ่ายครั้งที่ 5 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจากข้อ 3.2.9.2 เพื่อศึกษาปริมาณการผลิตกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส ที่เกิดขึ้น

3.3 วิธีการวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์กรดโคจิก

ตามวิธีของ Bentley. (1957) รายละเอียดในภาคผนวก ค.1

3.3.2 การวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส

ดัดแปลงจากวิธีของนวลพรรณ ณ ระนอง. (2540) รายละเอียดในภาคผนวก ค.2

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ในการผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลส

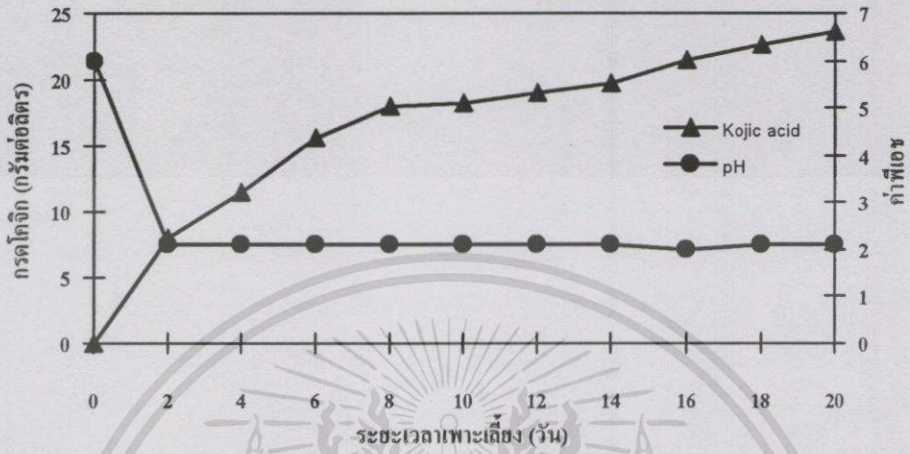
4.1.1 ความสามารถในการผลิตกรดโคจิก

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ เชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Kwak and Rhee (1992) นั้นพบว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 สามารถผลิตกรดโคจิกได้ตลอดช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยอัตราการผลิตกรดโคจิกมีค่าสูงใน 2 วันแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นอัตราการผลิตกรดโคจิกเริ่มลดลง และปริมาณการผลิตกรดโคจิกสูงสุดมีค่าเท่ากับ 23.65 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.1) สำหรับค่าพีเอชพบว่า เมื่อเชื้อเริ่มมีการผลิตกรดโคจิก ค่าพีเอชจะมีค่าลดลงจากค่าเริ่มต้น 6.0 เป็น 2.0 และมีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ผลการผลิตกรดโคจิกและค่าพีเอชนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Kwak and Rhee (1992) ซึ่งมีอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจึงเริ่มลดลง โดยช่วงเวลาที่การผลิตกรดโคจิก จะมีค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 ปริมาณการผลิตกรดโคจิกมีค่าสูงสุดอยู่ในช่วง 22-24 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 (รูปที่ 4.2) พบว่าไม่มีการผลิตกรดโคจิกเลยตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง

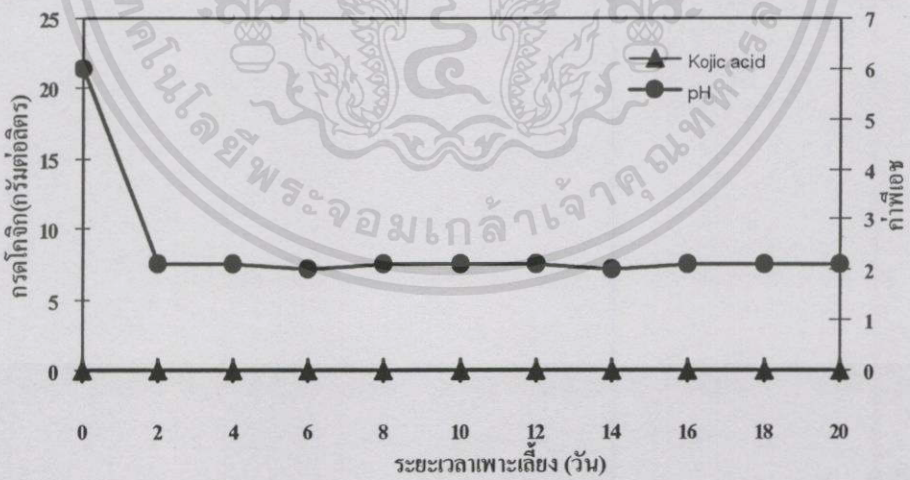
4.1.2 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งใช้ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กลงของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch medium พบว่าเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 3,512 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นการผลิตเอนไซม์เริ่มลดลงเรื่อยๆ โดยมีค่าเท่ากับ 1,649 1,205 964 618 และ 211 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 3 4 5 และ 6 ตามลำดับ (รูปที่ 4.3) ส่วนเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 พบว่ามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงเพียง 209.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร และหลังจากนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเริ่มลดลง โดยมีการผลิตเท่ากับ 159.94 74.17 52.12 48.84 และ 36.41 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 3 4 5 และ 6 ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้น้อยกว่าเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ถึงประมาณ 17 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

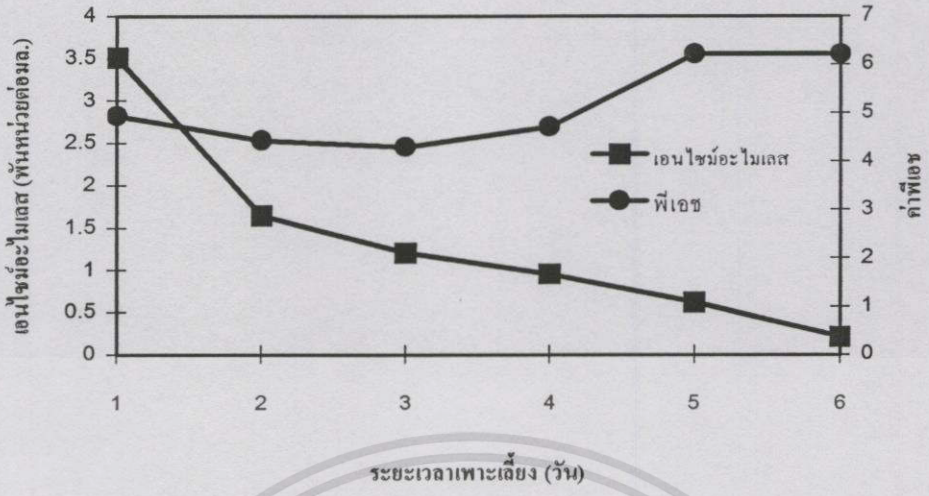


รูปที่ 4.1 แสดงการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในสูตรอาหารของ Kwak and Rhee (1992)

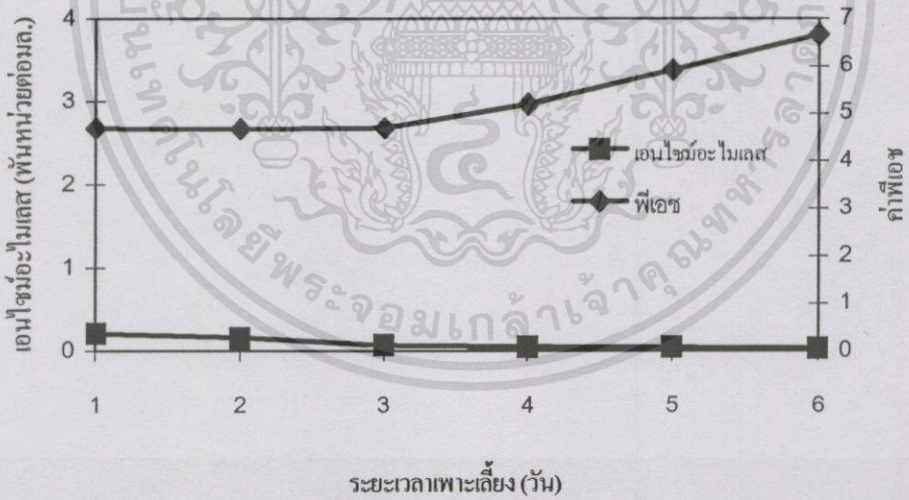


รูปที่ 4.2 แสดงการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ในสูตรอาหารของ Kwak and Rhee (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่4.3 แสดงกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ในสูตรอาหารของ Rosfarizan *et al.* (1998)



รูปที่4.4 แสดงกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 สูตรอาหารของ Rosfarizan *et al.* (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองข้างต้นนี้สรุปได้ว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 มีความสามารถผลิตกรดโคจิกในอาหารสูตรของ Kwak and Rhee (1992) ซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงสุดเท่ากับ 23.65 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสในสูตรอาหารของ Rosfarizan *et al.* (1998) ซึ่งมีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ได้เพียง 209.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ไม่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ แต่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงมาก โดยผลิตได้ 3,512 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง จากเหตุนี้จึงนำไปสู่ที่มาของการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ให้สามารถผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้งได้ดีขึ้นโดยอาศัยเทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) กับเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ซึ่งจะได้ทำการศึกษาในลำดับต่อไป

4.2 การเตรียมโปรโตพลาสต์

4.2.1 การศึกษาส่วนของเชื้อราที่เหมาะสมต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์

จากการนำส่วนต่างๆของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ได้แก่ สปอร์ที่กำลังงอก (germling spores) เส้นใย (mycelium) สปอร์ มาศึกษาการเกิดโปรโตพลาสต์ พบว่าส่วนที่เป็นเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์เกิดโปรโตพลาสต์น้อยมาก และเมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ จาก 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 30 และ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเพิ่มระยะเวลาในการบ่มจาก 2 ชั่วโมง เป็น 3 4 และ 5 ชั่วโมงแล้วก็ตาม จำนวนโปรโตพลาสต์ก็ไม่เพิ่มขึ้นจากเดิม สำหรับสปอร์ที่กำลังงอก พบว่าเกิดโปรโตพลาสต์ได้ตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการบ่ม การที่สปอร์กำลังงอกของเชื้อราเป็นส่วนที่เหมาะสมที่สุดต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์ อธิบายได้ว่าบริเวณปลายเส้นใยของสปอร์ที่กำลังงอกนั้นมีความไวต่อไลซิ่งเอนไซม์มาก เนื่องจากเป็นส่วนที่กำลังเจริญเติบโต ผนังเซลล์มีองค์ประกอบเป็น chitin β (1,3)-glucan, β (1,6)-glucan, galactomannoprotein และ α(1,3)-glucanที่ยังไม่สมบูรณ์ (Neil *et al.* 1995) ในขณะที่ส่วนที่เป็นเส้นใยและสปอร์มีผนังเซลล์หนาและมีองค์ประกอบเป็นโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของไลซิ่งเอนไซม์ (สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536)

ตารางที่ 4.1 แสดงขนาดของสปอร์และโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086

ชนิดของเชื้อ	ขนาดของสปอร์ (μm)	ขนาดของโปรโตพลาสต์ (μm)
Aspergillus oryzae NRRL 484	1.8-4.0	3.0-10.0
Aspergillus oryzae TISTR 3086	2.0-7.0	1.0-10.0

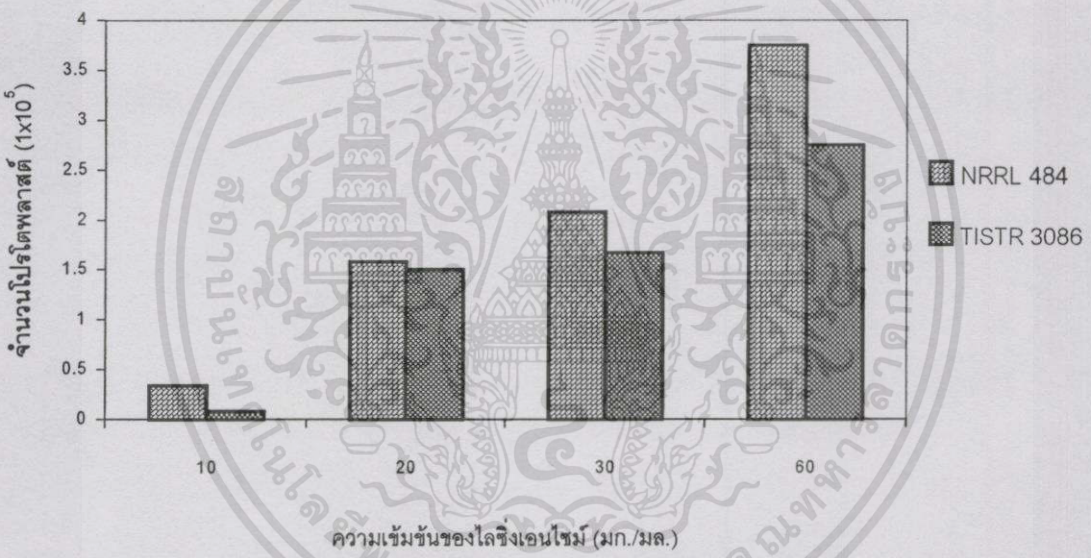
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเตรียมสปอร์ที่กำลังงอกนั้นจะมีสปอร์ที่ไม่งอกปะปนมาด้วย ดังนั้นเมื่อนำมาย่อยผนังเซลล์ด้วยไลซิ่งเอนไซม์แล้ว จึงมีสปอร์ปะปนมากับโปรโตพลาสต์ สปอร์ที่ปะปนมาจะมีขนาดใกล้เคียงกับโปรโตพลาสต์ (ตารางที่ 4.1)

4.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์

4.2.2.1 ความเข้มข้นของสารละลายไลซิ่งเอนไซม์

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยใช้โปรโตพลาสต์ที่เตรียมจากสปอร์ที่กำลังงอกของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 (ข้อ4.2.1) เมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ดังนี้คือ 10 20 30 และ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 4.5



รูปที่4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์กับจำนวนโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086

จากรูปที่ 4.5 พบว่าเมื่อใช้สารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้จำนวนโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 สูงสุดเท่ากับ 3.75×10^5 และ 2.75×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้สารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้โปรโตพลาสต์เท่ากับ 2.08×10^5 และ 1.67×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้สารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้โปรโตพลาสต์ใกล้เคียงกันคือ 1.5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจะเห็นได้ว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ให้มากขึ้น จำนวนโปรโตพลาสต์จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD)

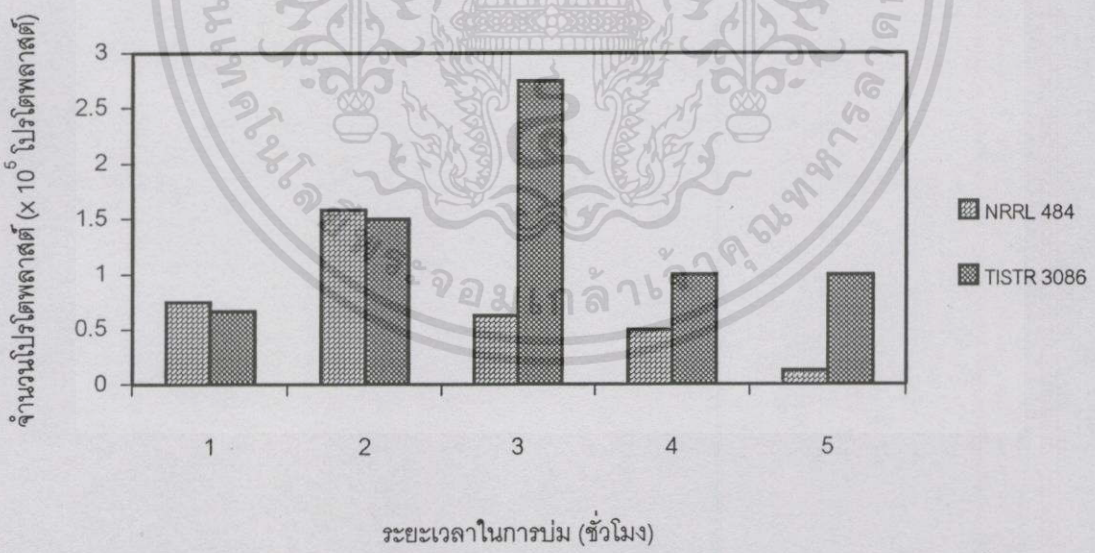
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD พบว่าระดับความเข้มข้นของสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่แตกต่างกัน มีผลทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 (ภาคผนวก ฉ)

ในการคัดเลือกระดับความเข้มข้นของสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่เหมาะสม เพื่อนำมาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์นั้น จำเป็นต้องคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์มีจำนวนใกล้เคียงกัน จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ใกล้เคียงกันคือ 1.5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ในการศึกษาต่อไป

4.2.2.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์

ผลจากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 เมื่อใช้ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแปรผันระยะเวลาในการบ่มดังนี้คือ 1 2 3 4 และ 5 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการบ่มกับจำนวนโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086

จากรูปที่ 4.6 พบว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 มีจำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุดเมื่อใช้เวลาในการบ่ม 2 ชั่วโมง ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เท่ากับ 1.58×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 มีจำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุดเมื่อใช้เวลาในการบ่ม 3 ชั่วโมงเท่ากับ 2.57×10^5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มมากขึ้น จำนวนโปรโตพลาสต์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์จะลดลง โดยเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ลดลงเหลือ 0.63 x 10^5 และ 0.13 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ลดลงเหลือ 1.50 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD พบว่าระยะเวลาในการบ่มโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกันทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 (ภาคผนวก ฉ) การที่จำนวนโปรโตพลาสต์ลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น อธิบายได้ว่าโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นอาจจะถูกทำลายโดยไลซิ่งเอนไซม์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ถูกห่อหุ้มด้วยพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) โดยพลาสมาเมมเบรนของสิ่งมีชีวิตมีส่วนที่เป็นโปรตีนประมาณร้อยละ 50 ขององค์ประกอบทั้งหมด (Alberts *et al.* 1994) ในขณะที่ไลซิ่งเอนไซม์มีเอนไซม์โปรติเนส (proteinase) เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยจึงอาจเกิดการย่อยสลายพลาสมาเมมเบรนขึ้นทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ลดลง จะเห็นได้ว่าในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อราทั้งสองชนิด เมื่อใช้เวลาในการบ่มนานขึ้นจำนวนโปรโตพลาสต์จะลดลง เพื่อลดความแตกต่างของจำนวนโปรโตพลาสต์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ จะใช้ระยะเวลาในการบ่ม 2 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาครั้งต่อไป

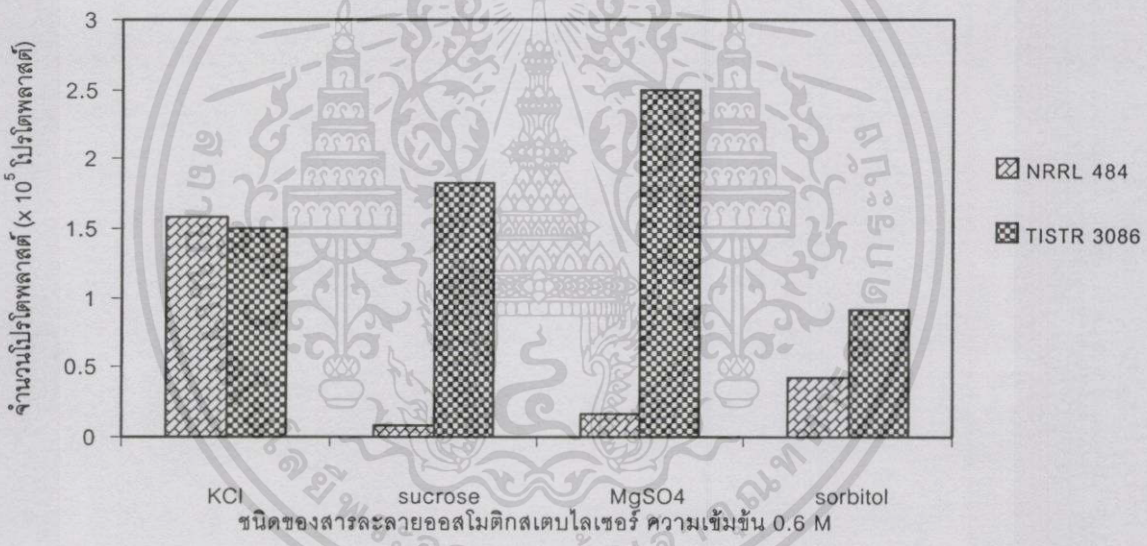
4.2.2.3 ชนิดของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์

ผลจากการศึกษาชนิดของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 4.7 พบว่า พบว่าสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 คือ 0.6 M KCl ได้โปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นเท่ากับ 1.58 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ 0.6 M sorbitol ได้โปรโตพลาสต์ 0.42 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 สารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่ทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ 0.6 M $MgSO_4$ รองลงมาคือ 0.6 M sucrose และ0.6 M KCl ตามลำดับ โดยมีจำนวนโปรโตพลาสต์เท่ากับ 2.50 x 10^5 1.83 x 10^5 และ 1.50 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD พบว่าสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่แตกต่างกัน มีผลทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 (ภาคผนวก ฉ) กล่าวได้ว่าโปรโตพลาสต์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถรักษาแรงดันภายในโปรโตพลาสต์ได้ดีในสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่มีสภาวะเป็นเกลืออนินทรีย์ ได้แก่ KCl และ $MgSO_4$ นั่นเอง การเลือกใช้เกลืออนินทรีย์เป็นสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ เช่นนี้สอดคล้องกับรายงานของ Solis *et al.* (1996) ซึ่งรายงานว่า จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *Aspergillus* spp. ในสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ต่างๆ ได้แก่ glucose NaCl KCl NH_4Cl sucrose และ sorbitol พบว่า KCl เป็นสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมที่สุดต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์ และการรีเจนเนอเรท โดยสามารถทำให้โปรโตพลาสต์เปลี่ยนกลับเป็นเซลล์ได้ 87 เปอร์เซ็นต์

ในการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ จำเป็นต้องมีจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ใกล้เคียงกันเพื่อให้การรวมโปรโตพลาสต์มีประสิทธิภาพ และจากผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ระยะเวลาการบ่ม และ ชนิดของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ สรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 คือนำสปอร์งอกของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ มาบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ 0.6 M KCl เป็นสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์



รูปที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์กับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086

4.2.2.4 การศึกษาการรีเจเนอเรทของโปรโตพลาสต์

จากการศึกษาความสามารถในการรีเจนเนอเรทของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ 0.6 M KCl เป็นสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์สามารถคำนวณความถี่ของการรีเจนเนอเรทของเชื้อราทั้งสองได้จากสูตรที่กล่าวไว้ในข้อ 3.2.4.3(4)

สำหรับเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 เมื่อแทนในสมการจะได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความถี่ของการรีเจนเนอเรท = 500/(550-20)

= 0.94

สำหรับเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 เมื่อแทนในสมการจะได้ดังนี้

ความถี่ของการรีเจนเนอเรท = (590)/(620-18)

= 0.98

โดยเชื้อ *A .oryzae* NRRL 484 ได้เท่ากับ 0.94 หรือคิดเป็น 94 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความถี่ของการรีเจนเนอเรทของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ได้เท่ากับ 0.98 หรือคิดเป็น 98 เปอร์เซ็นต์

ความถี่ของการรีเจนเนอเรทจะมากหรือน้อยนั้นขึ้นกับความเหมาะสมของ Regeneration medium และองค์ประกอบอื่นๆ (Arora *et al.* 1992) ในปี ค.ศ. 1992 Virk *et al.* ได้ศึกษาการเตรียมและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 7.2×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ 0.6 M KCl เป็นสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ และใช้ Novozyme 234 ร่วมกับ β-glucoronidase เป็นสารไลติกเอนไซม์ คำนวณค่าความถี่ของการรีเจนเนอเรทได้ประมาณ 70-90 เปอร์เซ็นต์ Ushijima *et al.* (1990) ได้ศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อ *Aspergillus oryzae* และ *A. sojae* สามารถคำนวณความถี่ของการรีเจเนอเรทของโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการหลอมรวมด้วย PEG แล้วพบว่าอยู่ในช่วง 10-30 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น เช่นเดียวกับ Gautam *et al.* (1996) ซึ่งศึกษาการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อราประเภทเทอร์โมฟิลิก (thermophilic fungus) คือเชื้อ *Malbranchea sulfurea* โดยใช้ไลติกเอนไซม์ คือ chitinase และ laminarinase จากเชื้อ *Paecilomyces varioti* ได้โปรโตพลาสต์สูงสุด 1.4×10^7 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความถี่ของการรีเจเนอเรทมีค่าเท่ากับ 34.6 เปอร์เซ็นต์

Anne and Peberdy (1976) รายงานว่าการปรากฏของสปอร์ที่ปะปนอยู่กับโปรโตพลาสต์ จะไม่ เป็นปัญหาต่อการรวมโปรโตพลาสต์ เนื่องจาก PEG ไม่ทำให้เกิดการรวมกันของสปอร์ได้ แต่จะทำให้เกิดการรวมกันเฉพาะโปรโตพลาสต์เท่านั้น

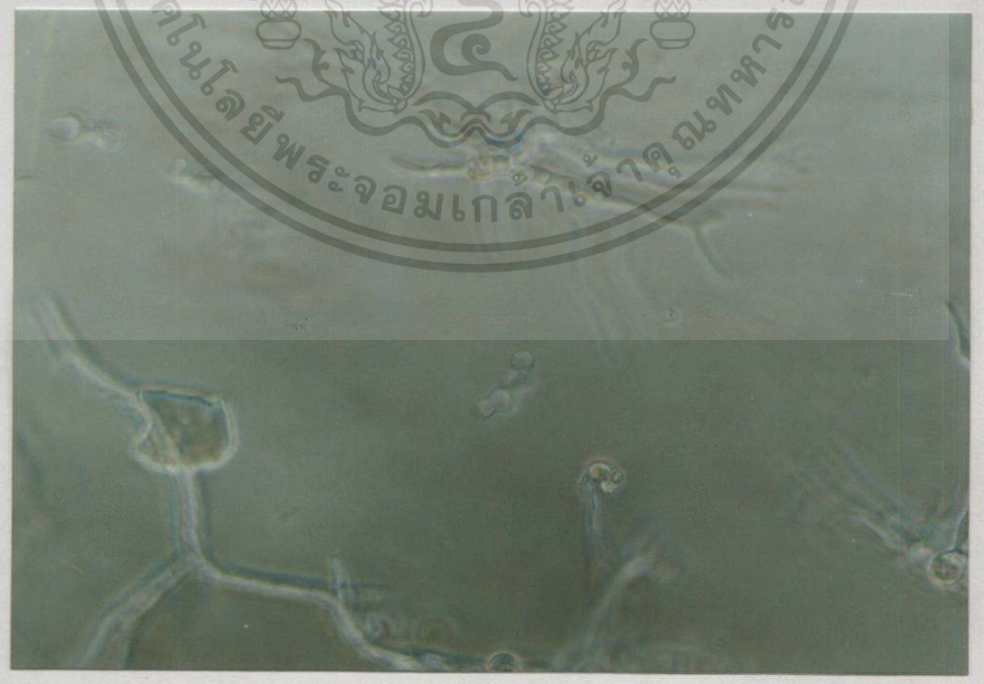
ลักษณะการเกิดโคโลนีบน Regeneration medium แสดงได้ดังรูปที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.8 แสดงโคโลนีที่เกิดขึ้นจากการรีเจนเนอเรทของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484

4.3 การรวมโปรโตพลาสต์

เมื่อทำการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เชื้อละประมาณ 1.5 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 40% PEG 6000 เป็นสารฟิวโซเจนท์ (fusogent) แสดงดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 แสดงโปรโตพลาสต์ที่กำลังหลอมรวมกัน เมื่อใช้ 40% PEG 6000 เป็นสารฟิวโซเจนท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการรวมโปรโตพลาสต์บางครั้งพบว่าเกิดการรวมโปรโตพลาสต์มากกว่า 2 โปรโตพลาสต์ขึ้นไป เนื่องจากมีโปรโตพลาสต์จำนวนมากมาอยู่ในบริเวณเดียวกันหรือใกล้กันมาก จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ช่วงระหว่างขั้นตอนการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย PEG จะต้องมีการหมุน หลอดทดลองที่ใช้รวมโปรโตพลาสต์ไปมาเบาๆ (หมุนหลอดในอุ้งมือ) เพื่อให้มีการกระจายตัวของโปรโตพลาสต์อย่างสม่ำเสมอ Zimmermann (1986) รายงานว่าการรวมโปรโตพลาสต์ ด้วย PEG มีข้อจำกัดได้แก่ จำนวนโปรโตพลาสต์ที่รวมกันไม่สามารถเลือกได้ ใช้เวลานาน และ สภาวะที่เหมาะสมผันแปรตามสปีชีส์ของเชื้อที่นำมารวมกัน เป็นต้น จึงได้มีการพัฒนาการรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้กระแสไฟฟ้า (Electrofusion) เกิดขึ้น ซึ่งมีข้อดีคือโอกาสเกิดการรวมโปรโตพลาสต์เพียง 2 โปรโตพลาสต์มีสูงกว่าการใช้ PEG Ushijima *et al.* (1991) รายงานว่าผลจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อ *Aspergillus oryzae* และ *A. sojzae* โดยใช้กระแสไฟฟ้า มีความถี่ของการเกิดเชื้อลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตลาสต์ด้วยไฟฟ้ามีมากกว่าการใช้สาร PEG ประมาณ 2-4 เท่า ทั้งนี้ได้ให้เหตุผลที่สอดคล้องกับ Zimmermann (1986) กล่าวคือ การรวมโปรโตพลาสต์ด้วยกระแสไฟฟ้ามีข้อดีกว่าการใช้สาร PEG ตรงที่สามารถทำให้เกิดการรวมแบบ cell-to-cell ซึ่งจะลดปัญหาการเกิดภาวะ multinucleus fusion ได้

หลังจากการรวมโปรโตพลาสต์แล้ว นำโปรโตพลาสต์ทั้งหมดไปรีเจนเนอเรทในอาหาร Regeneration medium ทำการเก็บโคโลนีที่เกิดขึ้นเดี่ยวๆ มาได้ทั้งหมดจำนวน 198 โคโลนี เก็บโคโลนีทั้งหมดในอาหารผิวเอียง Starch medium นำไปทดสอบหาเชื้อลูกผสมที่ต้องการต่อไป

4.4 การคัดเลือกเชื้อราลูกผสม

หลังจากนำเชื้อทั้งหมด 198 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารแข็ง Starch medium เป็นเวลา 7 วัน มาทำการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกด้วยการรวดสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ บนผิวหน้าอาหารแข็ง ถ้าเชื้อผลิตกรดโคจิกจะเกิดสีแดงขึ้นรอบๆโคโลนี สำหรับการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จะใช้สารละลายไอโอดีนราดบนผิวหน้าอาหารแข็ง ถ้าเชื้อผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะเกิดโซนใสขึ้นรอบๆโคโลนี จากผลการทดสอบพบว่ามีโคโลนีของเชื้อรา 3 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสในอาหาร Starch medium คือสายพันธุ์ที่ 49 87 และ 105 เมื่อสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อราลูกผสม พบว่าเส้นใยมีลักษณะฟูหนา มีสีนวลออกเหลือง โดยรวมแล้วมีลักษณะคล้ายเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ผลการทดสอบจะแสดงดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบการผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสในอาหารแข็ง Starch medium ของเชื้อที่ได้จากการรีเจนเนอเรทจำนวน 198 สายพันธุ์

สายพันธุ์	การทดสอบกรดโคจิก	การทดสอบเอนไซม์อะไมเลส
A. oryzae NRRL 484	-	-
A. oryzae TISTR 3086	-	+
49, 87, 105	+	+
52-54, 56, 59, 61, 63-64, 67-76, 79, 86-90, 92-97, 99-112, 154, 159-160, 164, 166-170, 173-179, 181-184, 191	-	+
1-48, 50-51, 55, 57-58, 60, 62, 65-66, 77-78, 80-85, 91, 98, 113-153, 155-158, 161-163, 165, 171-172, 185-190, 192-198	-	-

หมายเหตุ ผลการทดสอบกรดโคจิกเมื่อราดสารละลาย $FeCl_3$ จะเกิดสีแดงถ้ามีกรดโคจิก
เครื่องหมาย + หมายถึง เกิดกรดโคจิก - หมายถึง ไม่เกิดกรดโคจิก
ผลการทดสอบเอนไซม์อะไมเลสเมื่อราดสารละลายไอโอดีนจะเกิดวงใสรอบโคโลนี
เครื่องหมาย + หมายถึง เกิดวงใสรอบโคโลนี - หมายถึง ไม่เกิดวงใสรอบโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.2 พบว่ามีเชื้อราลูกผสมที่มีคุณสมบัติที่ต้องการ คือสามารถผลิตกรดโคจิกและผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ โดยให้ผลการทดสอบกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสเป็น + ทั้งสองการทดสอบ มีจำนวนทั้งสิ้น 3 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 49, 87 และ 105 ซึ่งสามารถคิดค่าความถี่ของการเกิดเชื้อราลูกผสมจากเชื้อทั้งหมดที่นำมาทดสอบ ดังนี้

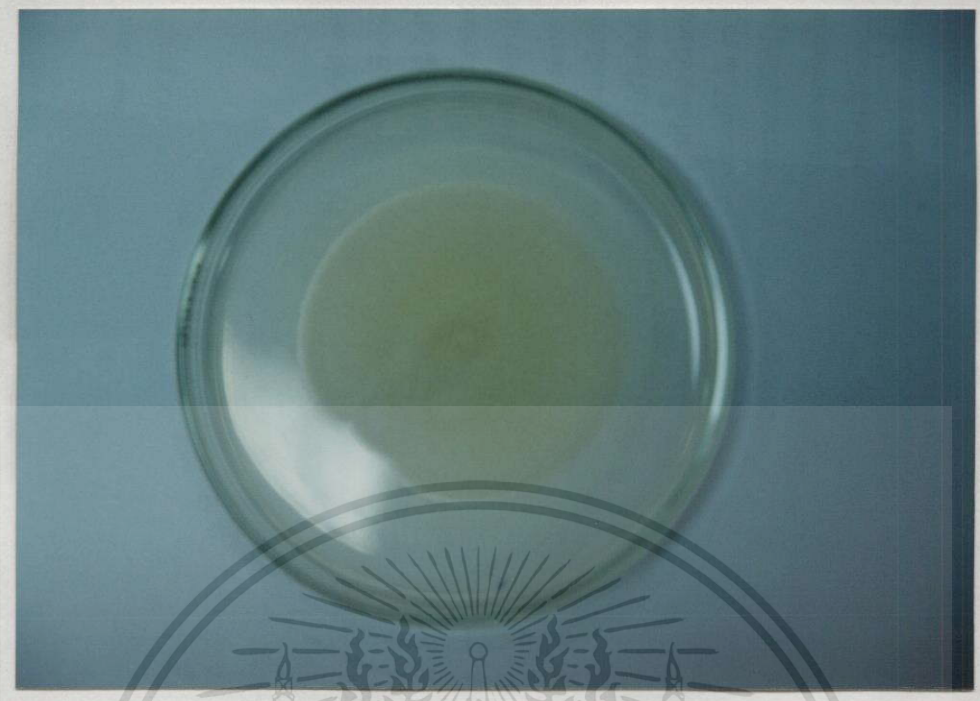
$$\text{ความถี่ของการเกิดเชื้อราลูกผสม} = \frac{\text{จำนวนเชื้อราลูกผสม}}{\text{จำนวนเชื้อราทั้งหมด}}$$

เมื่อแทนค่าจะได้ $= \frac{3}{198} = 0.015$ หรือ 1.5 เปอร์เซ็นต์

เมื่อแทนค่าในสูตรจะพบว่าความถี่ของการเกิดเชื้อลูกผสมมีค่าเท่ากับ 0.015 หรือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ รูปที่ 4.10 แสดงรูปถ่ายลักษณะการเกิดสารสีแดงที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของกรดโคจิกกับสารละลายเฟอริกคลอไรด์ ของเชื้อที่ทำการทดสอบ เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง Starch medium

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.

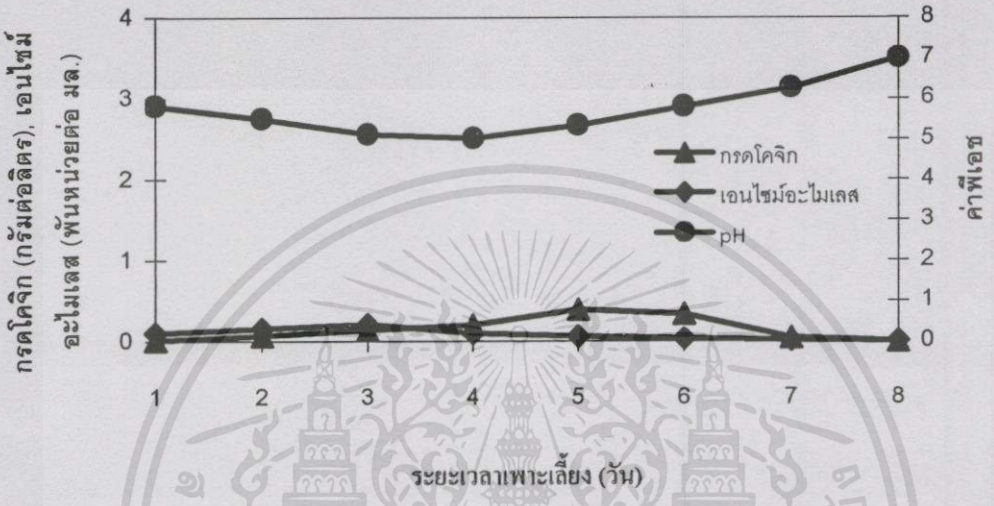
ข

รูปที่ 4.10 แสดงการเกิดสีแดงหลังจากราดสารละลาย $FeCl_3$ ทดสอบในอาหาร Starch medium ก. ไม่เกิดสีแดงหลังจากราด $FeCl_3$ ข. เกิดสีแดงหลังจากราด $FeCl_3$

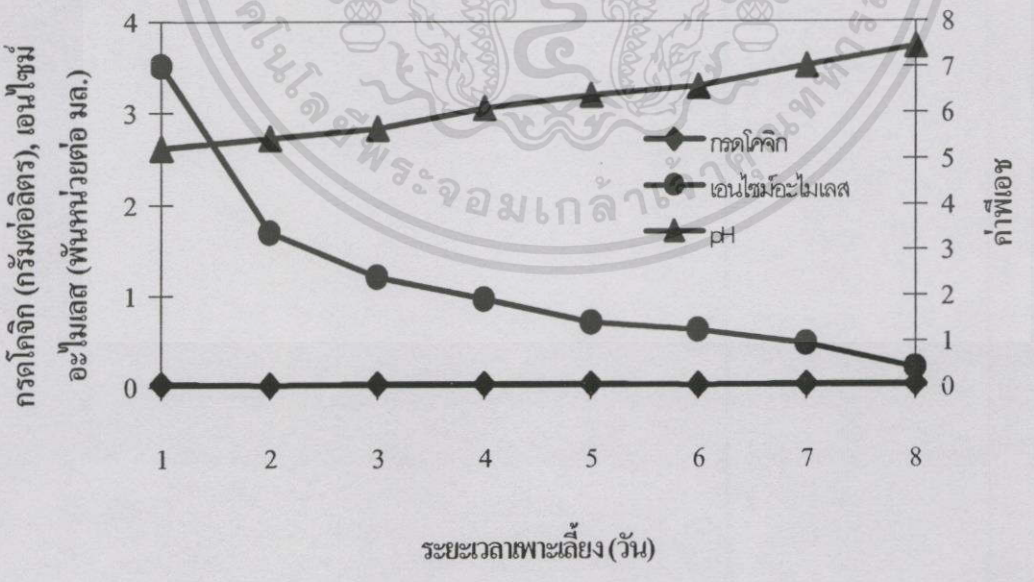
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราลูกผสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.4 ทั้งสามสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 49 87 และ 105 เปรียบเทียบกับเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ เพื่อคัดเลือกเชื้อราลูกผสมที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ดีที่สุด แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 4.11 - 4.13

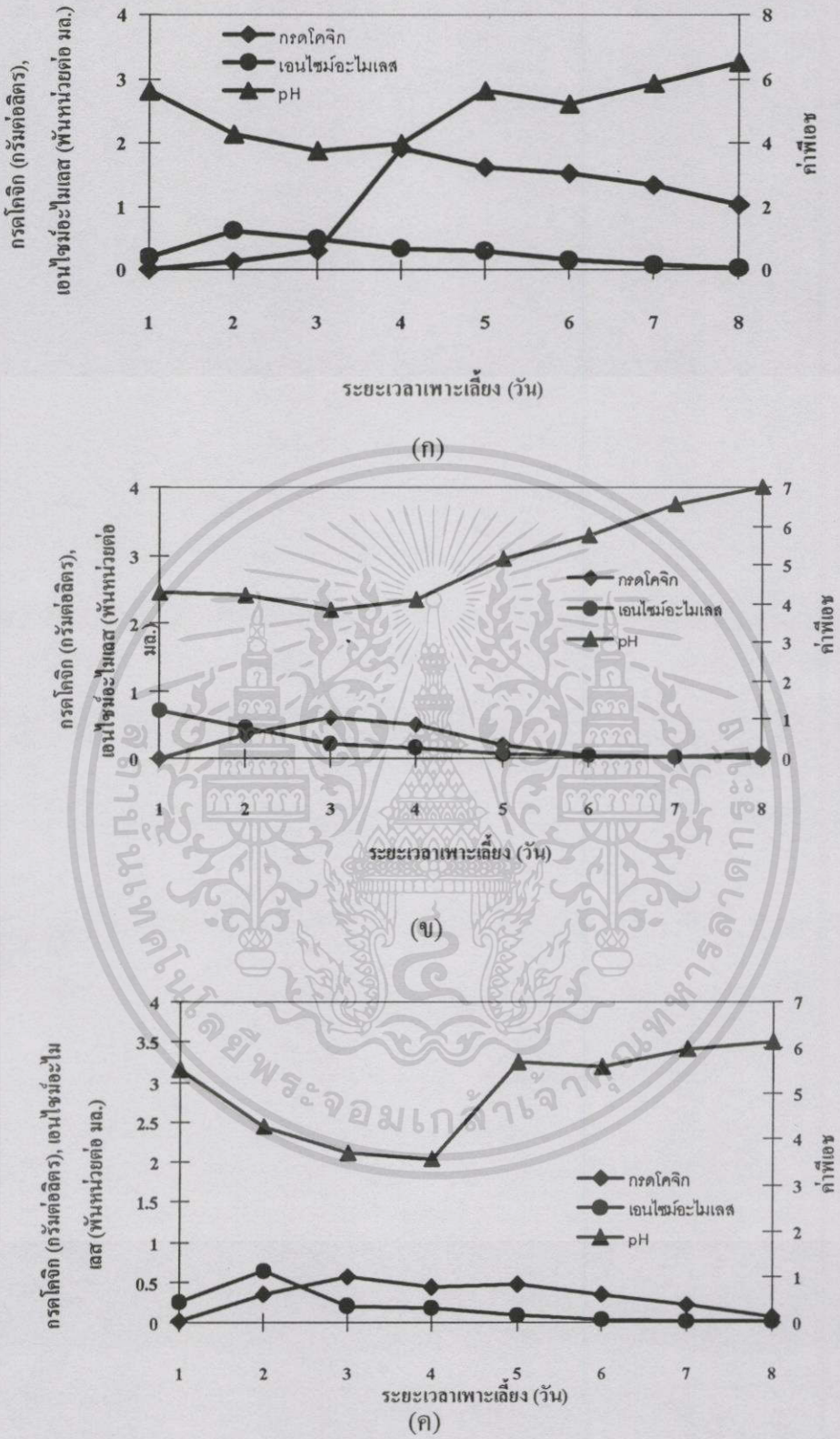


รูปที่ 4.11 แสดงการผลิตกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส และค่าพีเอช ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL484 เมื่อเพาะเลี้ยงใน Starch medium



รูปที่ 4.12 แสดงการผลิตกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส และค่าพีเอช ของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 เมื่อเพาะเลี้ยงใน Starch medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดงการผลิตกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส และค่าพีเอชของเชื้อราลูกผสม (ก) สายพันธุ์ที่ 49 (ข) สายพันธุ์ที่ 87 และ (ค) สายพันธุ์ที่ 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.11 เมื่อนำเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 มาเลี้ยงในอาหาร Starch medium พบว่ามีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 0.40 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเพียง 209.03 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง การที่เชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ในขณะที่มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสน้อยมาก อาจอธิบายได้ว่ามีน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นมาจากความร้อนในขณะนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งความร้อนจะเปลี่ยนสารพอลิแซ็กคาไรด์เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กลง ทำให้เชื้อนำน้ำตาลไปใช้ผลิตกรดโคจิกได้ สำหรับเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 (รูปที่ 4.12) จะพบว่าไม่มีการผลิตกรดโคจิกเลยตลอดระยะเวลาเพาะเลี้ยง แต่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 3,512.34 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง

สำหรับการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 สามารถผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 1.92 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 617.61 หน่วยต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.13 ก) ส่วนเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 87 พบว่ามีผลิตกรดโคจิกสูงสุดเพียง 0.61 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 708.29 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.13 ข) ในขณะที่เชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 105 พบว่ามีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเพียง 0.57 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 640.13 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.13 ค)

เมื่อพิจารณาผลการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราลูกผสมทั้งสามสายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ที่ 49 87 และ 105 จะพบว่า เชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด โดยผลิตได้เท่ากับ 1.92 กรัมต่อลิตร โดยสูงกว่าสายพันธุ์ที่ 87 และ 105 ประมาณ 3 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราลูกผสมทั้งสามสายพันธุ์กับเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 พบว่า ทั้งสามสายพันธุ์สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 จากการทดลองพบว่าเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ถึงประมาณ 5 เท่า

สำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่าเชื้อราลูกผสมทั้งสามสายพันธุ์มีการผลิตเอนไซม์ก้ำกึ่งระหว่างเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ โดยมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมากกว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 แต่น้อยกว่าเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ส่วนค่าพีเอช พบว่าจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณกรดโคจิกลดลง เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยผลการทดลองด้วย LSD พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อราที่แตกต่างกันมีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 (ภาคผนวก ฉ)

มีรายงานการเปรียบเทียบการผลิตผลิตภัณฑ์ (product) ของเชื้อราลูกผสมกับเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ ได้แก่การทดลองของ Ogawa *et al.* (1989) ซึ่งได้ทำการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

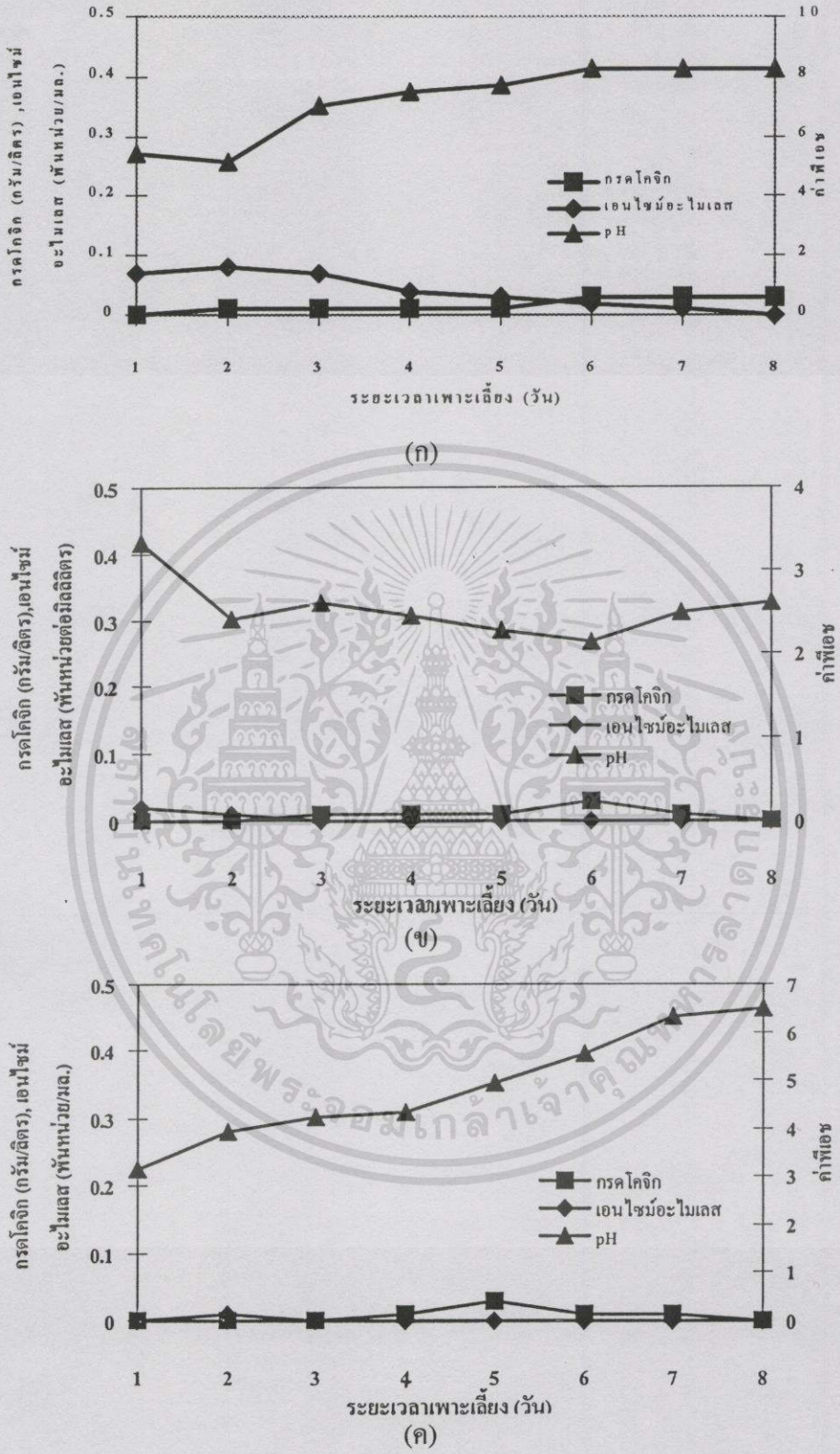
ระหว่างเชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูง และ *A. usamii* mut. *Shrirousamii* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดซิตริกสูง พบว่าเชื้อราลูกผสมที่ผ่านการทำให้เป็นเซลล์แฮพพลอยด์ (haploid cell) แล้ว มีเพียง 1 สายพันธุ์จากเชื้อราลูกผสมทั้งหมด 6 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกรดซิตริกได้สูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ Ushijima *et al.* (1991) ได้ศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยไฟฟ้าระหว่างเชื้อ *Aspergillus oryzae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูง และ *A. sojae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูง พบว่าเชื้อราลูกผสมที่คัดเลือกได้จำนวน 3 สายพันธุ์ มีเพียง 1 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสก้ำกึ่งระหว่างเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ และอีก 2 สายพันธุ์ที่เหลือสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ Ogawa *et al.* (1988) ได้ศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อ *Aspergillus awamori* var. *kawachi* และ *A. oryzae* โดยใช้ PEG 6000 พบว่า เชื้อราลูกผสมที่เกิดขึ้นและผ่านการทำให้เป็นเซลล์ดิพพลอยด์ (diploid cell) แล้ว สามารถผลิตกรดซิตริกมากกว่าเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ถึง 7 เท่า จากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้ว จึงเลือกเชื้อลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 เป็นเชื้อราลูกผสมที่ผลิตกรด-โคจิกได้สูงที่สุดสำหรับการศึกษาต่อไป

4.6 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก

4.6.1 ศึกษาความเข้มข้นของแป้ง ผลของยีสต์สกัดและแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

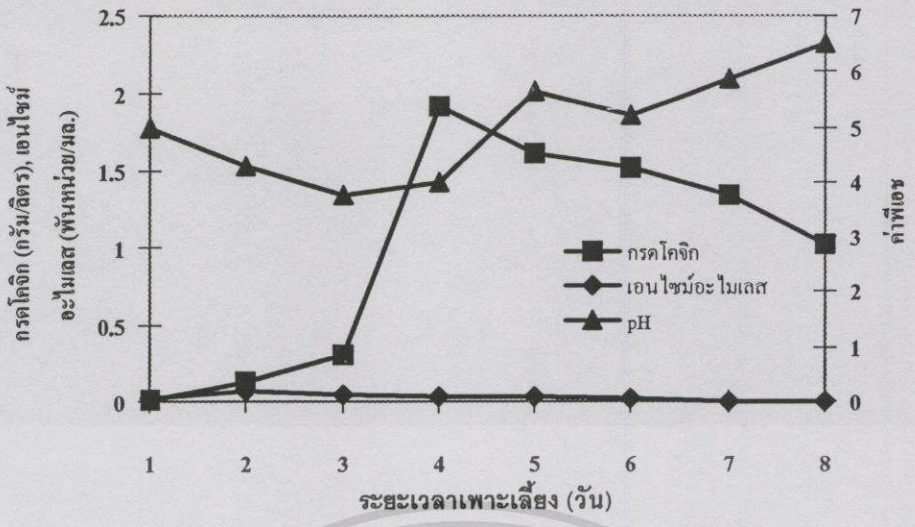
จากการศึกษาความเข้มข้นของแป้ง ผลของยีสต์สกัดและแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยแปรผันความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังดังนี้คือ 1 5 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัดและแหล่ง-อนินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต เพื่อผลิตกรดโคจิกของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 มีผลการทดลองดังนี้ เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์-สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 796.11 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ และ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไม-เลสสูงสุด 178.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1 -เปอร์เซ็นต์ และ แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 117.81 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

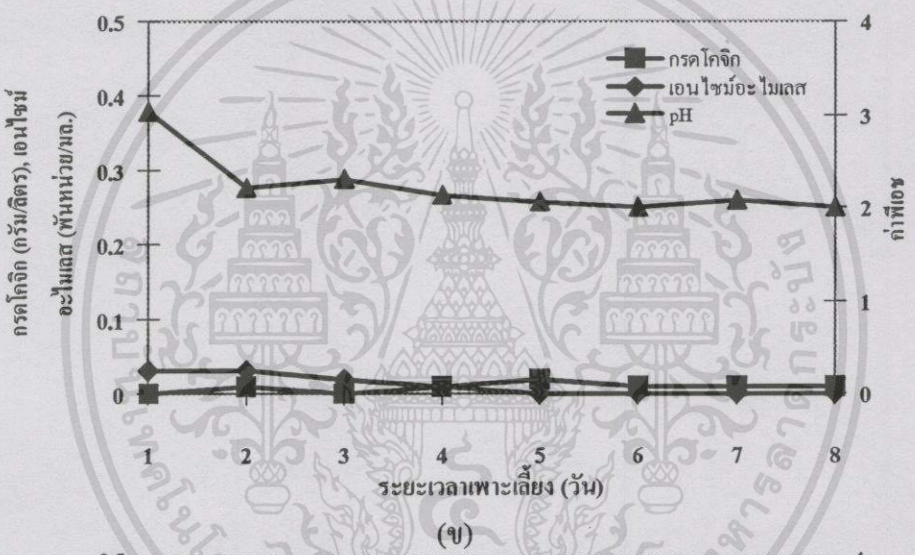


รูปที่ 4.14 แสดงการผลิตกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส และค่าพีเอชของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ในอาหาร Starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม (ก) ยีสต์สกัด (ข) แอมโมเนียมซัลเฟต และ (ค) แอมโมเนียมไนเทรต

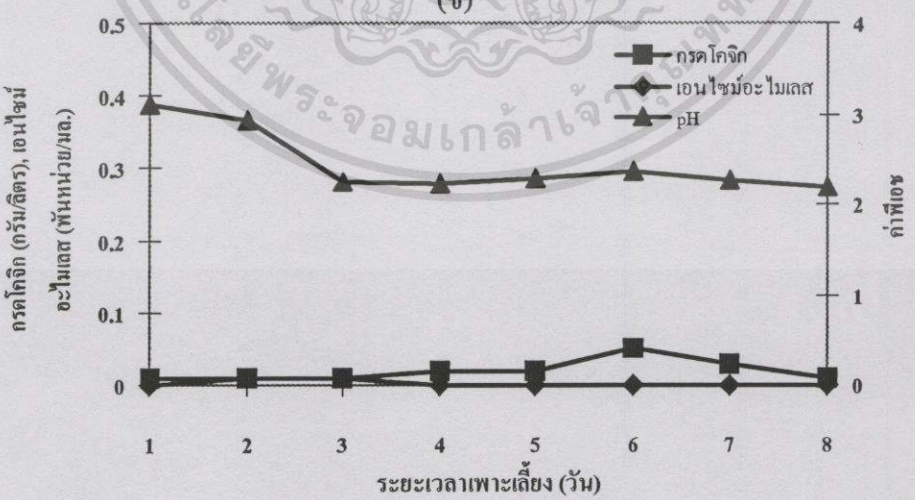
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



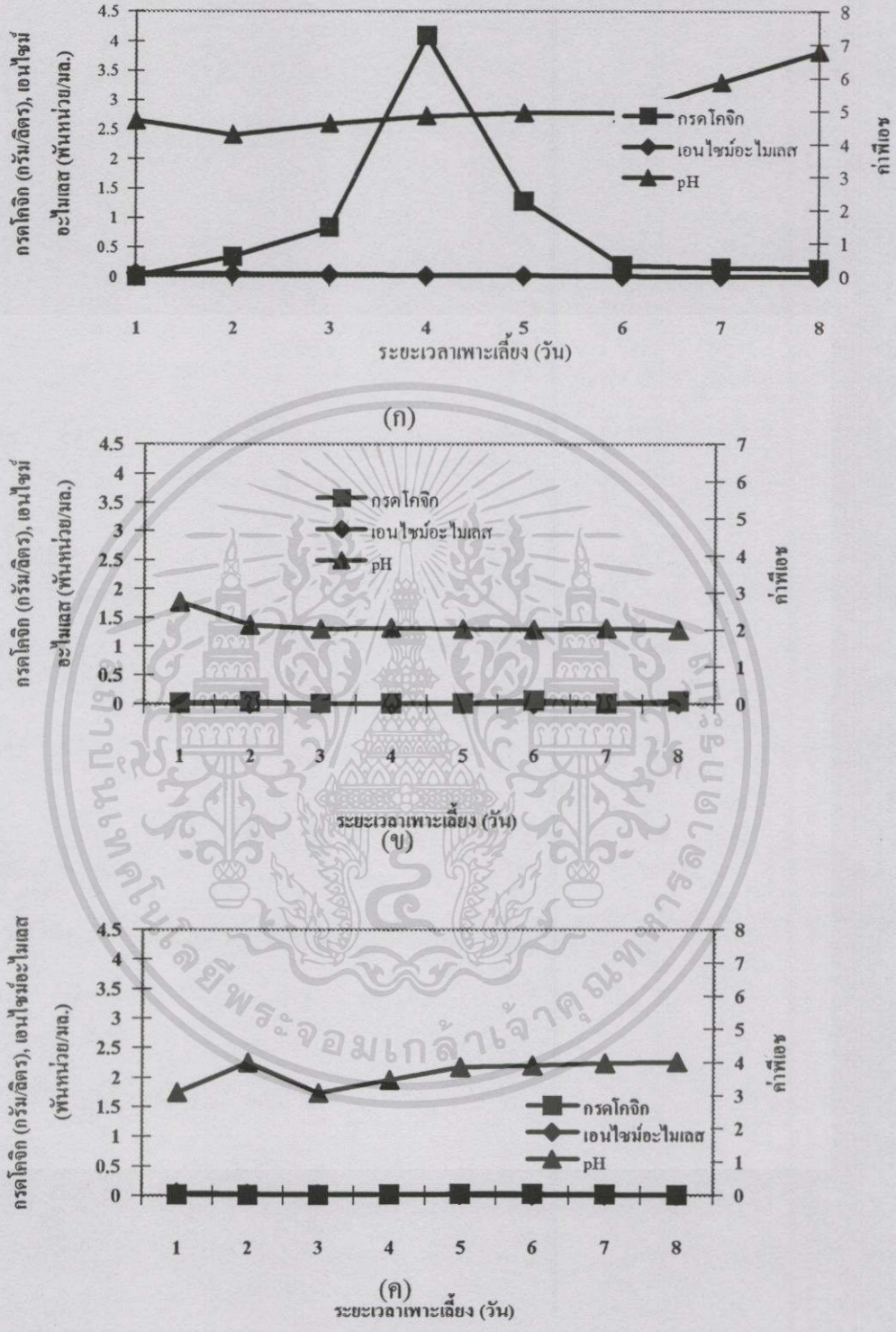
(ข)



(ค)

รูปที่ 4.15 แสดงการผลิตกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส และค่าพีเอชของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ในอาหาร Starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์ที่เติม (ก) ยีสต์สกัด (ข) แอมโมเนียมซัลเฟต และ (ค) แอมโมเนียมไนเทรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 แสดงการผลิตกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส และค่าพีเอชของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ในอาหาร Starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ที่เติม (ก) ยีสต์สกัด (ข) แอมโมเนียมซัลเฟต และ (ค) แอมโมเนียมไนเทรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเพิ่มปริมาณของแป้งมันสำปะหลังเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 1.92 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 617.61 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 342.72 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์ และ แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 146.37 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.15)

เมื่อเพิ่มปริมาณของแป้งมันสำปะหลังเป็น 8 เปอร์เซ็นต์ และใช้ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 4.09 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 567.63 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 0.06 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 124.95 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ และ แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 410.23 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.16)

พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 มีการผลิตกรดโคจิกน้อยมาก แม้จะใช้ยีสต์สกัดและแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนต่างๆแล้วก็ตาม อาจกล่าวได้ว่าสูตรอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ และส่งผลกระทบต่อการผลิตกรดโคจิก เมื่อเพิ่มปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น 5 และ 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อรามีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นเฉพาะเมื่อใช้ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 1.92 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และ 4.09 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ เมื่อสังเกตการผลิตเอนไซม์อะไมเลสพบว่า มีค่าสูงเท่ากับ 617.61 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และ 567.63 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณแป้งมันสำปะหลังมากขึ้น เชื้อราจะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและปริมาณกรดโคจิกเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าการมีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เพียงพอมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการผลิตกรดโคจิก สำหรับแหล่งไนโตรเจนพบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด จะเห็นได้ว่ายีสต์สกัดซึ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน มีความเหมาะสมต่อการส่งเสริมให้เชื้อราผลิตกรดโคจิกมากกว่าแหล่ง-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนินทรีย์ไนโตรเจนอื่นๆ เนื่องมาจากยีสต์สกัดมีองค์ประกอบเป็นสารอาหารและกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่อุดมสมบูรณ์ ซึ่งส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อทำให้มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมาย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กลง และใช้น้ำตาลโมเลกุลขนาดเล็กนี้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโคจิกต่อไป

ดังนั้นความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ผลของยีสต์สกัดและแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 มากที่สุดคือ แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นอินทรีย์ไนโตรเจน โดยผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดเท่ากับ 4.09 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's new multiple-range test พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันมีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ฉ)

4.6.2 ศึกษาชนิดของแป้ง

จากการศึกษาชนิดของแป้งที่เหมาะสมต่อการผลิตการผลิตกรดโคจิกของเชื้อลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 4.6.1 โดยทำการแปรผันชนิดแป้งดังนี้คือ แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และแป้งข้าวเจ้า แสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.17

จากรูปที่ 4.17 เมื่อนำเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 4.6.1 ที่แปรผันแป้งชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวโพด แสดงผลการทดลองดังนี้ เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง เชื้อรามีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 4.09 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 1,460 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้แป้งข้าวเจ้า เชื้อรามีการผลิตกรดโคจิกน้อยมากคือ 0.06 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 2,140 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับแป้งข้าวโพด เชื้อรามีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 4.72 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 1,540 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง

จากผลการทดลองพบว่าแป้งที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 คือแป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง เนื่องจากให้ปริมาณกรดโคจิกใกล้เคียงกัน Rosfarizan *et al.* (1998) ซึ่งทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการคัดเลือกเชื้อราจากแหล่งต่างๆจากธรรมชาติ พบว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* S33-2 ซึ่งได้มาจากดอกไม้ morning glory ซึ่งเป็นไม้เถาตระกูลผักบุ้ง สามารถผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีส่วนประกอบเป็นยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆกัน ได้แก่ แป้งสาคู แป้งมันฝรั่ง และ แป้งข้าวโพด พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Aspergillus flavus* S33-2 สามารถเจริญได้ดีในแป้งทุกชนิด แต่ผลิตกรดโคจิกได้ดีที่สุดในแป้งข้าวโพด ซึ่งให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 12.8 กรัมต่อลิตรในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้แป้งข้าวโพด 75 กรัมต่อลิตร

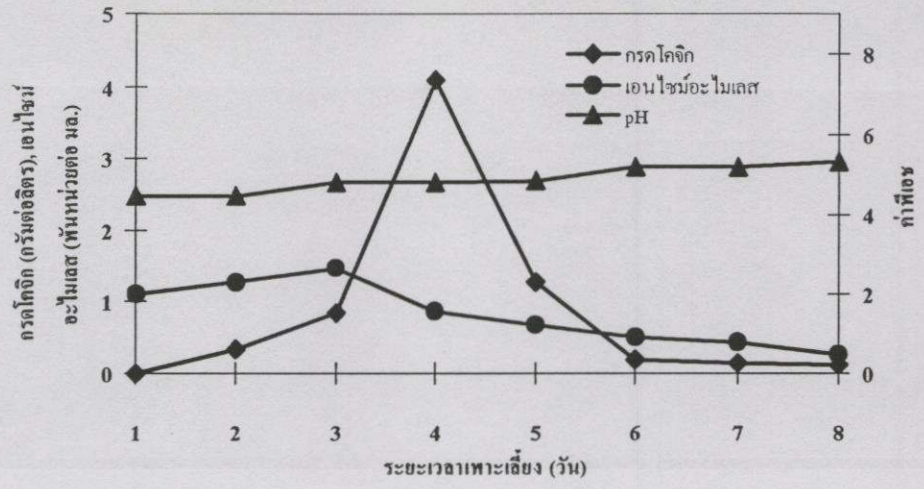
องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลัง (ได้จากส่วนหัวมันสำปะหลัง) แป้งข้าวเจ้า (ได้จากเมล็ด) และแป้งข้าวโพด (ได้จากเมล็ด) แสดงไว้ในภาคผนวก ง จากรายงานของเจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์ (2519) พบว่าแป้งเป็นส่วนประกอบหลักของส่วนเมล็ดและหัวของพืชเหล่านี้ ในแป้งมีองค์ประกอบเป็น 2 อย่าง คือ อะไมโลส และ อะไมโลเพคติน ปริมาณของอะไมโลส และอะไมโลเพคตินในพืชแต่ละชนิดไม่เท่ากัน

Copeland and McDonald (1995) รายงานว่าอะไมโลสประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคส 200-1,000 หน่วยเชื่อมต่อกันเป็นโซ่ตรงด้วยพันธะ α 1,4 glucosidic มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 10,000 – 100,000 ส่วนอะไมโลเพคตินประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคส 20-25 หน่วยต่อกิ่ง (branch) เชื่อมกันเป็นกิ่งก้านด้วยพันธะ α 1,4 และ α 1,6 glucosidic มีน้ำหนักโมเลกุล 50,000 – 1,000,000

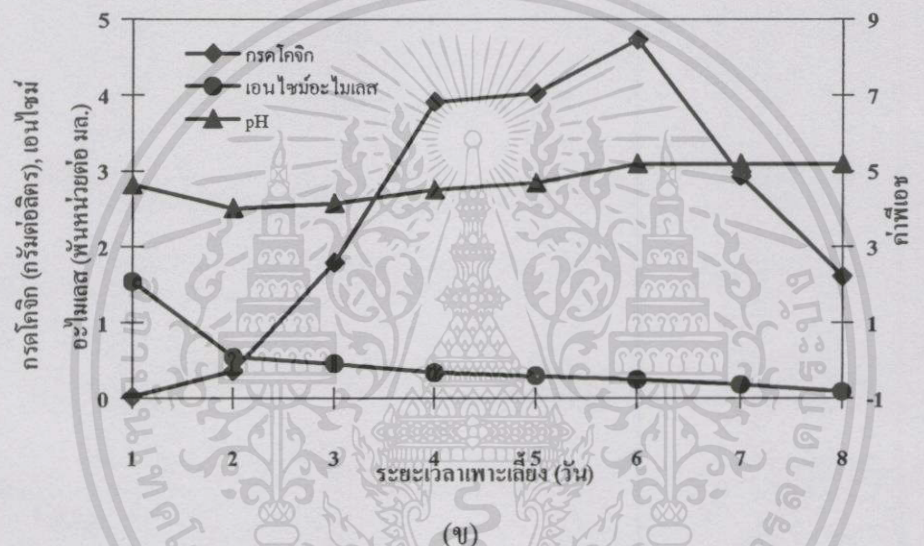
หัวมันสำปะหลังมีอะไมโลสเพียง 16-18 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแป้ง นอกนั้นเป็น อะไมโลเพคติน คือประมาณ 82-84 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแป้ง (เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2519) ส่วนเมล็ดข้าวเจ้ามีส่วนที่เป็นอะไมโลสเฉลี่ย 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแป้ง และมีอะไมโลเพคติน 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแป้ง (ประพาส วีระแพทย์. 2517) ในขณะที่เมล็ดข้าวโพดมีอะไมโลสประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแป้ง นอกจากนั้นประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแป้งเป็นอะไมโลเพคติน (Copeland and McDonald. 1995)

การที่แป้งข้าวโพดและแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงใกล้เคียงกัน เนื่องจากแป้งข้าวโพดและแป้งมันสำปะหลังมีปริมาณอะไมโลสใกล้เคียงกัน คือ มีอะไมโลสอยู่ระหว่าง 15-18 เปอร์เซนต์ ทำให้แป้งข้าวโพดและแป้งมันสำปะหลังละลายน้ำได้ดีกว่า จึงทำให้เอนไซม์อะไมเลส ย่อยแป้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่แป้งข้าวเจ้ามีปริมาณอะไมโลสสูงกว่าประมาณ 30 เปอร์เซนต์ ดังนั้นแป้งข้าวเจ้าจึงละลายน้ำได้น้อยกว่าส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์อะไมเลส มีประสิทธิภาพลดลง อาหารที่เตรียมจากแป้งข้าวเจ้ามีลักษณะจับเป็นก้อน ซึ่งมีผลต่อการเจริญของเชื้อราและการผลิตกรดโคจิกลดลงด้วย

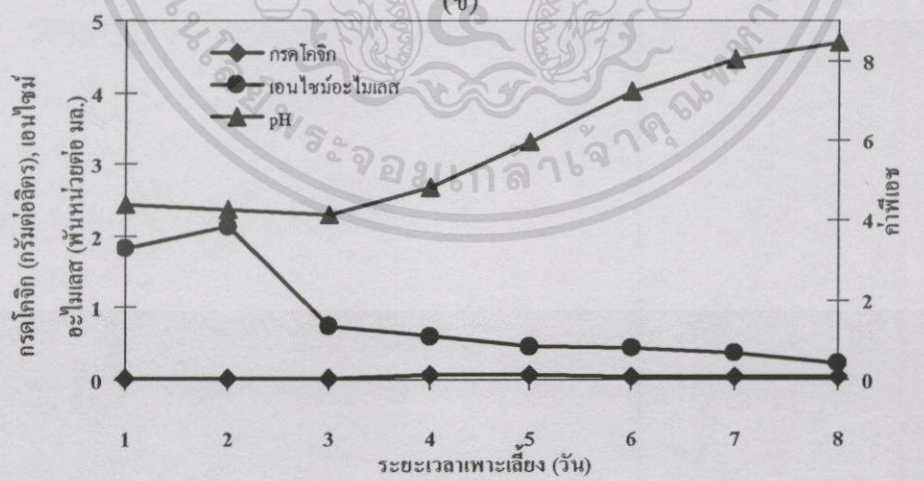
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.17 แสดงการผลิตกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส และค่าพีเอชของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้ง (ก) แป้งมันสำปะหลัง (ข) แป้งข้าวโพด และ (ค) แป้งข้าวเจ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

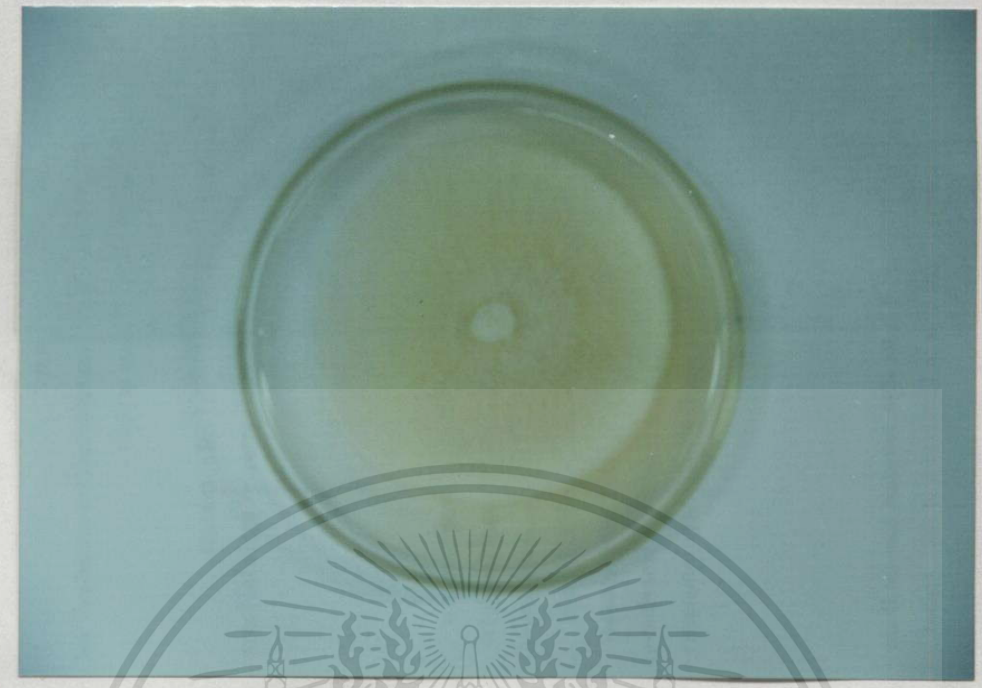
4.7 การศึกษาความเสถียรของสายพันธุ์เชื้อราลูกผสม

4.7.1 การศึกษาทางด้านสันฐานวิทยาของเชื้อรา

ทำโดยนำเชื้อลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด มาทำการถ่ายเชื้อในอาหารแข็ง Starch medium เป็นจำนวน 5 ครั้ง โดยดำเนินการทดลองตามวิธีการในข้อ 3.2.8.1 ทำการเปรียบเทียบลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่ทำการถ่ายทั้ง 5 ครั้ง ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.18 ถึง 4.22

รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ในอาหารแข็ง Starch medium

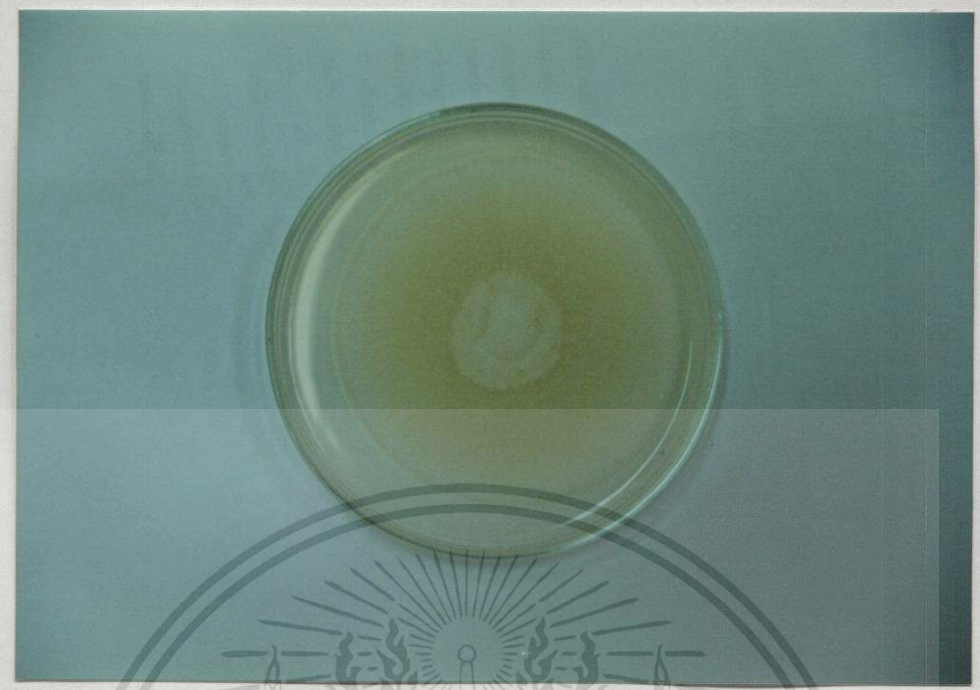
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ในอาหารแข็ง Starch medium

รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ในอาหารแข็ง Starch medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 แสดงลักษณะของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 ในอาหารแข็ง Starch medium

รูปที่ 4.22 แสดงลักษณะของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 5 ในอาหารแข็ง Starch medium

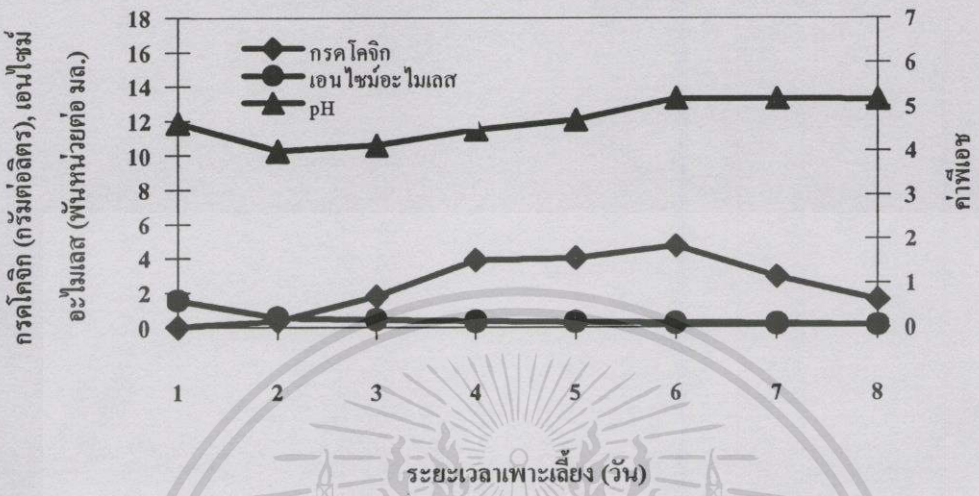
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.18 จะพบว่าโคโลนีของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 มีลักษณะฟูหนา มีสีขาวนวลออกเหลือง เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-7 วัน โคโลนีจะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5-5.0 เซนติเมตร ในขณะที่โคโลนีของเชื้อราลูกผสมที่ได้จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 มีลักษณะโคโลนีไม่แตกต่างจากเชื้อราลูกผสมที่ทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 มากนัก (รูปที่ 4.19) ส่วนโคโลนีของเชื้อราลูกผสมที่ทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 จะพบว่าลักษณะของโคโลนีคล้ายคลึงกับเชื้อราลูกผสมที่ทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และพบว่าเส้นใยที่บริเวณขอบของโคโลนีเริ่มมีความหนามากขึ้น (รูปที่ 4.20) การเปลี่ยนแปลงของโคโลนีจะเริ่มเห็นชัดเจนมากขึ้นในเชื้อราลูกผสมที่ทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 กล่าวคือที่บริเวณด้านในของโคโลนีมีการแยกตัวเป็นบริเวณเล็กๆ ดูคล้ายเป็นวงซ้อนอยู่กับโคโลนีเดิม ภายในบริเวณเล็กๆนี้มีเส้นใยเบาบาง และมีสีเหลืองเข้มขึ้นจากเชื้อที่ทำการถ่ายเชื้อครั้งแรกๆ (รูปที่ 4.21) เมื่อสังเกตเชื้อราลูกผสมที่ถ่ายเชื้อที่ 5 (รูปที่ 4.22) จะพบว่าบริเวณเล็กๆซึ่งเป็นวงซ้อนขึ้นมาจะขยายใหญ่ขึ้นอย่างชัดเจน

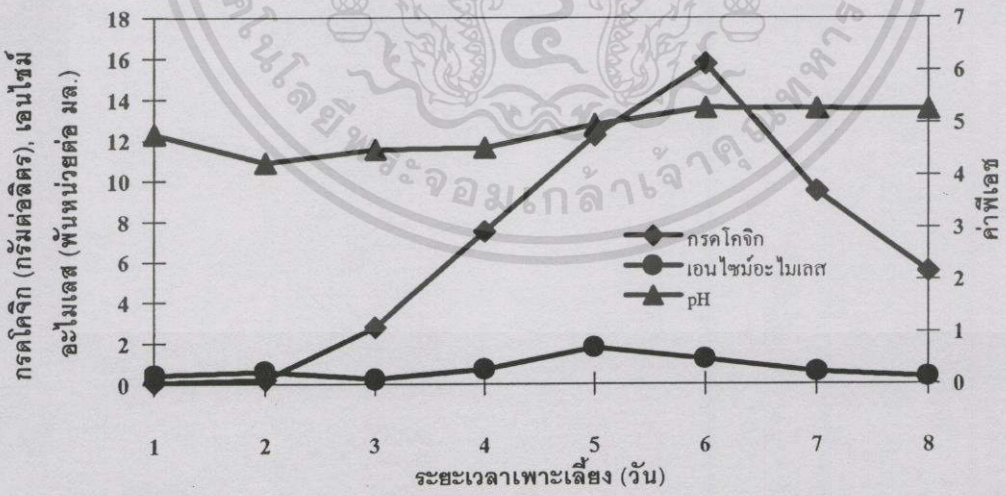
4.7.2 การผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว

ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ก่อนทำการถ่ายเชื้อ และหลังถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง ในอาหาร Starch medium ที่มีแป้งข้าวโพด 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน พบว่าเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดเท่ากับ 4.72 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 1,542 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.23) ส่วนเชื้อราลูกผสมที่ผ่านการถ่ายเชื้อครั้งที่ 5 สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดเท่ากับ 15.75 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 1,774 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.24)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 แสดงการผลิตกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส และค่าพีเอช ของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ก่อนทำการถ่ายเชื้อใน Starch medium



รูปที่ 4.24 แสดงการผลิตกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส และค่าพีเอช ของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 หลังถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง ใน Starch medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ที่ผ่านการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าเชื้อราลูกผสมก่อนทำการถ่ายเชื้อประมาณ 3 เท่า ซึ่งอาจเกิดจากมีการเพิ่มจำนวนชุดของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาในระดับของยีนต่อไป Ushijima *et al.* (1991) ได้อธิบายไว้ว่าอาจเป็นเพราะจำนวน gene copy ของเอนไซม์ในเชื้อราลูกผสมมีจำนวนแตกต่างจากในเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ อิทธิพลของการมีนิวเคลียสหลายอัน (multiplenucluse) ในโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการรวมกันแล้ว ทำให้มี gene copy ของการผลิตผลิตภัณฑ์ เกิดขึ้น 2-3 ชุดใน genome ของเชื้อราลูกผสมก็เป็นได้

Ogawa *et al.* (1989) ได้ทำการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อ *Aspergillus usamii* mut *shirousamii* และ *A. niger* โดยใช้สาร PEG พบว่าเชื้อราลูกผสมที่ผ่านการทำให้เป็นเซลล์ - แฮพลอยด์ (haploid cell) แล้วนั้น มีการผลิตกรดซิตริก และเอนไซม์อะไมเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ โดยเขาอธิบายว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อราลูกผสมที่เกิดขึ้น เนื่องจากกระบวนการ parasexual reconbination ใน genome ของเซลล์ดิพลอยด์ ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ปกติของเชื้อราประเภท *Aspergillus* sp. ทำให้เกิดการกลายของยีน (gene mutation) ซึ่งได้แก่ การรวมตัวของยีน (integration) การเพิ่มจำนวนซ้ำของยีน (duplication) และการลดลงของยีน (depletion) เป็นต้น

นอกจากนี้ Ushijima *et al.* (1991) ได้ศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยกระแสไฟฟ้าระหว่าง เชื้อ *Aspergillus oryzae* และ *A. sojze* พบว่าเชื้อราลูกผสมที่เกิดขึ้นจำนวน 3 สายพันธุ์มีลักษณะเป็นเฮเทอโรไซกัส ดิพลอยด์ (heterozygous diploid) เมื่อนำไปทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และ เอนไซม์โปรติเอส พบว่า มี 1 สายพันธุ์ ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ก้ำกึ่งระหว่างสายพันธุพ่อแม่ ส่วนอีกสองสายพันธุ์ผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ แต่หลังจากที่นำเชื้อราลูกผสมทั้งสามสายพันธุ์ไปผ่านขั้นตอนการทำให้เป็นเซลล์แฮพลอยด์ กลับพบว่าเชื้อลูกผสมที่เป็นเซลล์แฮพลอยด์แล้ว สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้น้อยกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ พวกเขาอธิบายว่าอาจเกี่ยวข้องกับระบบการควบคุม (regulation system) บางอย่างในการผลิตเอนไซม์ 2 ชนิดนี้ก็เป็นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของไลซิ่งเอนไซม์ ระยะเวลาในการบ่ม และสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 มีดังนี้คือ ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระยะเวลาในการบ่มเท่ากับ 2 ชั่วโมง และ ใช้สาร 0.6 M KCl เป็นสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ โดยได้จำนวนโปรโตพลาสต์เท่ากับ 1.58×10^5 และ 1.50×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อรา *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 โดยใช้ 40% PEG 6000 ที่มี 50 mM $CaCl_2$ เป็นสารฟิวโซเจนท์ (Fusogent) พบว่ามีเชื้อราลูกผสมที่สามารถผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้งได้จำนวน 3 สายพันธุ์ จากเชื้อทั้งหมด 198 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49, 87 และ 105 คิดเป็นความถี่ของการเกิดเชื้อราลูกผสมได้เท่ากับ 0.015หรือเท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทำการทดสอบความสามารถผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวของเชื้อราลูกผสมทั้งสามสายพันธุ์โดยใช้อาหาร Starch medium พบว่าเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 เป็นเชื้อราลูกผสมที่ผลิตกรดโคจิกได้ดีที่สุด โดยผลิตได้สูงสุด 1.92 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อลูกผสมนี้สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมถึงประมาณ 5 เท่า

เมื่อทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วย แป้งข้าวโพด 80 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และไดไฮโดรเจนโพแทสเซียมฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นประมาณ 6.0 โดยผลิตกรดโคจิกได้ 4.72 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และจะสร้างเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 1,542 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 โดยการถ่ายเชื้อเป็นจำนวน 5 ครั้ง พบว่าเชื้อลูกผสมที่ผ่านการถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 และ 5 มีลักษณะโคโลนีเปลี่ยนไปจากเชื้อลูกผสมที่ผ่านการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-3 อย่างชัดเจน สำหรับการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ 49 ที่ผ่านการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง พบว่าผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 15.75 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสูงกว่าเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ 49 ก่อนทำการถ่ายเชื้อประมาณ 3 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

เชื้อราลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ยังผลิตกรดโคจิกได้ไม่สูง จึงควรทำการศึกษาถึงสูตรอาหารและสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อไป นอกจากนี้ควรใช้วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยวิธีทำเชื้อกลายพันธุ์วิธีอื่นๆ เพื่อให้ได้เชื้อราลูกผสมที่ผลิตกรดโคจิกสูงขึ้น และมีความเสถียรของสายพันธุ์ เพื่อนำไปใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2519. **มันสำปะหลัง.** กรุงเทพมหานคร : คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. **ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา.** กรุงเทพมหานคร : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ประพาส วีระแพทย์. 2517. **ความรู้เรื่องข้าว.** กรุงเทพมหานคร : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

บุษกร สพช่อง, พิมลรัตน์ พิทักษ์วงศาภรณ์ และ มาริสา สำราญ. 2538. "การศึกษาการทำโปรโต-พลาสต์ฟิวชั่นและการหาออกโซโทรฟิกมิวแตนท์ของเชื้อราโมแนสคัส 4 สายพันธุ์ KB20M1, KB10M16, KB20M10.2 และ KB11304." โครงงานพิเศษปริญญาตรีภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

สุมาลี พิชญางกูร. 2541. **เห็ดโคนและลูกผสมฟิวแสนท์ของจุลินทรีย์.** กรุงเทพมหานคร : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรพล อุปดิสสกุล. 2528. **สถิติการวางแผนการทดลองเบื้องต้น.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร. : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536. **โปรโตพลาสต์ฟิวชั่นของจุลินทรีย์.** กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Albert, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson. 1994. **Molecular biology of the cell.** 3rd ed. London : Garland Publishing.

Anne, J. and J.F. Peberdy. 1976. "Induced fusion of fungal protoplast following treatment with polyethylene glycol." **J. Gen. Microbiol.** 92 : 413-417.

Arnteins, H.R.V. and R. Bentley. 1953. "The biosynthesis of kojic acid." **J. Biochem.** 54 : 493-508.

Arora, D.K., R.P. Rlander. and K.G. Mukerji. 1992. **Handbook of applied mycology: fungal biotechnology.** Vol. 4. 1st ed. USA : Oxford.

Bajpai, P., P.K. Agrawala. and L. Vishwanathan. 1981. "Enzymes relevant to kojic acid biosynthesis in *Aspergillus flavus*." **J. Gen. Microbiol.** 127 : 131-136.

Bajpai, P., P.K. Agrawala. and L. Vishwanathan. 1982. "Kojic acid: systhesis and properties." **J. Scient. Ind. Res.** 41 : 185-194.

Bassapa, S.C., V. Screenivasamurthy., and H.A.B. Parpia. 1970. "Aflatoxin and kojic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

production by resting cells of *Aspergillus oryzae* Link," **J. Gen. Microbiol.** 61 : 81-86.

Bentley, R. 1957. "Preparation and analysis of kojic acid." **Method Enzymol.** 3 : 238-241.

Challenger, F., L. Klein., and T.K. Walker. 1929. "The production of kojic acid from pentose by *Aspergillus oryzae*." **J. Chem. Soc.** 1498-1505.

Copeland, L.O. and M.B. McDonald. 1995. **Principals of seed science and technology.** 3rd ed. USA : Chapman&Hall.

Esser, K. and P.A. Lemke. 1994. **The mycota, growth, differentiation and sexuality. I.** 1st ed. Germany : Springer-Verlg.

Esser, K. and P.A. Lemke. 1995. **The mycota II genetics and biotechnology.** 1st ed. Germany : Springer-Verlg.

Gautam, S.P., A.K. Gupta, R. Shrivastava and M. Awasthi. 1996. "Protoplast formation from the thermaphilic fungus *Malbranchea sulfurea*, using the thermostable chitinase and laminarinase of *Paecilomyces varioti*." **World J. Microbiol & Biotech.** 12 : 99-100.

Inglett, G. E. 1970. **Corn : Culture, processing, products.** The AVI publishing, company, INC.

Kao, K.N. and M.N. Michayluk. 1974. "A method for high frequency intergenic fusion of plant protoplast." **Planta.** 115 : 355-367.

Kayahara, H. *et al.* 1990. "Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties." **Agric. Biol. Chem.** 54(9) : 2441-2442.

Kirimura, K., T. Yaguchi. and S. Usami. 1986. "Intraspecific protoplast fusion of citric acid-producing strains of *Aspergillus niger*." **J. Ferment. Technol.** 64(6) : 473-479.

Kwak, M.Y. and J.S. Rhee. 1992a. "Controlled mycelial growth for kojic acid production using Ca-alginate-immobilized fungal cells." **Appl. Microbial. Biotechnol.** 36 : 578-583.

Kwak, M.Y. and J.S. Rhee. 1992b. "Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production." **Biotech Bioeng.** 39 : 903-906.

Luh. B.S. 1980. **Rice : Production and utilization.** USA : AVI Publishing.

May, O.E. *et al.* 1931. "The production of kojic acid by *Aspergillus flavus*." **J. Am. Chem. Soc.** 53 : 774-782.

Minami, K. 1994. "Clinical effect of a kojic acid containing cream on hyberpigmentation of the skin." **Skin Res.** 36(5) : 707-709.

Morton, H.E. 1945. "Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *Aspergillus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

luteovirescens." **J. Bacteriol.** 50 : 579-584.

Nakagawa, M. and K. Kawai. 1995. "Contact allergy to kojic acid in skin care products." 32 (1) : 9-13.

Neil, A.L., G. Geoffrey. and M. Gadd. 1995. "The growing fungus." U.K. Chapman and Holl Press.

Ogawa, A. *et al.* 1995. "Production of kojic acid by Membrane-Surface Liquid Culture of *Aspergillus oryzae* NRRL 484." **J. Ferment Bioeng.** 80 (1) : 41-45.

Ogawa, k., H. Ohara and N. Toyama. 1988. "Interspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var *kawachi* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion." **Agric. Biol. Chem.** 52 (8) : 1985-1991.

Ogawa, K., M. Tsuchimochi, K. Taniguchi and S. Nakatsu. 1989. "Interspecific hybridization of *Aspergillus usamii* mut *shirousamii* and *Aspergillus niger* by protoplast fusion." **Agric. Biol. Chem.** 53 (11) : 2873-2880.

Ohyama, Y. and Y. Mishima. 1990. "Melanosis-inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism." **J. Fragrance** 6 : 53-58.

Parrish, F.W., B.J. Wiley., E.G. Simmons. and L.J. Long. 1966. "Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*." **Appl. Microbiol.** 14 : 139.

Peberdy, J.F. 1971. "Protoplasts from fungi." **Sci. Prog. (Oxford).** 60 : 73-86.

Rehm, H.J., G. Puhler. and P. Stadler. 1993. **Biotechnology: genetic fundamentals and genetic engineering.** 2nd ed. Vol. 2 VCH Press. Oxford.

Rosfarizan, M., S. Madihah. and A.B. Ariff. 1998. "Isolation of a kojic acid-producing fungus capable of using starch as a carbon source." **Lett. Appl. Microbiol.** 26 : 27-30.

Solis, S. M.E. Flores. And C. Huitron. 1996. "Protoplast from pectinolytic fungi : isolation, regenration and pectinolytic enzyme production." **Lett. Appl. Microbiol.** 23 : 36-42.

Stanbury, P.F., A. Whitaker. and S.J. Hall. 1995. **Principal of fermentation technology.** Oxford : Elsevien Science.

Stasz, T.E., G.E. Harman. and N.F. Needen. 1988. "Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*." **Mycologia.** 80(2) :141-150.

Tadera, K., F. Yahi. and A. Kobayashi. 1985. "Effects of cycasin on kojic acid-producing molds." **Agric. Biol. Chem.** 49(1) : 203-205.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Teruyoshi, H. 1992. "Isolation of fungal protoplast." 129. in Arora, D.K., R.P. Rlamder., and K.G. Mukerji. **Hand book of applied mycology : fungal biotechnology.** vol. 4. Oxford: USA.

Ushijima, S., T. Nakadai. and K. Uchida. 1990. "Breeding of new Koji-mold through interspecsific hybridization between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* by protoplast fusion." **Agric. Biol. Chem.** 54 (7) : 1667-1676.

Ushijima, S., T. Nakadai. and K. Uchida. 1991. "Interspecific electrofusion of protoplast between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*." **Agric. Biol. Chem.** 55(1) : 129-136.

Virk, S., B.N. Johri and S.P. Singh. 1992. "Protoplast from *Malbrachea pulchella* var. *sulfurea* : isolation and regeneration." **J.Gen. Appl. Microbiol.** 38 : 75-78.

Wei, C.J. *et al.* 1991. "Production of kojic acid by *Aspergillus candidus* in three culture media." **J. Food. Protec.** 54 : 546-548.

Yabuta, T. 1913. "Kojic acid new organic acid formed by *Aspergillus oryzae*." **Chem. Abstr.** 7 : 2191-2192.

Zimmermann, U. 1986. "Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion." **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacal.** 105 : 176-256.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 อาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่งปอกเปลือกและหั่น	200 กรัม
Glucose	20 กรัม
Agar	15 กรัม

ต้มมันฝรั่งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นกรองเอาน้ำใส และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เติม Glucose และ Agar ลงไป ต้มให้ละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ก.2 อาหารเลี้ยงเชื้อของ Kwak and Rhee (1992)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา โดยสูตรอาหารมีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสร้อยละ 10 มีองค์ประกอบดังนี้

Yeast extract	0.5 กรัม
Ammominum sulfate	0.75 กรัม
K_2HPO_4	0.25 กรัม
KH_2PO_4	0.25 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.25 กรัม
HCl solution เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์	0.5 มิลลิลิตร
Glucose	100 กรัม

HCl solution เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย $MnSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 2 , $FeSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 2 และ $ZnSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 3

ผสมเข้าด้วยกันทั้งหมด แล้วปรับพีเอช เป็น 6.0 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 2 นอร์มอล เตรียมส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 Starch medium สูตรของ Rosfarizan *et al.* (1998)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์อะไมเลส และทดสอบการผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้ง มีองค์ประกอบดังนี้

Yeast extract	5 กรัม
KH_2PO_4	1 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 กรัม
Soluble starch	50 กรัม

ปรับค่าพีเอชในช่วง 6.0

เตรียมส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำเข้า Microwave หรือต้มให้แป้งสุกทั่วก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หากเตรียมอาหารเป็นอาหารแข็ง (Starch agar) เติมวุ้น 20 กรัมต่อลิตร ทำให้วุ้นละลายและสุกก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อ

ก.4 PD medium (Ushijima *et al.* 1991)

PD medium คืออาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับบ่มให้สปอร์งอกเป็นเส้นใย (mycelium) มีองค์ประกอบดังต่อไปนี้

Peptone	10 กรัม
Dextrin	20 กรัม
KH_2PO_4	5 กรัม
$NaNO_3$	1 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 กรัม

ปรับค่าพีเอช ให้อยู่ในช่วง 5.5 – 6.0

เตรียมส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.5 Regeneration medium (Ushijima *et al.* 1991)

Regeneration medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับบ่มโปรโตพลาสต์ให้กลับเป็นเซลล์ โดยกระตุ้นโปรโตพลาสต์ให้มีการสร้างผนังเซลล์ขึ้น Regeneration medium จึงเป็นอาหารที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ (complete medium) มีองค์ประกอบดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hard agar

Malt extract	80 กรัม
Agar	20 กรัม

Soft agar

Malt extract	80 กรัม
Agar	5 กรัม

เฉพาะ Soft agar ขณะที่ใช้ต้องอยู่ในสภาพที่อุ่น ประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส เพื่อเททับลงบนสารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์ เตรียมส่วนผสมทั้งหมดละลายในสารละลาย KCL ความเข้มข้น 0.6 โมล (ภาคผนวก ข) ซึ่งใช้เป็นสารออสโมติก สเตบิไลเซอร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ทำการต้มให้วุ้นละลายก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.6 อาหารสำหรับเก็บรักษาสายพันธุ์

นำอาหาร Starch medium เติมวุ้น 20 กรัมต่อลิตร เตรียมส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำเข้า Microwave หรือ ต้มให้วุ้นสุกทั่วก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการบรรจุเป็นอาหารผิวเอียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมี

ข.1 0.01 M Phosphate buffer pH 5.5

เตรียมสารละลาย

A : 0.01 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 1.560 กรัมต่อลิตร)

B : 0.01 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$ 2.681 กรัมต่อลิตร)

สำหรับปริมาตร ประมาณ 500 มิลลิลิตร ทำโดย

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 385 มิลลิลิตร เข้ากับ สารละลาย B ปริมาตร 25 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้ววัดค่าพีเอช ปรับจนกว่าจะได้ ค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข.2 0.6 M KCl

ชั่ง KCl หนัก 44.470 กรัม ละลายในสารละลาย 0.01 M Phosphate buffer pH 5.5 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข.3 0.6 M $MgSO_4$

ชั่ง $MgSO_4.7H_2O$ หนัก 147.84 กรัม ละลายในสารละลาย 0.01 M Phosphate buffer pH 5.5 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข.4 0.6 M Sucrose

ชั่ง $MgSO_4.7H_2O$ หนัก 147.6 กรัม ละลายในสารละลาย 0.01 M Phosphate buffer pH 5.5 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.5 0.6 M Sorbitol

ชั่ง Sorbitol หนัก 109.3 กรัม ละลายในสารละลาย 0.01 M Phosphate buffer pH 5.5 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข.6 0.05 M $CaCl_2$

ชั่ง $CaCl_2 .2H_2O$ หนัก 0.7351 กรัม ละลายในสารละลาย 0.01 M Phosphate buffer pH 5.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ข.7 40% PEG 6000

สาร40% PEG 6000 เป็นสารฟิวโซเจนท์ (fusogen) ใช้สำหรับรวมโปรโตพลาสต์เข้าด้วยกัน เตรียมโดยชั่ง PEG 6000 หนัก 40 กรัมละลายใน 0.05 M $CaCl_2$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข.8 ไลซิ่งเอนไซม์ (Lysing enzymes)

ไลซิ่งเอนไซม์เป็นเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์ chitinase, cellulase และ proteinase ใช้สำหรับการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเตรียมโปรโตพลาสต์ การเตรียมไลซิ่งเอนไซม์จะต้องทำการกำจัดเชื้อที่อาจปนเปื้อนโดยการกรองผ่าน ชุดกรองมิลลิพอร์ โดยใช้ Swinnex และกระดาษกรองมิลลิพอร์ 0.45 ไมโครเมตร

การเตรียมไลซิ่งเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำโดย ชั่งไลซิ่งเอนไซม์ 0.2 กรัม ละลายในสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อทำให้ไลซิ่งเอนไซม์ละลายให้หมด กรองผ่านชุดกรองที่เตรียมไว้ นำสารละลายที่กรองได้มาใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์

ข.9 สารละลายไอโอดีน

Iodine crystal	1.0 กรัม
KI	2.0 กรัม
น้ำกลั่น	300 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์

ค.1 การวิเคราะห์กรดโคจิก ตามวิธีของ Bentley (1957)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสม จากการใช้สารละลายเฟอริกคลอไรด์ทำปฏิกิริยากับสารประกอบแอลฟาไฮดร็อกซิลและสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ในกรดโคจิก ให้สารละลายสีแดงเกิดขึ้น

สารเคมี

1. $FeCl_3.6H_6O$ ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ทำโดยชั่ง $FeCl_3.6H_6O$ หนัก 1 กรัมละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล (0.1 N HCl) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายกรดโคจิกมาตราฐานของ Sigma

ทำโดยเตรียมสารละลายกรดโคจิกที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 50 100 150 200 250 300 350 400 450 500 550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ปีเปตต์สารตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ ทำ Blank ควบคู่กันไปด้วยโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่างเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ

2. เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ ที่เตรียมไว้ ลงไป 4 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับ Blank ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยใช้ cuvette แก้ว

4. ทำกราฟมาตราฐานที่ใช้สารละลายมาตราฐานกรโคจิกความเข้มข้น 50-550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วคำนวณค่า Slope ของเส้นกราฟ

5. นำค่าการดูดกลืนแสง (A_{505}) ที่อ่านได้จากของสารตัวอย่างมาคำนวณปริมาณกรดโคจิกจากสูตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค.1 แสดงกราฟมาตราฐานกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสดัดแปลงจากวิธีของ นวลพรรณ ณ ระนอง (2540)

สารเคมี

1. สารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (1% Soluble starch) โดยละลายแป้ง 1 กรัมในน้ำกลั่นต้มด้วยไฟอ่อนจนแป้งละลาย ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. สารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) โดยละลาย DNS 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ (NaOH) 2.0 M ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บสารในขวดสีชา

3. สารละลายมาตราฐานน้ำตาลมอลโทส โดยใช้สารละลายน้ำตาลมอลโทสที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน ดังนี้ คือ 100 200 300 400 500 600 700 800 900 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. Citrate Phosphate buffer pH 5.0

วิธีการ

1. ใส่สารตัวอย่าง (ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม) 1 มิลลิลิตร และบัฟเฟอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

2. เติมน้ำแป้งอุ่น 50 องศาเซลเซียส ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

4. นำสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำหลอดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาทำให้เย็นทันที

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

6. ทำหลอดควบคุม (control) โดยทำเช่นเดียวกันแต่นำสารละลายตัวอย่างต้ม 5 นาทีก่อนใส่น้ำแป้งและบัฟเฟอร์ ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง

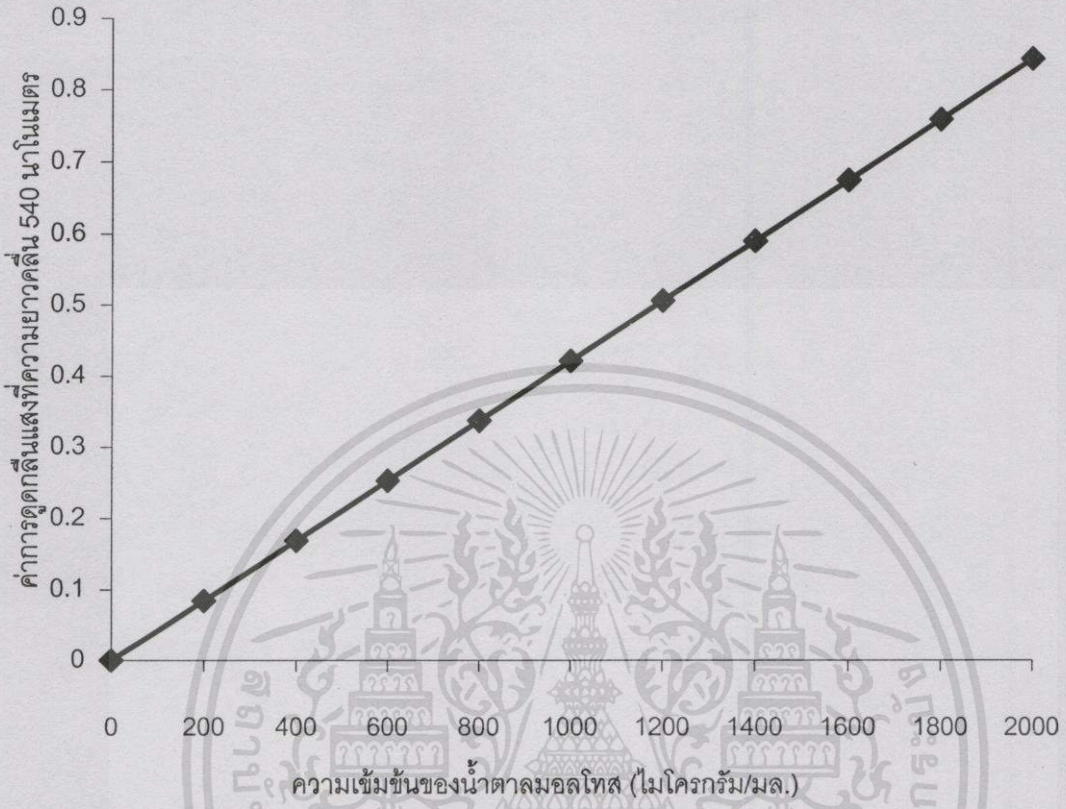
7. ทำกราฟมาตราฐานน้ำตาลมอลโทสที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 4-5 เขียนกราฟมาตราฐานระหว่างค่า A_{540} และความเข้มข้นน้ำตาลมอลโทส

8. คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

$$\text{กิจกรรมของอะไมเลส} = \frac{A_{540} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{Slope ของกราฟมาตราฐาน} \times \text{เวลา}}$$

หน่วยของเอนไซม์ คือ หน่วยต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.2 แสดงกราฟมาตราฐานน้ำตาลมอลโทส

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยแป้งและให้น้ำตาลรีดิวส์ (เทียบเท่าน้ำตาลมอลโทส) 1 ไมโครกรัมภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

องค์ประกอบแป้งชนิดต่างๆ

ง.1 แป้งมันปะหลัง

มันสำปะหลังมีประมาณโปรตีนต่ำ โดยเฉลี่ยแล้วหัวมันจะประกอบด้วยน้ำ 66 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของแร่ธาตุกับวิตามินค่อนข้างต่ำ แต่มีปริมาณของแคลเซียมและวิตามินซีสูง (ตาราง ง.1) คาร์โบไฮเดรตในส่วนหัวของมันสำปะหลังมีประมาณ 70-90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในแป้งมีองค์ประกอบ 2 อย่าง คืออะไมโลส และอะไมโลเพคติน ในแป้งจะมีอะไมโลสเพียง 16-18 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแป้ง นอกนั้นเป็นอะไมโลเพคติน คือประมาณ 82-84 เปอร์เซ็นต์ (เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2519)

ตารางที่ ง.1 แสดงส่วนประกอบของมันสำปะหลังที่ปอกเปลือกแล้ว

ส่วนประกอบต่างๆ	วิเคราะห์โดย INCAP (1968)%
น้ำ	66.0
สารสกัดไนโตรเจนอิสระ	30.8
สารสกัดอีเทอร์	0.3
เส้นใยหยาบ	1.4
โปรตีน	0.7
แร่ธาตุต่างๆ	0.9
แคลอรี่/100 กรัม	127.5

ที่มา : เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์ (2519)

ง.2 แป้งข้าวเจ้า

ส่วนที่เป็นเมล็ดของข้าวเจ้าทีองค์ประกอบดังตารางที่ ง.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 แสดงส่วนประกอบของข้าวเจ้าสีขาว

ส่วนประกอบต่างๆ	เปอร์เซ็นต์
ความชื้น	12.0
โปรตีน	6.7
ไขมัน	0.4
เถ้า	0.5
คาร์โบไฮเดรต (CHO)	80.4
เส้นใย	0.3
แคลเซียม (มิลลิกรัม/100 กรัม)	24
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม/100 กรัม)	94
เหล็ก (มิลลิกรัม/100 กรัม)	0.8
โซเดียม (มิลลิกรัม/100 กรัม)	5.0
โพแทสเซียม (มิลลิกรัม/100 กรัม)	92
ไทอามีน (มิลลิกรัม/100 กรัม)	0.07
ไรโบฟลาวิน (มิลลิกรัม/100 กรัม)	0.03
ไนอาซิน (มิลลิกรัม/100 กรัม)	1.6

ที่มา : Luh. (1980)

ง.3 แป้งข้าวโพด

องค์ประกอบทางเคมีแสดงในตารางที่ ง.3 และ แร่ธาตุที่วิเคราะห์โดย Inglet. (1976) ดังตารางที่ ง.4

ตารางที่ ง.3 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวโพด

ส่วนประกอบต่างๆ	เปอร์เซ็นต์
แป้ง	75
น้ำตาล	1.8
ไขมัน	39
โปรตีน	8.2
เถ้า	1.5

ที่มา : Copeland and McDonald. (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.4 แสดงการวิเคราะห์อาหารจาก Condensed fermented corn extractives

แร่ธาตุ	เปอร์เซ็นต์
Proximate analysis	
โปรตีน (N*6.25)	25
ไขมัน	0
Crude fibre	0
ความชื้น	47
เถ้า	78
ไนโตรเจนสกัดอิสระ	18
กรดอะมิโน	
อาร์จินีน	1.1
กรดแอสปาร์ติก	1.4
ซีสทีน	0.8
กรดกลูทามิก	3.5
ไกลซีน	1.1
ฮีสติดีน	0.7
ไอโซลิวซีน	0.7
ลิวซีน	2.0
ไลซีน	0.8
เมไทโอนีน	0.5
ฟีนินอะลานีน	0.8
โพรลีน	2.0
เซอร์รีน	1.0
ทรีโอนีน	0.9
ทริปโตเฟน	0.1
ไทโรซีน	0.5
แวลีน	1.2
อะลานีน	1.8
วิตามิน (มิลลิกรัม/ปอนด์)	
โคลีน	320

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 (ต่อ)

แร่ธาตุ	เปอร์เซ็นต์
ไนอะซีน	40
กรดเพนโททีนิก	6.8
ไพริด็อกซิน	4.0
ไรโบฟลาวิน	2.7
ไทอะมีน	1.3
ไบโอติน	0.025
กรดโฟลิก	0.1
อินโนสิทอล	125
แร่ธาตุต่างๆ	
ทองแดง (มิลลิกรัม/ปอนด์)	56.7
แมงกานีส (มิลลิกรัม/ปอนด์)	15.3
เหล็ก	0.01
แมกนีเซียม	1.0
ฟอสฟอรัส,%	1.8
แคลเซียม,%	0.06
โพแทสเซียม,%	2.4
ซิลิเนียม, ppm	0.1
พลังงาน	
Metabolizable energy (ME), Cal/lb.	707
Total digestible nuytreinte(TDN)	40

ที่มา : Inglet. (1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ จ.1 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.1 และ 4.2

ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	*Aspergillus oryzae* NRRL 484		*Aspergillus oryzae* TISTR 3086	
	pH	กรดโคจิก (กรัม/ลิตร)	p H	กรดโคจิก (กรัม/ลิตร)
0	6.0	0.00	6.0	0.000
2	2.1	8.01	2.1	0.002
4	2.1	11.46	2.1	0.003
6	2.1	15.59	2.0	0.003
8	2.1	17.95	2.1	0.003
10	2.1	18.19	2.1	0.003
12	2.1	19.00	2.1	0.003
14	2.1	19.72	2.0	0.003
16	2.0	21.54	2.1	0.002
18	2.1	22.63	2.1	0.003
20	2.1	23.65	2.1	0.003

ตารางที่ จ.2 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.3 และ 4.4

ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	*Aspergillus oryzae* NRRL 484		*Aspergillus oryzae* TISTR 3086	
	pH	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มล.)	p H	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มล.)
1	4.69	209.17	4.94	3,512
2	4.68	159.94	4.43	1,649
3	4.70	74.17	4.30	1,205
4	5.20	52.12	4.71	964
5	5.92	48.84	6.21	618
6	6.67	36.41	6.22	211

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.3 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.6

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	จำนวนโปรโตพลาสต์ (X 10^5 โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร)			
	10 มก./มล.	20 มก./มล.	30 มก./มล.	60 มก./มล.
Aspergillus oryzae NRRL 484	0.34	1.58	2.08	3.75
Aspergillus oryzae TISTR 3086	0.08	1.50	1.67	2.75

ตารางที่ จ.4 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.7

ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	จำนวนโปรโตพลาสต์ (x 10^5 โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร)	
	Aspergillus oryzae NRRL 484	*Aspergillus oryzae* TISTR 3086
1	0.75	0.67
2	1.58	1.5
3	0.63	2.75
4	0.5	1.0
5	0.13	1.0

ตารางที่ จ.5 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.8

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	จำนวนโปรโตพลาสต์ (X 10^5 โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร)			
	0.6 M KCl	0.6 M sucrose	0.6 M $MgSO_4$	0.6 M sorbitol
Aspergillus oryzae NRRL 484	1.58	0.08	0.17	0.42
Aspergillus oryzae TISTR 3086	1.50	1.83	2.50	0.92

ตารางที่ จ.6 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์และจำนวนโคโลนีที่นับได้ จากการรีเจเนอเรท ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086

ชนิดของเชื้อ	จำนวนเซลล์และโปรโต พลาสต์ที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์		จำนวนโคโลนีที่เจริญบน regenerated medium	
	ระดับความเจือจางใน KCl 100 เท่า	ระดับความเจือจางใน น้ำกลั่น 10 เท่า	ระดับความเจือจางใน KCl 100 เท่า	ระดับความเจือจางในน้ำกลั่น 10 เท่า
Aspergillus oryzae NRRL 484	5.50	2.00	5.00	0
Aspergillus oryzae TISTR 3086	6.20	1.80	5.90	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.7 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.12 ถึง 4.16

ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อ (วัน)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)				
	49	**87**	**105**	**484**	**3086**
1	0.012	0.010	0.019	0.013	0.030
2	0.130	0.349	0.344	0.067	0.020
3	0.310	0.609	0.567	0.138	0.030
4	1.920	0.497	0.435	0.205	0.030
5	1.620	0.201	0.473	0.398	0.030
6	1.520	0.047	0.341	0.340	0.020
7	1.340	0.018	0.217	0.047	0.030
8	1.030	0.059	0.078	0.001	0.030

ตารางที่ จ.8 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.12 ถึง 4.16

ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อ (วัน)	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)				
	49	**87**	**105**	**484**	**3086**
1	203.49	708.29	249.64	101.58	3512.34
2	617.61	462.00	640.13	157.11	1694.23
3	489.25	208.49	211.21	209.03	1205.04
4	332.72	141.37	187.65	102.66	964.51
5	297.02	67.83	100.22	63.49	706.32
6	152.71	40.08	31.41	34.99	618.72
7	79.97	16.42	21.06	11.00	471.75
8	29.27	10.02	18.11	6.40	205.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.9 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.17 ถึง 4.19

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	0.002	0.002	0.001	0.012	0.009	0.013	0.008	0.029	0.019
2	0.007	0.003	0.001	0.130	0.012	0.014	0.336	0.040	0.013
3	0.012	0.006	0.002	0.310	0.003	0.014	0.840	0.012	0.011
4	0.009	0.007	0.011	1.920	0.011	0.015	4.086	0.002	0.021
5	0.011	0.012	0.029	1.620	0.015	0.018	1.277	0.017	0.033
6	0.034	0.025	0.010	1.520	0.011	0.049	0.192	0.061	0.033
7	0.031	0.005	0.006	1.340	0.010	0.024	0.153	0.021	0.017
8	0.030	0.003	0.003	1.030	0.010	0.013	0.129	0.015	0.012

หมายเหตุ อักษร A หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

B หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

C หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์

D หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

E หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

F หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์

G หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

H หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

I หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.10 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.17 ถึง 4.19

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	674.73	178.50	64.26	203.49	342.72	49.97	567.63	124.95	410.23
2	796.11	121.38	117.81	617.61	297.02	146.37	503.37	92.82	328.44
3	596.19	82.54	31.42	489.25	171.36	128.52	442.68	64.26	201.35
4	396.27	34.27	9.28	332.72	128.52	98.88	242.76	34.26	178.5
5	309.52	21.42	2.14	297.02	57.12	76.39	211.34	11.42	135.66
6	222.77	10	1	152.71	54.26	51.41	128.55	3	84.25
7	128.52	4.57	0	79.97	21.42	36.41	88.51	2	41.41
8	92.82	3	0	29.27	10.43	5.71	60.1	1	11.5

หมายเหตุ อักษร A หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

B หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

C หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์

D หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

E หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

F หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์

G หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

H หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

I หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.11 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.17 ถึง 4.19

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าพีเอช								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	5.44	3.34	3.16	4.98	3.03	3.10	4.71	2.75	4.54
2	5.13	2.42	3.91	4.28	2.20	2.94	4.28	2.14	3.09
3	7.05	2.61	4.22	3.75	2.30	2.26	4.61	2.03	3.99
4	7.48	2.46	4.34	3.99	2.13	2.24	4.84	2.05	3.08
5	7.73	2.27	4.93	5.64	2.06	2.29	4.94	2.03	3.47
6	8.28	2.14	5.54	5.22	2.00	2.36	4.93	2.02	3.92
7	8.28	2.50	6.32	5.87	2.07	2.28	5.86	2.04	3.97
8	8.29	2.60	6.50	6.52	2.00	2.20	6.78	2.00	4.02

หมายเหตุ อักษร A หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

B หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

C หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์

D หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

E หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

F หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์

G หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

H หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

I หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.12 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.20

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง(วัน)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัม/ลิตร)		
	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งข้าวเจ้า	แป้งข้าวโพด
1	0.008	0.014	0.012
2	0.336	0.019	0.368
3	0.840	0.029	1.800
4	4.086	0.059	3.903
5	1.277	0.059	4.020
6	0.192	0.051	4.724
7	0.153	0.039	2.939
8	0.129	0.037	1.603

ตารางที่ จ.13 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.20

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง(วัน)	เอนไซม์อะไมเลส (พันหน่วย/มิลลิลิตร)		
	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งข้าวเจ้า	แป้งข้าวโพด
1	1.10	1.82	1.54
2	1.28	2.14	0.55
3	1.46	0.76	0.45
4	0.87	0.62	0.34
5	0.68	0.48	0.29
6	0.49	0.45	0.24
7	0.42	0.38	0.20
8	0.25	0.24	0.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.14 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.20

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง(วัน)	ค่าพีเอช		
	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งข้าวเจ้า	แป้งข้าวโพด
1	4.46	4.40	4.62
2	4.44	4.26	3.99
3	4.82	4.15	4.12
4	4.80	4.83	4.48
5	4.85	5.95	4.65
6	5.21	7.22	5.18
7	5.18	8.01	5.17
8	5.32	8.43	5.16

ตารางที่ จ.15 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.26

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง(วัน)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	
	ก่อนการถ่ายเชื้อ	เชื้อราลูกผสมหลังการถ่ายเชื้อครั้งที่ 5
1	0.012	0.094
2	0.368	0.219
3	1.800	2.783
4	3.903	7.517
5	4.020	12.229
6	4.724	15.754
7	2.939	9.509
8	1.603	0.039

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.16 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.26

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง(วัน)	เอนไซม์อะไมเลส (พันหน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	เชื้อราลูกผสมก่อนการถ่ายเชื้อ	เชื้อราลูกผสมหลังการถ่ายเชื้อครั้งที่ 5
1	1.54	0.43
2	0.55	0.59
3	0.45	0.23
4	0.34	0.74
5	0.29	1.77
6	0.24	1.21
7	0.20	0.59
8	0.10	0.34

ตารางที่ จ.17 แสดงผลการทดลองของรูปที่ 4.26

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง(วัน)	ค่าพีเอช	
	เชื้อราลูกผสมก่อนการถ่ายเชื้อ	เชื้อราลูกผสมหลังการถ่ายเชื้อครั้งที่ 5
1	4.62	4.78
2	3.99	4.23
3	4.12	4.49
4	4.48	4.53
5	4.65	4.96
6	5.18	5.28
7	5.17	5.27
8	5.16	5.26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ตารางค่าทางสถิติ

ฉ.1 การวิเคราะห์ทางสถิติ ของรูปที่ 4.3 และ 4.4

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

เชื้อรา 2 สายพันธุ์ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

Source of variation	d.f.	SS	MS
Treatment	1	16139010	16139010**
Error	4	118084	29521
Total	5	16257094	

C.V. (%) = 4.65%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Signification Difference)

ลำดับที่ตามความมากไปน้อย	เอนไซม์อะไมเลส(หน่วย/ม.ล)	สายพันธุ์เชื้อรา
1	3,512.00	3086
2	209.17	484
$LSD_{0.05}$	389.439	
$LSD_{0.01}$	645.885	

ฉ.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ ของรูปที่ 4.5

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ผลของความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ต่อการผลิตโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484

Source of variation	d.f.	SS	MS
Treatment	3	17.444	5.815**
Error	8	1.010	0.126
Total	11	18.455	

C.V. (%) = 4.64%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Signification Difference)

ลำดับที่ตามความมากไปน้อย	จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย (โปรโตพลาสต์/มล.)	ระดับความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ (มก./มล.)
1	3.75×10^5	60
2	2.08×10^5	30
3	1.58×10^5	20
4	0.34×10^5	10
$LSD_{0.05}$	**0.669**	
$LSD_{0.01}$	**0.974**	

ฉ.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ ของรูปที่ 4.5

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ผลของความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ต่อการผลิตโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086

Source of variation	d.f.	SS	MS
Treatment	3	7.864	2.621
Error	8	1.247	0.156
Total	11	9.111	

C.V. (%) = 7.18%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Signification Difference)

ลำดับที่ตามความมากไปน้อย	จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย (โปรโตพลาสต์/มล.)	ระดับความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ (มก./มล.)
1	2.75×10^5	60
2	1.67×10^5	30
3	1.50×10^5	20
4	0.08×10^5	10
$LSD_{0.05}$	**0.743**	
$LSD_{0.01}$	**1.081**	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ ของรูปที่ 4.6

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ผลของระยะเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484

Source of variation	d.f.	SS	MS
Treatment	4	3.358	0.840
Error	10	0.274	0.027
Total	14	3.632	

C.V. (%) = 4.48%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Signification Difference)

ลำดับที่ตามความมากไปน้อย	จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย (โปรโตพลาสต์/มล.)	ระยะเวลาในการบ่ม (ชม.)
1	1.58×10^5	2
2	0.75×10^5	1
3	0.63×10^5	3
4	0.50×10^5	4
5	0.13×10^5	5
$LSD_{0.05}$	0.301	
$LSD_{0.01}$	0.428	

ฉ.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ ของรูปที่ 4.6

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ผลของระยะเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086

Source of variation	d.f.	SS	MS
Treatment	4	5.237	1.309**
Error	10	0.758	0.076
Total	14	5.995	

C.V. (%) = 4.12%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Signification Difference)

ลำดับที่ตามความมากไปน้อย	จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย (โปรโตพลาสต์/มล.)	ระยะเวลาในการบ่ม (ชม.)
1	2.75×10^5	3
2	1.50×10^5	2
3	0.67×10^5	1
4	1.00×10^5	4
5	1.00×10^5	5
$LSD_{0.05}$	**0.501**	
$LSD_{0.01}$	**0.712**	

ฉ.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ ของรูปที่ 4.7

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ผลของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่มีต่อการผลิตโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484

Source of variation	d.f.	SS	MS
Treatment	3	3.843	1.281**
Error	8	0.157	0.020
Total	11	4.000	

C.V. (%) = 5.89%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Signification Difference)

ลำดับที่ตามความมากไปน้อย	จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย (โปรโตพลาสต์/มล.)	สารออสโมติกสเตบิไลเซอร์
1	1.58×10^5	KCl
2	0.42×10^5	Sorbitol
3	0.17×10^5	$MgSO_4$
4	0.08×10^5	Sucrose
$LSD_{0.05}$	**0.263**	
$LSD_{0.01}$	**0.383**	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ ของรูปที่ 4.7

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ผลของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่มีต่อการผลิตโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086

Source of variation	d.f.	SS	MS
Treatment	3	4.365	1.455*
Error	8	1.752	0.219
Total	11	6.117	

C.V. (%) = 6.79%

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Signification Difference)

ลำดับที่ตามความมากไปน้อย	จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย (โปรโตพลาสต์/มล.)	สารออสโมติก สเตบิไลเซอร์
1	2.50×10^5	$MgSO_4$
2	1.83×10^5	Sucrose
3	1.50×10^5	KCl
4	0.92×10^5	Sorbitol
$LSD_{0.05}$	**0.881**	
$LSD_{0.01}$	**1.282**	

ฉ.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ ของรูปที่ 4.11-4.13

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ผลของผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา 5 สายพันธุ์

Source of variation	d.f.	SS	MS
Treatment	5	7.320	1.830**
Error	10	0.892	0.089
Total	15	8.212	

C.V. (%) = 8.19%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Signification Difference)

ลำดับที่ตามความมากไปน้อย	กรดโคจิก (กรัม/ลิตร)	สายพันธุ์
1	2.068×10^5	49
2	0.654×10^5	484
3	0.465×10^5	105
4	0.430×10^5	87
5	0.035×10^5	3086
$LSD_{0.05}$	**0.131**	
$LSD_{0.01}$	**0.187**	

ฉ.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ ของรูปที่ 4.14-4.16

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ผลของสูตรอาหาร 9 สูตรที่มีต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราถูกผสมสายพันธุ์ที่ 49

Source of variation	d.f.	SS	MS
Treatment	8	1.921	0.284*
Error	18	0.548	0.107
Total	26	2.469	

C.V. (%) = 7.91%

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's new multiple – range test

ลำดับที่ตามความมากไปน้อย	ค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัม/ลิตร)	สูตรอาหาร
1	2.880	G
2	0.534	D
3	0.193[a]	H
4	0.132[a]	I
5	0.092[a]	A
6	0.070[a]	B
7	0.069[a]	F
8	0.045[a]	E
9	0.043[a]	C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อักษร a หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยมีความหมายอย่างสมบูรณ์ดังนี้ สูตรอาหาร A,B,C,E,F,H,I ให้ผลการผลิตกรดโคจิกไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

หมายเหตุ อักษร A หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

B หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

C หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์

D หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

E หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

F หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์

G หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

H หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์

I หมายถึง แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์

ฉ.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ ของรูปที่ 4.17

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ผลของชนิดแป้งที่มีต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49

Source of variation	d.f.	SS	MS
Treatment	1	165.270	165.270*
Error	4	1.505	0.376
Total	5	666.775	

C.V. (%) = 3.15%

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Signification Difference)

ลำดับที่ตามความมากไปน้อย	กรดโคจิก (กรัม/ลิตร)	ชนิดของแป้ง
1	4.72	แป้งข้าวโพด
2	4.09	แป้งมันสำปะหลัง
3	0.06	แป้งข้าวเจ้า
$LSD_{0.05}$	**1.390**	
$LSD_{0.01}$	**2.306**	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ ของรูปที่ 4.23-4.24

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ผลของรุ่นของเชื้อราลูกผสมสายพันธุ์ที่ 49 ที่มีต่อการผลิตกรดโคจิก

Source of variation	d.f.	SS	MS
Treatment	3	47.438	15.813**
Error	8	0.643	0.080
Total	11	48.081	

C.V. (%) = 3.56%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Signification Difference)

ลำดับที่ตามความมากไปน้อย	กรดโคจิก (กรัม/ลิตร)	รุ่นที่
1	15.75	5
2	4.72	1
$LSD_{0.05}$	6.484	
$LSD_{0.01}$	9.434	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวฐิติมา ศรีสกุณี เป็นชาวฝั่งธนบุรี จังหวัดกรุงเทพมหานคร เกิดเมื่อวันที่ 28 เมษายน 2518 สำเร็จการศึกษาระดับอุดมศึกษาจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2539 ในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ (BIOTECHNOLOGY) ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ เข้าทำงานที่บริษัทควีอลลิตี้แล็บ เขตสะพานสูง กทม. เป็นเวลาประมาณ 1 ปี ก่อนมาศึกษาต่อระดับปริญญาโท ในปีการศึกษา 2541 รวมระยะเวลาในการศึกษาระดับปริญญาโทได้ 2 ปีการศึกษา กับ 1 ภาคเรียน (2 ปีครึ่ง)

ผลงานวิชาการในระหว่างเป็นนักศึกษาปริญญาโท คือบทความวิชาการ 1 ฉบับ (Presentation) เรื่องการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 เพื่อผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้ง ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 1 วันที่ 10-11 มิถุนายน 2543 ณ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้