

การซักนำให้เกิดมิวเทชันในเชื้อร้าที่สามารถลดเสียงรบกวนส่า

นางสาวณัฏยา สมจิตต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-3363-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INDUCED MUTATION IN FUNGI DECOLORIZING MOLLASSES WASTEWATER

Miss Nattaya Somchit

คุณย์วิทยกรพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

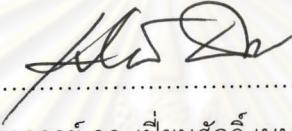
Chulalongkorn University

Academic year 2005

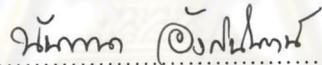
ISBN 974-14-3363-8

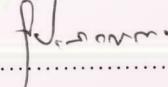
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การซักนำให้เกิดมิวเทชันในเรื่องราวด้วยความสามารถสืบของน้ำภาคล่า
โดย นางสาวณัฏฐา สมจิตร
สาขาวิชา พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. วรุณิ จุฬาลักษณานุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. จิตรตรา เพียญเรียม

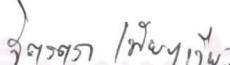
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

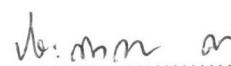
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นันทนา อัจกินันทน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรุณิ จุฬาลักษณานุกูล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. จิตรตรา เพียญเรียม)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คุณรัณ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีหนนทน์)

ณัฏญา สมจิต : การซักน้ำให้เกิดมิวเทชันในราที่สามารถลดสีของน้ำกาส่า. (INDUCED MUTATION IN FUNGI DECOLORIZING MOLASSES WASTEWATER) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วรรุษิ จุฬาลักษณ์นุกูล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร. จิตรา เพียญเจียว 61 หน้า. ISBN 974-14-3363-8.

รา CM5 สามารถลดสีของน้ำกาส่าได้สูงที่สุด จากราทั้งหมดที่คัดเลือกมา 16 ไอโซเลต โดยสามารถลดสีได้สูงสุด 49.19% ภายในเวลา 30 วัน ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 10% น้ำกาส่าและ 2% malt extract powder จากนั้นนำมาซักน้ำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ได้ UV2 มิวแทนท์ สามารถลดสีของน้ำกาส่าได้มากถึง 48.30% ในเวลา 8 วัน ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 10% น้ำกาส่า 0.1% Glucose 0.1% K_2HPO_4 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% KCl 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001% $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.0001% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ในขณะที่ไวค์ไทยป์สามารถลดสีได้ 31.42% และสามารถต้านทานต่อมลาไซต์กรีนสูงขึ้น มีค่า MIC ต่อมลาไซต์กรีน คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไวค์ไทยป์มีค่า MIC ต่อมลาไซต์กรีน คือ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ UV2 มิวแทนท์มีความไวต่อคีโตโคนาโซลมากขึ้น โดยมีค่า MIC คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่า MIC ต่อคีโตโคนาโซลของไวค์ไทยป์ คือ 0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น UV2 มิวแทนท์ ถูกนำไปซักน้ำให้เกิดมิวเทชันด้วยสาร MNNG ได้รานิวแทนท์ซึ่งอยู่ในช่วงอัตราการอยู่รอดต่ำกว่า 10% เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการลดสีของน้ำกาส่า พบว่า UV-NG10 มิวแทนท์สามารถลดสีได้สูงที่สุดถึง 84.15% ภายในระยะเวลา 8 วัน ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 10% น้ำกาส่า 0.1% Glucose 0.1% K_2HPO_4 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% KCl 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001% $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.0001% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ โดยเชื้อไวค์ไทยป์สามารถลดสีได้ 45.39% และมีค่า MIC ต่อมลาไซต์กรีน คือ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไวค์ไทยป์มีค่า MIC คือ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีความไวต่อคีโตโคนาโซล โดยมีค่า MIC คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไวค์ไทยป์ คือ 0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถตรวจพบความแปรผันทางพันธุกรรมที่ดำเนิน ITS ด้วยการตัดด้วย.enon ไซม์ตัดจำเพาะ จำเพาะ *AluI*, *HinfI* และ *MboI*

| | | |
|-------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| ภาควิชา.....พฤกษาศาสตร์..... | ลายมือชื่อนิสิต..... | ณัฏญา สมจิต |
| สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์..... | ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... | ดร. จิตรา เพียญเจียว |
| ปีการศึกษา...2548 | ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... | ดร. วรรุษิ จุฬาลักษณ์ |

4572289523 : MAJOR GENETICS

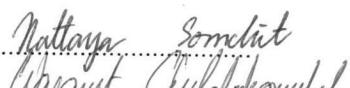
KEY WORD: INDUCED MUTATION/ MOLASSES WASTEWATER/ DECOLORIZATION/ FUNGI

NATTAYA SOMCHIT : INDUCED MUTATION IN FUNGI DECOLORIZING MOLASSES WASTEWATER. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. DR. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, THESIS COADVISOR : DR. JITTRA PIAPUKIEW, 61 pp. ISBN 974-14-3363-8.

The fungus, CM5, showed the highest decolorization of molasses wastewater from 16 isolated fungi. CM5 decolorized molasses wastewater 49.19% in 30 days, media containing 10% molasses wastewater and 2% malt extract powder. CM5 was induced mutation by ultraviolet irradiation. The mutant strain, UV-2 showed the highest decolorization of molasses wastewater that decolorized 48.30% in 8 days, media composed of 10% molasses wastewater 0.1% glucose 0.1% K_2HPO_4 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% KCl 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001% $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ and 0.0001% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, that wild type strain decolorized 31.42%. UV-2 enhanced resistant for malachite-green compared with wild type but it highly sensitive in ketoconazole. UV-2 mutant was induced mutation by MNNG then generated many UV-NG mutants. UV2-NG10 mutant was the greatest decolorizing molasses wastewater mutant that showed 84.15% decolorization in 8 days compared with wild type. No difference in ITS region restriction enzyme DNA pattern was detected from *AluI* *HinfI* and *MboI*.

คุณยศวิทยารหัสพยากรณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department.....BOTANY.....Student's signature.....
 Field of study....GENETICS.....Advisor's signature.....
 Academic year....2005.....Co-advisor's signature.....





กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย
ดังต่อไปนี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรุษิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเบิก ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นตลอดจนความ
ช่วยเหลือต่าง ๆ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่า
มาเป็นประธานกรรมการสอบในครั้งนี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มุกดา คุหิรัญ และ รองศาสตราจารย์ ดร.
ประกิตศิริ สีหันนทน์ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่า เพื่อเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย ที่เห็นความสำคัญและให้ทุนอุดหนุนการวิจัย
และทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อการตีพิมพ์และเผยแพร่ แก่งานวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณคุณภาศลัย ใจรังสี และบริษัทโรงงานสู่ราแสงโสม จำกัด ที่ให้
ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างน้ำภาคส่วน เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณ คุณพิมพ์ชนก เตึงเจริญ ที่อนุเคราะห์ร้าเด็นไยมาทดสอบนำเสนอ
ส่วนงานวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ ภาควิชาพุกามศาสตร์ ทุกท่านที่
กรุณาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ แก่ข้าพเจ้า

กราบขอบพระคุณ คุณแม่ พี่ ๆ ตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าที่สนับสนุน และ
ให้กำลังใจตลอดมา

และท้ายที่สุด ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง และทุก ๆ ท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และ
กำลังใจแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

สารบัญ

| | |
|---|----------|
| | หน้า |
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ๑ |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ๑ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ๙ |
| สารบัญ..... | ๙ |
| สารบัญตาราง..... | ๙ |
| สารบัญภาพ..... | ๙ |
| บทที่ ๑ บทนำ..... | ๑ |
| บทที่ ๒ เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | ๓ |
| 1. น้ำກากส่า..... | ๓ |
| 2. มิวเทชัน..... | ๘ |
| บทที่ ๓ วิธีดำเนินการวิจัย | ๑๔ |
| 1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... | ๑๔ |
| 2. สารเคมี..... | ๑๕ |
| 3. วิธีการวิจัย..... | ๑๗ |
| บทที่ ๔ ผลการทดลอง..... | ๒๔ |
| 1. การคัดแยกและเลือกเชื้อรากที่มีความสามารถในการลดสีของน้ำກากส่า..... | ๒๔ |
| 2. การวิเคราะห์ความสามารถในการลดสี..... | ๒๖ |
| 3. การซักนำไปให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและสาร MNNG..... | ๒๘ |
| 4. การศึกษาลักษณะของราไวค์ไทยปีและมิวแทนต์..... | ๓๓ |
| บทที่ ๕ วิจารณ์ผลการทดลอง..... | ๔๑ |
| บทที่ ๖ สรุปผลการทดลอง..... | ๔๓ |
| รายการอ้างอิง..... | ๔๔ |
| ภาคผนวก..... | ๔๘ |
| ภาคผนวก ก..... | ๔๘ |
| ภาคผนวก ข..... | ๕๒ |
| ภาคผนวก ค..... | ๕๖ |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... | ๖๑ |

หน้า

| | | |
|----|---|----|
| 1 | สมบัติทางเคมีของน้ำกากส่าจากโรงบำรัดน้ำเสีย โรงงานแสงโสม ก่อน และหลังการบำรัดแบบไม่ใช้อากาศ จ. นครปฐม..... | 4 |
| 2 | ราที่สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้จากแหล่งต่าง ๆ | 24 |
| 3 | ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของราต่าง ๆ | 27 |
| 4 | อัตราการอยู่รอดของเชื้อ CM5 เมื่อได้รับรังสีอัลตร้าไวโอเลต..... | 57 |
| 5 | ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของเชื้อรำวีแทนต์ UV1 - UV8..... | 57 |
| 6 | อัตราการอยู่รอดของ UV2 มีวีแทนต์ เมื่อได้รับสาร MNNG..... | 58 |
| 7 | ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของ UV2-NG1 ถึง UV2-NG16 มีวีแทนต์..... | 58 |
| 8 | ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของ CM5 UV2 มีวีแทนต์ และ UV2-NG10 มีวีแทนต์ เมื่อผ่านการต่อเชื้อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง | 58 |
| 9 | อัตราการเจริญเติบโตของรา CM5 และมีวีแทนต์..... | 59 |
| 10 | การเดินโดยตัวของรา CM5 บนอาหาร PDA ที่เติมมาแล้วต่ำความเข้มข้นต่างๆ | 59 |
| 11 | การเดินโดยตัวของรา CM5 บนอาหาร PDA ที่เติมคีโตโคนาโซลความเข้มข้นต่างๆ | 60 |
| 12 | การเจริญเติบโตของเชื้อราไวค์ไทป์และมีวีแทนต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม มาแล้วต่ำความเข้มข้น..... | 60 |
| 13 | การเจริญเติบโตของเชื้อราไวค์ไทป์และมีวีแทนต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ เติมคีโตโคนาโซล..... | 61 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

| | หน้า |
|--|------|
| 1 กรรมวิธีการผลิตสูราและจุดปล่อยน้ำเสีย..... | 3 |
| 2 กระบวนการ Millardreaction..... | 5 |
| 3 การเกิดไทดีเมอร์ และการซ่อมแซมคีอีนเอ..... | 8 |
| 4 โครงสร้างของ N-metyl-N'nitro-N-nitrosoguanidine:MNNG..... | 10 |
| 5 โครงสร้างทางเคมีของมาลาไซต์กรีน..... | 11 |
| 6 โครงสร้างทางเคมีของคีโตโคนาโซล..... | 12 |
| 7 บริเวณของ ITS และชนิดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา..... | 13 |
| 8 ความสามารถในการลดสีของเชื้อรา 16 ไอโซเลตบนอาหาร MoA เป็นเวลา 7 วัน..... | 25 |
| 9 ลักษณะสีของอาหารเหลวที่มีน้ำากล่าเป็นองค์ประกอบที่ผ่านการลดสีด้วย เชื้อรา 16 ไอโซเลต เป็นเวลา 7 วัน | 26 |
| 10 อัตราการอยู่รอดของเชื้อรา CMS เมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต..... | 28 |
| 11 ลักษณะสีของอาหารเหลวที่มีน้ำากล่าเป็นองค์ประกอบที่ผ่านการลดสีด้วย เชื้อรากวี-มิวนแทนต์ เป็นเวลา 8 วัน..... | 29 |
| 12 ความสามารถในการลดสีของเชื้อรา UV มิวนแทนต์เปรียบเทียบกับไวค์ไทย..... | 29 |
| 13 อัตราการอยู่รอดของเชื้อรากวี-มิวนแทนต์ UV2 เมื่อได้รับสาร MNNG..... | 30 |
| 14 ลักษณะของอาหารเหลวที่ผ่านการลดสีด้วยเชื้อรากวี-มิวนแทนต์ UV2-NG1-16 ในเวลา 8 วัน..... | 30 |
| 15 ความสามารถในการลดสีของน้ำากล่าโดยรา CMS UV2 มิวนแทนต์ และ UV2-NG1 ถึง NG16 มิวนแทนต์..... | 31 |
| 16 ความสามารถในการลดสีของน้ำากล่าของรา CMS และมิวนแทนต์ เมื่อผ่าน การต่อเชื้อเป็นเวลา 5 วัน..... | 32 |
| 17 ลักษณะของโคลโนนของเชื้อราไวค์ไทยและมิวนแทนต์บนอาหาร PDA..... | 33 |
| 18 อัตราการเจริญเติบโตของไวค์ไทยเปรียบเทียบกับมิวนแทนต์..... | 34 |
| 19 การเจริญของรา CMS บนอาหาร PDA ที่มีมาลาไซต์กรีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน..... | 34 |
| 20 อัตราการเติบโตของรา CM5 บนอาหาร PDA ที่มีมาลาไซต์กรีนความเข้มข้นต่าง ๆ..... | 35 |
| 21 รา CM5 ที่เจริญบนอาหารที่เติมคีโตโคนาโซลความเข้มข้นต่าง ๆ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน..... | 35 |
| 22 อิทธิพลของสารคีโตโคนาโซลต่อการเติบโตของรา CM5..... | 36 |

หน้า

| | | |
|----|--|----|
| 23 | อัตราการเติบโตของราไวค์ไทยปีและมิวแทนต์บนอาหารที่เติมมาลาไซต์กรีน ความเข้มข้นต่าง ๆ | 36 |
| 24 | อัตราการเติบโตของราไวค์ไทยปีและมิวแทนต์บนอาหารที่เติมคีโตโคนาโซล ความเข้มข้นต่าง ๆ | 36 |
| 25 | ผลการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อราไวค์ไทยปีและมิวแทนต์..... | 38 |
| 26 | การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อราไวค์ไทยปีและมิวแทนต์ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>AluI</i> และ <i>HinfI</i> | 38 |
| 28 | การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อราไวค์ไทยปีและมิวแทนต์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>MboI</i> | 39 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย