บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกราจากตัวอย่างดินตามบริเวณต่าง ๆ ที่คาดว่าจะมีราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสจากแหล่งต่าง ๆ ตะกรันน้ำมันและส่วนต่าง ๆ ของพืชน้ำมัน รวม 21 แหล่งสามารถคัดแยกราได้ทั้งสิ้น 70 ไอโซเลตบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ราส่วนใหญ่ที่คัดเลือกได้มาจากแหล่งตัวอย่างดิน โดยเฉพาะดินจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ดินจากในป่า ดินจากทุ่งนา ซึ่งอาจเนื่องจากดินจากแหล่งธรรมชาติมีความอุดมสมบูรณ์ และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี จึงมีความหลากหลายของราให้คัดเลือกตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการได้ อย่างไรก็ตามการคัดเลือกราจากสภาวะต่าง ๆ จะมีโอกาสในการคัดเลือกชนิดของราหลากหลายแตกต่างกัน จึงมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป

การคัดแยกราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเพสมีหลายวิธี วิธีการใช้ไตรบิวไทริน (tributyrin) (Lawrence, Fryer และ Reiter, 1967) หรือ Tween 80 (Sierra,1957) เป็นสารตั้งต้นโดยสังเกตจากการสร้างวงใสรอบโคโลนีเพื่อวัดความสามารถในการผลิตไลเพส แต่เนื่องจากไตรบิวไทรินและ Tween 80 เป็นสารตั้งต้นจำพวกสายคาร์บอนสายสั้นซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบทรูไลเพส (true lipases) เพราะสารตั้งต้นจำพวกสายคาร์บอนสายสั้นก็สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดไลซิสด้วยเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ได้ด้วยเช่นกัน (Kouker และ Jaeger, 1987) นอกจากนี้มีการดัดแปลง ใช้ Tween 80 ร่วมกับ วิคโทเรีย บลู บี (Victoria Blue B) โดยพิจารณาจากการเกิดบริเวณของสีรอบโคโลนีของเชื้อที่สามารถผลิตไลเพสได้ และยังพบว่าการเกิดบริเวณของสีรอบโคโลนีจะจะมีบริเวณกว้างกว่าการใช้สารตั้งต้นเป็นพวกไตรโอเลอิน และชัดเจนกว่าใช้สารตั้งต้นเป็นไตรบิวไทริน (Samad และคณะ, 1988) แต่การใช้ วิคโทเรีย บลู บี ก็มีข้อเสีย คือ เมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกรดสูงจะเป็นสีแดง ดังนั้นเมื่อไลเพสเกิดปฏิกิริยาไฮโดไลซิสกับสารตั้งต้นพวกไตรกลีเซอไรด์ จะเกิดผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันซึ่งก็เป็นสาเหตุให้วิคโทเรีย บลู บี กลายเป็นสีแดง แต่นอกจากสาเหตุดังกล่าวยังมีสาเหตุอื่นอีกที่ทำให้วิคโทเรีย บลู บี กลายเป็นสีแดง เช่น ราสามารถสร้างสารบางอย่างที่มีความเป็นกรดสูง ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้วิคโทเรีย บลู บี มาใช้ในการคัดเลือกราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสได้จริง จากการคัดแยกราในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะเลือกราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพส ซึ่งไลเพสเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มที่เรียกว่าเอนไซม์ลิโพไลติก (lipolytic enzyme) เป็นเอนไซม์กลุ่มที่สามารถสลายพันธะเอสเทอร์ของไขมันได้ เอนไซม์ในกลุ่มนี้โดยทั่วไปแล้วจะประกอบด้วย 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ (1) คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (carboxylesterases) และ (2) ทรู ไลเพส (true lipases) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 กลุ่มใหญ่นี้ทำหน้าที่

หลักคือ เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยการสลายพันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำ แต่เอนไซม์ทั้ง 2 กลุ่มก็มีความแตกต่างกันที่สารตั้งต้นที่จะเข้าทำปฏิกิริยา กล่าวคือ เอสเทอเรสจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจำพวกที่มีสายคาร์บอนสายสั้น (คาร์บอนน้อยกว่า 10) เช่น ไตรบิวไทริน ส่วนไลเพสจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจำพวกที่มีสายคาร์บอนสายยาว (คาร์บอนมากกว่าหรือเท่ากับ 10) เช่น ไตรโอเลอิน (triolein) ดังนั้นในการที่จะคัดเลือกราที่มีความสามารถในการผลิต ไลเพส จึงจำเป็นที่ต้องหาสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสมสำหรับที่จะใช้ในการคัดแยกราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสได้ ดังนั้นการเลือกสารตั้งต้นที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการคัดแยกราก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ จากงานวิจัยนี้ได้เลือกสารตั้งต้นสำหรับมาเป็นส่วนประกอบในอาหารคัดเลือกราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพส คือ น้ำมันปาล์มซึ่งจะประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว และกรดไขมันที่อิ่มตัวในสัดส่วนที่สมดุล สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวนั้น ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวพันธะเดี่ยว โอเลอิก (mono-unsaturated oleic acid) 40 เปอร์เซ็นต์ขณะที่กรดไขมันอิ่มตัวประกอบด้วย กรดปาล์มมิติก (palmitic acid) 44 เปอร์เซ็นต์และกรดสเตียริก (stearic acid) 5 เปอร์เซ็นต์ (Ma และ Hanna, 1999) ซึ่งในส่วนประกอบของน้ำปาล์มจะมีกรดไขมันที่มีคาร์บอนสายยาวเป็นองค์ประกอบอยู่มากจึงเหมาะที่จะนำมาเป็นสารตั้งต้นในการคัดเลือกราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสในเบื้องต้นได้ดี นอกจากการเลือกใช้สารตั้งต้นที่เหมาะสมกับการเข้าทำปฏิกิริยาของไลเพสแล้ว การใช้สารที่เป็นสีเข้ามาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการพิจารณาถึงความสามารถการเกิดปฏิกิริยาของไลเพสได้ดียิ่งขึ้น สีที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ คือ โรดามีน บี ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีคุณสมบัติสามารถเรืองแสงได้ (fluorescence dye) ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร สีโรดามีน บีเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง พบว่าไม่ได้เป็นสาเหตุในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อและมีความเสถียรเมื่อมีสภาวะความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลง ซึ่งต่างจากสีจำพวกที่ใช้เป็น pH indicators เช่น วิคโทเรีย บลู บี และ Nile-blue sulfate ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรดด่างและยังอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้อีกด้วย มีงานวิจัยมากมายที่ใช้วิธีการคัดแยกราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพส โดยการใช้สารตั้งต้นที่เป็นคาร์บอนสายยาวร่วมกับโรดามีน บี เช่นงานวิจัยของ Kouker และ Jaeger (1987) ได้ทำการศึกษาและวิเคราะห์สูตรอาหารกึ่งแข็งที่จำเพาะและเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ไลเพส โดยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง NA ที่ประกอบด้วยน้ำมันมะกอก และโรดามีน บี (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และพบว่าสารตั้งต้นที่ใช้จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยไลเพสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* PAC 1R และ *Staphylococcous aureus* ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโรดามีน บี ซึ่งจะมีคุณสมบัติเกิดการเรืองแสงสีส้มรอบโคโลนีของแบคทีเรีย โดยจะเห็นการเรืองแสงดังกล่าวภายใต้

รังสีอัตราไวโอเลต ส่วนสายพันธุ์ *Escherichia coli* ไม่มีการผลิตเอนไซม์ไลเพสจึงไม่มีการเรืองแสงสีส้มภายใต้รังสีอัตราไวโอเลต งานวิจัยของ Savitha และคณะ (2007) ทำการคัดแยกราจากดินได้ 32 ไอโซเลต แล้วนำราที่ได้จากการคัดแยกมาทดสอบเพื่อคัดเลือกราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสได้ราทั้งหมด 4 ไอโซเลต คือ *Aspergillus* sp. 3 ไอโซเลต และ *Mucor* sp. 1 ไอโซเลต โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง NA ที่ประกอบด้วยโรดามีน บี (0.001 เปอร์เซ็นต์ w/v) และแต่ละสูตรก็จะใส่ไตรกลีเซอไรด์ (1 เปอร์เซ็นต์ v/v) ที่ต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวสาลี น้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันงา และน้ำมันถั่วเหลือง งานวิจัยของ Cardenas และคณะ (2001) ได้ทำการคัดแยกราและยีสต์จากดินทั่วโลก รวมแล้วได้ 969 ไอโซเลต และทำการคัดเลือกราเส้นใย ยีสต์ และแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเพส โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งสูตร BYPO (ภาคผนวก ก) โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์น้ำมันมะกอกหรือไตรบิวไทริน (v/v) เตรียมอยู่ใน 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลายกัมอะราบิค และโรดามีน บี (0.001 เปอร์เซ็นต์ w/v) ซึ่งจากการวิจัยนี้ก็เลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งสูตร BYPO แต่ใช้ 1 เปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มเตรียมอยู่ใน 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลาย กัม อะราบิค และโรดามีน บี (0.001 เปอร์เซ็นต์ w/v) และจากผลการทดสอบสามารถคัดเลือกราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสได้ทั้งสิ้น 38 ไอโซเลต โดยพิจารณาและคัดเลือกราที่มีความสามารถในการเรืองแสงสีส้ม ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร และนำราดังกล่าวไปทำการเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาด้วยไลเพสต่อไป

การเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาด้วยไลเพสจากการปล่อยกรดไขมันออกมาจากสารตั้งต้น สามารถตรวจสอบได้ทั้งทางคุณภาพและปริมาณมีหลายวิธี เช่นวิธีตรวจสอบ Plate assay โดยใช้สีที่คุณสมบัติเรืองแสงได้ คือ โรดามีน บี โดยพิจารณาบริเวณที่มีการย่อยสลายไขมันได้โดยสังเกตจากการเกิดเรืองแสงสีส้มขึ้นเมื่อดูภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต วิธีนี้เป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบในทางเชิงคุณภาพของไลเพส วิธีดังกล่าวมีการประยุกต์เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบในเชิงปริมาณได้เช่นกัน (Kouker และ Jaeger, 1987) วิธีสเปกโตรโฟโตมิทรีเป็นวิธีที่รวดเร็วและง่าย ซึ่งนำมาใช้ในการวัดการทำงานของไลเพสได้ โดยพาราไนโตรฟีนิล เอสเทอร์ (*p*-nitrophenyl ester) ที่มีกรดไขมันสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอนต่างกันโดยจะมีการเลือกมาใช้เป็นสารตั้งต้น เช่น พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท (Maia และคณะ, 2000; Savitha และคณะ, 2007) การใช้สารละลายตั้งต้นที่เป็นพาราไนโตรฟีนิล เอสเทอร์ดังกล่าวด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตมิทรี แล้วตรวจสอบผลด้วยการวัดการดูดกลืนแสงของพารา-ไนโตรฟีนอล ซึ่งเป็นสารละลายผลิตภัณฑ์หลังทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร โดยปกติแล้วเอสเทอร์ที่มีสายสั้นนั้นจะสามารถละลายน้ำได้ซึ่งเป็นการทำงานของเอสเทอเรสมากกว่าของไลเพส จึงเลือกมีการใช้พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตทมาวัดการทำงาน

ของไลเพสในงานวิจัยนี้ เพราะมีกรดไขมันสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอนสูง แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ไม่เหมาะสมในการวัดที่สภาวะของปฏิกิริยาที่เป็นกรดเนื่องจากจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง ดังนั้นการวัดด้วยวิธีนี้จะเหมาะสำหรับในสภาวะที่เป็นกลางหรือด่างเท่านั้น นอกจากนี้การใช้พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท มักพบว่าสารจะมีความขุ่นเนื่องจากพารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท ไม่ละลายน้ำหรือกรดไขมันที่ปล่อยออกมาหลังจากเกิดปฏิกิริยา ดังนั้นจึงมีการใส่ ไตรตอน เอกซ์ -100 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวลงในสารละลายของสารตั้งต้นเพื่อให้สารไม่ขุ่น โดยไตรตอน เอกซ์ -100 จะส่งผลต่อการดูดกลืนแสงของพารา-ไนโตรฟีนอล น้อยมาก (Gupta และคณะ, 2002) จากการคัดแยกราบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ที่เติมโรดามีน บี ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถคัดเลือกราได้ 38 ไอโซเลต จากการตรวจวัดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเพสของราที่มีการเรืองแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ที่เติมโรดามีน บี พบว่าราไอโซเลต NAN103 ที่ได้จากดินในป่าเต็งรัง จ.น่าน มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเพส 87.73±0.99 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (รูปที่ 5 และภาคผนวก ช) ซึ่งเป็นไอโซเลตที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเพสสูงที่สุดของราที่ทำการคัดเลือกทั้งหมด จึงคัดเลือกราไอโซเลต NAN103 ไปศึกษาในขั้นต่อไป จากการคำนวณค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ภาคผนวก จ)พบว่าราไอโซเลต NAN103 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงอย่างโดดเด่นเมื่อเปรียบเทียบกับราไอโซเลต อื่น ๆ (รูปที่ 5 และภาคผนวก ช) ดังนั้นจึงเลือกราไอโซเลต NAN103 มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูพันธุศาสตร์เพื่อระบุสายพันธุ์ต่อไปราไอโซเลต NAN103 เป็นราเส้นใยที่สามารถแยกได้จากดินในป่าเต็งรัง จ.น่าน ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก คือ มีเส้นใยสีขาว ฟู ขอบโคโลนีเรียบส่วนลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าราไอโซเลต NAN103 เส้นใยแบบมีผนังกั้น มีสปอร์เป็นลักษณะยาวรี มีขนาดสปอร์เล็กและใหญ่ปะปนกัน ซึ่งสปอร์ขนาดใหญ่เรียกว่าแมคโครโคนิเดียภายในสปอร์จะแบ่งเป็น 1-4 เซลล์ ส่วนสปอร์ขนาดเล็กเรียกว่า ไมโครโคนิเดียภายในสปอร์จะแบ่งเป็น 1 เซลล์ (Booth,1977; Burgess และ Liddell, 1983) จากสัณฐานวิทยาดังกล่าวยังไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของราได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการศึกษาความแตกต่างในระดับโมเลกุลหรือดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต จะสามารถจำแนกและบ่งบอกสายพันธุ์ได้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น ในการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์มักเลือกใช้บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งเป็นบริเวณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง Ribosomal DNA เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกเก็บรักษาไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง (conserved region) ดังนั้นในงานวิจัยจึงเลือกใช้วิธีการตรวจสอบ ดีเอ็นเอบริเวณ ITS เพื่อใช้จำแนกสายพันธุ์ราที่คัดเลือก โดยทำการเพิ่มปริมาณยีน ITS ด้วยไพรเมอร์ คือ ITS1F และ ITS4 ที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิค PCR โดยสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยรา ผลจากปฏิกิริยาพบ (รูปที่ 8 และ 9) ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 564 คู่เบส จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของรามาโคลนและวิเคราะห์ลำดับเบส โดยนำมา

เปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสจาก GenBank ซึ่งพบว่าข้อมูลลำดับเบสกับ *Fusarium solani* โดยสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

อาณาจักร (Kingdom) : Fungi

ศักดิ์ (Phylum) : Ascomycota

ชั้น (Class): Pyrenomycetes

ลำดับ (Order) : Hypocreales

สกุล (Genus) : *Fusarium*

ชนิด (Species) : *Fusarium solani*

จากนั้นเมื่อนำราไอโซเลต NAN103 มาทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของรา โดยเริ่มจากนำราไอโซเลต NAN103 ซึ่งมีค่าแอกทิวิตีสูงสุด มาทำการคัดแยกโคโลนี ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวแล้วจึงทำการเก็บแยกโคโลนีเดี่ยวดังกล่าวออกจากกัน เนื่องจากการชักนำให้เกิดมิวเทชันจะนิยมทำกับเซลล์ที่แยกเป็นเซลล์เดี่ยวโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้โคโลนีที่ทุกเซลล์ในเส้นใยมีสารพันธุ์กรรมที่เหมือนกันทั้งหมดเนื่องด้วยเริ่มมาจากเซลล์หนึ่งเซลล์ การชักนำให้ราเกิดมิวเทชัน มักใช้สปอร์หรือเส้นใยเดี่ยว แต่เนื่องจากเส้นใยรามีลักษณะเป็นหลายเซลล์ ดังนั้นการชักนำให้เกิดมิวเทชันจึงต้องทำเส้นใยให้เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เสียก่อนด้วยการบดให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยว หรือ ตัดเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งวิธีดังกล่าวก็มีความยุ่งยาก และต้องใช้เวลา ดังนั้นการเลือกใช้ส่วนของสปอร์รามาชักนำให้เกิดมิวเทชันก็เป็นวิธีที่สะดวก อย่างไรก็ตามการใช้สปอร์ของรามาชักนำให้เกิดมิวเทชันอาจจะเหมาะสมกับราบางชนิดเท่านั้น เพราะสปอร์ราส่วนใหญ่จะมีผนังหนาซึ่งอาจทำให้ยากต่อการชักนำให้เกิดมิวเทชันได้เช่นกัน จากการวิจัยนี้เลือกที่จะใช้สปอร์ของราไอโซเลต NAN103 โดยเตรียมสารละลายสปอร์ ด้วยสารละลายผสมของ 0.02 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 กับ Tween 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 5,000 : 1 แล้วเขย่าเพื่อให้สปอร์ของราหลุดออกมาอยู่ในสารละลายเป็นสารแขวนลอย การที่ต้องมี Tween 80 ผสมอยู่ด้วยก็เพราะที่ผิวของสปอร์ส่วนใหญ่แล้วจะมีองค์ประกอบเป็นไข Tween 80 ช่วยลดแรงตึงผิวได้ จึงทำให้สปอร์ที่อยู่กันเป็นกลุ่มก้อนกระจายออกจากกันได้ดี จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ไปเขย่าอีกครั้งที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้สปอร์แยกออกจากกันและมีกระจายสม่ำเสมอยิ่งขึ้นเพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยว ๆ แล้วนำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้มากรองด้วยสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อกำจัดเส้นใยราออกไป สารแขวนลอยสปอร์ที่ความเข้มข้นจำนวน 10^5-10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรเหมาะสมต่อการนำไปทดลองต่อไป ถ้ามีการใช้ปริมาณสปอร์ที่ไม่เหมาะสมจะทำให้ได้ผลที่ไม่น่าพอใจ เช่น จำนวนการอยู่รอดน้อยมากเนื่องจากสปอร์เริ่มต้นมีจำนวนน้อยเกินไป ถ้ามีจำนวนสปอร์มากเกินไปการชักนำให้เกิด

มิวเทชันอาจไม่สม่ำเสมอ จากนั้นเมื่อสปอร์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ก็ทำการคัดเลือกราที่มีการเจริญแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลต นำราทั้ง 12 ไอโซเลต มาวัดค่าแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีนทั้งหมด และคำนวณค่าแอกทิวิตีจำเพาะ พบว่าเมื่อค่าแอกทิวิตีจำเพาะของแต่ละไอโซเลตไม่แตกต่างกันมาก แต่ก็ได้ทำการเลือกราไอโซเลต NS4 ซึ่งมีค่า แอกทิวิตีจำเพาะสูงสุดเมื่อเทียบกับสปอร์อื่น ๆ (รูปที่ 10) ที่คัดเลือกได้ จึงนำไอโซเลตดังกล่าวไปชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตต่อไป

การปรับปรุงสายพันธุ์โดยการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต มักนิยมใช้ในมิวเทชันเชื้อจุลินทรีย์ครั้งแรกเพื่อให้ได้มิวเทชัน ในช่วงที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ 0.01-5 เปอร์เซ็นต์ (Fantini, 1975) ซึ่งจากการวิจัยพบว่าเมื่อนำสปอร์ของราไอโซเลต NS4 ไปชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและบ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืดพบว่า ทุกช่วงเวลาที่ใช้ในการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ จึงพิจารณานำมาศึกษาโดยคัดเลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยว เพื่อมาทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส ซึ่งคัดเลือกได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลต โดยที่ช่วงเวลา 5 นาทีการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตได้ 19 ไอโซเลต ที่ช่วงเวลา 10 นาทีการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตได้ 1 ไอโซเลต ที่ช่วงเวลา 15 นาทีการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตได้ 2 ไอโซเลต ที่ช่วงเวลา 20 นาทีการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตได้ 2 ไอโซเลต ที่ช่วงเวลา 25 นาทีการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตได้ 1 ไอโซเลต ที่ช่วงเวลา 30 นาทีการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตได้ 1 ไอโซเลต จะเห็นได้ว่าระยะเวลาในการฉายรังสียิ่งระยะเวลามากก็ทำให้จำนวนสปอร์ที่อยู่รอดมีจำนวนลดน้อยลง โดยทั่วไปแล้วยังมีปัจจัยอื่นอีกหลายประการที่มีผลต่อการอยู่รอดของสปอร์ เช่น ความเข้มของแสง ระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดรังสีกับจุลชีพ จำนวนจุลชีพ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวจะมีความเหมาะสมแตกต่างกันไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลชีพนั้น การใช้รังสีอัลตราไวโอเลตในการชักนำให้เกิดมิวเทชันเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเพราะ วิธีการทำได้ง่ายและสะดวกรวดเร็ว รวมทั้งก่อให้เกิดมิวเทชันได้ผลดี เซลล์หรือสปอร์ที่ผ่านมิวเทชันด้วยแสงอัตราไวโอเลตเมื่อเจริญเป็นโคโลนีแล้ว จะสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของโคโลนีได้ชัดเจน (Fantini, 1975) จากการวิจัยในครั้งนี้พบว่าหลังจากสปอร์ได้รับการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตแล้ว และเมื่อสปอร์มีการงอกและเจริญขึ้นมาพบว่ามีโคโลนีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเทียบขนาดโคโลนีที่ไม่ได้รับการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเมื่อเจริญในระยะเวลา 24 ชั่วโมงเท่ากัน แต่เมื่อนำราที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตไปเปลี่ยนอาหารใหม่พบว่าการเจริญของโคโลนีของระหว่างที่ได้และไม่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตมีการเจริญไม่แตกต่างกัน จากลักษณะการเจริญของโคโลนีดังกล่าวอาจเกิดจากการได้รับรังสีในระยะแรกอาจทำให้เกิดความผิดปกติของลำดับเบส โดยรังสีอัลตราไวโอเลตจะทำให้เกิดพันธะเคมีที่ผิดปกติระหว่างเบสไพริมิดีนที่อยู่ติดกัน ส่งผลให้เกิดความผิดพลาดซึ่งส่วนใหญ่พบว่ามักจะเกิดเป็นไทมีนไดเมอร์มากกว่าไซโตซีนไดเมอร์

เมื่อเกิดไทมีนไดเมอร์จะส่งผลให้มีการยับยั้งกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอและเกิดความผิดพลาดขณะที่มีการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอ การซ่อมแซมดีเอ็นเอให้กลับสู่สภาพปกติได้ โดยแบ่งเป็นปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง (photoreactivation) ดังนั้นหลังจากการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตจึงต้องเก็บไว้ในที่มืดเพื่อป้องกันการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ส่วนการซ่อมแซมความผิดปกติอีกปฏิกิริยาคือปฏิกิริยาการซ่อมแซมดีเอ็นเอโดยไม่ใช้แสง (dark repair) ในกรณีที่เกิดความผิดปกติลำดับเบสนั้นเกิดอยู่ในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นเอนไซม์ที่ต้องการก็จะทำให้มิวแทนต์มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป แต่ถ้าหากเกิดมิวเทชันที่เปลี่ยนแปลลำดับเบสที่บริเวณสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์เกิดการสูญเสียไป จนไม่สามารถสร้างโปรตีนชนิดนั้นขึ้นมาได้หรือสร้างขึ้นมาแล้วแต่มีองค์ประกอบที่เปลี่ยนแปลงไปจนไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อเซลล์ได้อีก เซลล์นั้นก็จะตายในที่สุด ราที่สามารถอยู่รอดและถูกคัดเลือกมาทั้งหมด 27 ไอโซเลตที่ได้จากการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตจะถูกนำมาวัดค่าแอกทิวิตีการทำงานของเอนไซม์ไลเพส ปริมาณโปรตีนทั้งหมด และ คำนวณค่าแอกทิวิตีจำเพาะในชั่วรุ่นที่ 2 และ ชั่วรุ่นที่ 6 เพื่อดูการทำงานของเอนไซม์ไลเพส ซึ่งเมื่อคำนวณค่าแอกทิวิตีจำเพาะในชั่วรุ่นที่ 2 แล้วเปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะกับราไอโซเลต NS4 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่า 15 ไอโซเลต และต่ำกว่า 12 ไอโซเลต ส่วนค่าแอกทิวิตีจำเพาะในชั่วรุ่นที่ 6 พบว่าค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่า 8 ไอโซเลต และต่ำกว่า 19 ไอโซเลต (รูปที่ 12) แม้ว่าจะทำการคัดเลือกราที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดต่ำแล้วก็ตาม แต่ก็ไม่ได้มิวแทนต์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นทั้งหมด เพราะการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีมิวเทชันนั้น จะเกิดขึ้นแบบสุ่มจึงไม่อาจคาดเดาได้ว่าต้องได้ผลดังปรารถนาเสมอไป ซึ่งอาจให้ผลทั้งสูงขึ้น ต่ำลง หรือเท่าเดิมก็เป็นได้

การปรับปรุงพันธุ์โดยปกติแล้วมักจะต้องการสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม การใช้รังสีอัลตราไวโอเลตมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์จะทำให้จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิมได้ แต่ถ้าต้องการให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นมาก ๆ จำเป็นต้องทำมิวเทชันอย่างต่อเนื่อง อีกทั้งการด้วยรังสีอัตราไวโอเลตนั้น มีโอกาสที่จะได้สายพันธุ์ที่ไม่เสถียรได้สูงเนื่องปฏิกิริยาการซ่อมแซมดีเอ็นเอโดยใช้แสง ซึ่งอาจจะซ่อมแซมดีเอ็นเอให้กลับไปเหมือนเดิมได้ ดังนั้นการชักนำให้เกิดมิวเทชันซ้ำโดยการใช้สาร NTG เข้ามาร่วมด้วยอาจจะทำให้ได้สายพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงขึ้นมาก ๆ ได้ งานวิจัยของ Kuhad และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษามิวเทชันของ *Fusarium oxysporum* โดยการชักนำให้เกิดมิวเทชันโดยรังสีอัตราไวโอเลตร่วมกับสาร NTG เพื่อเพิ่มความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากการตรวจสอบค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์เดิมประมาณ 2 เท่าเมื่อทำการชักนำรังสีอัตราไวโอเลตและนำมาชักนำต่อด้วยสาร NTG ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 30-60 นาที โดยเมื่อวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์เดิมประมาณ 3 เท่า ส่วนงานวิจัย

ของ Tan และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษามิวเทชันของ *Candida* sp. 99-125 ด้วยรังสีอัตราไวโอเลต สาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.05 0.1 0.2 0.5 0.7 และ 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชักนำซ้ำ 2 ครั้ง และตามด้วยนิวตรอน พบว่าทำให้ได้ค่าแอกทิวิตีของไลเพสสูงกว่าสายพันธุ์เดิมถึง 10 เท่า ในกรณีนี้การชักนำมิวเทชันซ้ำอย่างต่อเนื่องทำให้เกิดจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างมาก จากการทดลองในการวิจัยนี้ได้นำราที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุดจากการคัดเลือกโดยการชักนำให้เกิดมิวเทชันโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า UV2002 เป็นราที่มีค่าแอกติวิตีจำเพาะสูงสุด จึงนำราไอโซเลต UV2002 มาชักนำให้เกิดมิวเทชันโดยใช้สาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.1–0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าในช่วงความเข้มข้น 0.1–0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ จึงพิจารณานำมาศึกษาโดยคัดเลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยว เพื่อมาทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส ซึ่งคัดเลือกได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลต จากนั้นนำรา 14 ไอโซเลตมาวัดค่าแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีนทั้งหมด และคำนวณค่าแอกทิวิตีจำเพาะในชั่วรุ่นที่ 2 และ ชั่วรุ่นที่ 6 ซึ่งเมื่อคำนวณค่าแอกทิวิตีจำเพาะในชั่วรุ่นที่ 2 แล้วเปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะกับราไอโซเลต UV2002 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะต่ำกว่าทั้ง 14 ไอโซเลต ส่วนค่าแอกทิวิตีจำเพาะในชั่วรุ่นที่ 6 พบว่าค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่า 7 ไอโซเลต และต่ำกว่า 7 ไอโซเลต (รูปที่ 14) จากการทดลองเลี้ยงราที่ถูกชักนำด้วยสาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.1–0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ชั่วรุ่นที่ 2 และชั่วรุ่นที่ 6 แล้วนำมาวัดค่าแอกทิวิตีจำเพาะ พบว่าราที่ผ่านการชักนำด้วยสาร NTG ที่ความเข้มข้นดังกล่าวมาตรวจค่าแอกทิวิตีจำเพาะปรากฏว่าต่ำกว่าสายพันธุ์เดิมทุกไอโซเลต และเมื่อเลี้ยงราถึงชั่วรุ่นที่ 6 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราก็สูงขึ้นกว่าชั่วรุ่นที่ 2 ยกเว้นราไอโซเลต NTG022 ที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะต่ำลงเล็กน้อยและราไอโซเลต NTG022 ในชั่วรุ่นที่ 2 ก็มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่าไอโซเลตอื่น ๆ แต่ก็ยังต่ำกว่าสายพันธุ์เดิม แต่เนื่องจาก NTG022 มีความเสถียรกว่าไอโซเลตอื่น ๆ จึงทำการเลือกราไอโซเลต NTG022 มาใช้ในการทดลองต่อไป

จากการนำราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีพบว่ามีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันระหว่างสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์ (รูปที่ 16) ส่วนลักษณะโคโลนีและเส้นใยแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย กล่าวคือราไอโซเลต NS4 ถือเป็นราสายพันธุ์เดิมเส้นใยฟูโคโลนีสีขาวทั้งโคโลนี ส่วนมิวแทนต์ คือราไอโซเลต UV2002 ซึ่งได้จากการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยการฉายรังอัตราไวโอเลตที่ช่วงเวลาที่ 20 นาทีของการฉายรังสี และราไอโซเลต NTG022 ซึ่งได้จากการชักนำราไอโซเลต UV2002 ด้วยสาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมิวแทนต์ทั้งสองมีลักษณะโคโลนีคล้ายคลึงกัน โดยมีลักษณะเส้นใยฟูโคโลนีสีขาวออกเหลืองอ่อน แต่บริเวณตรงกลางโคโลนีมีเส้นใยฟูสีขาวล้วน รอบนอกโคโลนีเส้นยังจะเจริญในแนวเฉียงเล็กน้อย สามารถมองเห็นลักษณะ

เช่นนี้เมื่อดูด้านหลังโคโลนี และเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะเห็นว่าโคโลนีของมิวแทนต์ทั้งสองมีขนาดเล็กกว่าสายพันธุ์เดิมเล็กน้อย ส่วนลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์มีลักษณะคล้ายคลึงกัน จากสัญฐานวิทยาของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก (รูปที่ 15) และเมื่อนำเส้นใยของราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน มาตัดด้วยเครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร แล้วย้ายชิ้นวุ้นมาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB และตรวจวัดน้ำหนักแห้งทุก 3 วัน พบว่าในช่วง 3 ถึง 6 วันอยู่ในช่วง Exponential phase และเริ่มเข้าสู่ Stationary phase ในช่วงวันที่ 9 ถึง วันที่ 21 ซึ่งการเจริญของราไอโซเลตรา NS4 UV2002 และ NTG022 มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันมาก (รูปที่ 17) การชักนำให้เกิดมิวเทชันดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการทดสอบนำสารละลายเอนไซม์จากราไอโซเลต NAN103 มาทำเป็นไลเพสตรึงรูปที่ตรึงบนวัสดุค้ำจุน 2 ชนิด คือ โดโลไมต์ และไดอะตอมมาเชียส เอิร์ธ พบว่าสารละลายเอนไซม์จากราไอโซเลต NAN103 สามารถที่จะตรึงลงบนวัสดุค้ำจุนทั้ง 2 ชนิดได้ พบว่าไลเพสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์และวัสดุค้ำจุนไดอะตอมมาเชียส เอิร์ธ สามารถดูดซับปริมาณโปรตีนต่อกรัมวัสดุค้ำจุนใกล้เคียงกัน แต่จากการคำนวณ (ภาคผนวก จ) ค่าร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึงของวัสดุค้ำจุนไดอะตอมมาเชียส เอิร์ธก็มีค่าร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึงมากกว่าวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ อาจเป็นเพราะโครงสร้างของไดอะตอมมาเชียส เอิร์ธ มีโครงสร้างเป็นรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมาก และยังมีลักษณะเป็นผงละเอียดและเบาโดยเกิดจากซากพืชเซลล์เดียว ดังนั้นจึงทำให้เอนไซม์ถูกแทรกเข้าไปกักเก็บในรูพรุนภายในโครงสร้างดังกล่าวได้ดี เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปดังกล่าวไปใช้ทดสอบในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วทดสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี TLC โดยใช้ปริมาณโปรตีน 5 มิลลิกรัมโปรตีน ที่ 50 เปอร์เซ็นต์สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม พบว่า ผลจากการทดสอบไลเพสตรึงรูปจากวัสดุค้ำจุนทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวไม่สามารถเร่งปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลเพื่อทำให้เกิดเมทิลเอสเทอร์ที่ชั่วโมง 0 24 และ 48 ได้ คือจากการทดสอบด้วยวิธี TLC ไม่มีแถบสารเกิดขึ้น ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.72 ซึ่งก็คือ สารมาตรฐานเมทิลโอลิเอต แต่เมื่อมีการเติมน้ำลงไปในปฏิกิริยาปริมาณที่ 50 เปอร์เซ็นต์สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัมพบว่า ไลเพสตรึงรูปจากวัสดุค้ำจุนทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอล แล้วเกิดเมทิลเอสเทอร์ชั่วโมงที่ 24 และ 48 ได้ ส่วนชั่วโมงที่ 0 ไม่มีเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นเมื่อทดสอบด้วย วิธี TLC เหตุที่เอนไซม์ตรึงรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอล ได้ในกรณีที่ต้องมีน้ำ เนื่องจากน้ำสามารถปกป้องเอนไซม์จากการทำลายของเมทานอลที่ใช้ในปฏิกิริยา

ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจึงยังคงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ (Kaieda และคณะ, 2001) นอกจากการนำละลายเอนไซม์จากราไอโซเลต NAN103 ไปตรึงบนวัสดุค้ำจุนแล้ว ยังใช้สารละลายเอนไซม์จาก NAN103 ที่ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม (1.34 มิลลิลิตร) และ 100 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม (2.71 มิลลิลิตร) นำไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธี TLC พบว่าสารละลายเอนไซม์จากราไอโซเลต NAN103 สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลชั่วโมงที่ 24 และ 48 แล้วเกิดเมทิลเอสเทอร์ได้ดี โดยสามารถสังเกตเห็นแถบเมทิลเอสเทอร์บนแผ่น TLC ได้ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาที่ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม ซึ่งพบว่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแล้วเกิดเมทิลเอสเทอร์มีความแตกต่างกันที่ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม จึงนำไปทดสอบปริมาณการเกิดเมทิลเอสเทอร์ในเชิงปริมาณด้วยวิธี HPLC พบว่าถ้าใช้สารละลายเอนไซม์ปริมาณมากก็ทำให้สามารถไปเร่งปฏิกิริยาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแล้วเกิดเมทิลเอสเทอร์ปริมาณที่มากด้วยเช่นกัน และรูปแบบการใส่เมทานอลใน 2 รูปแบบ คือ โดยการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น และการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง เมื่อนำไปหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐาน พบว่าการใส่เมทานอลทั้ง 2 รูปแบบให้ค่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐานใกล้เคียงกัน ทั้งในส่วนที่มีการเติมปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม แต่การใส่เมทานอลแบบต่อเนื่องจะมีค่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐานมากกว่าการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้นเสมอ ทั้งในส่วนที่มีการเติมปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม การใส่เมทานอลลงไปในปฏิกิริยาในครั้งเดียวหมดพบว่าเมทานอลปริมาณมากจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จึงเป็นผลทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ลดลงด้วยเช่นกัน ดังนั้นการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น และการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่องจะช่วยลดปัญหาดังกล่าวลงได้ แต่จากการวิจัยพบว่าการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่องจะได้ผลิตภัณฑ์ที่ใกล้เคียงกันกับการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น แต่เนื่องจากการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่องสะดวกและใช้เวลาน้อยจึงได้เลือกวิธีการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่องมาใช้ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลในงานวิจัยนี้ตลอดการทดลอง

จากการค้นคว้าพบว่าการนำสารละเอนไซม์จากเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium solani* มาทดสอบการทำปฏิกิรายาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ยังไม่มีรายงานที่แพร่หลาย ดังนั้นปฏิกิริยา

ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นหนทางหนึ่งเพื่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์ไลเพสจาก จุลินทรีย์มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน แทนการใช้กรดและด่างเนื่องจากมีข้อดีกว่าหลายประการ เช่น ประโยชน์ต่อการรักษาสิ่งแวดล้อม แต่เนื่องจากไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์ยังมีราคาที่แพงจึงยังไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมการผลิตไบดีเซล ดังนั้นต้องมีการปรับปรุงสายพันธุ์ ปรับเปลี่ยนรูปแบบการนำเอนไซม์ไปใช้โดยให้อยู่ในรูปตรึงเพื่อที่จะได้นำมาใช้ซ้ำได้ซึ่งก็เป็นการลดต้นทุนได้บางส่วน สำหรับงานวิจัยที่ทำการพัฒนาความสามารถของไลเพสจากจุลินทรีย์เพื่อสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตไบดีเซล พบว่าส่วนใหญ่จะจุลินทรีย์จำพวกยีสต์ เช่น *Candida rugosa* *Candida antarctica* (Sumukawa และคณะ, 2000 ; Watanabe และคณะ, 2002 ; Shimada และคณะ, 2002) ซึ่งสายพันธุ์นี้ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์และพัฒนาอยู่ในรูปตรึงบนวัสดุค้ำจุนชนิด resin โดยมีชื่อทางการค้าว่า Novozyme มีการนำไปใช้อย่างกว้างขวาง ส่วนไลเพสจากแบคทีเรียจะเลือกใช้สายพันธุ์ ดังเช่น *Pseudomonas fluorescens* (Iso และคณะ, 2001) *Pseudomonas cepacia* ซึ่ง 2 สายพันธุ์นี้ Kaieda และคณะ (2001) ได้ผลิตไลเพสในรูปผงและสารละลายเอนไซม์ แล้วนำไปทดสอบการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จากน้ำมันพืชและเมทานอลแล้วได้เมทิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซล แต่เนื่องจากการไลเพสยังอยู่ในรูปอิสระเป็นผง ถึงแม้สะดวกในการเก็บและนำไปใช้ แต่มีข้อปัญหาในการนำกลับมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม

Fusarium solani เป็นสายพันธุ์ราที่สามารถผลิตไลเพสได้สูงและยังสามารถนำไปเร่งปฏิกิรายาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ ผลการทดลองด้วยวิธี TLC จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากสารละลายเอนไซม์ราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์ของ *Fusarium solani* พบว่าสามารถเกิดเมทิลเอสเทอร์ได้ทั้งทุกไอโซเลต และจากการทดสอบด้วยวิธี TLC พบว่าการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอล ชั่วโมงที่ 24 และ 48 สามารถเกิดเมทิลเอสเทอร์ในปริมาณที่ต่างกัน โดยเทียบจากขนาดของแถบเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น แต่อย่างไรก็ตามควรต้องมีการนำไปตรวจสอบในเชิงปริมาณต่อไปเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นจริงในปฏิกิริยาของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์ในแต่ละไอโซเลต ผลการทดสอบด้วยวิธี HPLC จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่ 48 ชั่วโมง และใช้ปริมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์ที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต และสาร NTG มีเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์พื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ที่ต่างกันในช่วงรุ่นที่ 2 แต่ชั่วรุ่นที่ 6 แตกต่างกันไม่มาก แม้ว่าทำการเลือกรามิวแทนต์จากการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตจากการ hydrolytic activity ที่สูงแต่ก็พบว่า synthetic activity

ไม่ได้มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันเพราะผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำสารละลายเอนไซม์ของราไอโซเลต NAN 103 มาเร่งปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลมีผลิตภัณฑ์น้อยกว่าราไอโซเลตที่มี hydrolytic activity ที่ต่ำกว่า และราไอโซเลต NTG022 ที่เลือกมาศึกษาเพราะมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะไม่เปลี่ยนแปลงมากในระหว่างชั่วรุ่นที่ 2 กับ ชั่วรุ่นที่ 6 ถึงแม้ว่าจะมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะต่ำกว่าราสายพันธุ์เดิม เมื่อนำมาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลพบว่ามีผลิตภัณฑ์ไม่แตกต่างจากราสายพันธุ์เดิมเมื่อแทนจากเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์พื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ และยังพบว่ามีราไอโซเลต NTG022 เปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์พื้นที่ใต้พีคของ เมทิลเอสเทอร์สูงกว่าของราไอโซเลต UV2002 ซึ่งมีค่า hydrolytic activity สูงกว่าก็ตาม จากในรายงานของ Wu และคณะ (1996) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากเอนไซม์ของรา 3 สายพันธุ์คือ *Aspergillus niger*, *Rhizomucor miehei* และ *Rhizopus* sp. พบว่า ไลเพสจากทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเร่งปฏิกิรายาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยเฉพาะ *R. miehei* และ *Rhizopus* sp. ได้ผลิตภัณฑ์ที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับ ยีสต์ และแบคทีเรียที่ได้ทำการศึกษาด้วยเช่นกัน และยังพบว่าค่าของ hydrolytic activity และ synthetic activity ที่ทำการวัดไม่ได้มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน (รูปที่ 31-32)