

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง 3 α ,15 β -DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 ในขวดแก้วทรงกรวย

1.1 องค์ประกอบของอาหาร

1.1.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในขวดแก้วทรงกรวยตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.2 โดยใช้ไซโตเดียมโนเตรทปริมาณ 15 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้แหล่งคาร์บอนปริมาณ 40 กรัม/ลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆกัน 11 ชนิด ทำการวิเคราะห์ปริมาณของ 3 α ,15 β -DHC และ น.น. เซลแห้งหลังจากการหมักเชื้อเป็นเวลา 72 ชม. พบว่าแป้งละลายน้ำ (soluble starch) เดกซ์ตริน และ แป้งมันสำปะหลัง ให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์สูงเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆดังแสดงในตารางที่ 1 และเมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งราคาของวัตถุดิบที่จะใช้ในการผลิต จึงเลือกแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ชนิดของแหล่ง คาร์บอน (40กรัม/ลิตร)	น.น. เซลแห้ง (กรัม/ลิตร)	3 α ,1 β -DHC (มก./ลิตร)
กลูโคส	13.1	82
กาแลคโตส	11.9	36
แลคโตส	9.0	10
ราฟิโนส	5.8	0
ซูโครส	3.0	0
ไซเดียมอะซีเตท	5.4	118
กลีเซอรอล	9.4	30
แป้งละลายน้ำ	13.8	219
เดกซ์ตริน	12.4	210
แป้งมันสำปะหลัง	12.1	201
ผงสกัดจากมอลต์	13.3	27

ตารางที่ 1 ผลของการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆต่อการเจริญของเชื้อ และการสร้าง 3 α ,1 β -DHC จาก LCA โดย *Absidia* sp.BA 16 เมื่อใช้ไซเดียมโนเตรท ปริมาณ 15 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

1.1.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อ Absidia sp. BA 16 ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.2 ใช้แป้งมันสำปะหลังปริมาณ 40 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แหล่งไนโตรเจนปริมาณ 15 กรัม/ลิตร โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ กัน 12 ชนิด ทำการวิเคราะห์ปริมาณของ 3 α ,15 β -DHC และ นน. เซลแห้งหลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 72 ชม. พบว่าไซเตียมโนเครท เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดดังแสดงในตารางที่ 2 จึงเลือกใช้ไซเตียมโนเครท เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ชนิดของแหล่ง ไนโตรเจน (15 กรัม/ลิตร)	นน. เซลแห้ง (กรัม/ลิตร)	3 α ,15 β -DHC (มก/ลิตร)
ไซเตียมโนเครท	13.8	173
แอมโมเนียมคลอไรด์	11.6	0
แอมโมเนียมซัลเฟต	12.3	0
แอสพาราจัน	18.5	86
กรดแอสพาทิก	10.7	157
ผงสกัดจากยีสต์	23.2	20
ไกลซีน	10.8	117
กรดกลูตามิก	23.9	152
กรดแอสอะมิโน	22.5	0
เปปโตน	23.1	0
กากถั่วเหลือง	_*	0
เคซีน	_*	0

ตารางที่ 2 ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆต่อการเจริญของเชื้อ และการสร้าง 3 α ,15 β -DHC โดย Absidia sp. BA 16 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 40 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

* ไม่สามารถหา นน. เซลแห้งโดยวิธีการกรอง เนื่องจากไม่สามารถแยกเซลล์ออกจากกากถั่วเหลืองและเคซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1.3 ปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อ *Absidia* sp. BA 16 ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 3.2 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ผันแปรปริมาณของแป้งมันสำปะหลังและโซเดียมไนเตรทตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 3 ทำการวิเคราะห์ปริมาณของ 3 α ,15 β -DHC และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อมีระยะเวลาการหมัก 48 และ 72 ชม. พบว่าที่อายุการหมัก 48 ชม. จะให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงกว่าที่ 72 ชม. และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 40, 50 และ 60 กรัม/ลิตร ให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์สูงเป็นที่น่าสนใจดังแสดงในตารางที่ 3 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้ง 40 กรัม/ลิตร จะให้ผลิตภัณฑ์ต่ำกว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีแป้ง 50 และ 60 กรัม/ลิตร เล็กน้อย แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อใช้ปริมาณแป้ง 50 และ 60 กรัม/ลิตรมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้อาหารที่มีปริมาณแป้ง 40 และ 50 กรัม/ลิตร ส่วนปริมาณของโซเดียมไนเตรทนั้นการแปรค่าในการทดลองนี้ไม่แสดงให้เห็นความแตกต่างของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ (ในการทดลองที่ใช้แป้ง 40 และ 50 กรัม/ลิตร) ปริมาณโซเดียมไนเตรทที่ใช้ อาจจะทำให้เกิดความจำเป็น ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงได้ผันแปรปริมาณของโซเดียมไนเตรทพร้อมทั้งหาปริมาณที่เหลือเมื่อหยุดการหมักเพื่อหาค่าที่เหมาะสมต่อไป

ปริมาณของ แมงมันสำปะหลัง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณของ โซเดียมไนเตรท (กรัม/ลิตร)	นน. เซลแห้ง (กรัม/ลิตร)		3 α ,15 β -DHC (มก./ลิตร)	
		ชม.ที่ 48	ชม.ที่ 72	ชม.ที่ 48	ชม.ที่ 72
20	5	7.5	6.9	132	40
	10	7.3	6.8	112	32
	15	7.9	7.4	112	52
30	10	9.1	8.7	300	120
	12	9.3	9.6	280	100
	15	8.5	9.4	336	104
40	10	9.9	11.9	400	224
	15	9.9	11.6	368	264
	20	9.6	10.8	408	244
50	15	10.4	13.0	448	456
	20	9.9	11.9	426	414
	25	9.9	12.7	439	448
60	20	11.3	16.3	425	434
	25	11.2	14.5	402	440
	30	10.4	13.9	460	442

ตารางที่ 3 ผลของการผันแปรปริมาณของแมงมันสำปะหลังและโซเดียมไนเตรทต่อการเจริญของเชื้อ และการสร้าง 3 α ,15 β -DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 ที่อายุการหมัก 48 และ 72 ชม.

เพื่อให้ทราบปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิต $3\alpha,15\beta$ -DHC โดยเชื้อ Absidia sp.BA 16 ในการทดลองคือไปนึ่งเลี้ยงเชื้อ Absidia sp.BA 16 ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 3.2 โดยใช้แอม้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณ 40 และ 50 กรัม / ลิตร และผัฒแปรปริมาณของโซเดียมไนเตรทเป็น 5 8 10 และ 12 กรัม / ลิตร หลังจากหมักเป็นเวลา 48 ชม. วิเคราะห์ปริมาณของ $3\alpha,15\beta$ -DHC นน. เศลแห่ง ปริมาณของแอม้งและโซเดียมไนเตรทที่เหลื้ศ พบว่าปริมาณโซเดียมไนเตรท 5 กรัม / ลิตร เพียงพอต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตกัณฑ์ ปริมาณของโซเดียมไนเตรทสูงกว่านี้ ไม่ทำให้ปริมาณของผลผลิตกัณฑ์เพิ่มขึ้นแต่กลับจะทำให้มีโซเดียมไนเตรทเหลือหลังการหมัก ส่วนปริมาณแอม้งมันสำปะหลังนั้นเมื่อใช้ปริมาณ 50 กรัม / ลิตร ถึงแม้ว่าจะให้ผลผลิตกัณฑ์สูงกว่าเมื่อใช้ปริมาณ 40 กรัม / ลิตร เล็กน้อย แต่ปริมาณแอม้งที่เหลื้ศหลังการหมักมีปริมาณสูงคังแสดงในตารางที่ 4 คัณฑ์นั้นในการทดลองคือไปนึ่งเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอม้งมันสำปะหลัง 40 กรัม / ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและมีโซเดียมไนเตรท 5 กรัม / ลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นอาหารในการเลี้ยงเชื้อ Absidia sp.BA 16 เพื่อผลิต $3\alpha,15\beta$ -DHC

แป้งมันสำปะหลัง เริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	โซเดียมไนเตรท เริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แป้งที่เหลือ กรัม/ลิตร	โซเดียมไนเตรท ที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	3 α ,15 β -DHC (มก./ลิตร)
40	5	8.8	10.3	1.4	439
	8	8.6	8.6	4.7	476
	10	8.7	13.3	6.0	439
	12	9.5	7.8	6.4	460
50	5	9.0	15.8	1.3	511
	8	8.7	20.3	4.1	483
	10	8.9	18.0	5.8	528
	12	9.0	23.6	7.9	497

ตารางที่ 4 ผลของการค้นแปรปริมาณของแป้งมันสำปะหลังและโซเดียมไนเตรทที่มีต่อการเจริญของเชื้อและการสร้าง 3 α ,15 β -DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 แสดงปริมาณของแหล่งอาหารที่เหลือหลังจากการหมักเปรียบเทียบกับ การเจริญและการสร้าง 3 α ,15 β -DHC

1.2 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) ต่อการสร้าง 3 α ,15 β -DHC

เนื่องจากสารตั้งต้น (precursor) คือ LCA ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย (0.015 กรัม/ลิตร) (11) จึงได้ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เพื่อเพิ่มการละลายของ LCA โดยคาดว่าจะช่วยให้การสร้าง 3 α ,15 β -DHC เพิ่มขึ้นได้

1.2.1 ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์

จากการวิเคราะห์ปริมาณของ 3 α ,15 β -DHC ที่เกิดขึ้นจาก LCA โดยเซลล์ระยะพัก (resting cells) ของ Absidia sp. BA 16 เมื่อนำมาแช่เบี่ยง (wet cell) 1 กรัมกับ LCA 20 มก. ในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0 ดังที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1.2 โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อละลาย LCA ปริมาตรร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆกัน ดังนี้

- เอทานอล (ethanol)
- ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO)
- ไดออกเซน (dioxane)
- ไดเมทิลฟอร์มามิด (dimethylformamide, DMF)
- ไม่เติมตัวทำละลายอินทรีย์ (control)

พบว่าไดออกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ละลาย LCA ได้เหมาะสมที่สุด โดยได้ปริมาณของ 3 α ,15 β -DHC เป็นร้อยละ 184 เมื่อเทียบกับผลที่ได้จากการทดลองที่ไม่เติมตัวทำละลายอินทรีย์ (control) ซึ่งคิดปริมาณของ 3 α ,15 β -DHC ที่เกิดขึ้นในการทดลองนี้เป็นร้อยละ 100 (relative activity) ดังแสดงในตารางที่ 5

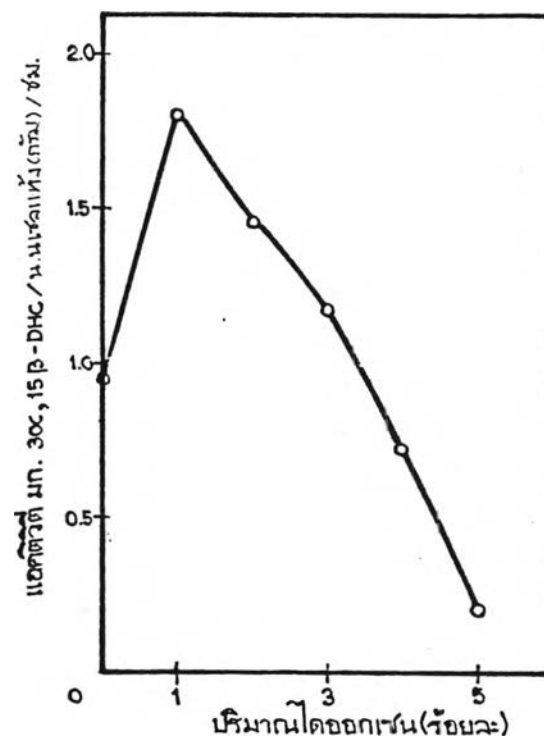
ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ ร้อยละ (ปริมาตร/ปริมาตร)	ร้อยละของ 3 α ,15 β -DHC
เอทานอล	111
โค เมทิลซิลฟอกไซด์	_*
โคออกเซน	184
โค เมทิลฟอร์มามิด	149
ไม่เคมิคัลทำละลายอินทรีย์	100

ตารางที่ 5 ผลของการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆกัน ค่อการสร้าง 3 α ,15 β -DHC จาก LCA โดยเซลล์ระยะพักของ *Absidia* sp. BA 16

* ตรวจไม่พบผลิตภัณฑ์เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟี

1.2.2 ปริมาณของไดออกเซนที่เหมาะสม

จากการวิเคราะห์ปริมาณของ $3\alpha,15\beta$ -DHC เมื่อบ่มเซลล์เบียดของ Absidia sp.BA 16 ในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0 ดังที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1.2 โดยผันแปรปริมาณของไดออกเซนเป็นร้อยละ 0-5 (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่า ปริมาณของไดออกเซนร้อยละ 1 เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดดังแสดงในกราฟรูปที่ 1



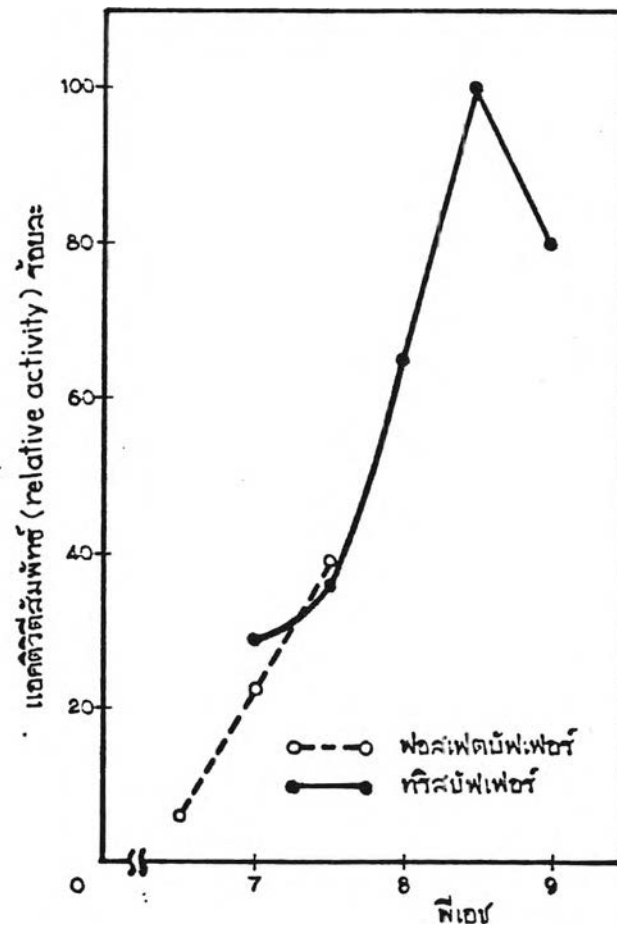
กราฟรูปที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณ $3\alpha,15\beta$ -DHC ที่สร้างจาก LCA โดยเซลล์ระยะพักของ Absidia sp. BA 16 เมื่อผันแปรปริมาณของไดออกเซน

1.3 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง 3 α , 15 β -DHC

จากการวิเคราะห์ปริมาณของ 3 α , 15 β -DHC ที่ได้จากการบ่มเซลล์เบียกของ Absidia sp. BA 16 1 กรัมกับ LCA 20 มก. ดังกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1.2 โดยใช้ ไดออกเซนร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นตัวทำละลาย LCA และคืนแปรสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอชต่างๆกันดังนี้

- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.5 7.0 และ 7.5
- ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (tris-hydrochloride buffer) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 7.5 8.0 8.5 และ 9.0

พบว่าความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.5 เหมาะสมสำหรับการสร้าง 3 α ,15 β -DHC จาก LCA โดยเซลล์ระยะพักของ Absidia sp. BA 16 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 2

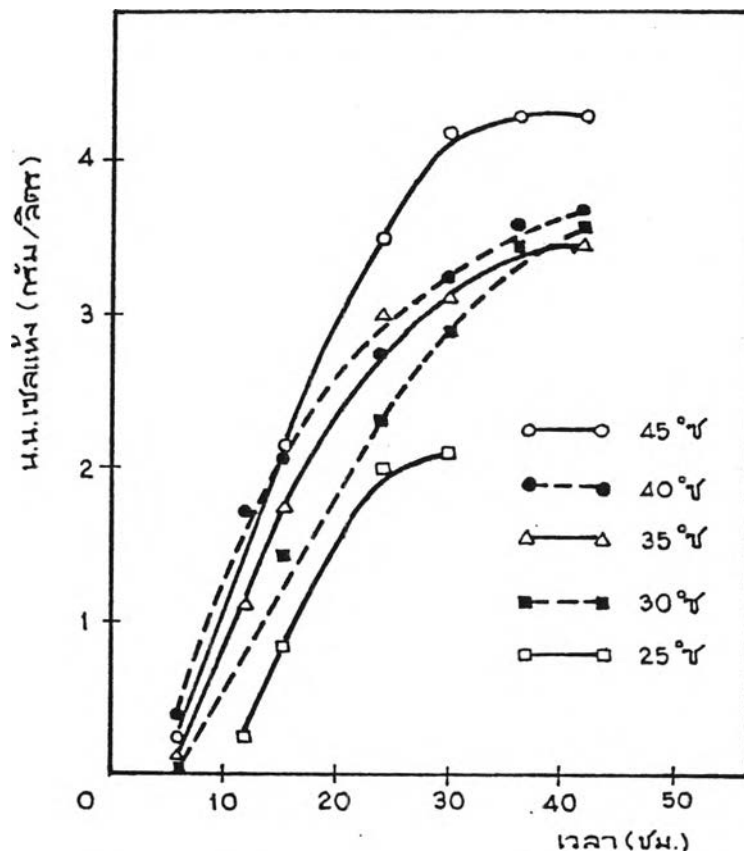


กราฟรูปที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณ $3\alpha,15\beta$ -DHC ที่สร้างจาก LCA โดยเซลล์ระยะพักของ *Absidia* sp. BA 16 ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆกัน โดยกำหนดค่าแอกติวิตี (activity) สูงสุดเป็นร้อยละ 100

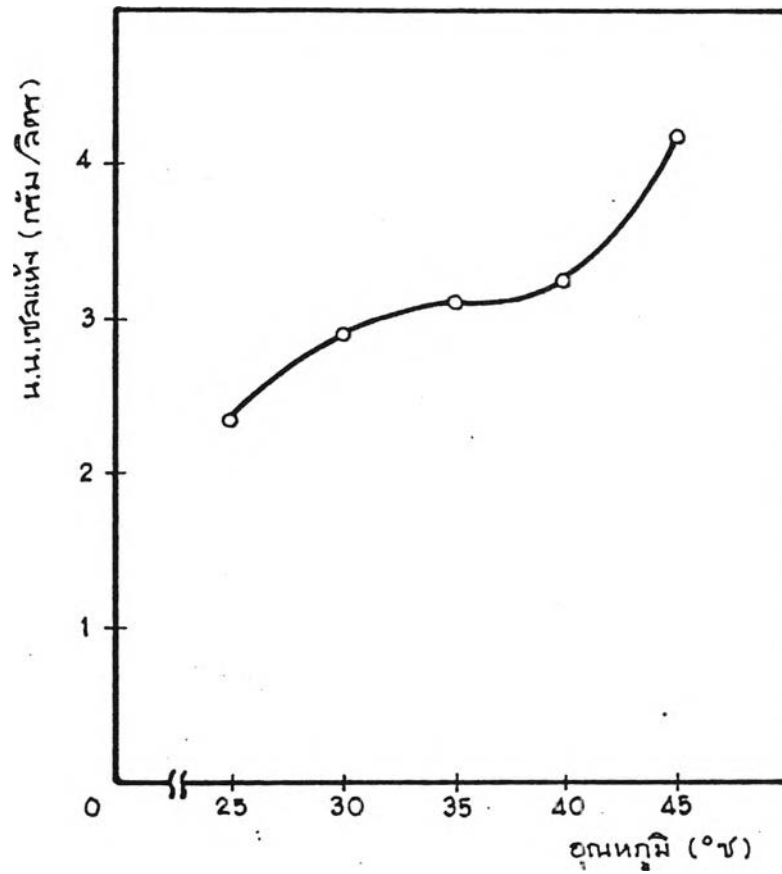
1.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้าง 3 α ,15 β -DHC ของเชื้อ
Absidia sp.BA 16

1.4.1 การเจริญของเชื้อ *Absidia* sp.BA 16 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่
อุณหภูมิต่างๆ

เลี้ยงเชื้อ *Absidia* sp.BA 16 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.2) ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 3.2 ติดตามการเจริญของเชื้อทุก 6 ชม. จนถึง 42 ชม. ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ 30 $^{\circ}$ 35 $^{\circ}$ 40 $^{\circ}$ และ 45 $^{\circ}$ ซ. พบว่า *Absidia* sp.BA 16 สามารถเจริญในอาหารเตรียมหัวเชื้อได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 $^{\circ}$ ซ. ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3 และ 4



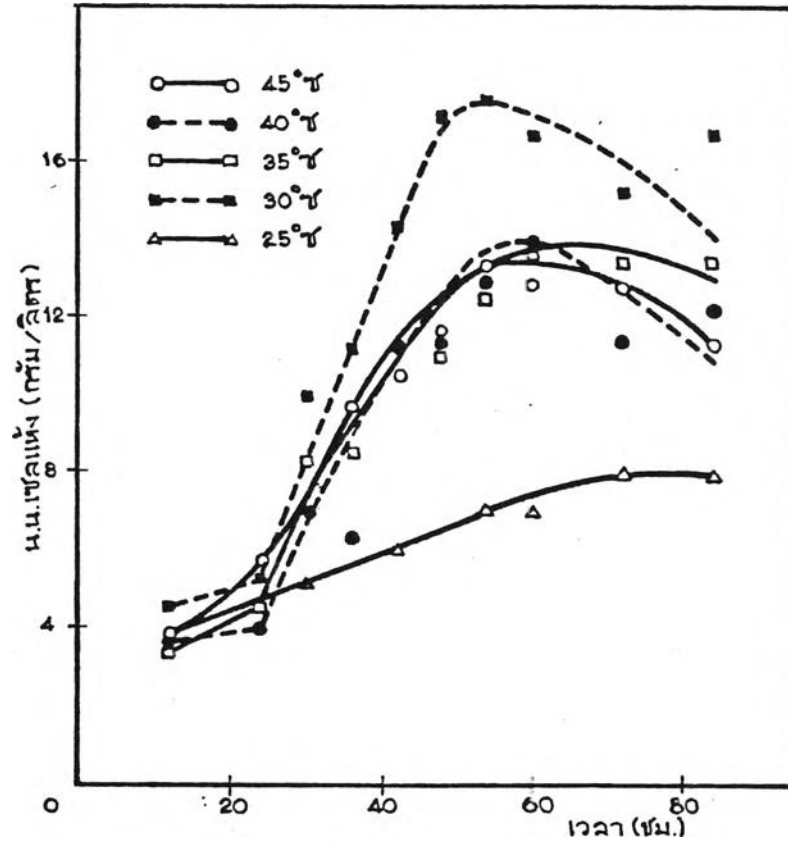
กราฟรูปที่ 3 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Absidia* sp. BA 16 ในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่
อุณหภูมิต่างๆกัน



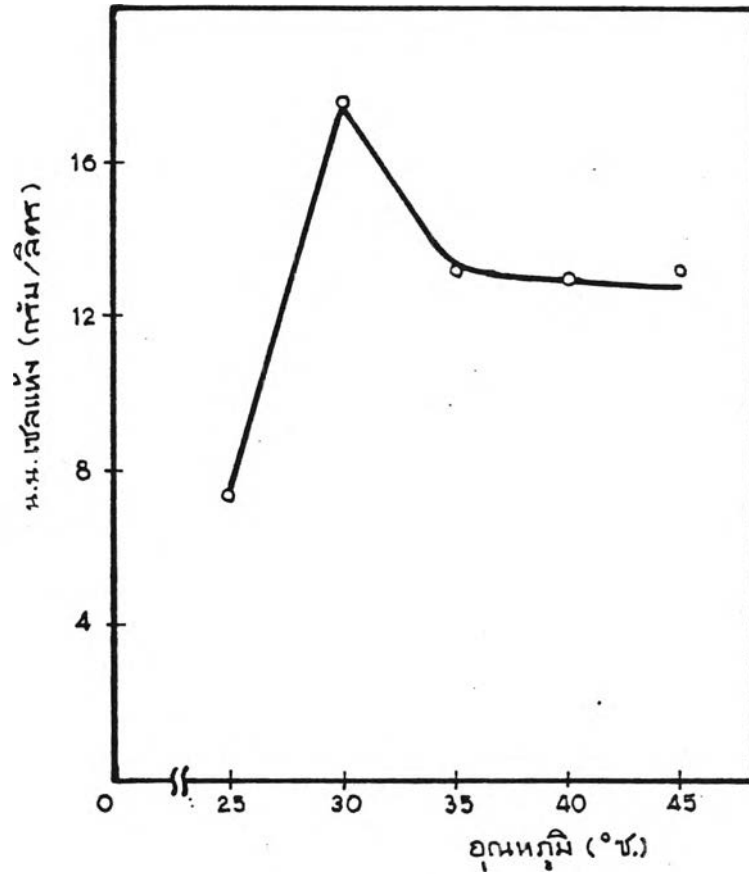
กราฟรูปที่ 4 การเจริญของ *Absidia* sp.BA 16 ในอาหารครีมหัวเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อเชื้อมีอายุ 30 ชม.

1.4.2 การเจริญของเชื้อ *Absidia* sp. BA 16 ในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3 α , 15 β -DHC ที่อุณหภูมิต่างๆ

เลี้ยงเชื้อ *Absidia* sp. BA 16 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3 α , 15 β -DHC (ภาคผนวกที่ 1.4) ที่อุณหภูมิ 25^o 30^o 35^o 40^o และ 45^oซ. โดยใช้หัวเชื้อที่เลี้ยงที่อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ แต่อายุของหัวเชื้อจะเป็นช่วงที่อยู่ในระยะการเจริญแบบทวีคูณ กล่าวคือ ที่ 25^o และ 30^oซ. ใช้หัวเชื้ออายุ 24 ชม. ที่ 35^o และ 40^oซ. ใช้หัวเชื้ออายุ 20 ชม. และที่อุณหภูมิ 45^oซ. ใช้หัวเชื้ออายุ 18 ชม. หลังจากติดตามการเจริญของเชื้อทุก 6 ชม. เป็นเวลา 48 ชม. พบว่า *Absidia* sp, BA 16 สามารถเจริญในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3 α , 15 β -DHC ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30^oซ. ดังแสดงในกราฟรูปที่ 5 และ 6

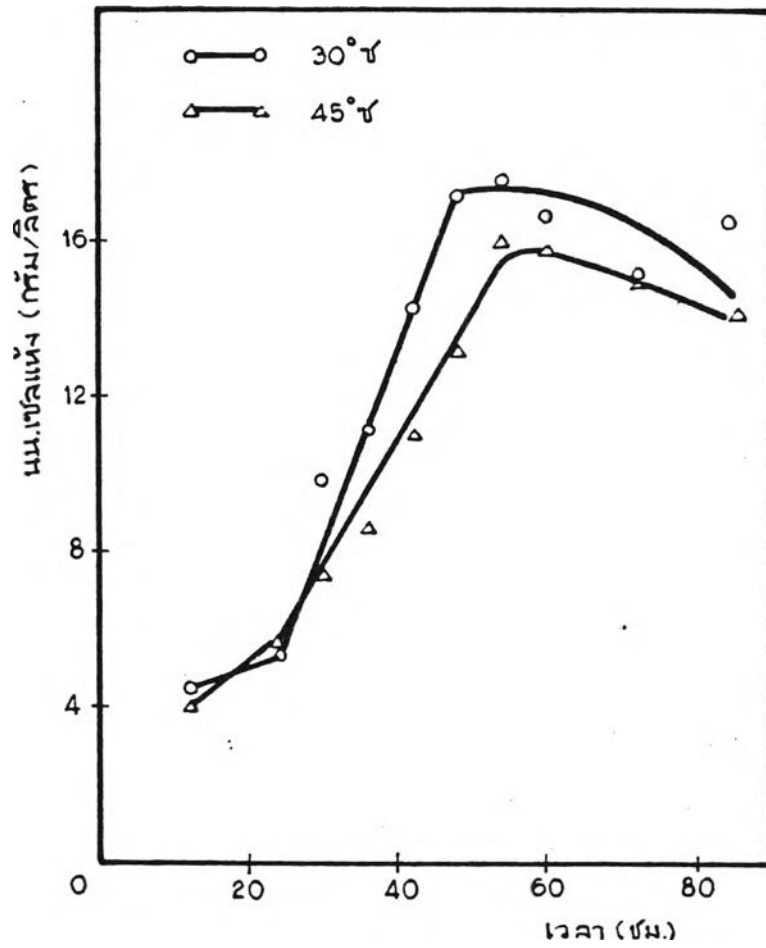


กราฟรูปที่ 5 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Absidia* sp. BA 16 ในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ เพื่อสร้าง 3 α ,15 β -DHC ที่อุณหภูมิต่างๆกัน



กราฟรูปที่ 6 การเจริญของเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3 α ,15 β -DHC ที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อเชื้อมีอายุ 54 ชม.

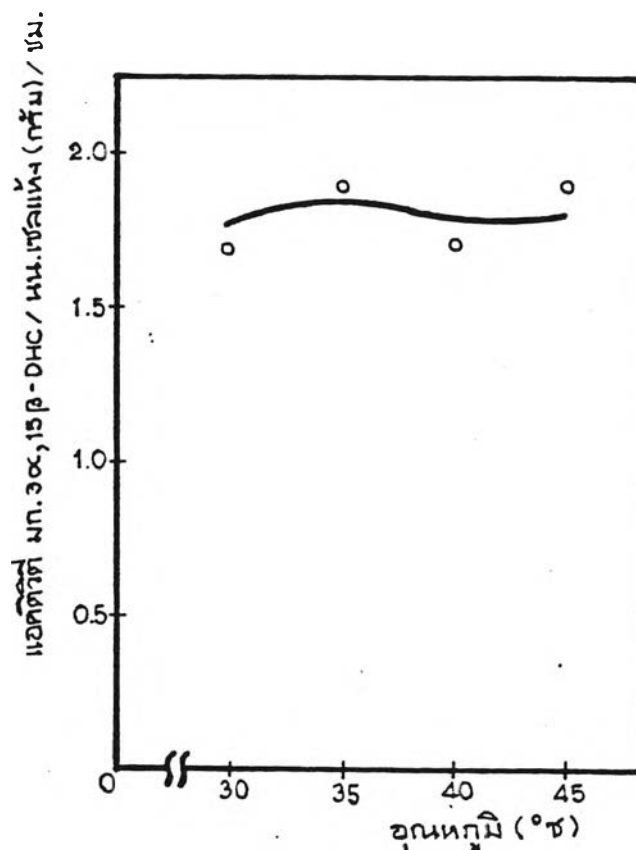
เนื่องจากเชื้อ Absidia sp. BA 16 เจริญได้ดีในอาหาร ครีมหัวเชื้อที่อุณหภูมิ 45^oซ. แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3 α ,15 β -DHC เชื้อจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30^oซ. จึงทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่ทำให้เชื้อเจริญได้สูงสุด โดยใช้หัวเชื้อของ Absidia sp. BA 16 ที่เลี้ยงในอาหารสำหรับครีมหัวเชื้อตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 3.2 ที่อุณหภูมิ 45^oซ. จนเชื้อมีอายุ 18 ชม. และหัวเชื้อของ Absidia sp. BA 16 ซึ่งเลี้ยงด้วยวิธีการเดียวกันที่อุณหภูมิ 30^oซ. จนเชื้อมีอายุ 24 ชม. เป็นหัวเชื้อในการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3 α ,15 β -DHC ที่อุณหภูมิ 30^oซ. หลังจากติดตามการเจริญของเชื้อทุก 6 ชม. จนถึง 48 ชม. พบว่าเชื้อจะเจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้หัวเชื้อซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30^oซ. อายุ 24 ชม. เป็นหัวเชื้อ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 7



กราฟรูปที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3 α ,15 β -DHC ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ C. เมื่อใช้หัวเชื้อซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ และ 45 $^{\circ}$ C. เป็นหัวเชื้อ

1.4.3 การสร้าง $3\alpha,15\beta$ -DHC จาก LCA โดยเซลล์ระยะพักของ Absidia sp.BA ที่อุณหภูมิต่างๆ

เลี้ยงเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 3.2 เป็นเวลา 48 ชม. นำเซลล์มากรองและล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง บ่มเซลล์เบียด 1 กรัม กับ LCA 20 มก. ในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.5 และใช้ไดออกเซนปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นตัวทำละลาย LCA ผันแปรอุณหภูมิสำหรับการเกิดปฏิกิริยาเคมหนูไฮดรอกซีที่ 30° 35° 40° และ 45° ซ. พบว่าการผันแปรอุณหภูมิดังกล่าวไม่มีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ดังแสดงในกราฟรูปที่ 8



กราฟรูปที่ 8 เปรียบเทียบการสร้าง $3\alpha,15\beta$ -DHC จาก LCA โดยเซลล์ระยะพักของ Absidia sp.BA 16 ที่อุณหภูมิต่างๆ



2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 3 α ,15 β -DHC โดยเชื้อ Absidia sp.BA 16
ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการศึกษาสภาวะต่างๆในขวดแก้วทรงกรวยพบว่า สูตรอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 40 กรัม/ลิตร และโซเดียมไนเตรท 5 กรัม/ลิตร (ภาคผนวกที่ 1.4) เป็นอาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3 α ,15 β -DHC และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ 30^oC. จึงเลือกสูตรอาหารและอุณหภูมิดังกล่าวสำหรับการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร ส่วนการควบคุมความเป็นกรดด่าง การเติม LCA ระหว่างการเลี้ยงเชื้อ และการใช้โคออกเซนเพื่อช่วยในการละลายของ LCA จะทำการศึกษาในขั้นต่อไป

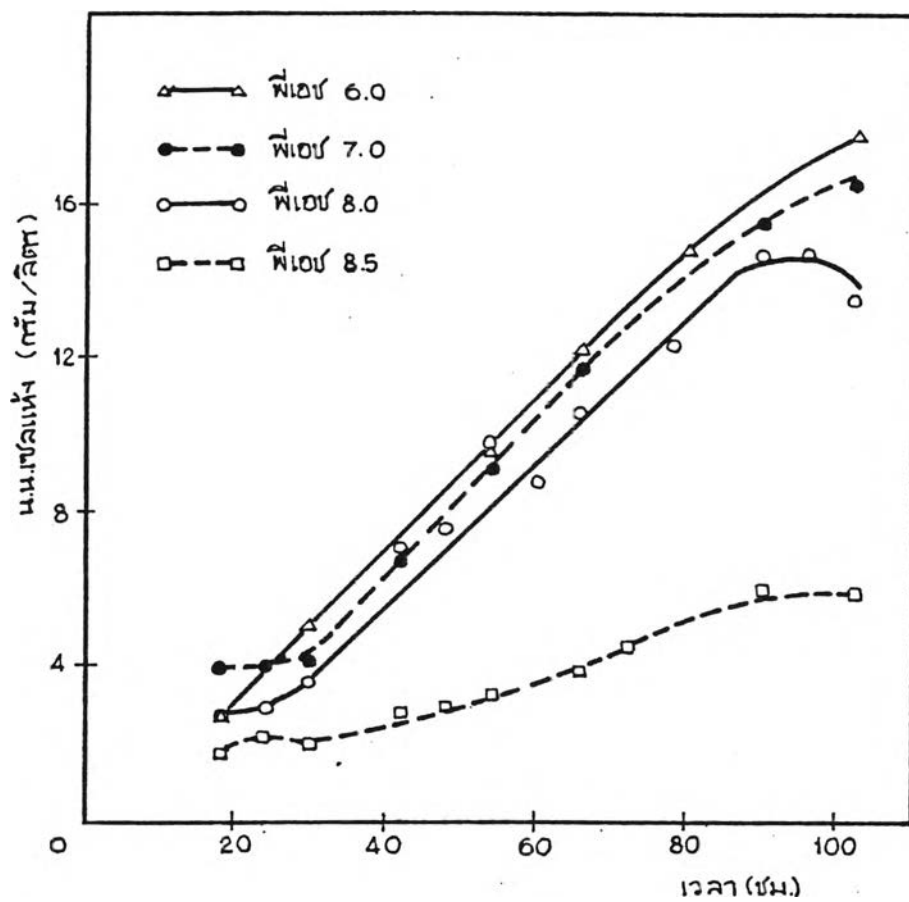
2.1 ผลของการควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอชต่างๆต่อการเจริญของเชื้อ
Absidia sp.BA 16

จากการเลี้ยงเชื้อ Absidia sp.BA 15 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.3 โดยควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 6.0 7.0 8.0 และ 8.5 ตลอดการทดลอง พบว่าการเจริญของเชื้อที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 6.0 7.0 และ 8.0 มีลักษณะการเจริญใกล้เคียงกัน ส่วนการเจริญของเชื้อที่ควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.5 จะต่างแสดงในกราฟรูปที่ 9 และ 10

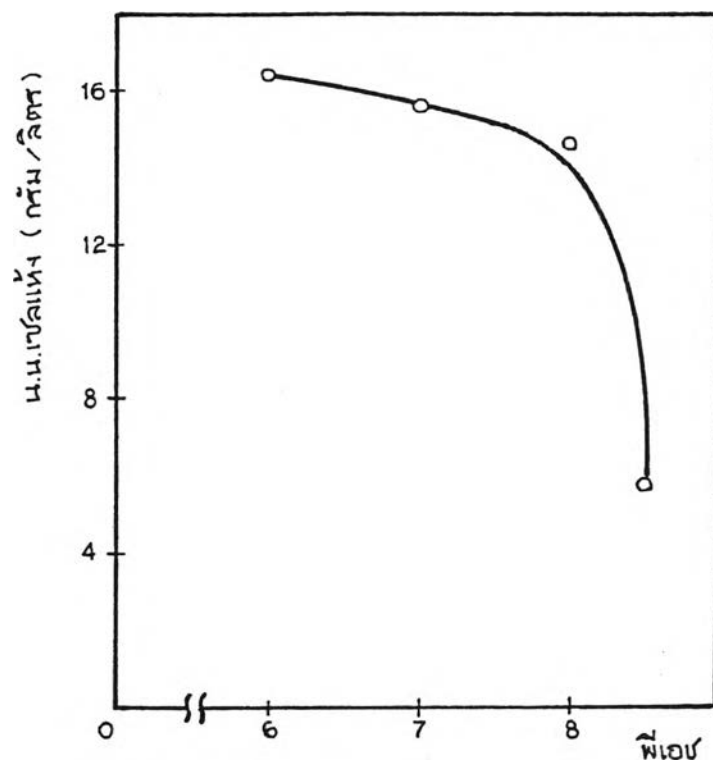
จากการศึกษาโดยใช้เซลล์ระยะพักของ Absidia sp.BA 16 พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลบน LCA คือที่พีเอช 8.5 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 2 แต่เนื่องจากการควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.5 ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ ดังนั้นหากจะมีการควบคุมความเป็นกรดด่างระหว่างการหมักจึงน่าจะเลือกควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 ซึ่งเชื้อสามารถเจริญได้ดีและเป็นค่าพีเอชที่ให้แอสดีวีดีสัมพันธ์ในการสร้าง 3 α ,15 β -DHC เป็นร้อยละ 65 ของการสร้างผลิตภัณฑ์ที่พีเอช 8.5 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 2

อย่างไรก็ตามในการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าค่าพีเอชของอาหารจะค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปดังแสดงในกราฟรูปที่ 11 โดยระหว่างชม.ที่ 0-72 ของการหมักมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6.4-7.9 และระหว่างชม.ที่ 72-102 มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 7.9-8.3 ซึ่งในระยะแรกของการเลี้ยงเชื้อ เป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ ส่วนในระยะหลัง เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ นอกจากนั้นการเจริญของเชื้อในการทดลองที่ควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 กับการเจริญของเชื้อโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างมีลักษณะไม่แตกต่างกันมากนัก คือ น.น. เซลล์แห้งสูงสุดเมื่อควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 ได้

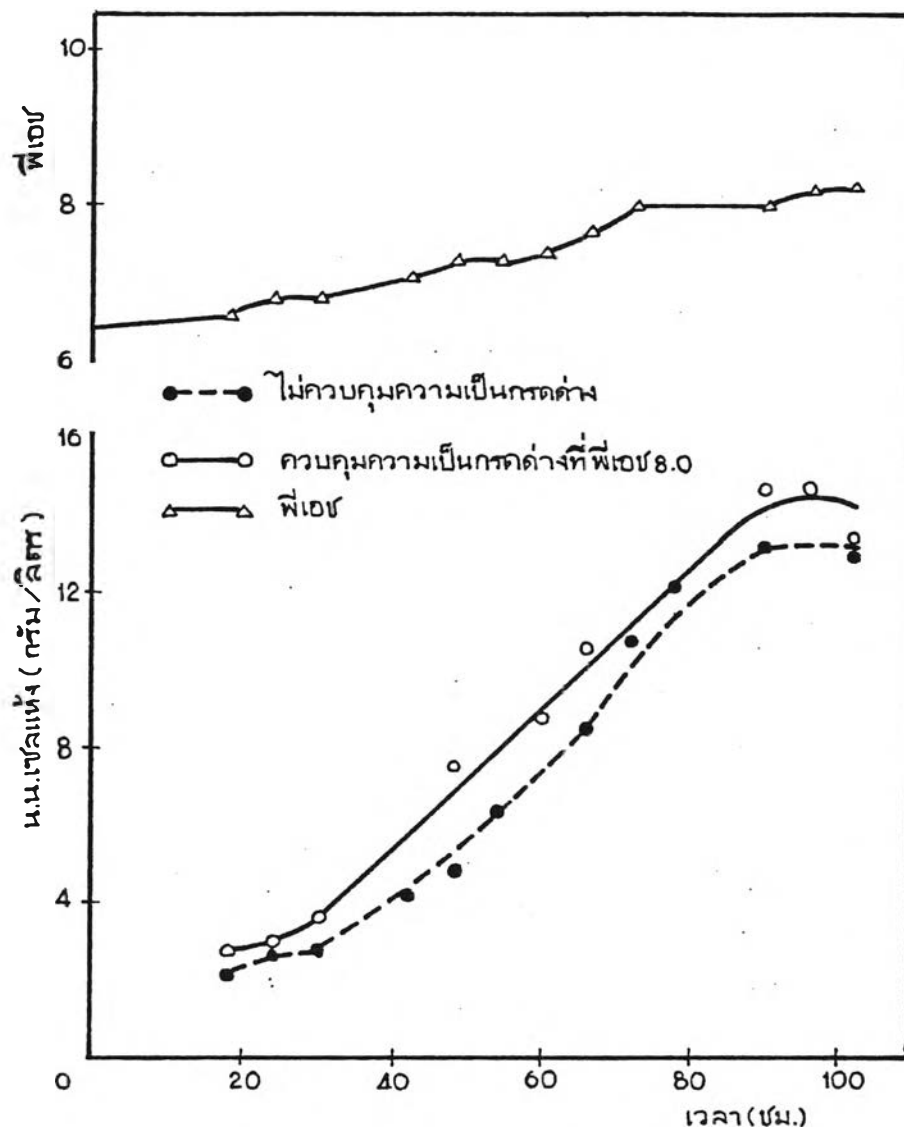
14.8 กรัม/ลิตร และนม. เซลล์แห้งสูงสุดเมื่อไม่ควบคุมความเป็นกรดต่างได้ 13.2 กรัม/ลิตรดัง
แสดงไว้ในกราฟรูปที่ 11 ดังนั้นถ้าไม่มีความแตกต่างในด้านประสิทธิภาพการสร้าง $3\alpha, 15\beta$ -DHC
ระหว่างการหมักทั้ง 2 แบบก็น่าจะเลือกการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดต่างในการผลิตระดับ
ขยายส่วนเพื่อจะได้ตัดค่าใช้จ่ายในการควบคุมความเป็นกรดต่าง ในการทดลองขั้นต่อไปเพื่อเปรียบเทียบ
ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงเลือกศึกษาการหมักที่ควบคุมความเป็นกรดต่างที่พีเอช 8.0 และการ
หมักที่ไม่ควบคุมความเป็นกรดต่าง



กราฟรูปที่ 9 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Absidia* sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร
เมื่อควบคุมความเป็นกรดต่างที่พีเอช 6.0 7.0 8.0 และ 8.5



กราฟรูปที่ 10 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Absidia* sp.BA 16 เมื่อเพาะเลี้ยงใน
 ถังหมักขนาด 5 ลิตรที่พีเอช 6.0 7.0 8.0 และ 8.5 เมื่อเชื้อมีอายุ 90 ชม.



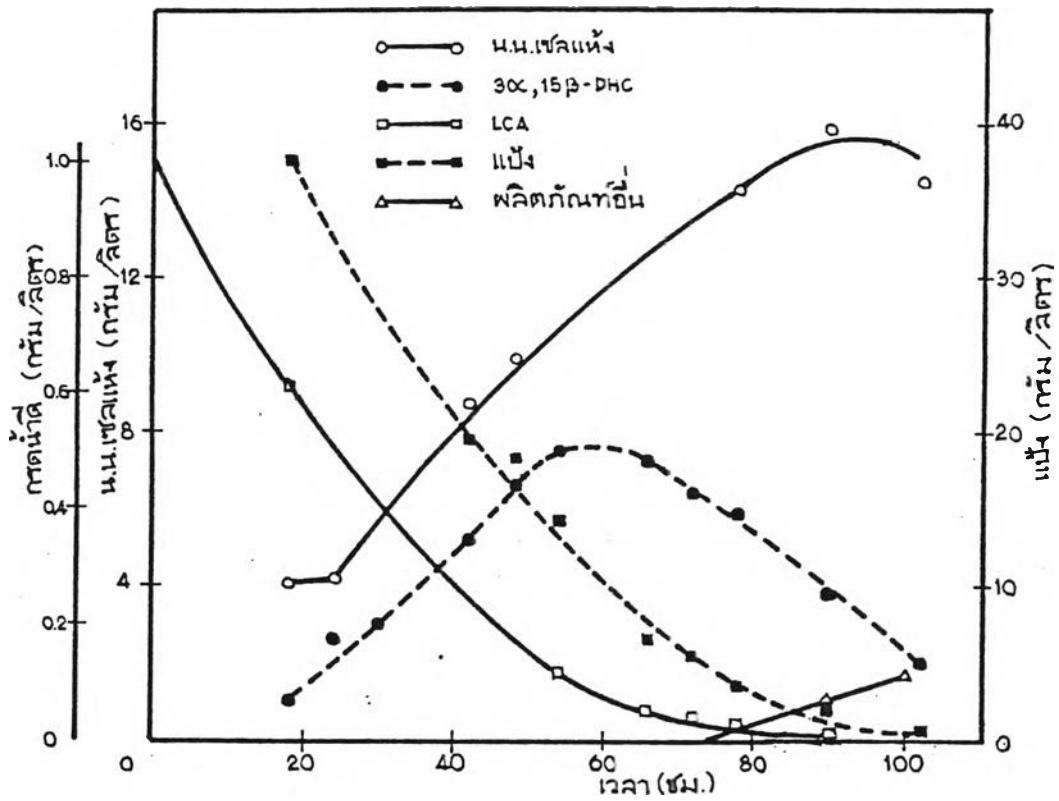
กราฟรูปที่ 11 เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของเชื้อ *Absidia* sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมความเป็นกรดต่ำที่พีเอช 8.0 และไม่ควบคุมความเป็นกรดต่ำ และรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการหมักในการทดลองที่ไม่ควบคุมความเป็นกรดต่ำ

2.2. การสร้าง 3 α ,15 β -DHC ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

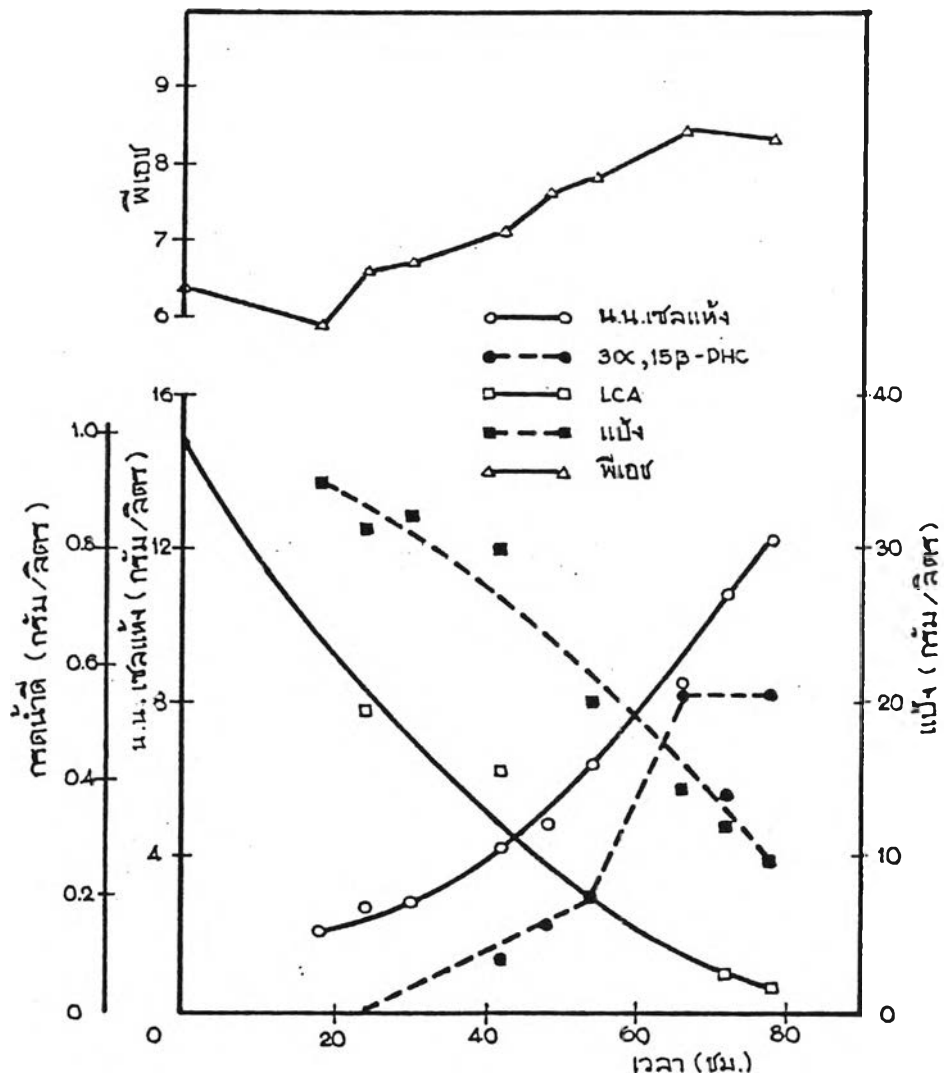
2.2.1 การสร้าง 3 α ,15 β -DHC ในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยไม่เติม LCA ระหว่างการหมัก

จากการเลี้ยง Absidia sp.EA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรตามที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.3 โดยควบคุมความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 8.0 ตลอดจนทดลองพบว่าสามารถสร้าง 3 α ,15 β -DHC ได้ประมาณ 0.48 กรัม/ลิตร ในระหว่างชม.ที่ 54-56 ของการหมักดังแสดงในกราฟรูปที่ 12 และจากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะเดียวกันแต่ไม่ควบคุมความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถสร้าง 3 α ,15 β -DHC ได้ประมาณ 0.54 กรัม/ลิตร ในระหว่างชม.ที่ 66-78 ของการหมักดังแสดงในกราฟรูปที่ 13

จากผลการทดลองแสดงว่า การควบคุมความเป็นกรดต่างที่พีเอช 8.0 จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุดเร็วกว่าการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดต่าง แต่ในขณะเดียวกันการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดต่างมีแนวโน้มจะให้ผลิตภัณฑ์สูงกว่าเล็กน้อย



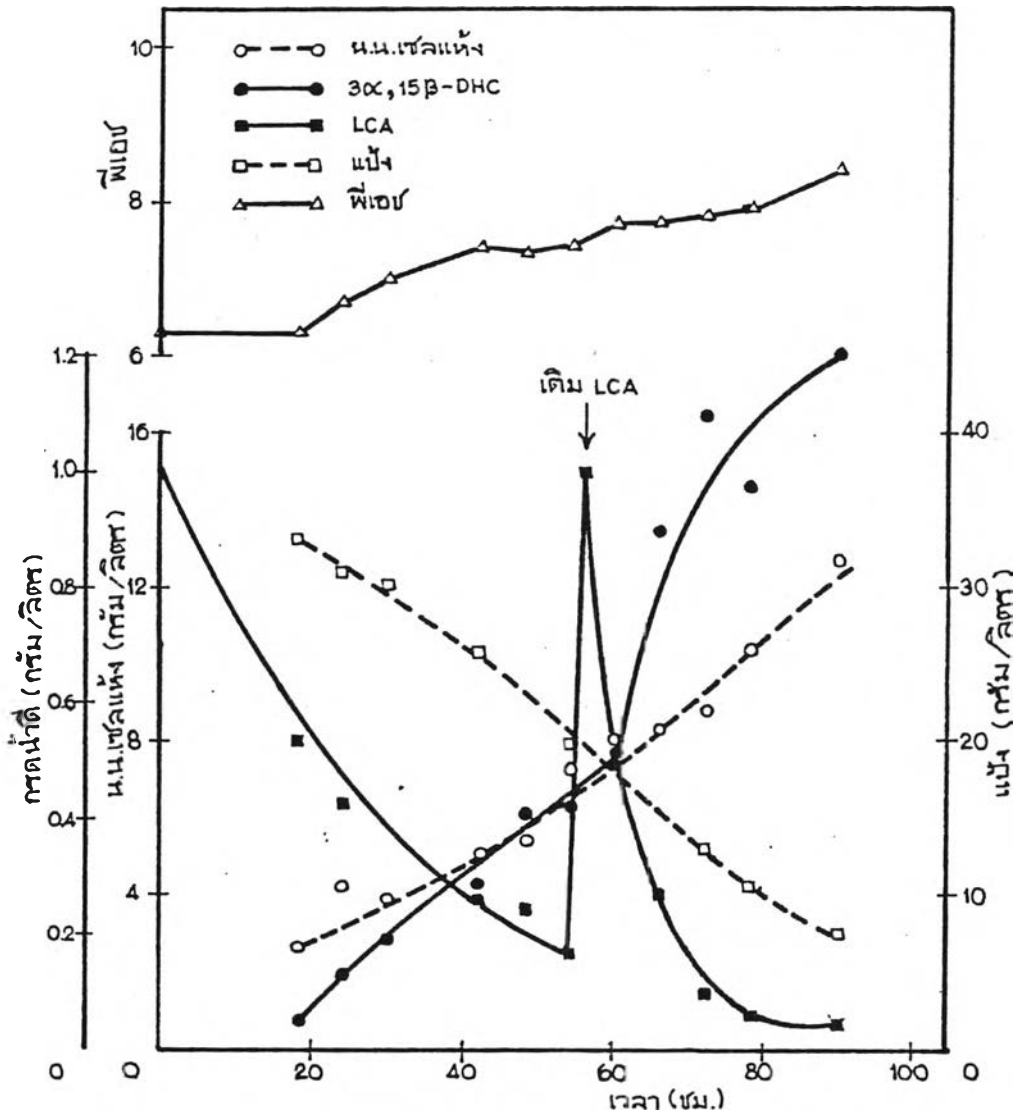
กราฟรูปที่ 12 การสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดย *Absidia* sp. BA 16 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร โดยควบคุมความเป็นกรดต่างที่พีเอช 8.0



กราฟรูปที่ 13 การสร้าง $3\alpha,15\beta$ -DHC จาก LCA โดย *Absidia* sp. BA 16 ในถังหมัก
ขนาด 5 ลิตร โดยไม่ควบคุมความเป็นกรดต่าง

2.2.2 การสร้าง 3 α ,15 β -DHC ในถังหมักขนาด 5 ลิตรเมื่อเติม LCA ในระหว่างการหมัก

จากการเลี้ยงเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรตามที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.3 โดยไม่ควบคุมความเป็นกรดต่าง และเติม LCA ลงไปในชม.ที่ 56 ทำให้ความเข้มข้นของ LCA ในถังหมักเพิ่มขึ้นจาก 0.16 กรัม/ลิตร เป็น 1.0 กรัม/ลิตร พบว่าสามารถสร้าง 3 α ,15 β -DHC ได้ประมาณ 1.20 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 90 ของการหมัก หรือคิดเป็นร้อยละ 65 ของปริมาณ LCA ที่เติมทั้งหมดดังแสดงในกราฟรูปที่ 14 จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ LCA ในถังหมักมีความสำคัญต่อการสร้าง 3 α ,15 β -DHC อย่างมาก โดยเมื่อเติมสารตั้งต้น LCA ลงไปในถังหมักเพื่อเพิ่มความเข้มข้นขณะที่ความเข้มข้นของ LCA ลดค่าลงจะทำให้ปริมาณผลิตภัณฑ์เพิ่มจาก 0.54 กรัม/ลิตร เป็น 1.20 กรัม/ลิตร จากกราฟรูปที่ 13 และ 14



กราฟรูปที่ 14 การสร้าง $3\alpha,15\beta$ -DHC จาก LCA โดย *Absidia* sp. BA 16 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร โดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง และเติม LCA ในชม.ที่ 56 ของการหมัก



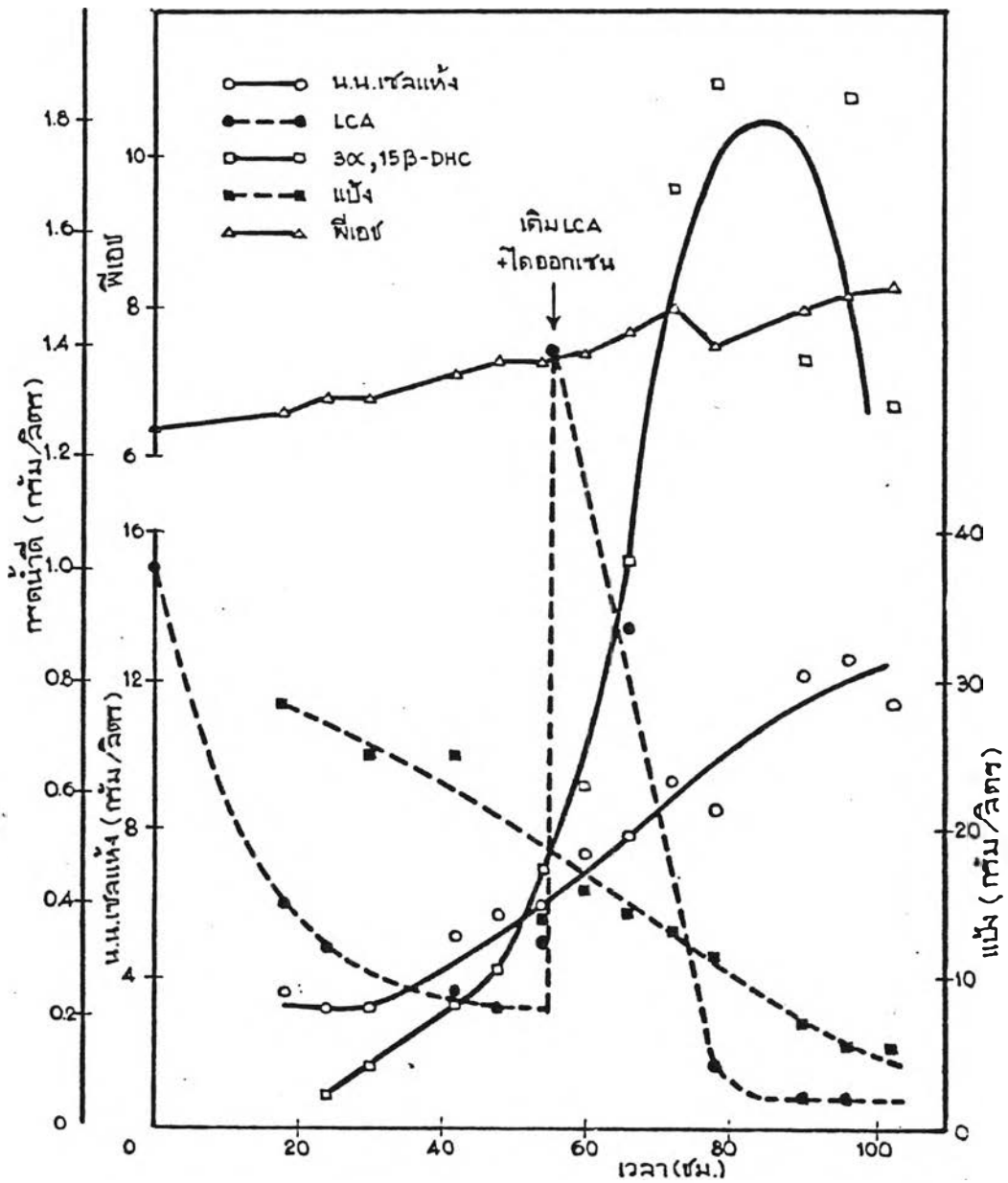
2.2.3 การสร้าง 30X,15β-DHC ในถังหมักขนาด 5 ลิตรเมื่อเติม LCA ร่วมกับไดออกเซน ในระหว่างการหมัก

จากการศึกษาโดยใช้เซลล์ระยะพักของ Absidia sp.BA 16 ในข้อ

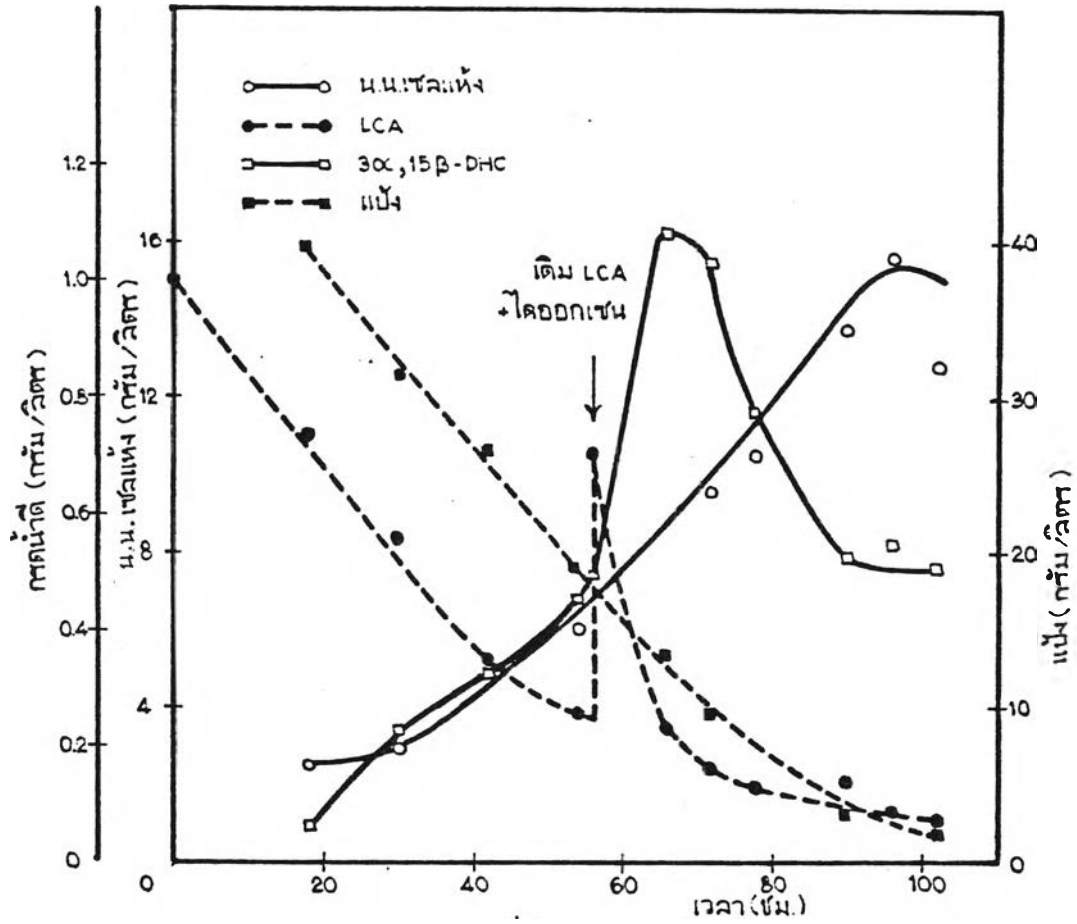
1.2.1 และ 1.2.2 พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อช่วยในการละลายของ LCA และ ทำให้การสร้าง 30X,15β-DHC เพิ่มขึ้นได้แก่ไดออกเซนในปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ไดออกเซนปริมาณร้อยละ 1 เป็นตัวทำละลาย LCA โดยเติมร่วมกับ LCA ระหว่างการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการทดลองเติม LCA ร่วมกับไดออกเซนในชม.ที่ 56 ของการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดต่าง ปริมาณของ LCA ในชม.ที่ 56 เพิ่มขึ้นจาก 0.20 กรัม/ลิตร เป็น 1.40 กรัม/ลิตร สามารถสร้าง 30X,15β-DHC ได้ประมาณ 1.80 กรัม/ลิตร ในระหว่างชม.ที่ 78-96 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 15 ปริมาณของ 30X,15β-DHC ที่สร้างได้คิดเป็นร้อยละ 82 ของปริมาณ LCA ที่เติมทั้งหมด ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเติมไดออกเซนร่วมกับ LCA มีส่วนช่วยให้สร้าง 30X,15β-DHC ได้มากขึ้นโดย เปรียบเทียบกับการผลิตที่เติม LCA เพียงอย่างเดียวซึ่งได้ผลผลิตประมาณร้อยละ 65 ดังที่กล่าวแล้วในข้อ 2.2.2

เพื่อเปรียบเทียบกับหมักโดยควบคุมความเป็นกรดต่างที่พีเอช 8.0 จึงทำการทดลองเติม LCA ร่วมกับไดออกเซนในชม.ที่ 56 ของการหมักที่มีการควบคุมความเป็นกรดต่างที่พีเอช 8.0 ด้วย พบว่าการเติม LCA ร่วมกับไดออกเซนทำให้ปริมาณของ LCA ในถังหมักเพิ่มขึ้นจาก 0.25 กรัม/ลิตร เป็น 0.71 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 56 ของการหมัก สามารถสร้าง 30X,15β-DHC ได้สูงสุดประมาณ 1.08 กรัม/ลิตร ในระหว่างชม.ที่ 66-72 ของการหมักหรือคิดเป็นร้อยละ 74 ของปริมาณ LCA ดังแสดงในกราฟรูปที่ 16 จากผลการทดลองจะเห็นว่าแม้ว่าการหมักแบบควบคุมความเป็นกรดต่างที่พีเอช 8.0 จะให้ผลิตภัณฑ์สูงสุดเร็วกว่าการหมักแบบไม่ควบคุมความเป็นกรดต่าง แต่ขณะเดียวกันผลิตภัณฑ์ที่ได้มีแนวโน้มว่าจะต่ำกว่า ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่รายงานไว้ในข้อ 2.2.1 ในประเด็นที่ว่าหมักโดยควบคุมความเป็นกรดต่างที่พีเอช 8.0 จะให้ผลิตภัณฑ์สูงสุดเร็วกว่าการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดต่างประมาณ 12 ชม. แต่ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้มีแนวโน้มว่าจะต่ำกว่าการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดต่างประมาณร้อยละ 6-8 ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดต่าง เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวกและเป็นการลดรายจ่ายที่จะต้องใช้ในการควบคุมความเป็นกรดต่างด้วย

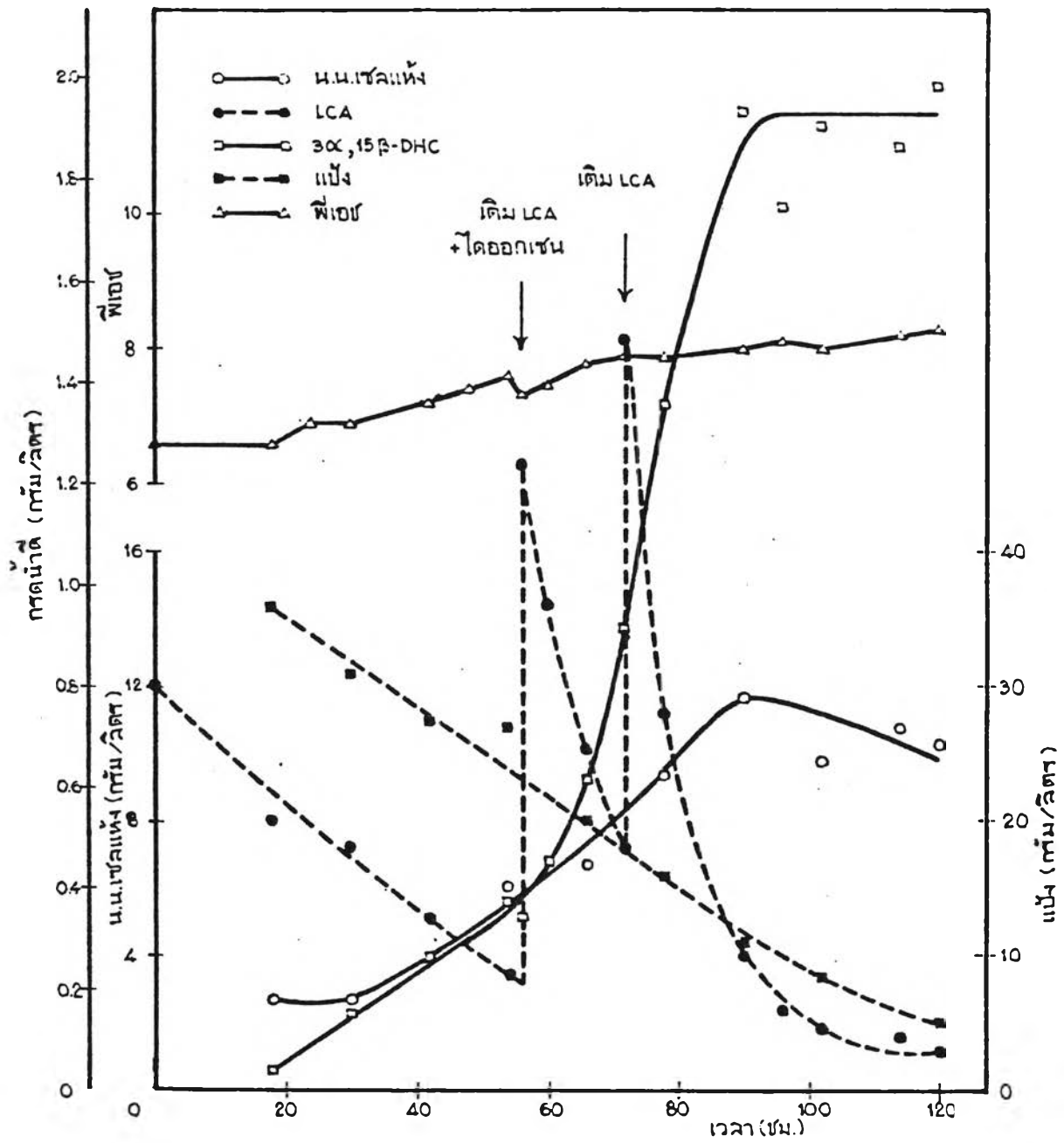


กราฟรูปที่ 15 การสร้าง $3\alpha, 15\beta$ -DHC จาก LCA โดย *Absidia* sp. BA 16 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร โดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง โดยเติม LCA ร่วมกับ ไดออกเซนในชม.ที่ 56 ของการหมัก



กราฟรูปที่ 16 การสร้าง $3\alpha,15\beta$ -DHC จาก LCA โดย *Absidia* sp. BA 16 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 โดยเติม LCA ร่วมกับ ไดออกเซนในชม.ที่ 56 ของการหมัก

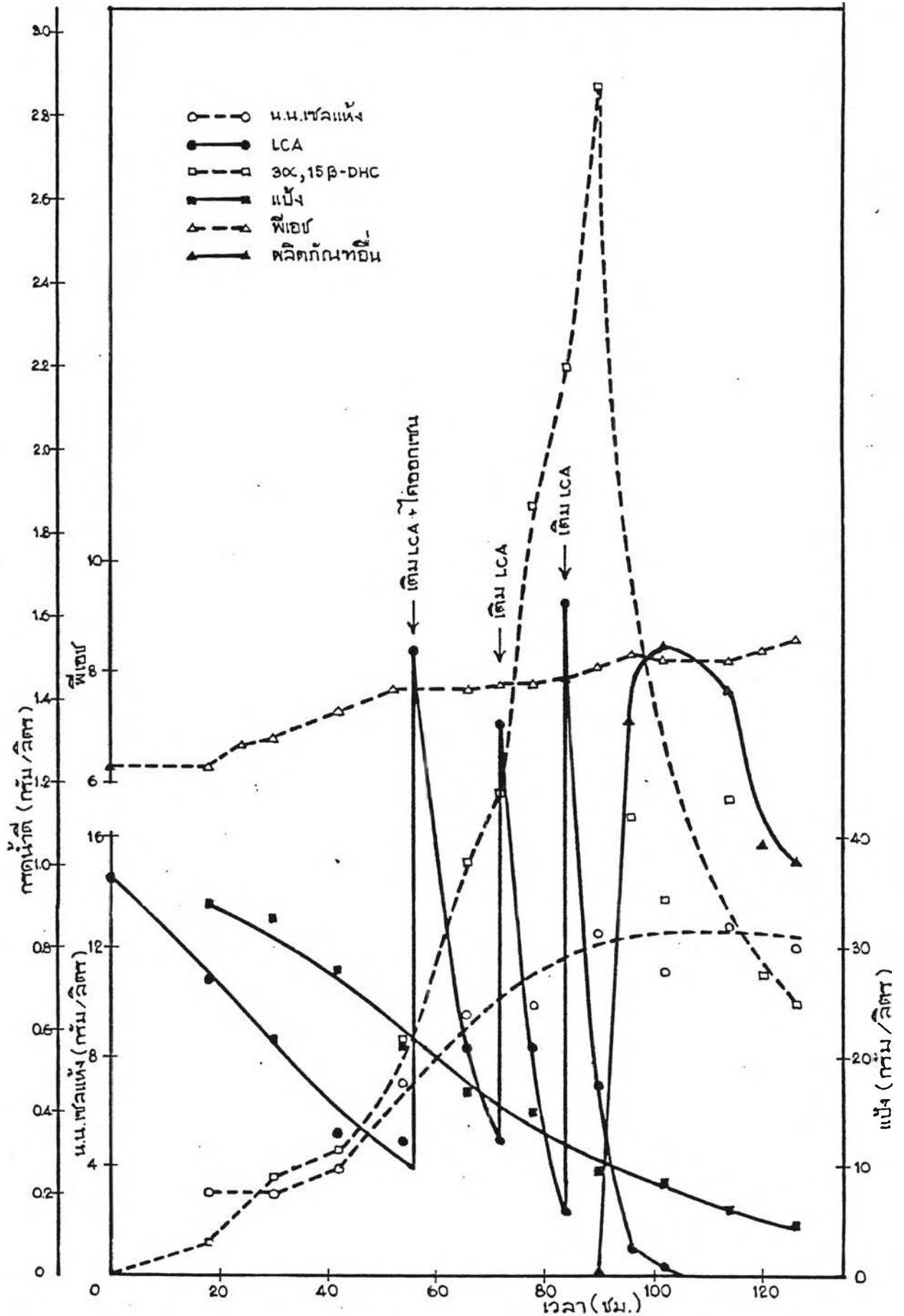
จากการทดลองเดิม LCA ร่วมกับไดออกเซนในชม.ที่ 56 ของการหมัก โดยไม่ควบคุมความเป็นกรดค้างในข้อ 2.2.3 กราฟรูปที่ 15 ความเข้มข้นของ LCA ในถังหมัก เพิ่มขึ้นจาก 0.20 กรัม/ลิตร เป็น 1.40 กรัม/ลิตร และ LCA ที่เดิมลงไปนี้จะถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อย่างรวดเร็วจนได้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุดประมาณ 1.80 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 78 ของการหมัก จากกราฟรูปที่ 15 นี้จะเห็นว่าในชม.ที่ 78 ของการหมัก เชื้อยังอยู่ในระยะการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) แต่ความเข้มข้นของ LCA ในถังหมักขณะนั้นเหลือเพียง 0.11 กรัม/ลิตร ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเดิม LCA ลงในถังหมักอีกครั้งหนึ่งในชม.ที่ 72 ของการหมักเพื่อรักษาความเข้มข้นของ LCA ให้สูงอยู่ในระดับหนึ่ง ผลการทดลองเมื่อเดิม LCA ร่วมกับไดออกเซนครั้งที่ 1 ในชม.ที่ 56 ของการหมัก พบว่าความเข้มข้นของ LCA เพิ่มขึ้นจาก 0.21 กรัม/ลิตร เป็น 1.24 กรัม/ลิตร และเมื่อเดิม LCA ครั้งที่ 2 ในชม.ที่ 72 ของการหมัก ความเข้มข้นของ LCA เพิ่มขึ้นจาก 0.48 กรัม/ลิตร เป็น 1.48 กรัม/ลิตร ปริมาณของ $3\alpha,15\beta$ -DHC ได้สูงสุดประมาณ 1.94 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 90 ของการหมักหรือคิดเป็นร้อยละ 71 ของปริมาณ LCA ที่เดิมทั้งหมดดังแสดงในกราฟรูปที่ 17



กราฟรูปที่ 17 การสร้าง $3\alpha,15\beta$ -DHC จาก LCA โดย *Absidia* sp. BA 16 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร โดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง และเติม LCA ร่วมกับ ไดออกเซนในชม.ที่ 56 เติม LCA อีกครั้งหนึ่งในชม.ที่ 72 ของการหมัก

จากการเติม LCA ในระหว่างการหมักพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ 3 α ,15 β -DHC ได้มากขึ้นและในการทดลองเติม LCA ในระหว่างการหมัก 2 ครั้งดังแสดงใน กราฟรูปที่ 17 ซึ่งเป็นการรักษาระดับความเข้มข้นของ LCA ให้สูงได้ระดับหนึ่งเป็นระยะเวลา นานขึ้นพบว่าเชื้อสามารถสร้าง 3 α ,15 β -DHC ได้เพิ่มขึ้นเป็น 1.94 กรัม/ลิตร อย่างไรก็ตาม ในขณะที่ความเข้มข้นของ LCA หลังจากการเติมครั้งที่ 2 ลดลงเหลือประมาณ 0.44 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 84 ของการหมักการเจริญของเชื้อยังไม่เข้าสู่สภาวะคงที่ (stationary phase) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเติม LCA ลงในถังหมักอีกครั้งหนึ่งในชม.ที่ 84 ของการหมัก

จากการทดลองเติม LCA ลงในถังหมักในระหว่างการหมัก 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 เติม LCA ร่วมกับโคออกเซนในปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ในชม.ที่ 56 ของการหมัก ความเข้มข้นของ LCA เพิ่มขึ้นจาก 0.30 กรัม/ลิตร เป็น 1.52 กรัม/ลิตร ครั้งที่ 2 เติม LCA ในชม.ที่ 72 ของการหมัก ความเข้มข้นของ LCA เพิ่มขึ้นจาก 0.34 กรัม/ลิตร เป็น 1.35 กรัม/ลิตร ครั้งที่ 3 เติม LCA ในชม.ที่ 84 ของการหมักความเข้มข้นของ LCA เพิ่มขึ้นจาก 0.17 กรัม/ลิตร เป็น 1.63 กรัม/ลิตร พบว่า มีการสร้าง 3 α ,15 β -DHC เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หลังจากเติม LCA แต่ละครั้ง และได้ปริมาณ 3 α ,15 β -DHC สูงสุด 2.87 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 90 ของการหมักหรือคิดเป็นร้อยละ 62 ของปริมาณ LCA ที่เติมทั้งหมด ดังแสดงในกราฟรูปที่ 18



กราฟรูปที่ 18 การสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดย *Absidia* sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่ควบคุมความเป็นกรด่าง เติม LCA ร่วมกับไดออกเซนในชม. ที่ 56 และ เติม LCA อีก 2 ครั้งในชม. ที่ 72 และ 84 ของการหมัก

3. การศึกษาทางอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของเชื้อ *Absidia* sp. BA 16

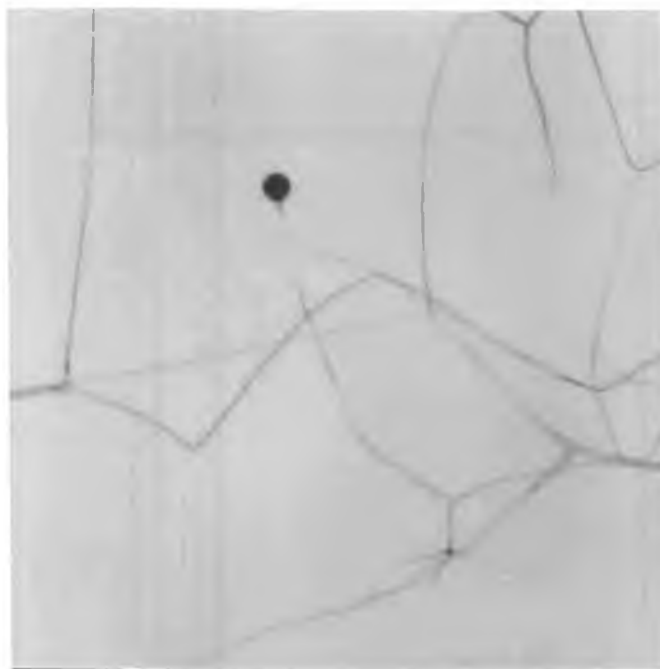
Absidia sp. BA 16 เป็นเชื้อราที่แยกได้จากชานอ้อยในประเทศไทยที่อุณหภูมิ 45⁰ซ. ลักษณะของโคโลนี (colony) บนอาหารแข็ง PDA (ภาคผนวกที่ 1.1) มีสีขาวฟู (white wooly) เส้นใยไม่มีผนังกัน (non septate mycelium) สืบพันธุ์แบบไม่มีเพศโดยการสร้างสปอร์ (spore) อยู่ภายในอับสปอร์ (sporangium) อับสปอร์มีรูปร่างค่อนข้างกลม (globose) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 45-90 ไมครอน สปอร์มีสีเทาแก่เป็นรูปไข่ (oval) ขนาด 3-5 × 2-3 ไมครอน เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 25⁰-45⁰ซ. และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37⁰ซ. บนอาหารแข็ง PDA มีการสร้างไรซอยด์ (rhizoid) บนสโตลอน (stolon) จากลักษณะดังกล่าว เชื้อรานี้จึงจัดอยู่ในสกุล (genus) "*Absidia*"(22, 23) ลักษณะต่างๆ ของ *Absidia* sp. BA 16 แสดงในรูปที่ 15 และ 16

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะต่างๆของ *Absidia* sp. BA 16 กับเชื้อราสกุล "*Absidia*"พบว่า *Absidia* sp. BA 16 มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อราในสกุลนี้ 2 ชนิด (species) คือ *Absidia corymbifera* (*Absidia lichtheimii*) IFO 4009 และ *Absidia butleri* (*Gongronella butleri*) IFO 8080 (22, 23) ลักษณะต่างๆของเชื้อ *Absidia* sp. BA 16 เปรียบเทียบกับเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงในตารางที่ 6

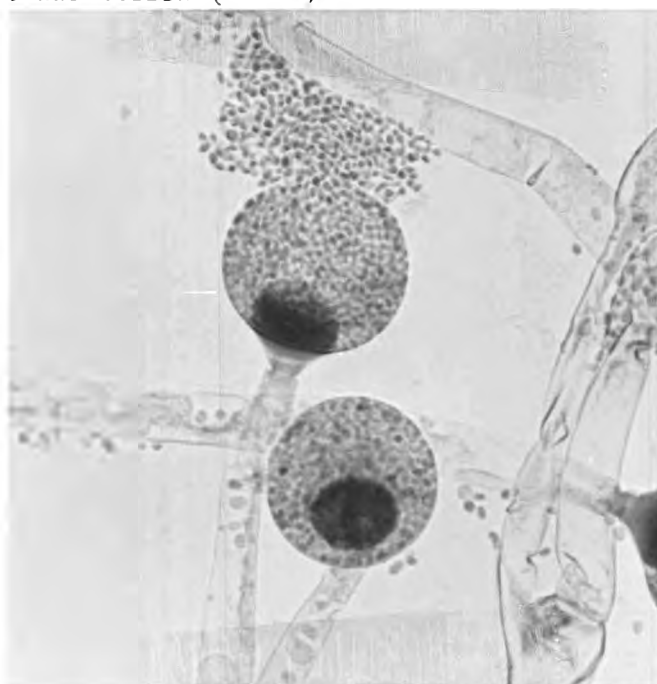
จากผลการศึกษาที่แสดงในตารางที่ 6 พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และสรีรวิทยา (physiology) ของเชื้อ *Absidia* sp. BA 16 มีลักษณะบางประการใกล้เคียงกับเชื้อรา 2 ชนิดคือ *Absidia corymbifera* (*Absidia lichtheimii*) IFO 4009 และ *Absidia butleri* (*Gongronella butleri*) IFO 3080 ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน (reference strain) ตัวอย่างเช่น มีลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็ง PDA และสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37⁰ซ. บนอาหารแข็ง PDA เช่นเดียวกับ *A. corymbifera* (*A. lichtheimii*) IFO 4009 สามารถเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่างใกล้เคียงกับ *A. butleri* (*Gongronella butleri*) IFO 8080 เป็นต้น แต่ก็มีลักษณะที่สำคัญบางประการแตกต่างจากเชื้อราสายพันธุ์มาตรฐานดังกล่าว จึงคาดว่า *Absidia* sp. BA 16 อาจเป็นเชื้อราชนิดใหม่ในสกุล "*Absidia*"

ลักษณะ	<u>Absidia</u> sp.BA 16	<u>A. corymbifera</u> (<u>A. lichtheimii</u>) IFO 40C9	<u>A.butleri</u> (<u>Gongronella butleri</u>) IFO 8080
โคโลนีสบนอาหาร แข็ง PDA	ขาวฟู (white wooly)	ขาวฟู (white wooly)	ขาวเรียบ (white floccose)
ก้านชูอับสปอร์ (sporangiophore)	เอนราบ แดกสาขา (prostrate branch)	เอนราบ แดกสาขา ออกจากตำแหน่งเดียว กัน (prostrate branch in corymb)	ชูขึ้น แดกสาขา (erect branch)
อับสปอร์ (sporangium)	กลม (globose) เส้นผ่าศูนย์กลาง 45-90 ไมครอน	รูปลูกแพร์ (pear shape) เส้นผ่าศูนย์กลาง 45-60 ไมครอน	กลม (globose) เส้นผ่าศูนย์กลาง 22-24 ไมครอน
โคลูเมลลา (columella)	รูปกรวยหรือทรงกลม (funnel or globose)	กลม (globose)	รูปไข่ (oval)
สปอร์ (sporangiospore)	รูปไข่ (oval) ขนาด 2-3 X 3-5 ไมครอน	กลม (globose) เส้น ผ่าศูนย์กลาง 3.4 - 4.6 ไมครอน	รูปไข่ (oval) ด้านหนึ่งแบน ขนาด 2.2-4.5 X 1.6 - 2.5 ไมครอน
อุณหภูมิที่เจริญได้ดี บนอาหารแข็ง PDA	37 ^o ซ.	37 ^o ซ.	25 ^o ซ.
ค่าพีเอชที่เจริญได้ดี	6.0-8.0	3.8-6.8	6.0-7.0

ตารางที่ 6 ลักษณะของเชื้อ Absidia sp. BA 16 เปรียบเทียบกับ A.corymbifera IFO 4009 และ A. butleri (Gongronella butleri) IFO 8080



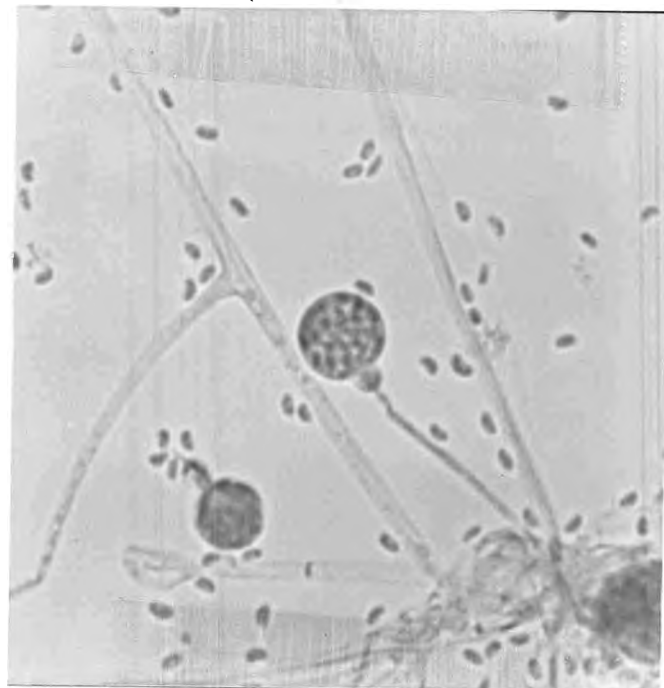
รูปที่ 15 เชื้อ Absidia sp.BA 16 เสี่ยงบนอาหารแข็ง PDAอายุ 2 วัน แสดงก้านชูสปอร์
อับสปอร์ และ โรซอยด์ (X 40)



รูปที่ 16 เชื้อ Absidia sp.BA 16 เสี่ยงบนอาหารแข็ง PDA อายุ 3 วัน แสดงอับสปอร์
และสปอร์ (X 200)



รูปที่ 17 เชื้อ Absidia corymbifera IFO 4009 เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA อายุ 3 วัน
แสดงอับสปอร์ และ สปอร์ (X200)



รูปที่ 18 เชื้อ Absidia butleri (Gongronella butleri) IFO 8080 เลี้ยงบนอาหาร
แข็ง PDA อายุ 3 วัน แสดงอับสปอร์ และ สปอร์ (X400)