การชักนำให้เกิดมิวเทชันในเชื้อราที่สามารถลดสีของน้ำกากส่า

นางสาวณัฏยา สมจิตร

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
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	การชักนำให้เกิดมิวเทชันในเชื้อราที่สามารถลดสีของน้ำกากส่า
โดย	นางสาวณัฏยา สมจิตร
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ณัฏยา สมจิตร : การชักนำให้เกิดมิวเทชันในราที่สามารถลดสีของน้ำกากส่า. (INDUCED MUTATION IN FUNGI DECOLORIZING MOLLASSES WASTEWATER) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว 61 หน้า. ISBN 974-14-3363-8.

รา CM5 สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้สูงที่สุด จากราทั้งหมดที่คัดเลือกมา 16 ไอโซเลต โดยสามารถลดสีได้สูงสุด 49.19% ภายในเวลา 30 วัน ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 10% น้ำกากส่าและ 2% malt extract powder จากนั้นนำมาชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตได้ UV2 มิวแทนต์สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้มากถึง 48.30% ในเวลา 8 วัน ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 10% น้ำกากส่า 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% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ในขณะที่ไวด์ไทป์สามารถลดสีได้ 31.42% และสามารถต้านทานต่อมาลาไชต์กรีนสูงขึ้น มีค่า MIC ต่อมาลาไชต์กรีน คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไวด์ไทป์มีค่า MIC ต่อมาลาไชต์กรีน คือ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ UV2 มิวแทนต์มีความไวต่อคีโตโคนาโซลมากขึ้น โดยมีค่า MIC คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่า MIC ต่อคีโตโคนาโซลของไวด์ไทป์ คือ 0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น UV2 มิวแทนต์ ถูกนำไปชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยสาร MNNG ได้รามิวแทนต์ซึ่งอยู่ในช่วงอัตราการอยู่รอดต่ำกว่า 10% เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่า พบว่า UV-NG10 มิวแทนต์สามารถลดสีได้สูงที่สุดถึง 84.15% ภายในระยะเวลา 8 วัน ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย10% น้ำกากส่า 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% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ โดยเชื้อไวด์ไทป์สามารถลดสีได้ 45.39% และมีค่า MIC ต่อมาลาไชต์กรีน คือ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไวด์ไทป์มีค่า MIC คือ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีความไวต่อคีโตโคนาโซล โดยมีค่า MIC คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไวด์ไทป์ คือ 0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถตรวจพบความแปรผันทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง ITS ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จำเพาะ *AluI HinfI* และ *MboI*

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....ณัฏยา สมจิตร.....

สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา...2548 .....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4572289523 : MAJOR GENETICS

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

NATTAYA SOMCHIT : INDUCED MUTATION IN FUNGI DECOLORIZING MOLLASSES 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*.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department.....BOTANY.....Student's signature...Nattaya Somchit

Field of study....GENETICS.....Advisor's signature...Warawut Chulalaksananukul

Academic year.....2005..... Co-advisor's signature...Jittra Piapukiew

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ดังต่อไปนี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นตลอดจนความช่วยเหลือต่าง ๆ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่ามาเป็นประธานกรรมการสอบในครั้งนี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่า เพื่อเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย ที่เห็นความสำคัญและให้ทุนอุดหนุนการวิจัย และทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อการตีพิมพ์และเผยแพร่ แก่งานวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณคุณภาศัลย์ ใจรังสี และบริษัทโรงงานสุราแสงโสม จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างน้ำกากส่า เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณ คุณพิมพ์ชนก เต็งเจริญ ที่อนุเคราะห์ราเส้นใยมาทดสอบน้ำกากส่าในงานวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ แก่ข้าพเจ้า

กราบขอบพระคุณ คุณแม่ พี่ ๆ ตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าที่สนับสนุน และให้กำลังใจตลอดมา

และท้ายที่สุด ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง และทุก ๆ ท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

1. น้ำกากส่า..... 3

2. มิวเทชัน..... 8

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 14

1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 14

2. สารเคมี..... 15

3. วิธีการวิจัย..... 17

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 24

1. การคัดแยกและเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่า..... 24

2. การวิเคราะห์ความสามารถในการลดสี..... 26

3. การชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและสาร MNNG..... 28

4. การศึกษาลักษณะของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์..... 33

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 41

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 43

รายการอ้างอิง..... 44

ภาคผนวก..... 48

ภาคผนวก ก..... 48

ภาคผนวก ข..... 52

ภาคผนวก ค..... 56

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 61

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

1 สมบัติทางเคมีของน้ำกากส่าจากโรงบำบัดน้ำเสีย โรงงานแสงโสม ก่อนและหลังการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ จ. นครปฐม 4

2 ราที่สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้จากแหล่งต่าง ๆ 24

3 ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของราต่าง ๆ 27

4 อัตราการอยู่รอดของเชื้อ CM5 เมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต 57

5 ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของเชื้อรามิวแทนต์ UV1 - UV8 57

6 อัตราการอยู่รอดของ UV2 มิวแทนต์ เมื่อได้รับสาร MNNG 58

7 ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของ UV2-NG1 ถึง UV2-NG16 มิวแทนต์ 58

8 ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของ CM5 UV2 มิวแทนต์ และ UV2-NG10 มิวแทนต์ เมื่อผ่านการต่อเชื้อเป็นเวลา 5 รุ่น 58

9 อัตราการเจริญเติบโตของรา CM5 และมิวแทนต์ 59

10 การเติบโตของรา CM5 บนอาหาร PDA ที่เติมมาลาไชต์กรีนความเข้มข้นต่างๆ 59

11 การเติบโตของรา CM5 บนอาหาร PDA ที่เติมคีโตโคนาโซลความเข้มข้นต่างๆ 60

12 การเจริญเติบโตของเชื้อราไวด์ไทป์และมิวแทนต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมมาลาไชต์กรีน 60

13 การเจริญเติบโตของเชื้อราไวด์ไทป์และมิวแทนต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมคีโตโคนาโซล 61

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

1 กรรมวิธีการผลิตสุราและจุดปล่อยน้ำเสีย....3

2 กระบวนการ Millardreaction....5

3 การเกิดไทมีนไดเมอร์ และการซ่อมแซมดีเอ็นเอ....8

4 โครงสร้างของ N-metyl-N'nitro-N-nitrisoguanidine:MNNG....10

5 โครงสร้างทางเคมีของมาลาไชต์กรีน....11

6 โครงสร้างทางเคมีของคีโตโคนาโซล....12

7 บริเวณของ ITS และชนิดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา....13

8 ความสามารถในการลดสีของเชื้อรา 16 ไอโซเลตบนอาหาร MoA เป็นเวลา 7 วัน....25

9 ลักษณะสีของอาหารเหลวที่มีน้ำกากส่าเป็นองค์ประกอบที่ผ่านการลดสีด้วยเชื้อรา 16 ไอโซเลต เป็นเวลา 7 วัน....26

10 อัตราการอยู่รอดของเชื้อรา CM5 เมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต....28

11 ลักษณะสีของอาหารเหลวที่มีน้ำกากส่าเป็นองค์ประกอบที่ผ่านการลดสีด้วยเชื้อรายูวี-มิวแทนต์ เป็นเวลา 8 วัน....29

12 ความสามารถในการลดสีของเชื้อรา UV มิวแทนต์เปรียบเทียบกับไวด์ไทป์....29

13 อัตราการอยู่รอดของเชื้อรามิวแทนต์ UV2 เมื่อได้รับสาร MNNG....30

14 ลักษณะของอาหารเหลวที่ผ่านการลดสีด้วยเชื้อรามิวแทนต์ UV2-NG1-16 ในเวลา 8 วัน....30

15 ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าโดยรา CM5 UV2 มิวแทนต์ และ UV2-NG1 ถึง NG16 มิวแทนต์....31

16 ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของรา CM5 และมิวแทนต์ เมื่อผ่านการต่อเชื้อเป็นเวลา 5 รุ่น....32

17 ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราไวด์ไทป์และมิวแทนต์บนอาหาร PDA....33

18 อัตราการเจริญเติบโตของไวด์ไทป์เปรียบเทียบกับมิวแทนต์....34

19 การเจริญของรา CM5 บนอาหาร PDA ที่มีมาลาไชต์กรีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน....34

20 อัตราการเติบโตของรา CM5บนอาหาร PDA ที่มีมาลาไชต์กรีนความเข้มข้นต่าง ๆ....35

21 รา CM5 ที่เจริญบนอาหารที่เติมคีโตโคนาโซลความเข้มข้นต่าง ๆ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน....35

22 อิทธิพลของสารคีโตโคนาโซลต่อการเติบโตของรา CM5....36

หน้า

23 อัตราการเติบโตของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์บนอาหารที่เติมมาลาไชต์กรีน ความเข้มข้นต่าง ๆ.....36

24 อัตราการเติบโตของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์บนอาหารที่เติมคีโตโคนาโซล ความเข้มข้นต่าง ๆ.....36

25 ผลการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อราไวด์ไทป์และมิวแทนต์.....38

26 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อราไวด์ไทป์และมิวแทนต์ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *HinfI*.....38

28 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อราไวด์ไทป์และมิวแทนต์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MboI*.....39

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย