การกลายพันธุ์ของรา *Acrophialophora* sp. ที่ย่อยสลายเซลลูโลส

นายพิสุทธิ์ พวงนาค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-890-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19160390

MUTATION OF A CELLULOLYTIC FUNGUS *Acrophialophora* sp.

Mr. Pisut Puangnak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-334-890-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกลายพันธุ์ของรา *Acrophialophora* sp. ที่ย่อยสลายเซลลูโลส
โดย	นายพิสุทธิ์ พวงนาค
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. พันธ์พิมพ์ วอนขอพร)

พิสุทธิ์ พวงนาค: การกลายพันธุ์ของรา *Acrophialophora* sp. ที่ย่อยสลายเซลลูโลส (MUTATION OF A CELLULOLYTIC FUNGUS *Acrophialophora* sp.) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.มุกดา ดูหิรัญ; 106 หน้า. ISBN 974-334-890-5

การชักนำให้เกิดการกลายใน *Acrophialophora* sp. เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ด้วย 3 วิธี คือ การใช้แสงอัลตราไวโอเลต การใช้สาร N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) และ การใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG การคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นพื้นฐานทำโดยการเลี้ยงบนอาหารสูตร CMC ที่มี cycloheximide จากนั้นนำสายพันธุ์กลายที่ให้ความสามารถในการผลิตเซลลูเลสได้สูงสุด ที่ระดับ 10% มาทดสอบหาความสามารถในการผลิตเซลลูเลสในอาหารเหลวสูตร production เปรียบเทียบกับ *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและ *Trichoderma reesei* QM9414 ซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า สายพันธุ์กลาย UV10-14 ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase สูงกว่า *Acrophialophora sp.* สายพันธุ์เดิมเป็น 2 เท่า และสูงกว่า *T. reesei* QM9414 ซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็น 4 เท่า จากการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต exoglucanase ของ *Acrophialophora sp.* สายพันธุ์กลาย UV10-14 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน 0.08 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด 0.076 หน่วยต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา	-	ลายมือชื่อนิสิต	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2542	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

3972773023 :MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS :*Acrophialophora* sp./ CELLULASE/ CELLULOLYTIC FUNGI/ MUTATION

PISUT PUANGNAK: MUTATION OF A CELLULOLYTIC FUNGUS *Acrophialophora* sp. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. MUKDA KUHIRUN; 106 pp. ISBN 974-334-890-5

Induced mutation in *Acrophialophora* sp. for increased cellulase production was carried out using 3 methods: ultraviolet (UV) light, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) treatment, and a combination of both UV and NTG. Mutants were screened on CMC agar medium containing cycloheximide. Top 10% cellulase producing mutants were then tested for cellulase production ability in liquid production medium in comparison with the wild type *Acrophialophora* and *Trichoderma reesei* QM9414 at 30 and 40°C. *Acrophialophora* mutant strain UV10-14 exhibited an increase in exoglucanase activity, doubled that of the wild type *Acrophialophora* and quadrupled that of *T. reesei* QM9414 at 40 °C. Optimization study to find appropriate conditions for exoglucanase production in *Acrophialophora* mutant strain UV10-14 revealed that a culture medium containing 3% CMC as the sole carbon source, 0.08% ammonium sulfate as the nitrogen source, with an initial pH of 5.0, at 40°C, gave maximum enzyme activity of 0.076 U/ml.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา	-	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา	2542	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อแนะนำและคำปรึกษาซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อข้าพเจ้า ตลอดจนได้สละเวลาอันมีค่าในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน ประธานกรรมการ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.พันธ์พิมพ์ วอนขอพร กรรมการ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์รวมถึงบุคคลากรในภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ และ น้อง ทุกคน ที่กรุณาเอื้อเฟื้อและให้ความช่วยเหลือเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายสุด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่ได้สนับสนุนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา จนงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ซ
สารบัญภาพ..... ฎ
บทที่
1. บทนำ..... 1
2. การตรวจเอกสาร..... 5
3. วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย..... 29
4. ผลการทดลอง..... 37
5. วิจารณ์ผลการทดลอง..... 71
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 81
รายการอ้างอิง..... 85
ภาคผนวก..... 91
ประวัติผู้เขียน..... 106

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณเซลลูโลสในพืชและส่วนต่าง ๆ ของพืช	7
2	ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ *Acrophialophora* sp.และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย *Acrophialophora* sp. ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต	37
3	ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต ก่อนและหลังการทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์	40
4	ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย *Acrophialophora* sp. ด้วย NTG	42
5	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในแต่ละองค์ประกอบของ *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต	48
6	ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ UV10-02 และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย UV10-02 ซ้ำด้วย NTG	51
7	ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ UV10-07 และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย UV10-07 ซ้ำด้วย NTG	52
8	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละองค์ประกอบสูงสุดที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลายที่ปรับปรุงได้จากการกลายทั้ง 3 วิธี เทียบกับ *Acrophialophora* sp. และ *Trichoderma reesei* QM9414 ในแต่ละช่วงระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ	58
9	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ	65
10	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยใช้ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	66
11	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่ เลี้ยงด้วยแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ	67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยใช้ ammonium sulphate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	68
13	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยปรับค่า pH เริ่มต้นต่างๆ	69
14	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ	70
15	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงกว่า *Acrophialophora* sp. ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต	102
16	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงกว่า *Acrophialophora* sp. ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ NTG	102
17	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงกว่า *Acrophialophora* sp. ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG	103
18	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย UV10-14 ในอาหารสูตร production ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ	103
19	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย UV10-14 ในอาหารสูตร production ที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	103

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
20	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย UV10-14 ในอาหารสูตร production ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ	104
21	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย UV10-14 ในอาหารสูตร production ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	104
22	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย UV10-14 ในอาหารสูตร production ที่ปรับค่า pH เริ่มต้นต่าง ๆ	104
23	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย UV10-14 ในอาหารสูตร production ที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ	105

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แนวทางการผลิตจากสารตั้งต้นที่เป็นเซลลูโลส.....	1
2	ก.) สูตรโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส ข.) ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส.....	6
3	สูตรโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส.....	10
4	โมเลกุลของลิกนิน.....	11
5	thymine-thymine-cyclobutane dimer ที่เกิดจากการฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต....	16
6	การซ่อมแซม thymine dimer โดยกระบวนการที่ต้องใช้แสง.....	17
7	การซ่อมแซมด้วยกลไกที่ไม่ต้องใช้แสง.....	18
8	สูตรโครงสร้างโมเลกุลของ NTG.....	19
9	การเติมหมู่อัลคิลให้กับเบสกวานีนซึ่งเกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายด้วยสารเคมี NTG.....	20
10	เชื้อรา *Acrophialophora* sp.	29
11	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดแต่ละองค์ประกอบที่ผลิตได้จาก *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต.....	49
12	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase สูงสุดที่ผลิตได้จากทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ และสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดที่ปรับปรุงได้จากทั้ง 3 วิธี.....	61
13	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ endoglucanase สูงสุดที่ผลิตได้จากทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ และสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดที่ปรับปรุงได้จากทั้ง 3 วิธี.....	62
14	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ β-glucosidase สูงสุดที่ผลิตได้จากทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ และสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดที่ปรับปรุงได้จากทั้ง 3 วิธี.....	63
15	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละองค์ประกอบสูงสุดที่ผลิตได้จาก *Trichoderma reesei* QM9414 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	64
16	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ.....	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยใช้ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	66
18	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงด้วยแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ	67
19	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยใช้ ammonium sulphate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	68
20	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยปรับค่า pH เริ่มต้นต่าง ๆ	69
21	ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ	70
22	กราฟน้ำตาลมาตราฐาน	101

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ในพืชและเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีมากที่สุดในโลก (Fogarty, 1983) โดยพบว่าในทุกๆ ปีเซลลูโลสจะถูกสร้างขึ้นใหม่และสลายไปในปริมาณ 10^{15} กิโลกรัม (Anne และคณะ, 1996) จึงนับได้ว่าเซลลูโลสเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติแหล่งหนึ่งประเภทที่ใช้แล้วเกิดกลับมาให้ใช้ได้ใหม่ในระยะเวลาอันสั้นที่ใหญ่ที่สุด (Kuhad Kumar และ Singh, 1994) ถ้าสามารถเปลี่ยนโมเลกุลที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือน้ำตาลกลูโคส ก็จะเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความหมายและมีคุณค่าอย่างยิ่งในอุตสาหกรรม เพราะสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตแอลกอฮอล์ โปรตีนเซลล์เดี่ยว ไวตามิน กรดอินทรีย์ ยาปฏิชีวนะ อาหารสัตว์และเคมีภัณฑ์ต่างๆ ได้โดยผ่านกระบวนการหมัก (Goksoyr และ Eriksen, 1980) เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 1. การย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นโมเลกุลเดี่ยวๆ นั้น นิยมที่จะใช้เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยามากกว่าที่จะใช้สารเคมี เพราะปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่ค่อยรุนแรง ได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์กว่าและที่สำคัญคือไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Kuhad Kumar และ Singh, 1994)

ภาพที่ 1. แนวทางการผลิตจากสารตั้งต้นที่เป็นเซลลูโลส (Raimo, 1990)

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นระบบเอนไซม์ที่ซับซ้อนประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญอย่างน้อย 3 ชนิดทำงานร่วมกัน คือ exoglucanase หรือ cellobiohydrolase หรือ β-1,4-glucan cellobiohydrolase (EC. 3.2.1.91) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยเข้าตัดที่พันธะ β-1,4-glycosidic จากปลายด้าน non-reducing ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นเซลโลไบโอสและกลูโคสบางส่วน ชนิดที่สองคือ endoglucanase หรือ β-1,4-glucan glucanohydrolase (EC. 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยเข้าตัดที่พันธะ β-1,4-glycosidic ในส่วนที่เป็น amorphous โดยจะเข้าตัดพันธะอย่างสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลักเป็นเซลโลไบโอสและได้กลูโคสบางส่วน และเอนไซม์ชนิดสุดท้ายคือ β-glucosidase หรือ cellobiase (EC.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอส ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลูโคส (Ryu และ Mandels, 1980)

จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ แต่อุปสรรคที่สำคัญในการใช้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายเซลลูโลสก็คือ ต้นทุนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสค่อนข้างสูง (Kuhad Kumar และ Singh 1994) เอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้อยู่ในปัจจุบันนั้นผลิตได้จากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ซึ่งนิยมใช้กันแพร่หลายในอุตสาหกรรม แต่ก็พบว่าแทนที่จะได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก กลับได้เซลโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ ทั้งนี้เนื่องมาจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ β-glucosidase ทำได้น้อยและปฏิกิริยาการย่อยสลายยังไวต่อการถูกยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end-product inhibition) นั่นก็คือถูกยับยั้งด้วยกลูโคสนั่นเอง (Alberto Owen และ D'Souza, 1991 ; Sterberge Vijayakumar และ Reese, 1977) ความสามารถในการผลิตเอนไซม์และการถูกยับยั้งปฏิกิริยาของ *T. reesei* เหล่านี้จึงเป็นอุปสรรคอย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม (Esterbauer Steiner และ Labudova, 1991) ดังนั้นการหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่ามาทดแทน *T. reesei* จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ (Jana Ghosh และ Singh, 1994)

Acrophialophora sp. เป็นเชื้อราที่คัดแยกได้จากบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์ (*Agave sisalana* Perrine.) สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่สูงและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นเชื้อ**ที่ค่อนข้างทนร้อนจึง**เหมาะอย่างยิ่งต่อการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม (พรเทพ ถนนแก้ว, 2538) แต่ *Acrophialophora* sp. ที่คัดแยกได้จากธรรมชาตินั้นพบว่ามีความไม่เสถียรและประสิทธิภา**พในการ**ผลิตเอนไซม์ลดลง เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน โดยทั่วไปอาจเพิ่มศักยภาพของการผลิตเอนไซม์ได้ โดยเลือกใช้อาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลิตผลของจุลินทรีย์ แต่การเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีนี้จะถูกจำกัดโดยความสามารถในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน (Sikyta, 1983) ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นอีก จึงต้องปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีศักยภาพดีขึ้น นั่นคือการปรับปรุงยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ ให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้น โดยวิธีการปรับปรุงยีนมีด้วยกัน 2 วิธีใหญ่ๆ คือ การตัดต่อยีนและการกลาย (mutation) (Lloyd, 1986) โดยปกติแล้ววิธีที่เป็นที่นิยม

ใช้มักจะเป็นการชักนำให้เกิดการกลายโดยการใช้รังสีและสารเคมี เพราะเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อนยุ่งยาก เสียค่าใช้จ่ายน้อย (Sikyta, 1983) นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าทำการกลายอย่างต่อเนื่อง (continual genetic modification) อาจจะยิ่งทำให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพตามที่เราต้องการสูงมากยิ่งขึ้น (อรพิน ภูมิภมร, 2527)

งานวิจัยนี้มุ่งที่จะพยายามปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Acrophialophora* sp. ให้มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีขึ้น ด้วยการชักนำให้เกิดการกลายทั้งสิ้น 3 วิธี คือ การชักนำให้เกิดการกลายด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร การชักนำให้เกิดการกลายด้วยสารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) และการชักนำให้เกิดการกลายด้วย 2 วิธีร่วมกันคือการใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับการใช้ NTG จากนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพดีที่สุด มาทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ต่อไป เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานต่อไปในการนำไปพัฒนาใช้ในเชิงอุตสาหกรรม

วัตถุประสงค์

เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Acrophialophora* sp. ให้มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสดีขึ้นและทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์ที่ปรับปรุงแล้ว เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ที่ปรับปรุงแล้ว ซึ่งมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง เพื่อนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรม โดยช่วยในส่วนของการลดต้นทุนการผลิตและไม่ก่อให้เกิดปัญหาทางมลพิษกับสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังเป็นแนวทางในการเปลี่ยนเศษวัสดุทางการเกษตรและขยะจำพวกเซลลูโลส ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าในเชิงพาณิชย์ นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหาการสะสมของขยะและลดต้นทุนในการกำจัดขยะในทางอ้อม

ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้มุ่งศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Acrophialophora* sp. โดยทำการกลายด้วยรังสี สารเคมีและการใช้รังสีร่วมกับสารเคมี โดยการทดสอบดูแอคติวิตีที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยง *Acrophialophora* sp. บนอาหาร CMC agar โดยเปรียบเทียบขนาดของวงใส เพื่อให้ทราบถึงศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสของสายพันธุ์ที่ปรับปรุงได้กับสายพันธุ์เดิม จากนั้นจึงคัดแยกมาวัดปริมาณเอนไซม์ทั้ง 3 components อีกครั้ง ซึ่งเป็นการวัดศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส

อย่างละเอียด เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่ปรับปรุงได้กับสายพันธุ์เดิม จากนั้นนำสายพันธุ์ที่ปรับปรุงได้และมีศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงที่สุด มาหาภาวะต่างๆ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น อุณหภูมิ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ส่วนประกอบในเซลล์พืช

พืชเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติประเภทที่ใช้แล้วเกิดกลับมาใช้ได้ใหม่ในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นพืชจึงเป็นแหล่งสารประกอบอินทรีย์แหล่งใหญ่ที่สำคัญในอนาคต ส่วนประกอบหลักของพืชได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ซึ่งมีในปริมาณที่แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดและภาวะที่เจริญเติบโตของพืชนั้นๆ การนำเอาส่วนประกอบของพืชชนิดต่างๆ มาใช้ให้เหมาะสมกับงานและให้เกิดประโยชน์สูงสุด จึงจำเป็นต้องทราบลักษณะโครงสร้างของพืชและปริมาณส่วนประกอบต่างๆ ที่มีในพืชนั้นๆ ด้วย (Inagaki และ Phillips, 1989)

เซลลูโลส (cellulose)

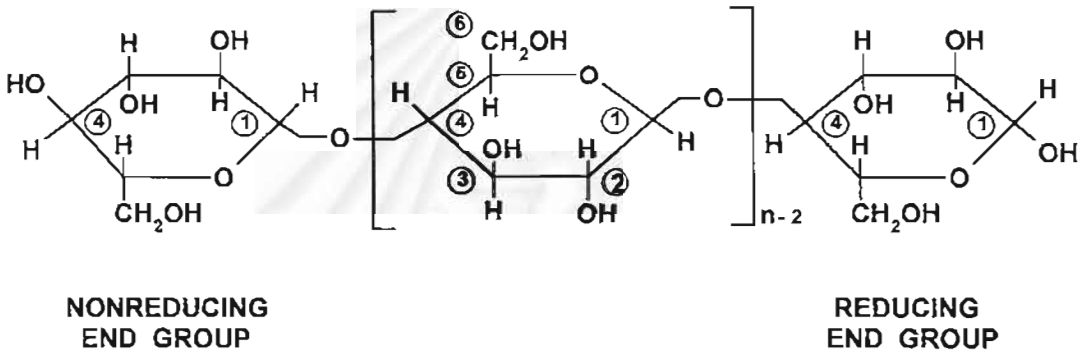
เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดในเซลล์พืช พบตามผนังเซลล์ของพืชทุกชนิด มีหน้าที่ช่วยทำให้พืชมีโครงสร้างแข็งแรง เป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ไม่ละลายน้ำที่อุณหภูมิปกติและไม่ละลายในตัวทำละลายส่วนใหญ่ เอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยสลายได้ แต่มีประโยชน์ในการช่วยเพิ่มกากอาหาร (Maglione James และ Wilson, 1997) ในธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มักจะพบรวมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส กัม (gum) เพนโตแซน (pentosan) แทนนิน (tannins) ไขมัน (lipid) และสารเกิดสี (colouring matter) เป็นต้น (Cowling และ Kirk, 1976)

ลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลเซลลูโลส

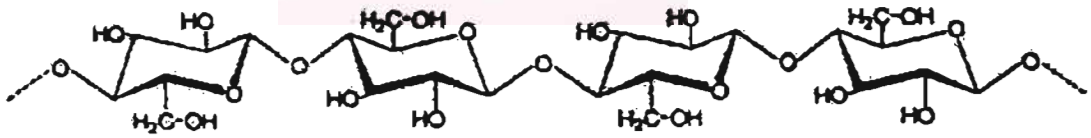
เซลลูโลสเป็นสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ที่เป็นโพลีแซคคาร์-ไรด์ (polysaccharide) ประกอบไปด้วยโมเลกุลของ ดี-กลูโคส (D-glucose) ในรูปบีต้า-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-glucopyranose) หลายโมเลกุล เรียงต่อกันเป็นโครงสร้างคล้ายลูกโซ่ แต่ละโมเลกุลจับกันด้วยพันธะไกลโคสิดิก (glycosidic bond) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ของโมเลกุลถัดไป เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group,-OH) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 อยู่ในตำแหน่งบีต้า (beta) จึงเรียกพันธะนี้ว่า พันธะบีต้า-1,4 ไกลโค

ซิดิก (β-1,4 glycosidic bond) โดยรูปแบบของการจัดเรียงตัวของหน่วย ดี-กลูโคส จะอยู่ในลักษณะรูปเก้าอี้ (chair-form) แต่ละสายของเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่มีแขนงย่อย พบว่ามีสูตรเคมีทั่วไปคือ $-(C_6H_{10}O_5)-_n$ เมื่อ n คือจำนวนหน่วยของดี-กลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง จำนวนหน่วยของดี-กลูโคสในสายเซลลูโลสไม่สามารถทราบจำนวนที่แท้จริงได้ แต่ประมาณได้ว่าต้องมีเป็นจำนวนมาก ตั้งแต่ 15 ถึง 14,000 หน่วย (Cowling และ Kirk, 1976) แต่โดยทั่วไปจะพบเฉลี่ยอยู่ที่ 3,000 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 50,000 ถึง 2,500,000 (Norkrans, 1967) (ภาพที่ 2.)

ก.)



ข.)



ภาพที่ 2. ก.) สูตรโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส
ข.) ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส

จากคุณสมบัติในการละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ของเซลลูโลส สามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามปริมาณการละลายได้เป็น 3 ชนิด คือ

- แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) คือเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง

- บีต้า-เซลลูโลส (β-cellulose) คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง และสามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด

- แกมม่า-เซลลูโลส.(γ-cellulose) คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮ-ดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง โดยละลายได้ในสารละลายกรด และสามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์ (Paturau, 1989)

ปริมาณเซลลูโลสในพืชชนิดต่าง ๆ

ปริมาณของเซลลูโลสในส่วนต่างๆ ของพืชนั้น จะมีมากน้อยแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับว่าจะเป็นพืชชนิดใดและส่วนไหนของพืช ตัวอย่างปริมาณเซลลูโลสที่พบในพืชชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1.

ตารางที่ 1. ปริมาณเซลลูโลสในพืชและส่วนต่างๆ ของพืช

ชนิดพืช	ส่วนต่างๆ ของพืช	ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
ข้าว	แกลบ (hulls)	42
	ฟาง (straw)	30
ข้าวโอต	เมล็ด	18
	ฟาง (straw)	40
	แกลบ (hulls)	51
ข้าวฟ่าง	ต้นแห้ง (hay)	32
	เปลือก (hulls)	51
ข้าวไร	ฟาง (straw)	34
ข้าวบาเลย์	ฟาง (straw)	40
ข้าวโพด	ต้น (stover)	36
	ซัง (cobs)	28
ถั่วเหลือง	ต้นแห้ง (hay)	31
	เปลือก (hulls)	52
ถั่วลิสง	เปลือก (hulls)	49
ฝ้าย	เปลือกหุ้มเมล็ด	60
	เส้นใย	91
	ลำต้น (stalks)	35
อ้อย	ต้นแก่	42
	ชานอ้อย (bagasse)	48

ตารางที่ 1. ปริมาณเซลลูโลสในพืชและส่วนต่างๆ ของพืช (ต่อ)

ชนิดพืช	ส่วนต่างๆ ของพืช	ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
สับปะรด	กากแห้ง	25
ต้นอัลฟัลฟา	ต้นอ่อนแห้ง	30
	ต้นแก่แห้ง	36

การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส

การย่อยสลายเซลลูโลสคือการลดจำนวนกลูโคสที่เรียงต่อกันในโมเลกุลของเซลลูโลสให้สั้นลง เมื่อถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมีเพียงชนิดเดียวคือกลูโคส แต่ถ้าการย่อยสลายเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะประกอบไปด้วย กลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคาไรด์ชนิดต่างๆ การย่อยเซลลูโลสสามารถทำได้ 2 วิธีใหญ่ๆ คือ

1. การย่อยด้วยสารเคมี (chemical hydrolysis) เป็นการย่อยด้วยสารละลายกรดหรือสารละลายด่าง ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาการทำลายพันธะไกลโคสิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจน (oxygen) ถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส

การย่อยด้วยสารเคมีสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ

1.1 การย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) แบ่งได้เป็น 2 กระบวนการคือ

- กระบวนการแบบโฮโมจีเนียส (homogeneous process) เป็นกระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) หรือกรดซัลฟูริก (sulfuric acid) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่คือน้ำตาลกลูโคส แต่มีข้อเสียคือต้องมีการแยกกรดที่ใช้ออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้ และการผุกร่อนของเครื่องมือ

- กระบวนการแบบเฮเทอโรจีเนียส (heterogeneous process) เป็นกระบวนการที่ใช้กรดอย่างอ่อนทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงกว่า 180 องศาเซลเซียส ผลการย่อยจะได้เซลลูโลสที่ยังคงมีโครงสร้างเป็นเส้นใยอยู่

1.2 การย่อยด้วยด่าง (alkaline hydrolysis) สารละลายที่นิยมใช้ คือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เอทิลีนไดอะมีน (ethylene diamime) และแอมโมเนีย (ammonia) เป็นต้น การใช้สารละลายด่างในการย่อย จะทำให้สายของโพลีแซคคาไรด์สั้นลง โดยปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 160 - 180 องศาเซลเซียส และต้องใช้ออกซิเจนเข้าร่วมในปฏิกิริยาการย่อยด้วย

ปัญหาของการย่อยสลายด้วยสารเคมีนั้นพบว่าแม้ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นค่อนข้างเร็ว คือ ประมาณ 15-20 นาที แต่ก็มีปัญหามากมาย เช่น อุปกรณ์ที่ใช้ต้องทนต่อความเป็นกรด-ด่างสูง ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง ปฏิกิริยาบางปฏิกิริยาก็จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูง จึงต้องเสียค่าใช้จ่ายใน

ส่วนของพลังงานค่อนข้างสูง อีกทั้งการย่อยสลายด้วยสารเคมีภายใต้ภาวะเช่นนี้กลูโคสที่เกิดขึ้นบางส่วนจะทำปฏิกิริยากับกรดที่ใช้ในการย่อยสลาย เกิดเป็นสารประกอบซนิดอื่นที่ไม่ต้องการ เช่น เฟอร์ฟูรัล (furfural) และไฮดรอกซีเมธิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxy methyl furfural) นอกจากนี้สารเคมียังสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารประกอบอื่นที่ปนมากับเซลลูโลสได้ด้วย นั่นก็คือปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยสารเคมีจะมีความจำเพาะเจาะจง (specific) ต่อเซลลูโลสต่ำ (Blazej Kosik และ Spilda, 1990)

2. การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สิ่งมี ชีวิตสร้างขึ้น เพื่อทำหน้าที่เร่ง (catalyst) ปฏิกิริยาภายในเซลล์ เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพสูง ในภาวะการทำงานที่เหมาะสมจะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วถึง 10^{8}-10^{11} เท่า เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความจำเพาะ (specificity) ต่อสับสเตรท (substrate) ในปฏิกิริยาหนึ่งๆ เท่านั้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง แม้ว่าเอนไซม์จะถูกสร้างและอยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) แต่ก็สามารถสกัดออกมาใช้งานได้เช่นเดียวกับเมื่ออยู่ภายในเซลล์ (Prescott และ Dunn, 1959)

โดยเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลสก็คือ เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งส่วนใหญ่จะได้จากเชื้อรา (fungi) และแบคทีเรีย (bacteria) การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับสารประกอบเซลลูโลสอย่างมาก โดยจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปนมาด้วย จึงทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ กลไกการย่อยสลายก็ดำเนินไปอย่างช้าๆ ในภาวะที่อุณหภูมิปกติที่สิ่งมีชีวิตสามารถเจริญเติบโตได้ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นก็ไม่รุนแรงและไม่ต้องการความเป็นกรด-ด่างอย่างแรง จึงไม่จำเป็นต้องใช้ภาชนะที่มีความทนทานต่อการกัดกร่อนและที่สำคัญยังไม่ทำให้เกิดมลพิษกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

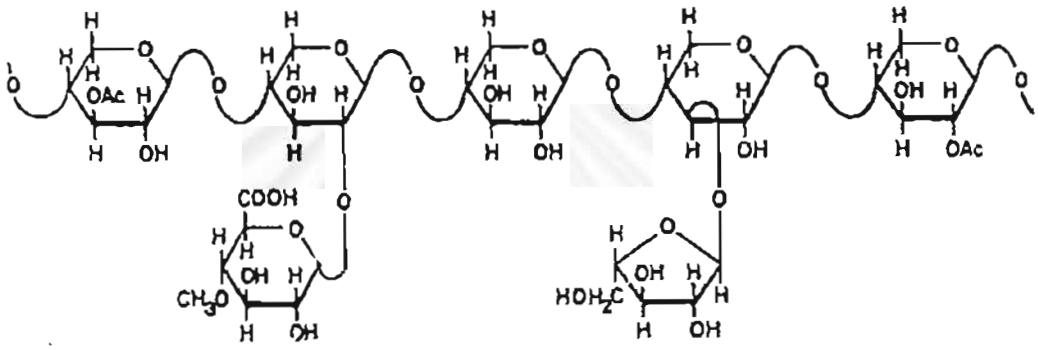
เฮมิเซลลูโลสเป็นอินทรีย์สารที่พบมากเป็นอันดับที่สองรองมาจากเซลลูโลส มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ (polymer) ของน้ำตาลเพนโตส (pentose) (Robinson, 1977) ซึ่งส่วนมากเป็น ดี-ไซแลน (D-xylan) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส (xylose) หลายๆ โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1, 4-ไกลโคสิดิก ดังแสดงในภาพที่ 3. สายพอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเฮทเทอร์โรจีเนียส โดยประกอบด้วยโพลิแซคคาไรด์หลายชนิดปนกัน (Ericksson Blanchette และ Ander, 1990) ได้แก่

- เพนโตแซน (pentosan) ส่วนใหญ่เป็นไซแลนและอะราแบน (araban) เมื่อนำไปย่อยจะได้น้ำตาลไซโลสและอะราบิโนส (arabinose) ไซแลนเป็นสารที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลสมากกว่าสารอื่น

- เฮกโซแซน (hexosan) ส่วนใหญ่เป็นแมนแนน (mannan) กาแลคแตน (galactan) และกลูแคน (glucan) ตามลำดับ

- โพลียูโรไนด์ (polyuronides) ส่วนมากเป็นสารประกอบของกรดโพลียูโรนิค (polyuronic acid) และยังพบกรดยูโรนิค (uronic acid) ปนอยู่ด้วย ที่สำคัญคือเฮกซูโรนิค (hexuromic acid) เช่น บีต้า-ดี-กลูคูโรนิค (β-D-glucuronic) และ บีต้า-ดี-แมมมูโรนิค (β-D-mammuronic) เป็นต้น

ข้อแตกต่างของเฮมิเซลลูโลสกับเซลลูโลสคือ สายพอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขามากกว่าและมีความยาวของสายพอลิเมอร์สั้นกว่า โดยมีความยาวประมาณ 40 หน่วยกลูโคส (Kirk, 1983)

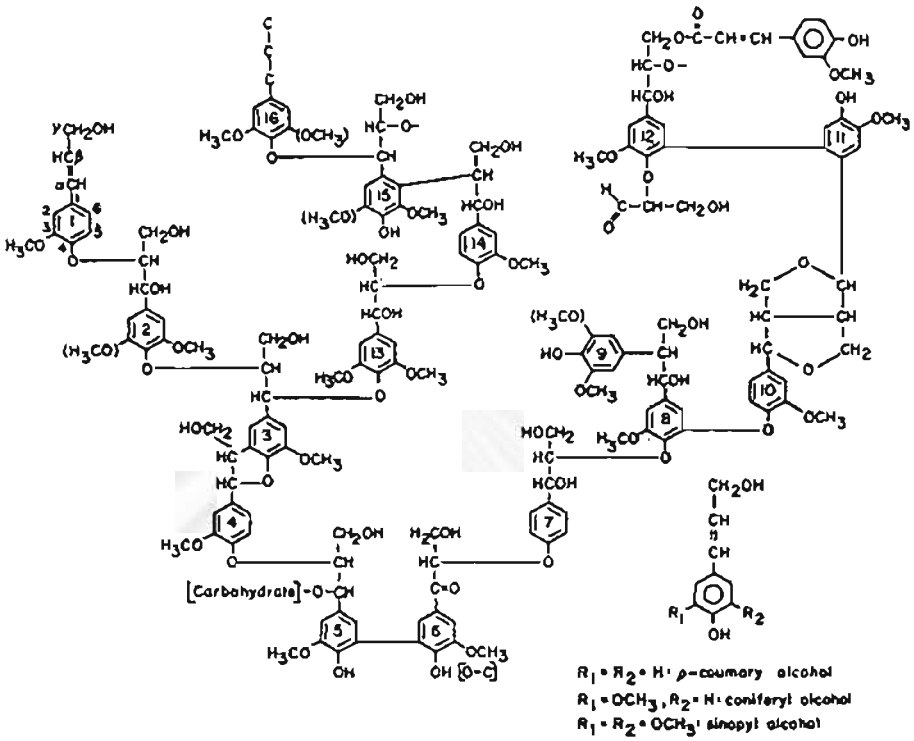


ภาพที่ 3. สูตรโครงสร้างของ**เฮมิเซลลูโลส** (Ericksson, Blanchette และ Ander, 1990)

ลิกนิน (lignin)

เป็นสารประกอบ**ที่มีอยู่ในพืชรองลงมาจาก**เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส พบได้ในส่วนผนังเซลล์ชั้นที่สองและ middle lamella ของพืชชั้นสูงทั้ง gymnosperm และ angiosperms fern และ club moss **นอกจากนี้ยังพบในส่วนของ** vascular tissue แต่ลิกนินไม่พบในพืชพวก mosses lichens และ algae โดยในพืชที่อ่อนอยู่จะมีลิกนินเพียงเล็กน้อย และจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อพืชแก่ขึ้น ลิกนินถูกสังเคราะห์โดยกระบวนการที่เรียกว่า lignification โดยโมเลกุลของลิกนินจะแทรกอยู่ในช่องว่างระหว่าง cellulose fibrils และสายของเฮมิเซลลูโลส ลิกนินที่พบในส่วนของผนังเซลล์จะทำหน้าที่เสมือนเกราะป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ โครงสร้างของลิกนิน เป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) หรือเรียกว่าเป็น ฟีโนลิกพอลิเมอร์ (phenolic polymer) โดยมีหน่วยฟีนิลโพรเพน (phenylpropane unit) เรียงต่อกันแบบสุ่ม (random) ที่หน่วยฟีนอล (phenol unit) อาจเป็นกัวอิเอซิล (guaiacyl) หรือไซรินกิล (syringyl) ดังแสดงในภาพที่ 4. ที่ตำแหน่งแอลฟาและบีต้าของโมเลกุลลิกนิน อาจเกิดการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุลหรือคาร์บอนในหน่วยฟีนอล อาจเกิดพันธะกับคาร์บอนในอีกหน่วยหนึ่งภายในสายพอลิเมอร์ที่ประกอบกัน

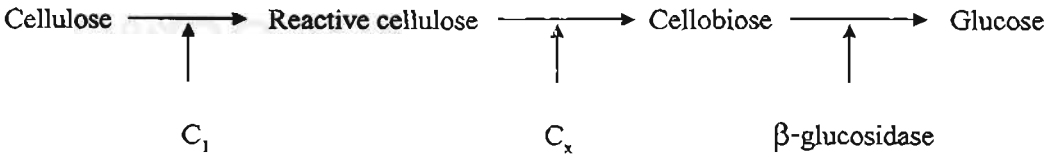
เป็นโมเลกุลลิกนิน ทำให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น ในเอทธานอลหรือเมทานอล (methanol) ที่ร้อน และในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Ericksson, Blanchette และ Ander, 1990)



ภาพที่ 4. โมเลกุลของลิกนิน (Kirk และ Farrell, 1987)

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเริ่มขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1950 โดยสมมติฐานของ Reese และคณะ ดังสมการ



สมมติฐานนี้แสดงให้เห็นว่า เซลลูโลสถูกย่อยด้วยเอนไซม์ C_1 ให้เกิดเป็น reactive cellulose ต่อมาเอนไซม์ C_x ก็จะย่อยสลายอนุพันธ์เซลลูโลสที่เกิดจากการย่อยสลายของ C_1 ให้กลายเป็นเซลโลไบโอส ทั้งหมดนี้เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยกระบวนการทางชีวเคมี ทำให้ทราบว่าเอนไซม์เซลลูเลสประกอบไปด้วย C_1 และ C_x หลังจากนั้นเซลโลไบโอสซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็กจะซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์

ของจุลินทรีย์ และเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) จะย่อยเซลโลไบโอสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสต่อไป

ในเวลาต่อมา ได้มีการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จาก *Trichoderma viride* พบว่าองค์ประกอบแต่ละส่วนให้ผลที่แตกต่างไปจากสมมติฐานของ Reese และคณะ คือพบว่าเอนไซม์ C_x จะเข้าทำปฏิกิริยากับเซลลูโลส จากนั้นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะถูกย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์ C_1 และยังพบว่าการทำงานของเอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ β-glucosidase จะถูกยับยั้งการทำงานด้วยกลูโคสก่อน ทำให้เกิดการสะสมของเซลโลไบโอสขึ้น ซึ่งเซลโลไบโอสนี้จะไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ C_x และ C_1 ต่อไป (Ericksson Blanchette และ Ander, 1990)

องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาระบบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อรา พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ จากนั้นจะปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีหลายองค์ประกอบ (multicomponent enzyme) โดยจะมีองค์ประกอบของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกัน ดังนี้คือ (Beldman และคณะ, 1987)

- Exoglucanase หรือ cellobiohydrolase หรือ 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase (EC.3.2.1.91) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยตัดที่พันธะ β-1,4-glucosidic จากปลายด้าน non-reducing ได้เป็นเซลโลไบโอสและกลูโคสบางส่วน

- Endoglucanase หรือ 1,4-β-D-glucan 4-glucanohydrolase (EC.3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยตัดที่พันธะ β-1,4-glucosidic ในส่วนที่เป็น amorphous โดยจะเข้าตัดพันธะอย่างสุ่ม ได้เซลโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลักและได้กลูโคสเป็นบางส่วน

- β-glucosidase หรือ β-D-glucoside glucohydrolase หรือ cellobiase (EC.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสและ cello-oligosaccarides ให้ได้เป็นกลูโคส (Fogarty, 1983)

จะเห็นได้ว่าการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลูโคสนั้น ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด

คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเซลลูเลสเป็น glycoprotein ประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ถึง 60,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ co-factor หรือโลหะอื่นๆ ใน

การช่วยทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน ประมาณ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิด นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง ทนต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วงกว้างประมาณ 4.0-8.0 และคงทนต่อสารเคมีได้ดี ส่วนการเก็บรักษานั้นสามารถเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 และ 4.0 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลาหลายปี หรือเก็บโดยวิธี freeze dry หรือตกตะกอนด้วยอะซิโตนหรือเอทธานอลได้โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติ (Ryu และ Mandels, 1980) อย่างไรก็ตามเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันย่อมจะมีคุณสมบัติต่างๆ แตกต่างกันไปด้วย

การกระตุ้นและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

โดยทั่วไปคนส่วนใหญ่จะเข้าใจว่าเซลลูโลสเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์เซลลูเลสเพียงชนิดเดียว แต่เซลลูโลสเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำจึงไม่สามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปได้ ดังนั้นจึงไม่น่าจะถูกใช้เป็นสารกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสได้ แต่พบว่าสารตั้งต้นประเภทคาร์บอน เช่น กลีเซอรอลสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลลูเลสได้ นอกจากนั้นยังมีสารตัวอื่นที่สามารถกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสได้ดีคือ แลคโตส (lactose) สาลิซิน (salicin) เซลโลไบโอส และ โซฟอโรส (sophorose: 2-0-D-gluco-pyranosyl-D-glucose) จากการทดลองพบว่า โซฟอโรส (ซึ่งสารตัวนี้อาจปนอยู่กับกลูโคสที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายแป้ง) สามารถกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสได้ดีกว่าเซลโลไบโอสถึง 200 เท่า แต่ก็ไม่อาจสรุปได้ว่าโซฟอโรสมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเซลลูเลสในธรรมชาติ เพราะสารกระตุ้นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลลูเลสในธรรมชาตินั้นคือเซลโลไบโอส (Mandels, 1960)

สำหรับการยับยั้งการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลสนั้น จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มมากขึ้นดังนี้คือ β-glucosidase จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้นและส่งผลยับยั้งอย่างต่อเนื่อง คือทำให้ในระบบมีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้น โดยที่เซลโลไบโอสจะเป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ endoglucanase และ exoglucanase ต่อไป ทำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์น้อยลง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจึงช้าลงและหยุดในที่สุด (Siu และ Reese, 1953) นอกจากนี้ยังมีสารจำพวก protein reactants ที่เป็น halogens (ได้แก่ Cl I Br F) โลหะหนัก และสารลดแรงตึงผิวก็มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยเช่นกัน แต่ชนิดของสารยับยั้งที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสก็ขึ้นกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วย เช่น กลูโคสที่ความเข้มข้น 0.034 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Cellulomonas* sp. ได้ถึง 15 ถึง 50 เปอรเซ็นต์ (Prasertsan และ Doelle, 1986) ใน *Thermomonospora fusca* พบว่า Pb^{2+} และ Hg^{2+} ที่ความเข้มข้น 1.0 mM มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและนอกจากนี้ยังพบว่าเอทานอล ethanol ก็มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลสลดลงถึง 15 เปอร์เซ็นต์ (Ferchak และ Pye,

1983) ส่วนใน *Aspergillus terreus* GTC 826 กลูโคสที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ กลับมีผลในการกระตุ้นให้เชื้อราสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี (Ali และ Sayed, 1992)

การกลาย (mutation)

คือการเปลี่ยนแปลงในลำดับของเบสหรือโครงสร้างของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตให้ผิดไปจากสภาพธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้จะต้องสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ โดยทั่วไปแล้วการกลายนั้นเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือการกลายที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งโดยปกติแล้วจะมีอัตราในการเกิดที่ค่อนข้างต่ำ คือมีน้อยกว่า 1 ในล้านเซลล์ และการกลายที่เกิดเนื่องจากการใช้สารชักนำ (induced mutation)

การกลายที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ

การกลายที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาตินั้น มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมากคือมีโอกาสน้อยกว่า 1 ในล้านเซลล์ โดยสาเหตุของการเกิดการกลายขึ้นเองตามธรรมชาตินั้น คาดว่าน่าจะเกิดจาก cosmic ray (ionizing radiation) หรือเกิด tautomeric shift ของเบสในสายเดิมของ DNA ดังนั้นเมื่อมีการสังเคราะห์ DNA ขึ้นใหม่ก็จะเกิดการจับคู่ของ base ในสาย DNA ผิดไป (Cess และ David, 1996)

การกลายของจุลินทรีย์ตามธรรมชาตินั้น พบว่ามีสมมติฐานในการเกิดขึ้นได้ดังนี้คือ

1. จุลินทรีย์ที่เจริญปะปนอยู่ในประชากรของจุลินทรีย์นั้นมีโอกาสน้อยมากที่จะเกิดการกลายได้ภายในหนึ่งชั่วของการเจริญ (generation) แต่เมื่อเกิดการกลายขึ้นก็จะเกิดเป็นจุลินทรีย์กลายที่อาจจะเป็น sensitive mutant ที่ไวต่อสารเคมี อุณหภูมิหรือยาปฏิชีวนะ โดยอาจทำให้เกิดการตายของจุลินทรีย์ได้ หรืออาจเกิดเป็น resistant mutant คือจุลินทรีย์กลายที่สามารถทนทานต่อภาวะต่างๆ และ**เมื่อจุลินทรีย์กลายเหล่านี้มีการเพิ่มจำ**นวน ก็จะเป็นการขยายพันธุ์ของจุลินทรีย์กลายให้เพิ่มมากขึ้น ทำให้ได้จุลินทรีย์กลายใหม่ที่มีคุณสมบัติที่ไวหรือทนทานต่อภาวะต่าง ๆ ด้วย

2. ในช่วงของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้น พบว่าการกลายอาจเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งระหว่างการเจริญ (growth cycle) โดยโอกาสของการเกิดการกลายจะขึ้นกับจำนวนครั้งของการขยายพันธุ์ นั่นคือถ้าจำนวนครั้งของการขยายพันธุ์มีมากครั้ง โอกาสในการเกิดการกลายก็จะมีมากขึ้นด้วย

การกลายเนื่องจากสารที่ชักนำให้เกิดการกลาย

เนื่องจากโอกาสของการเกิดจุลินทรีย์กลายโดยธรรมชาติมีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมาก จึงมีการใช้สารที่ก่อให้เกิดการกลายขึ้น เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและเพิ่มความถี่ของการเกิดการกลาย การกลายอาจจะเกิดขึ้นได้ทุกส่วนของ DNA ที่อยู่ในจุลินทรีย์ ทฤษฎีของการเกิดการกลายเนื่องจากสารที่ชักนำให้เกิดการกลายคือ

1. สารที่ชักนำให้เกิดการกลายไปทำให้เอนไซม์ทั้งหมดหรือบางส่วนไม่ทำงานหรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ active site ทำให้เอนไซม์นั้นๆ มีประสิทธิภาพในการทำงานดียิ่งขึ้น

2. สารที่ชักนำให้เกิดการกลายอาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน structural protein หรือ regulatory protein หรือ functional RNA เช่น tRNA หรือ rRNA มีผลทำให้เกิดความผิดพลาดในกระบวนการแปลรหัส (translation)

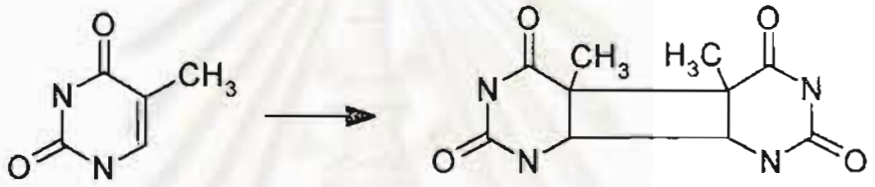
3. สารที่ชักนำให้เกิดการกลายไปทำให้ลำดับของเบสเดิมในส่วนของ operator gene ในโอเปอรอนมีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้น active repressor protein ไม่สามารถที่จะจับกับส่วนนี้ได้ ทำให้มีการสังเคราะห์ mRNA ได้อย่างมากมาย เป็นต้น

ความสำเร็จในการทำ mutagenesis นั้น ถ้าต้องการให้ประสบความสำเร็จสูงแล้ว มักจะใช้สารมากกว่า 1 ชนิดในการชักนำ หรือที่เรียกว่า การชักนำให้เกิดการกลายซ้ำ (repeated mutation) (Aida และคณะ, 1973)

การกลายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet light)

แสงอัลตราไวโอเลตเป็นแสงที่ชักนำให้เกิดการกลาย ในกลุ่มของสารรังสี โดยรังสีที่แผ่ออกมานั้นเป็นรังสีชนิดที่ไม่แตกตัว (nonionizing radiation) คือเป็นรังสีที่ไม่ทำให้เกิดประจุ มีพลังงานน้อยกว่ารังสีที่แตกตัวได้ และมีความสามารถในการทะลุทะลวงต่ำกว่า ซึ่งเป็น physical mutagen ที่ใช้ชักนำให้เกิดการกลายที่มีประสิทธิภาพสูง นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะง่ายและสะดวกในการชักนำให้เกิดการกลายได้เป็นอย่างดี การเลือกใช้ช่วงเวลาในการฉายแสง ระยะห่างจากแหล่งแสงและความเข้มของแสงที่พอเหมาะ สปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเมื่อเจริญเป็นโคโลนีจะสามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงได้อย่างชัดเจน เช่น สีสปอร์ของราบางชนิดจะหมดไป หรือสีของโคโลนีอาจเปลี่ยนแปลงไป หรือความสามารถในการสร้างสปอร์อาจลดน้อยลงหรือไม่มีการสร้างเลย เป็นต้น จึงนิยมนำแสงอัลตราไวโอเลตมาใช้กันบ่อยๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเริ่มต้นปรับปรุงสายพันธุ์ (strain development) แสงอัลตราไวโอเลตที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการกลาย ต้องเป็นแสงอัลตราไวโอเลตที่ปล่อยพลังงานออกมาในช่วงความยาวคลื่นสั้นเท่านั้น คืออยู่ระหว่าง 200-300 นาโนเมตร แต่ความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายได้ดีที่สุด ควรมีความยาวคลื่น 253.7

นาโนเมตร เพราะเป็นความยาวคลื่นที่ DNA สามารถดูดกลืนคลื่นแสงเข้าไปในโมเลกุลของเบสได้สูงสุด ทำให้เกิดความผิดปกติบนสาย DNA โดยทำให้เบสไพริมิดีน 2 โมเลกุลที่อยู่ชิดกันบนสาย DNA เดียวกัน มีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) เกิดเป็น thymine-thymine dimer (dimerization) ดังแสดงในภาพที่ 5. หรือ thymine-cytosine dimer หรือ cytosine-cytosine dimer ซึ่งอาจจะเกิดได้ในอัตราส่วน 2:1:1 หรืออาจมีสาเหตุมาจากการเกิดไดเมอร์บนสาย DNA เดียวกันแล้วทำให้เกิดการบิดตัวของ double helix ไปจนเสียรูป การเกิดไดเมอร์จะมีผลต่อการจำลองตัวของ DNA เพราะพันธะโควาเลนท์ที่เกิดจะทำให้ไดเมอร์ไม่สามารถแยกออกจากกัน ส่งผลให้ thymine ไม่สามารถจับคู่กับ adenine ของสาย DNA ที่อยู่ตรงกันข้ามได้ เมื่อ DNA ต้องการจำลองตัวจึงต้องมีกลไกเข้ามาซ่อมแซม จึงอาจทำให้เกิดการผิดพลาด จากการนำเอาเบสคู่ใหม่เข้ามาแทนที่



Thymine **Thymine dimer**

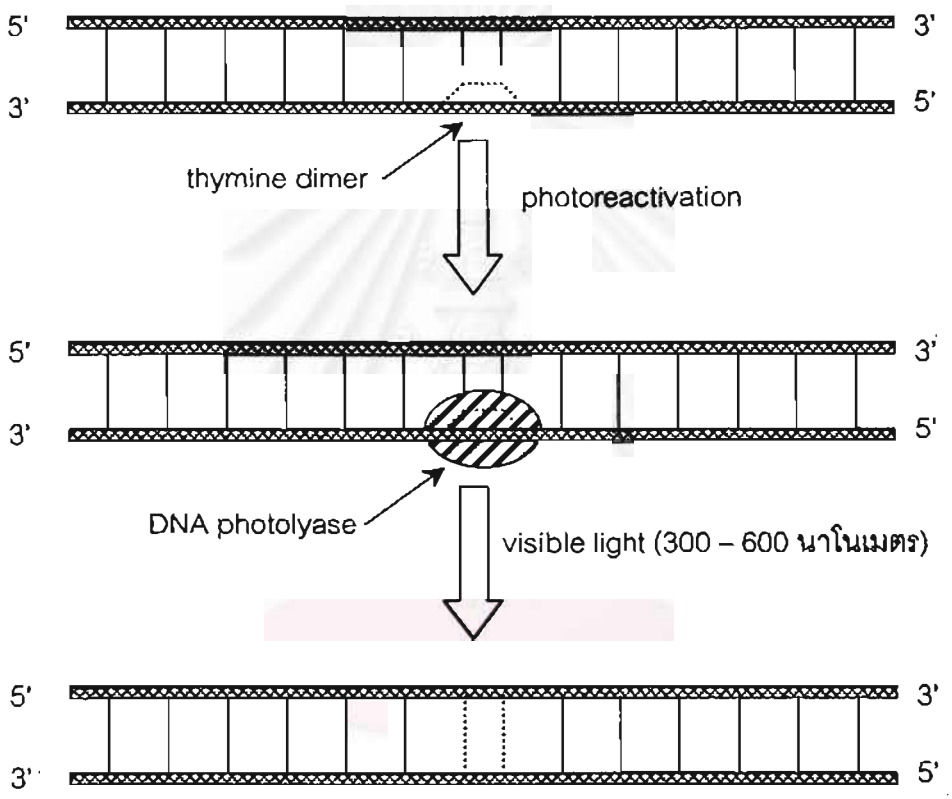
ภาพที่ 5. thymine-thymint-cyclobutane dimer ที่เกิดจากการฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Davies, 1964)

ผลจากการชักนำให้เกิดการกลายโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต ส่วนใหญ่จะเกิดการกลายแบบ AT → GC ซึ่งเป็นการกลายแบบ transition base pair mutations และอาจพบ transversion base pair mutations frameshift mutations และ deletions ได้เช่นกัน (Davies, 1964)

ความผิดปกติของเบสที่เกิดจากแสงอัลตราไวโอเลตนี้ สามารถทำให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ โดยนำสปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแล้วไปฉายกับ visible light (แสงช่วงความยาวคลื่น 300-450 นาโนเมตร เช่นแสงแดด แสงจากหลอดฟลูโอเรสเซนท์) ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า photoreactivation ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ photolyase เข้าช่วย เอนไซม์นี้จะทำงานโดยมีแสงเป็นตัวกระตุ้น จากนั้นจะเข้าตัดไดเมอร์ที่เกิดขึ้นให้ขาดออกกลายเป็นโมโนเมอร์ของเบสไพริมิดีน ไดเมอร์มากกว่า 80% ในจีโนม (genome) รวมทั้ง cross link ที่เกิดจากแสงอัลตราไวโอเลต จะสามารถเกิด photoreactivation ได้ ระบบการซ่อมแซมนี้ไม่มีความผิดพลาด ดังนั้นถ้ามีกระบวนการนี้ขึ้นจะไม่พบการกลายเลย ในการทดลองจึงต้องพยายามไม่ให้สปอร์ที่ผ่านการฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลตแล้ว ได้รับแสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง visible light ทันทีตั้งแต่เริ่มมีการฉายแสงอัลตราไวโอเลต

กระบวนการซ่อมแซมการเกิดไดเมอร์นั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ

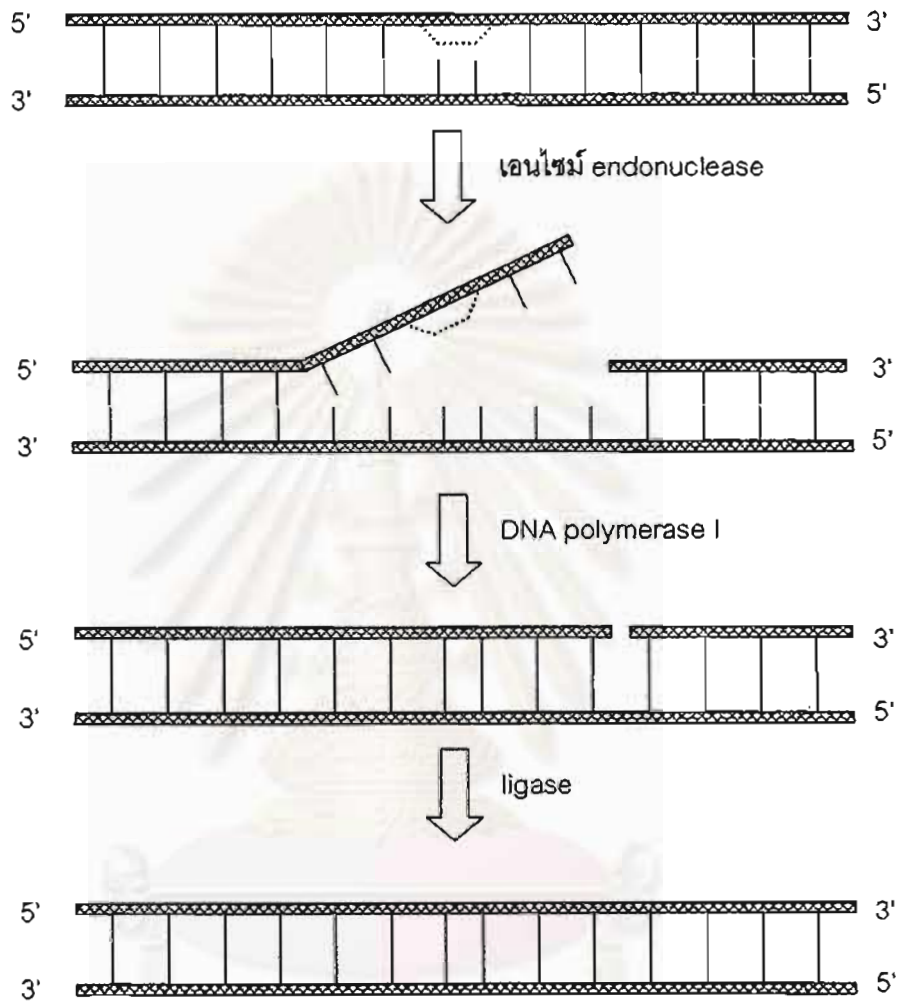
1. กระบวนการซ่อมแซมที่ต้องใช้แสง (photoreactivation) เมื่อเกิด thymine dimer ขึ้น เอนไซม์ photoreactivating หรือเอนไซม์ DNA photolyase จะไปเกาะที่ตำแหน่งที่เกิด thymine dimer และเอนไซม์นี้จะดูดซับแสงสว่าง เพื่อใช้เป็นตัวกระตุ้นให้เอนไซม์นี้เข้าทำลายพันธะที่ยึดระหว่าง thymine ออก ทำให้ thymine สามารถเข้าคู่กับ adenine ของสายตรงข้ามได้เหมือนเดิม จากนั้นเอนไซม์ก็จะหลุดออกไปจาก DNA ตำแหน่งที่ผิดปกติ ทำให้ได้โมเลกุลของ DNA ที่ปกติเหมือนเดิม (Brown, 1992) ดังแสดงในภาพที่ 6.



ภาพที่ 6. การซ่อมแซม thymine dimer โดยกระบวนการที่ต้องใช้แสง (Brown, 1992)

2. กระบวนการซ่อมแซมที่ไม่ต้องใช้แสง (dark repair หรือ excision repair) เป็นกระบวนการซ่อมแซมโมเลกุลของ DNA ที่ผิดปกติทั่วๆ ไป โดยจะตัดส่วนของ DNA ที่เสียหายหรือผิดปกติออกไป ด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ และจะมีการสร้างส่วนของ DNA ที่ถูกต้องแทนส่วนที่ถูกตัดออก เช่น หากเกิด thymine dimer ขึ้น จะมีเอนไซม์ endonuclease ไปจับกับ thymine dimer และตัดพันธะระหว่างน้ำตาลและฟอสเฟตออก จากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase I จะทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องบริเวณช่องว่างที่ถูกตัดออกไปให้สมบูรณ์

และเอนไซม์ ligase จะเชื่อมส่วนของ DNA ที่ได้รับการซ่อมแซมเข้ากับ DNA สายเดิม (Devlin, 1982) ดังแสดงในภาพที่ 7.

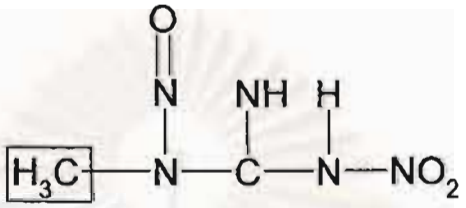


ภาพที่ 7. การซ่อมแซมด้วยกลไกที่ไม่ต้องใช้แสง (Devlin, 1982)

โดยทั่วไป**นิยม**ใช้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นตัวชัก**นำตัวแรก** ในการทำให้เกิดการกลาย และเมื่อคัดเลือกได้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ต้องการแล้ว ก็สามารถนำมาชักนำให้เกิดการกลายซ้ำอีก โดยใช้สลับกับสารชักนำชนิดอื่น เช่น การใช้ NTG หลังจากที่มีการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

การกลายด้วย NTG

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) เป็นสารประกอบทางเคมี มีสูตรโมเลกุล $C_2H_5N_5O_3$ และมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 8. น้ำหนักโมเลกุล 147.1 ละลายน้ำได้สูงสุด 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จุดหลอมเหลว 116-118 องศาเซลเซียส สามารถชักนำให้เกิดการกลายได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 6-9

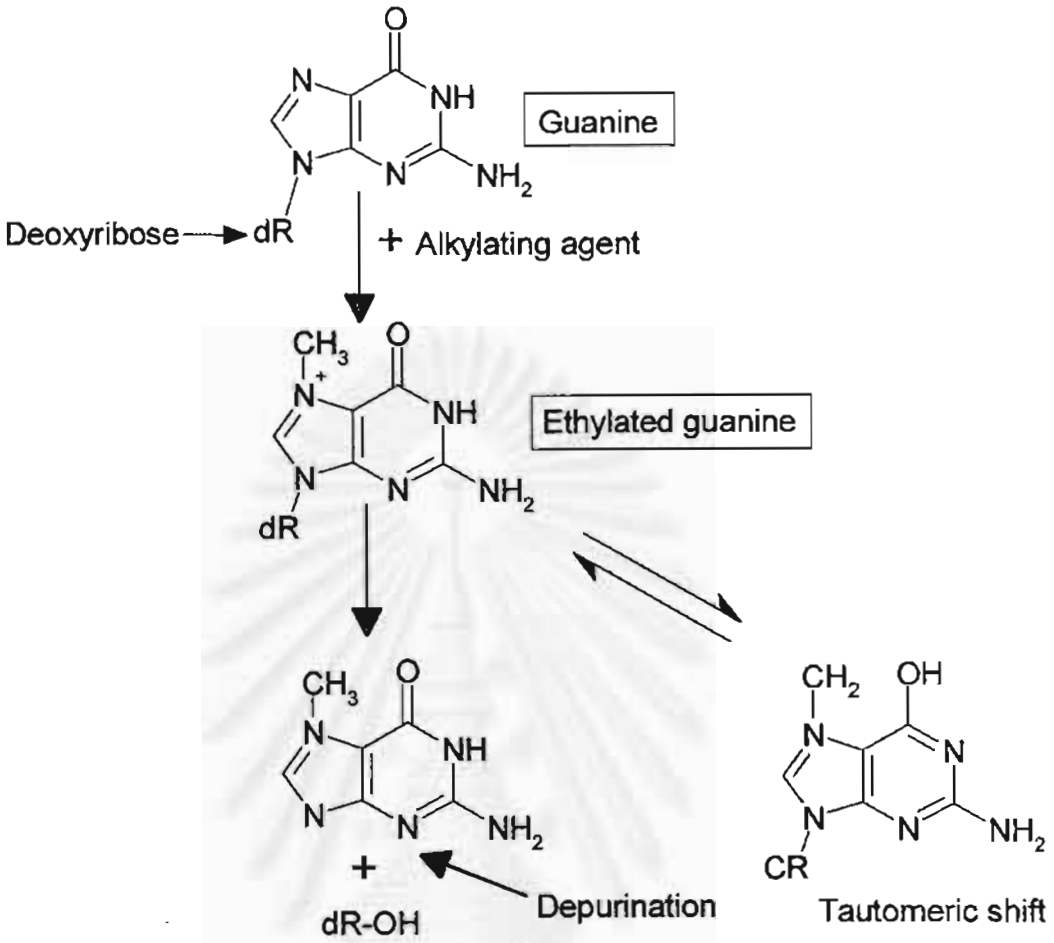


ภาพที่ 8. สูตรโครงสร้างโมเลกุลของ NTG (Crueger W. และ Crueger A., 1984)

NTG เป็นตัวอย่างของสารที่ชักนำให้เกิดการกลายในกลุ่มของ alkylating agent ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา เพราะเป็นสารที่ชักนำให้เกิดการกลายที่มีความรุนแรงสูงมากที่สุด โดยจะมีคุณสมบัติทำให้เกิดการย้ายหมู่อัลคิลตั้งแต่ 1 หมู่ขึ้นไปให้กับสารอื่นๆ ได้ ก่อให้เกิดการกลายแบบ transitions base pair substitution transversions base pair substitution deletions และหรือ frameshift mutations (Carlton และ Brown, 1981)

กลุ่มสารที่ทำงาน (functional group) ในสารเคมีกลุ่มของ alkylating agent คือ กลุ่มเอทธิลและเมทธิล ซึ่งสามารถที่จะเคลื่อนย้ายได้ การที่หมู่เอทธิลหรือเมทธิล จะย้ายเข้าไปอยู่ที่โมเลกุลของ base ในสายของ DNA นั้น จะเคลื่อนย้ายเข้าสู่ตำแหน่งเฉพาะใน base แต่ละชนิด คือที่ตำแหน่งไนโตรเจนหรือออกซิเจน การเคลื่อนย้ายของหมู่อัลคิลมีผลโดยตรง โดยทำให้เกิดการจับคู่ผิดกันของ base ที่มีหมู่อัลคิลเข้าไปอยู่ และมีผลทางอ้อมต่อการซ่อมแซม DNA แบบ error-prone อันเนื่องมาจากการย้ายหมู่อัลคิลเข้าสู่ตำแหน่งอื่นของ base ชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เพราะมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการกลายสูง เมื่อใช้ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

การทำงานของ NTG ต้องมีการแตกตัวจึงจะมีคุณสมบัติเป็นสารชักนำให้เกิดการกลายได้ NTG สามารถแตกตัวเป็น nitrous acid ได้อย่างรวดเร็วในภาวะที่เป็นกรด โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน 0.1 M HCl ส่วนในภาวะที่เป็นด่าง NTG จะแตกตัวอย่างรวดเร็วเป็น diazomethane (CH_2N_2) ซึ่งเป็น strong methylating agent แล้วเข้าจับกับสปอร์อย่างรวดเร็วในการชักนำให้เกิดการกลายในรา โดยชักนำให้เกิดการเติมหมู่อัลคิล 1 หมู่ให้กับเบส จากนั้นชักนำให้คู่เบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้ามาอยู่แทนที่เบสปกติในระหว่างการจำลองตัวเอง (ภาพที่ 9.) (Sikyta, 1983)



ภาพที่ 9. การเติมหมู่อัลคิลให้กับเบสกวานีนซึ่งเกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายด้วยสารเคมี NTG (Sikyta, 1983)

ทำให้เบสบนสาย DNA เกิดการเปลี่ยนแปลงไป การเติมหมู่อัลคิลจะเกิดที่ตำแหน่งไนโตรเจนหรือออกซิเจนของเบสแต่ละชนิด คือ N^3 ของ adenine N^3 ของ guanine O^6 ของ guanine O^4 ของ thymine และ N^4 ของ cytosine (Goodenough, 1984) การเคลื่อนย้ายของหมู่อัลคิลนั้นมีผลโดยตรงต่อการจับคู่ผิด และมีผลทางอ้อมต่อการซ่อมแซม DNA โดยทำให้การซ่อมแซมเกิดความผิดพลาดได้ถึง 90% ของการกลาย การกลายด้วย NTG มักเกิด transition base pair substitution แบบ GC → AT การชักนำให้เกิดการกลายด้วย NTG นั้น นิยมละลาย NTG ในสารละลาย Tris-maleic acid pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจาก NTG สามารถเข้าจับกับสปอร์ได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นในการทดลองควรให้เวลาพอที่ NTG จะสัมผัสกับสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ (ประมาณ 15 นาที) เชื่อกันว่า NTG จะเข้าไปจับกับ DNA ที่กำลังจำลองตัวเองในช่วง replication fork NTG จะมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการทำให้เกิดการกลาย ถ้าถูกใช้ในขณะที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัว (Carlton และ Brown, 1981) ปัจจัยหลักที่สำคัญของการใช้ NTG เป็นสารชักนำให้เกิดการกลาย คือความเข้มข้น โดยความเข้มข้นของ NTG ยิ่งมาก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เปอร์เซ็นต์รอดของสปอร์ก็จะยิ่งต่ำลง จะพบสปอร์ที่เกิดการกลายไปแล้วจำนวนมาก ที่ช่วงความเข้มข้นที่นิยมใช้คือความเข้มข้นที่ทำให้สปอร์มีเปอร์เซ็นต์รอดอยู่ระหว่าง 0-50% โดยนิยมใช้ความหนาแน่นของสปอร์เริ่มต้นประมาณ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Cai Buswell และ Chang (1998) ได้นำ *Volvariella volvacea* ซึ่งเป็นเห็ดที่นิยมรับประทานกันทั่วไปมาเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อผลิตเอนไซม์ β-glucosidase โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน คือ Sigma cell lactose CMC cellobiose และ กลูโคส โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด 1.8 1.4 1.55 2.25 และ 0 U/mg ตามลำดับ และเมื่อนำไปทำ FPLC โดยใช้คอลัมน์ Mono-P HR 5/5 พบว่ามี 2 องค์ประกอบคือ BGL I และ BGL II และเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าค่า specific activities ของ BGL I และ BGL II มีค่าเป็น 61.7 และ 43.9 U/mg โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของ BGL I อยู่ระหว่าง 6.2-7.4 ส่วน BGL II อยู่ระหว่าง 5.4-6.6 โดยมวลโมเลกุลของ BGL I เท่ากับ 158,000 และ BGL II เท่ากับ 256,000

Svetlana Mark และ David (1997) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei* RUT C30 ในอาหารเหลว เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าการเจริญของเส้นใยจะมี 2 แบบคือ primary mycelium และ secondary mycelium โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะผลิตจาก secondary mycelium และเอนไซม์เซลลูเลสจะดูดซับอยู่กับ particle ของ substrate ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับเซลลูโลสนี้จะลดลงเมื่อเซลลูโลสถูกเปลี่ยน ทั้งนี้จะไม่สรุปว่าเซลโลไบโอสและกลูโคสเป็นตัวยับยั้งการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพราะเมื่อวัดปริมาณของเซลโลไบโอสหลังเสร็จสิ้นการหมักพบว่ามีปริมาณของเซลโลไบโอสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนกลูโคสนั้นขณะที่เริ่มมีการเจริญนั้น พบว่ามีปริมาณของกลูโคสสูงถึง 1.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งก็ยังไม่มากพอที่จะยับยั้งการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้

AbdElNasser Helmy และ ElGammal (1997) ได้ศึกษาเชื้อรากลุ่ม white rot fungi 3 สายพันธุ์ คือ *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6359 *P. chrysosporium* NRRL 6361 และ *Coriolus versicolor* NRRL 6102 มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซแลนเนส (xylanase) และ กลูคาเนส (glucanase) โดยวัดจากปริมาณ reducing sugar ที่เกิดขึ้น โดยเลี้ยงทุกเชื้อใน basal media พบว่าเชื้อที่มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โดยเฉลี่ยสูงที่สุดคือ *P. chrysosporium* NRRL 6359 จากนั้นนำมาหาแหล่งคาร์บอนที่เป็นเศษวัสดุทางการเกษตรที่เหมาะสม ได้แก่ ไซแลน ซานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ ซานอ้อย ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ เปลือกถั่ว และ cellulose powder ในปริมาณ 0.25-3.5% (w/v) โดยพบว่าซังข้าวโพด ซานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพและฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสคือ 5.5 เมื่อใช้ฟางข้าวและค่า

ความเป็นกรด-ด่าง 6.5 เมื่อใช้ชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ ส่วนกลูคาเนสนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.5-7.5 และไซเลนเนสค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5-5.5 ในทุกแหล่งคาร์บอน โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อทั้งสิ้น 7 วัน

Mahesware และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma* reesei โดยใช้ฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคือที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 12 วัน พบว่าเมื่อฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ CMCase และ FPase สูงกว่าการใช้ฟางข้าวสาลีที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 52 และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Okeke และ Obi (1993) ได้ทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Arthrographis* sp. ที่คัดแยกได้จากกองปุ๋ยหมัก พบอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5.0-6.0 โดยมีกระดาษกรองและ microcrystalline cellulose (MCC) ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ NH_4NO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยจะให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase สูงสุดเท่ากับ 2.10 8.33 และ 3.89 U/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการเติม tween 80 ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้นเป็น 2.54 13.37 และ 5.97 U/ml ตามลำดับ

Ali และ Sayed (1992) ได้ศึกษาการควบคุมการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* GTC 826 พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็น กลูโคส ไซโลส และ เซลโลไบโอส ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจะถูกยับยั้งได้ถึง 57 64 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Schafner และ Toledo (1992) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* โดยการหมักแบบต่อเนื่อง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก พบว่าเชื้อรามีความสามารถในการเจริญได้ดีที่สุดในน้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเติม sordose ลงไปเสริมที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีปริมาณของเซลล์เท่ากับ 4.54 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ในภาวะที่เหมาะสมคือค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0 และให้ค่า FPA activity 0.69 หน่วย เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน แต่มีค่าความเป็นกรด-ด่างตลอดการเลี้ยงเท่ากับ 3.5

Keskar (1992) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Penicillium janthinellum* พบว่าชานอ้อย รำข้าว และรำข้าวสาลี ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์เซล

ลูเลส โดยให้ FPase CMCase และ β-glucosidase เท่ากับ 45 3.2 และ 4.5 U/ml ตามลำดับ โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทั้ง 3 ชนิด คือ 4.5-5.5 และเมื่อทำการผลิตเอนไซม์ในถังหมักขนาด 14 ลิตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase FPase และ β-glucosidase ได้สูงสุดคือ 60.0 5.0 และ 9.0 U/ml ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 10 วัน และพบว่าเมื่อนำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ไปย่อยสลายฟางข้าวสาลีและกระดาษกรองที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ให้ค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด 57-58 เปอร์เซ็นต์ และให้น้ำตาลกลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

Bastawde (1992) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* พบว่าเชื้อจะเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด เมื่อใช้ cellulose powder เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตเอนไซม์ endo-1,4-β-glucosidase FPase และ β-glucosidase ได้สูงที่สุดเท่ากับ 14.4 1.3 และ 10.0 U/ml ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดคือ NH_4Cl $NH_4H_2PO_4$ และ $(NH_4)_2SO_4$ ตามลำดับ โดยมีภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดคือค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 สำหรับเอนไซม์ endo-1,4-β-glucosidase ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 สำหรับเอนไซม์ FPase และค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4.0-4.5 สำหรับเอนไซม์ β-glucosidase โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วันหรือเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน และเมื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตได้นี้ไปย่อยสลายเซลลูโลสคือ สำลี กระดาษกรอง ชานอ้อย และฟางข้าวพบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง

Abrha และ Gashe (1992) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Cladosporium* sp. พบว่าเชื้อจะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดเมื่อใช้ CMC ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์และ KNO_3 ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเติม tween 80 ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์จะช่วยทำให้เชื้อรามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เพิ่มขึ้น 1.5-4.5 เท่า ภายใต้ภาวะในการหมักที่เหมาะสม คือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 5.2 ที่อุณหภูมิอยู่ในช่วง 20-23 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบ/นาที โดยเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตได้นั้นจะมีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุดเมื่อปมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0

Gashe (1992) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. A-001 ที่คัดแยกได้จากกองปุ๋ยหมักพบว่า เชื้อมีความสามารถในการเจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอนทุกชนิด ได้แก่ CMC stover card-board avicel กระดาษกรอง เปลือกข้าวบาเลย์ หญ้าและฟางข้าวสาลี แต่การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนั้น แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดคือกระดาษกรองที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อราจะผลิตเอนไซม์ CMCase FPase และ β-glucosidase

ได้สูงสุด 167.0 18.0 · และ 49.0 U/ml ตามลำดับและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดคือ KNO_3 ที่ความเข้มข้นที่ 0.6 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อเทียบกับ NH_4Cl และ urea ที่ความเข้มข้นเดียวกัน) นอกจากนี้ยังพบว่า การเติม tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยให้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ CMCase FPase และ β-glucosidase สูงขึ้น 2.6-23.0 2.0-60.0 และ 3.8-1225.0 เท่าตามลำดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ โดยภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 5.2 ที่อุณหภูมิอยู่ในช่วง 28 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบ/นาที ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตได้นั้นจะมีประสิทธิภาพในการทำงานสูงที่สุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.5

Gomes และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma viride* BT2169 โดยเลี้ยงในอาหารสูตร basic mineral (BM) โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.5 พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ FPase และ β-glucosidase คือ 32.8 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 144 ชั่วโมง และ 31.1 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 170 ชั่วโมง โดยมี sulphite pulp ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยจะให้ค่า unit of enzyme 0.55 และ 3.37 U/ml ตามลำดับ เมื่อทำการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ sulphite pulp ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อราจะให้ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ FPase และ β-glucosidase เท่ากับ 0.61 และ 2.72 U/ml ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ sulphite pulp เป็น 6 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่า unit of enzyme เป็น 3.0 และ 2.4 เท่า ตามลำดับ

Macris และคณะ (1989) ได้ศึกษาวิธีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและ β-glucosidase อย่างง่ายแบบประหยัดจากเชื้อรา *Neurospora crassa* แบบ solid state พบว่าเมื่อใช้ฟางข้าวสาลีที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอนและเติมด้วยสาร mineral salts จะทำให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ cellobiohydrolase CMCase และ β-glucosidase ได้สูงสุด 6.1 969.2 และ 169.4 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ภายใต้ภาวะในการเลี้ยงที่เหมาะสมคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0-7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Jin และ Toda (1989) ได้ศึกษาถึงผลของ urea K_2HPO_4 yeast extract และเซลลูโลสต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Clostridium thermocopriae* พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ urea จาก 2 เป็น 6 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 จาก 4.4 เป็น 5.0 กรัมต่อลิตร และลดความเข้มข้นของ yeast extract จาก 6.0 เป็น 4.0 กรัมต่อลิตร จะช่วยทำให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 1.6 เท่า (จาก 0.60 เป็น 0.94 หน่วย) และการใช้ cellobiose เข้าไปแทนที่เซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อรา ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ไม่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแต่อย่างใด แต่ถ้าเพิ่มปริมาณของ cellobiose เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะลดลงอย่างรวดเร็ว

Gomes และคณะ (1989) ได้ศึกษาถึงองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในเชื้อรา *Gliocladium verens* พบว่าการใช้ฟางข้าวสาลีที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และมี bacto-peptone ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.14 เปอร์เซ็นต์และ urea ที่ความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 จะทำให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดโดยให้ค่า FPase และ β-glucosidase เท่ากับ 0.33 และ 1.52 U/ml ตามลำดับ

Soundar และ Chandra (1988) ได้คัดแยกเชื้อจากดินในป่าเมื่อจำแนกเชื้อแล้ว พบว่าเป็น *Humicola grisea* Fb ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถใช้ lignocellulose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารจำพวกเซลลูโลสก่อน ได้แก่ cellulose powder avicel กระดาษกรองเบอร์หนึ่ง กระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษบุกล่อง กระดาษทิชชู และ CMC โดยพบว่า cellulose powder เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยมากที่สุดและชักนำให้ผลิตเอนไซม์ที่ให้ค่าแอคติวิตีของ CMCase สูงที่สุด 7.40 U/ml ส่วน avicel ให้ค่า FPA แอคติวิตี และ β-glucosidase สูงที่สุด 0.148 U/ml และ 0.163 U/ml ส่วนกระดาษหนังสือพิมพ์ให้ค่า Avicelase สูงที่สุด 0.050 U/ml กระดาษบุกล่องให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ xylanase สูงที่สุด 5.14 U/ml แต่วัสดุเหล่านี้ค่อนข้างมีราคาแพง จึงมีการทดสอบหาแหล่งคาร์บอนใหม่ที่เป็นกลุ่มของสารพวก lignocellulose แทนซึ่งมีราคาค่อนข้างถูกได้แก่ กาบมะพร้าว เปลือกถั่วลิสง แกลบ ฟางข้าว ชานอ้อย หยวกกล้วย รำข้าว holocellulose โดย holocellulose เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยมากที่สุด ส่วนหยวกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนที่ชักนำให้ผลิตเอนไซม์ที่ให้ค่าแอคติวิตีของ CMCase และ FPA activity สูงที่สุดคือ 1.926 U/ml และ 0.15 U/ml ตามลำดับ โดยค่า FPA activity ที่ได้นั้นมีค่าเท่ากับแหล่งคาร์บอนที่เป็น holocellulose ส่วนฟางข้าวนั้นให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ β-glucosidase สูงที่สุด 0.030 U/ml และชานอ้อยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ xylanase สูงที่สุด 4.16 U/ml เมื่อนำ crude enzyme มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60% (w/v) จะทำให้เอนไซม์มีค่า specific activity สูงขึ้น 13-17% ในทุกๆ เอนไซม์

Kawamori และคณะ (1986) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าชานอ้อยที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์นั้น ทำให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ carboxymethyl cellulase (CMCase) สูงสุดถึง 100 U/ml

Acebal และคณะ (1986) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* QM9414 โดยใช้ฟางข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อราจะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อใช้ฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ แต่จะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดเมื่อใช้ฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมีเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจะให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดคือ 666 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท

Sandhu และ Arora (1985) ได้ศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อราที่คัดแยกได้จากเปลือกของต้นเครือคางควาย (Dalbergia) ที่เน่าเปื่อย ซึ่งพิสูจน์แล้วว่ามีเชื้อทั้งสิ้น 4 ชนิด คือ *Thielavia sepedonium, Thielavia terricola Chaetomium cellulolyticum* และ *Acrophialophora nainiana* โดยพบว่า *T. sepedonium* ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุด 18.0 IU/ml $x10^2$ ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง *T. terricola* ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุด 18.0 IU/ml $x10^2$ ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง *C. cellulolyticum* ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุด 18.0 IU/ml $x10^2$ ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง และ *A. nainiana* ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุด 17.0 IU/ml$x10^2$ ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทุกตัวจะผลิตเอนไซม์ β-glucosidase ได้มากที่สุดในวันที่ 12 ยกเว้น *T. terricola* ที่ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 18 โดยค่าแอคติวิตีของทุกสายพันธุ์ที่วัดได้สูงสุดจะอยู่ในช่วง 4.0-5.0 IU/ml $x10^2$

Tan Yeoh และ Tian (1985) ได้นำเศษไม้ที่ใช้รองกรงเลี้ยงเป็ด ไก่ มาคัดแยกหาเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ พบเชื้อทั้งสิ้น 3 ชนิด คือ *Fusarium roseum* USDB 0005 *Curvularia lunata* var. USDB 0006 และ *Trichoderma hamatum* USDB 0008 โดยทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับจานเพาะเชื้อ พบว่าทุกตัวมีแอคติวิตีน้อยมากทั้ง 3 ชนิด แต่เมื่อทดสอบในระดับหลอดทดลองพบว่า *T. hamatum* USDB 0008 ให้ผล positive ชัดเจน และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase และ β-glucosidase ที่ได้มีค่าต่ำมาก แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ endoglucanase สูงถึง 0.47 mg/ml ที่ผลิตได้/ชั่วโมง ใน 5 วันแรกและ 0.50 mg/ml ที่ผลิตได้/ชั่วโมง ในวันที่ 6

Basil (1984) ได้ทำการกลาย conidia ของ *Alternaria alternata* ด้วยรังสีแกมม่า เพื่อให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงขึ้น โดยคัดเลือกเชื้อที่เปอร์เซ็นต์รอด 10% ได้สายพันธุ์กลายทั้งสิ้น 5000 สายพันธุ์ เลือกมาใช้ทดสอบ 39 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิต β-glucosidase ขั้นต้นโดยเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าได้เชื้อที่มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ β-glucosidase สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีอยู่ 1 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสปอร์ คือสายพันธุ์ M7 โดยพบว่า crude enzyme ที่ได้จาก *A. alternata* M7 ให้ค่าแอคติวิตีของ CMCase และ β-glucosidase สูงที่สุดเท่ากับ 19.3 U/ml และ 2.5 U/ml ตามลำดับ และเมื่อนำ crude enzyme ที่ได้ไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ค่าอิ่มตัว 20 และ 80 เปอร์เซ็นต์ จะได้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้นเป็น 74.9 U/ml และ 8.7 U/ml ตามลำดับ แต่เมื่อนำไปผ่านกระบวนการ freeze-drying ค่าแอคติวิตีจะลดลงเหลือ 29.6 U/ml และ 3.5 U/ml ตามลำดับ โดยทั่วไปเอนไซม์ β-glucosidase จะมีคุณสมบัติไม่ทนร้อนมากนัก แต่เอนไซม์ β-glucosidase ที่ผลิตได้จาก *A. alternata* M7 มี half-life ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 65 และ 70 องศาเซลเซียสเท่ากับ 3.5 วัน 1.8 ชั่วโมง และ 10 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงมากกว่าเอนไซม์ β-glucosidase ที่ผลิตได้จากเชื้อ

ราชนิดอื่น เช่น *Thermomonospora* sp. จึงจัดได้ว่าเอนไซม์ β-glucosidase ที่ผลิตได้จาก *A. alternata* M7 นี้มีคุณลักษณะที่มี thermostability สูง

Warzywoda Ferre และ Pourquie (1983) ได้ศึกษาการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Trichoderma reesei* พบว่า whatman CC 41 cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์

Rao และคณะ (1983) ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในสภาพการหมักแบบ solid state ด้วยเชื้อรา *Pestalotiopsis versicolor* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นกระดาษหนังสือพิมพ์ ชานอ้อย ฟางข้าวและฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ (pretreated) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสคือ KNO_3 ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อสับสเตรท 10 กรัม

Kishen Harvey และ Charles (1981) ได้ศึกษาหาวิธีการเพิ่มผลผลิตในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส และ β-glucosidase ของเชื้อ *Trichoderma reesei* RUT C30 ด้วยการหาภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โดยพบว่าในการเลี้ยงเชื้อให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและ β-glucosidase สูงที่สุดนั้นใน 2 วันแรกภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมคือการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0 หลังจากนั้นควรปรับอุณหภูมิให้ลดต่ำลงอยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 แต่ต้องควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการหมักให้ต่ำกว่า 6.0 เพราะอาจส่งผลให้เอนไซม์ที่ผลิตได้เกิดการเสียสภาพไป ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2.5% โดยพบว่าแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่า FP activity สูงที่สุดคือ Solka Floc รองลงมาเป็น avicel และ lactose ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.1 U/ml 2.9 U/ml และ 2.4 U/ml ตามลำดับ แต่แหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดนี้มีราคาสูง จึงหันมาสนใจแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกจึงทำให้ซังข้าวโพดที่ผ่านการสภาพด้วยกรดและปรับสภาพซ้ำด้วยด่างซึ่งให้ค่าแอคติวิตีต่ำกว่าแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดเล็กน้อยคือ 2.0 U/ml นอกจากนี้ยังพบว่า tween 80 0.1% มีความสามารถในการยับยั้งค่า FPA activity ให้ลดลงได้ด้วย ส่วนภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ xylanase นั้น พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ Solka Floc 10 g/l โดยเลี้ยงที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและเติม proteose peptone 1.0 g/l ลงไปด้วย จะให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ xylanase สูงที่สุด 114 U/ml

Sadana Shewale และ Deshpande (1979) ได้ศึกษาเปรียบเทียบ *Sclerotium rolfsii* และสายพันธุ์กลายที่ถูกชักนำด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยอาหารสูตร NM-2 และ NM-3 โดยเลี้ยงในภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 29-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าสายพันธุ์กลายให้ค่า unit of enzyme สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในทุกสูตรอาหาร โดยให้ค่า FPA

สูงที่สุด 1.60 U/ml และให้ค่า CMCase สูงที่สุด 185 U/ml แต่พบว่าในอาหารสูตร NM-3 ค่า p-nitrophenyl-β-glucosidase และ cellobiase ของสายพันธุ์กลายให้ค่า unit of enzyme ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

Mandels James และ Richard (1971) ได้ทดลองนำ conidia ของ *Trichoderma viride* QM 6a มาฉายด้วย high energy electrons (24-million electron watt) 18 kw ในรูปของ spore suspension โดยเลือกเปอร์เซ็นต์รอดที่ 0.05-0.20 megarads จากนั้นนำมาเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ cellulose 0.5% glucose 0.5% cellobiose 1.0% lactose 1.0% และ starch 0.5% โดยเลี้ยงในภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ cellulose 0.5% โดยให้ค่า FPA ของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายเป็น 2.30 U/ml และ 4.95 U/ml ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

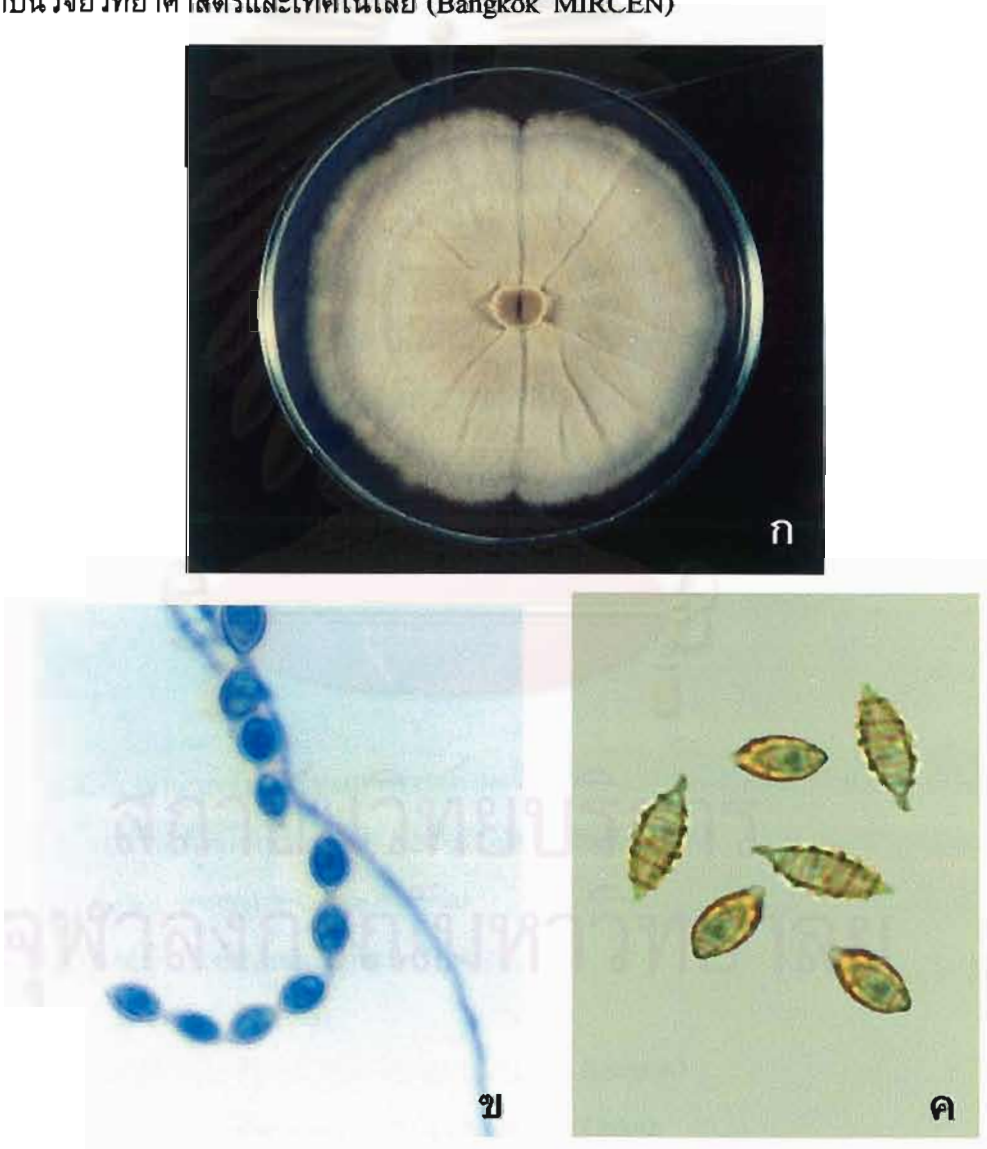
บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อที่ใช้ในการวิจัย

1. เชื้อรา *Acrophialophora* sp. ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์ ซึ่งคัดแยกโดย พรเทพ ถนนแก้ว (2538) (ภาพที่ 10.)

2. เชื้อรา *Trichoderma reesei* QM9414 ได้รับจากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (Bangkok MIRCEN)



ภาพที่ 10. เชื้อรา *Acrophialophora* sp.

ก) ลักษณะโคโลนี

ข) สายของ young conidia (x40x2x4)

ค) mature conidia (x100x2x4)

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต รุ่น D-6900 UV 254/366 ของบริษัท DESAGA Heidelberg, Germany
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น NovaSpec 4049 ของบริษัท LKB Biochrom, England
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น G 25 บริษัท Scientific Co. Inc.
4. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ของบริษัท Lab-Line
5. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Steam Sterilizer/ Autoclave) ของบริษัท Ta Chang Medical Instrument Factory, Taiching, Taiwan
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) Model universal 16 ของบริษัท Hettich, Germany
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) model SS40-2 Ambient ของบริษัท Grant Instruments (Cambridge) Ltd. , England
8. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ รุ่น E5 EA ของบริษัท OMROM
9. ตู้อบความร้อนสูง (Hot Air Oven) รุ่น U50 790,387 ของบริษัท Memmert
10. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น U4600P ของบริษัท Scientific Promotion Co. Ltd.
11. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น Mettler H10 ของบริษัท Scientific Promotion Co. Ltd.
12. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น ion analyzer 255 ของ บริษัท Corning, USA

เคมีภัณฑ์

เคมีภัณฑ์สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ (Cairo Erba Reagent)
2. carboxymethyl cellulose (Sigma)
3. ผงสกัดยีสต์ (yeast extract) (Difco)
4. วุ้นผง (agar) (Difco)
5. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) (Cairo Erba Reagent)
6. แคลเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($CaHPO_4$) (Fluka)
7. corn steep liquor (Sigma)
8. tween 80 (Fluka)
9. เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) (M&B)

10. ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) (M&B)
11. แมงกานัสซัลเฟต ($MnSO_4$) (M&B)
12. โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) (M&B)
13. avicel (Fluka)
14. กระดาษกรองเบอร์ 1 (filter paper no.1) (Whatman)
15. แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) (Fluka)
16. ยูเรีย ($CO(NH_2)_2$) (Fluka)
17. peptone (Difco)
18. เยื่อกระดาษยูคาลิปตัส
19. ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 10% NaOH
20. cycloheximide ($C_{15}H_{23}NO_4$) (Sigma)
21. fungizone (amphotericin B) (Squibb)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้สำหรับวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

1. congo red ($C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$) (Merck)
2. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (M&B)
3. โซเดียมไบซัลไฟต์ ($NaHSO_3$) (M&B)
4. 3,5-dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$) (Fluka)
5. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต ($COOK(CHOH)_2COONa$) (Calro Erba Reagent)
6. D-salicin ($C_{13}H_{18}O_7$) (Fluka)
7. ดี-กลูโคส (D-glucose) (Merck)
8. ฟีนอล (C_6H_6O) (Merck)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้สำหรับเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Fluka)
2. กรดซิตริก ($C_3H_4(OH)(COOH)_3$) (M&B)
3. กรดไฮโดรคลอริค (HCl) (Mallinckrodt)
4. Tris ($C_4H_{11}NO_3$) (Sigma)
5. แคลเซียมไนเตรท ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$) (Fluka)
6. โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต ($K_3PO_4.H_2O$) (Fluka)
7. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (M&B)
8. ไตรโซเดียมซิเตรท ($Na_3C_6H_5O_7.H_2O$) (Fluka)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้สำหรับการทำการกลาย

ไนโตรโซกวาดินีน ($C_2H_3N_5O_3$) (Fluka)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

1.1 นำเชื้อรา *Acrophialophora* sp. มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 7 วัน นำโคนิเดีย (conidia) มาทำเป็นสารละลายสปอร์ (spore suspension) ที่มีความหนาแน่นของ สปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^5-10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วย 0.01% Tween-80 กรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น จากนั้นดูดสารละลายสปอร์มา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยเชื้อ (spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร CMC agar (ภาคผนวก ก) ที่มีส่วนผสมของ 20 ไมโครกรัม cycloheximide ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาว คลื่นแสง 254 นาโนเมตร โดยให้มีระยะห่างจากแหล่งแสง 30 เซนติเมตร และใช้ระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตต่างๆ กัน คือ 5 10 15 และ 20 นาที โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

1.2 นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.1 มาเพื่อทดสอบหาสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นได้ในปริมาณสูงสุด โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar โดยบ่มเชื้อราทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ จากนั้นนำมาราดทับด้วย 0.01 % congo red ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วย 1 M NaCl จะปรากฏ clear zone จากนั้นวัดความกว้างของ clear zone และความกว้างของโคโลนี นำไปหาอัตรส่วนระหว่างความกว้างของโคโลนีกับความกว้างของ clear zone

1.3 คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดขั้นต้น โดยนำข้อมูลจากตารางที่ 2. มาเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างความกว้างของโคโลนีและความกว้างของ clear zone เพื่อหาสายพันธุ์ที่ให้อัตราส่วนที่ต่ำสุด เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

2. การทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

2.1 นำสายพันธุ์กลาย UV102 UV107 UV1014 UV520 และ UV522 ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 มา subculture 5 ครั้ง นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยป้องกันไม่ให้ได้รับแสง นาน 3 เดือน

2.2 นำเชื้อราจากข้อ 2.1 มา subculture อีก 5 ครั้ง จึงนำไปทดสอบความ

สามารถในการต้านทาน cycloheximide ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่มี cycloheximide ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมอยู่ด้วย

2.3 นำเชื้อราจากข้อ 2.2 มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นตามวิธีการทดลองข้อ 1.2

2.4 พิจารณาความเสถียรของสายพันธุ์จากคุณสมบัติในการต้านทาน cycloheximide ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น

3. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ NTG

3.1 นำเชื้อรา *Acrophialophora* sp. มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน นำสปอร์มาทำเป็นสารละลายสปอร์ที่มีความหนาแน่นของสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^5-10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วย tris-maleate บัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) กรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น ดูดสารละลายสปอร์มา 0.1 มิลลิลิตร แช่ลงในสารละลาย NTG ที่ละลายใน tris-maleate บัฟเฟอร์ ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 62.5 100 150 200 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะเขย่า นำสปอร์มาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) ปราศจากเชื้อ ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 5 มิลลิลิตรด้วยบัฟเฟอร์ปราศจากเชื้อ เกลี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร CMC agar ที่มีส่วนผสมของ 20 ไมโครกรัม cycloheximide ต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

3.2 ทำการคัดเลือกสปอร์ที่อยู่ในความเข้มข้นของ NTG ที่ให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ต่ำกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสปอร์งอกนำมาราดทับด้วย congo red แล้วจึงพิจารณาจากขนาดของวงใส เพื่อคัดเลือกโคโลนีของราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มาก

3.3 นำเชื้อราที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2 มาเพื่อทดสอบหาคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ปริมาณสูงสุด โดยดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.2

3.4 คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดขั้นต้น โดยนำข้อมูลจากตารางที่ 3. มาเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างความกว้างของโคโลนีและความกว้างของ clear zone เพื่อหาสายพันธุ์ที่ให้อัตราส่วนที่ต่ำสุด เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

4. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 ที่ผ่านการทดสอบความเสถียร มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน ตัดปลายเส้นใยให้มีขนาด 1.0 X 1.0 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร production (ภาคผนวก ก) จำนวน 100 มิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 วัน เลือกเอาเฉพาะเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด เมื่อเทียบกับ *Acrophialophora* sp. ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

5. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG

5.1 นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4. มาทำการทดลองต่อ โดยนำมาทำเป็นสารละลายสปอร์ที่มีความหนาแน่นของสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^5-10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วย tris-maleate บัฟเฟอร์ กรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น ดูดสารละลายสปอร์มา 0.1 มิลลิลิตร แช่ลงในสารละลาย NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 50 100 150 200 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำสปอร์มาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปราศจากเชื้อปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 5 มิลลิลิตรด้วยบัฟเฟอร์ปราศจากเชื้อ เกลี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร CMC agar ที่มีส่วนผสมของ 20 ไมโครกรัม amphotericin B ต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

5.2 จากนั้นนำเชื้อราจากข้อ 5.1 มาทดสอบหาสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ปริมาณสูงสุด โดยดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.2

5.3 คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดขั้นต้น โดยนำข้อมูลจากตารางที่ 6. และ 7. มาเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างความกว้างของโคโลนีและความกว้างของ clear zone เพื่อหาสายพันธุ์ที่ให้อัตราส่วนที่ต่ำสุด เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

6. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดโดยเปรียบเทียบกับ *Trichoderma reesei* QM9414

6.1 นำเชื้อรา *Trichoderma reesei* QM9414 มาเลี้ยงแบบเดียวกับข้อ 4. โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส

6.2 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบหาค่าแอคติวิตีสูงสุดกับเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 3.4 และ 5.3 ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4. เพื่อเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

7. การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย

7.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร production แต่เปลี่ยนแปลงชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็น CMC avicel กระดาษกรอง สำลี ฟางข้าว และ เยื่อกระดาษ ความเข้มข้น 3 % เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก จ)

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร production ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น CMC มาหาความเข้มข้นของ CMC ที่เหมาะสม โดยการศึกษาที่ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก จ)

7.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร production ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น CMC 3 เปอร์เซ็นต์ แต่เปลี่ยนแปลงชนิดของแหล่งไนโตรเจนเป็น ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) ammonium nitrate (NH_4NO_3) urea ($CO(NH_2)_2$) และ peptone ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก จ)

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร production ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น CMC 3 เปอร์เซ็นต์ และมีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต มาหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0.04 0.06 0.08 0.10 0.12 และ 0.14 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก จ)

I 19160392

7.3 การศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร production ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น CMC 3 เปอร์เซ็นต์ และมีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.08 เปอร์เซ็นต์ โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีค่า pH เริ่มต้นต่างกัน 6 ระดับ คือ 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 ตามลำดับ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก จ)

7.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการบ่มเชื้อ

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร production ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น CMC 3 เปอร์เซ็นต์ และมีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.08 เปอร์เซ็นต์ โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 นำไปบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิต่างกัน 5 ระดับคือ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 3 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์หาเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก จ)

8. การวิเคราะห์เอนไซม์ด้วยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์ด้วยวิธี filter paper activity (FPA) ตามวิธีการของ Ghose, 1987 (ภาคผนวก จ)

การวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์ Endo-1,4-β-glucanase ด้วยวิธี carboxymethyl cellulase (CMCase) ตามวิธีการของ Ghose, 1987 (ภาคผนวก จ)

การวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์ด้วยวิธี β-glucosidase ตามวิธีการของ Sternberg และ คณะ, 1976 (ภาคผนวก จ)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

จากการทดลองทำการกลายเชื้อราสายพันธุ์ *Acrophialophora* sp. ด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ได้สายพันธุ์กลายทั้งสิ้น 47 สายพันธุ์ แยกเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการฉายด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลตนาน 5 นาที 31 สายพันธุ์ นาน 10 นาที 14 สายพันธุ์ นาน 15 และ 20 นาที อย่างละ 1 สายพันธุ์ โดยให้ชื่อตามระยะเวลาในการได้รับแสงอัลตร้าไวโอเลตเรียงตามลำดับคือ ที่ระยะเวลา 5 นาที ให้ชื่อ UV05-01 ถึง UV05-31 ที่ระยะเวลา 10 นาที ให้ชื่อ UV10-01 ถึง UV10-14 ที่ระยะเวลา 15 นาที ให้ชื่อ UV15-1 และที่ระยะเวลา 20 นาทีให้ชื่อ UV20-1 ตามลำดับ

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 47 สายพันธุ์มาทดสอบหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ตามวิธีการทดลองข้อ 1.2 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2.

ตารางที่ 2. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย *Acrophialophora* sp. ด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
Acrophialophora sp.	4.38	4.10	0.936^{i}
UV05-01	2.60	2.34	0.900^{c-i}
UV05-02	2.47	2.24	0.906^{f-i}
UV05-03	3.31	3.12	0.944
UV05-04	3.04	2.78	0.912^{f-i}
UV05-05	3.22	2.93	0.910^{f-i}
UV05-06	3.58	3.30	0.918^{f-i}
UV05-07	3.72	3.42	0.920^{ghi}
UV05-08	4.57	4.33	0.952
UV05-09	3.64	3.40	0.934^{i}
UV05-10	3.32	3.13	0.942
UV05-11	2.36	2.07	0.876^{def}
UV05-12	3.48	3.40	0.918^{f-i}

ตารางที่ 2. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย *Acrophialophora* sp. ด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต (ต่อ)

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
UV05-13	2.47	2.26	0.916^{f-i}
UV05-14	3.55	3.34	0.942
UV05-15	3.38	3.13	0.924^{ghi}
UV05-16	3.40	3.17	0.930^{i}
UV05-17	3.22	2.93	0.906^{f-i}
UV05-18	3.64	3.42	0.938
UV05-19	3.56	3.17	0.910^{f-i}
UV05-20	3.70	3.18	0.858^{cd}
UV05-21	3.58	3.28	0.936
UV05-22	2.62	2.23	0.870^{cde}
UV05-23	3.85	3.56	0.924^{ghi}
UV05-24	3.82	3.58	0.938
UV05-25	4.23	4.00	0.948
UV05-26	4.30	3.87	0.902^{e-i}
UV05-27	2.57	2.34	0.908^{f-i}
UV05-28	2.85	2.60	0.910^{f-i}
UV05-29	3.09	2.83	0.914^{f-i}
UV05-30	2.69	2.44	0.890^{d-h}
UV05-31	2.50	2.23	0.888^{d-g}
UV10-01	4.35	3.97	0.912^{f-i}
UV10-02	3.87	3.25	0.842^{c}
UV10-03	3.40	3.20	0.940
UV10-04	3.24	3.04	0.938
UV10-05	3.78	3.46	0.914^{f-i}
UV10-06	4.44	4.25	0.940
UV10-07	4.04	3.12	0.772^{b}
UV10-08	3.13	2.91	0.930^{i}
UV10-09	3.22	2.95	0.920^{ghi}

ตารางที่ 2. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย *Acrophialophora* sp. ด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต (ต่อ)

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
UV10-10	4.09	3.78	0.922^{ghi}
UV10-11	3.34	3.06	0.926^{hi}
UV10-12	3.56	3.34	0.938
UV10-13	3.98	3.17	0.934^{i}
UV10-14	2.93	2.11	0.716^{a}
UV15-01	4.29	4.02	0.936
UV20-01	3.37	3.12	0.928^{i}

หมายเหตุ ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าอัตราส่วนเฉลี่ยของความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์ ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

จากตารางที่ 2. เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงขึ้นมาจำนวน 10% จากสายพันธุ์กลายที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น ได้สายพันธุ์กลายทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์คือ UV10-14 UV10-07 UV10-02 UV05-20 และ UV05-22 ให้ค่าอัตราส่วนเฉลี่ย 0.716 0.772 0.842 0.858 และ 0.870 ตามลำดับ

2. การทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

จากการนำสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุด 10% ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต ได้สายพันธุ์กลายทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ UV10-14 UV10-07 UV10-02 UV05-20 และ UV05-22 มาทดสอบความเสถียรตามวิธีการทดลองข้อ 2. พบว่าทั้ง 5 สายพันธุ์ยังคงมีคุณสมบัติในการต้านทาน cycloheximide ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 5 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นตามวิธีการทดลองข้อ 1.2 พบว่าทั้ง 5 สายพันธุ์ให้ค่าอัตราส่วนเฉลี่ยแตกต่างไปจากเดิมสูงสุดเพียง 0.022 ดังแสดงในตารางที่ 3.

ตารางที่ 3. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต ก่อนและหลังการทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์

สายพันธุ์	Plate ที่	ก่อนการทดสอบความเสถียร		หลังการทดสอบความเสถียร	
		อัตราส่วน (b/a)	อัตราส่วนเฉลี่ย	อัตราส่วน (b/a)	อัตราส่วนเฉลี่ย
UV10-14	1	0.73	0.72	0.71	0.74
	2	0.79		0.71	
	3	0.65		0.74	
	4	0.72		0.80	
	5	0.69		0.73	
UV10-07	1	0.74	0.77	0.72	0.78
	2	0.78		0.81	
	3	0.78		0.78	
	4	0.77		0.81	
	5	0.79		0.78	
UV10-02	1	0.85	0.84	0.86	0.84
	2	0.81		0.84	
	3	0.90		0.84	
	4	0.81		0.80	
	5	0.84		0.85	
UV05-20	1	0.87	0.86	0.87	0.86
	2	0.87		0.87	
	3	0.84		0.85	
	4	0.86		0.85	
	5	0.85		0.84	
UV05-22	1	0.88	0.87	0.85	0.88
	2	0.94		0.84	
	3	0.88		0.90	
	4	0.83		0.90	
	5	0.82		0.89	

จากตารางที่ 3. จะเห็นได้ว่าค่าอัตราส่วนเฉลี่ยก่อนและหลังการทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์ มีค่าใกล้เคียงกันมาก คือ UV10-14 มีค่าความแตกต่างของอัตราส่วนเฉลี่ยก่อนและหลังการทดสอบความเสถียร 0.02 UV107 มีค่าความแตกต่างของอัตราส่วนเฉลี่ยก่อนและหลังการทดสอบความเสถียร 0.01 UV102 ไม่มีความแตกต่างของอัตราส่วนเฉลี่ยก่อนและหลังการทดสอบความเสถียร UV0520 ไม่มีความแตกต่างของอัตราส่วนเฉลี่ยก่อนและหลังการทดสอบความเสถียร และ UV0522 มีค่าความแตกต่างของอัตราส่วนเฉลี่ยก่อนและหลังการทดสอบความเสถียร 0.01

3. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ NTG

จากการทดลองทำการกลายของราสายพันธุ์ *Acrophialophora* sp. ด้วย NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้สายพันธุ์กลายทั้งสิ้น 4185 สายพันธุ์ แยกเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากความเข้มข้นต่างๆ คือ 62.5 100 150 200 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 1264 666 1046 586 417 และ 206 สายพันธุ์ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์รอดที่ต่ำกว่า 0.1% จึงเลือกนำสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายด้วย NTG ความเข้มข้น 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์รอดเท่ากับ 0.08 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ได้จำนวนสายพันธุ์ทั้งสิ้น 623 สายพันธุ์ หลังจากพิจารณาจากขนาดของวงใสที่ถูกราดทับด้วย congo red ทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้ทั้งสิ้น 142 สายพันธุ์ แยกเป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายด้วย NTG ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 34 สายพันธุ์ โดยให้ชื่อตามความเข้มข้นของ NTG เรียงตามลำดับคือ N250-001 ถึง N250-034 และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายด้วย NTG ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 108 สายพันธุ์ โดยให้ชื่อตามความเข้มข้นของ NTG เรียงตามลำดับคือ N300-001 ถึง N300-108

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 142 สายพันธุ์มาทดสอบหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ตามวิธีการทดลองข้อ 1.2 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.

ตารางที่ 4. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย *Acrophialophora* sp. ด้วย NTG

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
Acrophialophora sp.	4.38	4.10	0.936^{k}
N250-001	3.18	2.98	0.938
N250-002	3.59	3.38	0.938
N250-003	3.46	3.26	0.940
N250-004	3.53	3.33	0.942
N250-005	3.63	3.43	0.946
N250-006	3.35	3.14	0.938
N250-007	3.52	3.32	0.940
N250-008	3.59	3.36	0.936
N250-009	3.22	2.93	0.910^{k}
N250-010	3.34	2.98	0.892^{g-k}
N250-011	3.31	3.05	0.924^{ijk}
N250-012	3.65	3.44	0.944
N250-013	3.07	2.85	0.926^{ijk}
N250-014	2.61	2.28	0.874^{d-g}
N250-015	3.04	2.79	0.918^{h-k}
N250-016	3.62	3.39	0.932^{k}
N250-017	3.49	3.26	0.936
N250-018	3.376	3.09	0.914^{h-k}
N250-019	3.46	3.21	0.926^{ijk}
N250-020	3.41	3.18	0.934^{k}
N250-021	3.38	3.11	0.922^{h-k}
N250-022	3.30	3.06	0.928^{j-k}
N250-023	3.33	3.13	0.940
N250-024	2.70	2.25	0.830^{c}
N250-025	2.99	2.72	0.908^{g-k}
N250-026	3.00	2.72	0.844^{cd}

ตารางที่ 4. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย *Acrophialophora* sp. ด้วย NTG (ต่อ)

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
N250-027	3.54	3.34	0.944
N250-028	3.59	3.33	0.928^{ijk}
N250-029	4.08	3.70	0.904^{g-k}
N250-030	4.35	4.11	0.946
N250-031	4.36	4.11	0.940
N250-032	3.94	3.57	0.904^{g-k}
N250-033	4.24	4.20	0.952
N250-034	3.96	3.54	0.910^{g-k}
N300-001	3.66	3.45	0.946
N300-002	3.20	3.96	0.926^{ijk}
N300-003	3.58	3.36	0.942
N300-004	3.30	3.10	0.940
N300-005	3.37	3.17	0.940
N300-006	3.44	3.24	0.944
N300-007	4.28	4.04	0.950
N300-008	3.58	3.38	0.940
N300-009	3.60	3.30	0.902^{g-k}
N300-010	3.26	3.06	0.940
N300-011	3.54	3.36	0.948
N300-012	3.28	3.08	0.940
N300-013	3.22	3.02	0.938
N300-014	3.62	3.42	0.944
N300-015	3.49	3.30	0.948
N300-016	3.38	3.19	0.944
N300-017	3.16	2.97	0.940
N300-018	3.64	3.43	0.946
N300-019	3.51	3.26	0.932^{k}

ตารางที่ 4. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย *Acrophialophora* sp. ด้วย NTG (ต่อ)

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
N300-020	3.51	3.25	0.922^{h-k}
N300-021	3.40	3.20	0.940
N300-022	3.45	3.25	0.940
N300-023	3.44	3.24	0.940
N300-024	3.25	3.04	0.938
N300-025	3.43	3.23	0.940
N300-026	3.46	3.28	0.944
N300-027	3.44	3.23	0.940
N300-028	3.38	3.19	0.944
N300-029	3.67	3.37	0.918^{h-k}
N300-030	3.46	3.27	0.944
N300-031	3.27	3.07	0.938
N300-032	3.50	3.28	0.936
N300-033	3.44	3.23	0.940
N300-034	3.54	3.33	0.940
N300-035	3.52	3.32	0.940
N300-036	3.54	3.31	0.936
N300-037	3.61	3.40	0.942
N300-038	3.50	3.28	0.934^{k}
N300-039	3.53	3.23	0.914^{h-k}
N300-040	3.40	3.20	0.940
N300-041	3.54	3.33	0.938
N300-042	3.54	3.32	0.940
N300-043	3.52	3.29	0.934^{k}
N300-044	3.50	3.28	0.936
N300-045	3.52	3.30	0.938
N300-046	3.55	3.35	0.944

ตารางที่ 4. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย *Acrophialophora* sp. ด้วย NTG (ต่อ)

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
N300-047	3.56	3.36	0.944
N300-048	3.27	3.08	0.938
N300-049	3.49	3.29	0.942
N300-050	3.48	3.16	0.898^{g-k}
N300-051	3.51	3.31	0.940
N300-052	3.38	3.18	0.938
N300-053	3.42	3.18	0.928^{ijk}
N300-054	3.52	3.31	0.942
N300-055	3.46	3.27	0.946
N300-056	3.20	2.76	0.860^{cde}
N300-057	3.52	3.33	0.944
N300-058	2.56	1.93	0.752^{b}
N300-059	3.45	3.24	0.940
N300-060	3.36	3.16	0.940
N300-061	3.32	3.06	0.920^{ijk}
N300-062	3.42	3.20	0.934^{k}
N300-063	3.18	2.98	0.938
N300-064	2.69	2.47	0.920^{h-k}
N300-065	3.08	2.57	0.834^{c}
N300-066	4.49	4.00	0.888^{c}
N300-067	4.71	4.49	0.952
N300-068	4.60	4.39	0.946
N300-069	4.79	4.50	0.934^{k}
N300-070	4.72	4.46	0.942
N300-071	3.13	2.92	0.936
N300-072	3.48	3.27	0.938
N300-073	3.48	3.27	0.912^{h-k}

ตารางที่ 4. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย *Acrophialophora* sp. ด้วย NTG (ต่อ)

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
N300-074	3.5	3.35	0.934^{k}
N300-075	3.41	3.13	0.918^{h-k}
N300-076	2.50	2.10	0.842^{cd}
N300-077	3.46	3.25	0.940
N300-078	3.53	3.33	0.940
N300-079	4.39	4.30	0.930^{jk}
N300-080	3.23	3.01	0.933^{k}
N300-081	3.61	3.41	0.944
N300-082	3.45	3.24	0.940
N300-083	3.47	3.27	0.942
N300-084	3.46	3.24	0.934^{k}
N300-085	4.55	4.26	0.932^{k}
N300-086	4.52	4.20	0.926^{ijk}
N300-087	4.75	4.50	0.944
N300-088	4.63	4.40	0.946
N300-089	4.73	4.40	0.926^{ijk}
N300-090	3.66	3.24	0.884^{c-h}
N300-091	2.74	2.44	0.892^{c-j}
N300-092	3.08	2.77	0.898^{f-k}
N300-093	3.50	3.23	0.924^{ijk}
N300-094	3.54	3.35	0.946
N300-095	2.36	2.21	0.934^{k}
N300-096	3.17	2.98	0.940^{e}
N300-097	3.96	2.80	0.918^{h-k}
N300-098	3.51	3.29	0.936
N300-099	3.61	3.40	0.942
N300-100	2.76	1.80	0.656^{a}

ตารางที่ 4. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย *Acrophialophora* sp. ด้วย NTG (ต่อ)

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
N300-101	3.28	3.10	0.938
N300-102	3.42	3.20	0.932^{k}
N300-103	3.31	3.09	0.930^{ijk}
N300-104	3.28	3.04	0.924^{ijk}
N300-105	3.36	3.18	0.944
N300-106	3.48	3.28	0.940
N300-107	4.40	4.12	0.936
N300-108	3.72	3.21	0.864^{c-f}

หมายเหตุ ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าอัตราส่วนเฉลี่ยของความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์ ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

จากตารางที่ 4. เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงขึ้นมาจำนวน 10% จากสายพันธุ์กลายที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ได้สายพันธุ์กลายทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ N250-024 N250-026 N300-058 N300-065 N300-076 และ N300-100 ให้ค่าอัตราส่วนเฉลี่ย 0.830 0.844 0.752 0.834 0.842 และ 0.656 ตามลำดับ

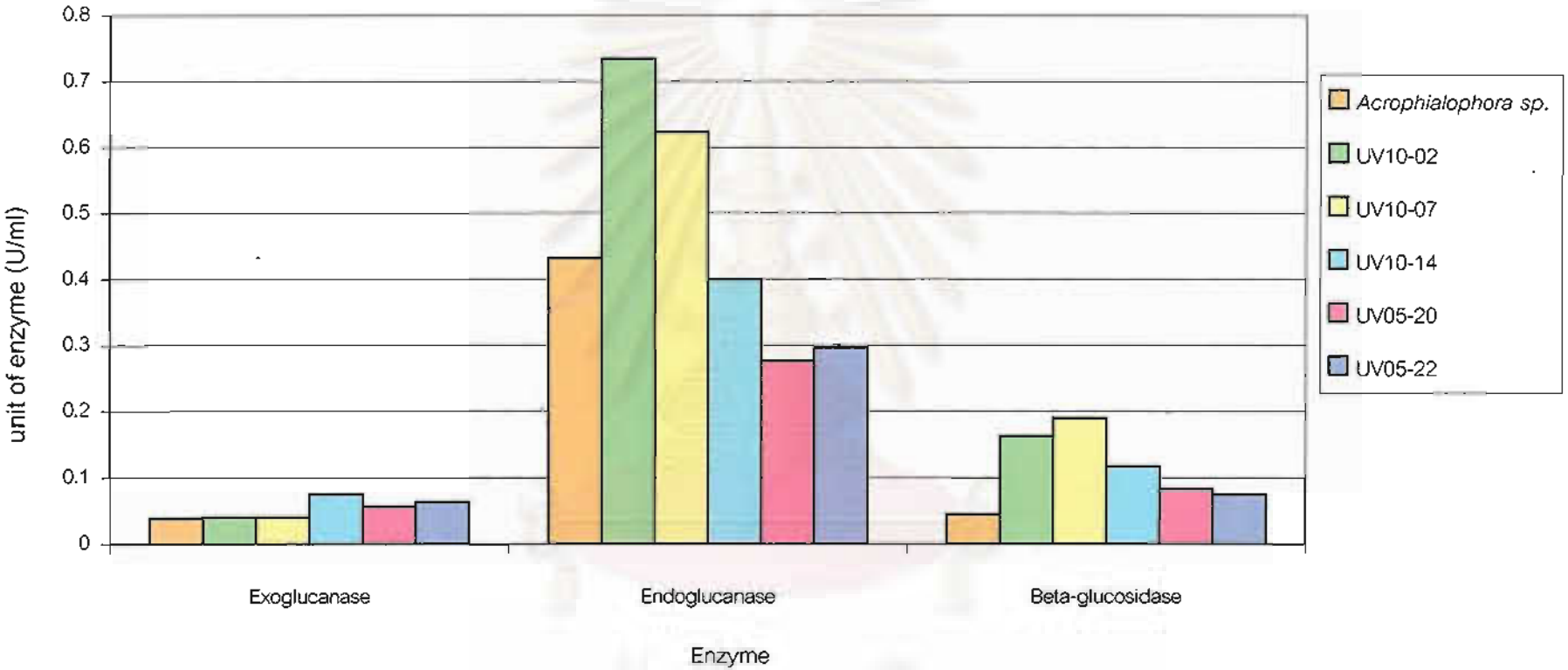
4. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

จากผลการทดลองตามตารางที่ 2. เมื่อพิจารณาจากค่าทางสถิติแล้ว จึงเลือกสายพันธุ์กลายที่จะนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับฟลาก์สทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์ ได้แก่ UV10-14 UV10-07 UV10-02 UV0520 และ UV0522 โดยเปรียบเทียบกับ *Acrophialophora* sp. ก่อนปรับปรุงสายพันธุ์ ได้ผลความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในแต่ละองค์ประกอบ ดังแสดงในตารางที่ 5. และภาพที่ 11.

ตารางที่ 5. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดแต่ละองค์ประกอบของ *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

เวลา	Cellulase	ค่า unit of enzyme ของแต่ละสายพันธุ์ (U/ml)					
(วัน)		Acro	UV05-20	UV05-22	UV10-02	UV10-07	UV10-14
3	exoglucanase	0.021	0.019	0.064	0.041	0.029	0.076
	endoglucanase	0.317	0.143	0.218	0.254	0.097	0.183
	β-glucosidase	0.022	0.030	0.072	0.046	0.084	0.118
6	exoglucanase	0.039	0.049	0.060	0.028	0.041	0.051
	endoglucanase	0.334	0.276	0.252	0.357	0.590	0.325
	β-glucosidase	0.027	0.044	0.076	0.053	0.189	0.076
9	exoglucanase	00003	0.057	0.059	0.040	0.011	0.060
	endoglucanase	0.358	0.273	0.296	0.683	0.445	0.361
	β-glucosidase	0.045	0.070	0.018	0.124	0.102	0.065
12	exoglucanase	0.011	0.043	0.037	0.023	0.024	0.049
	endoglucanase	0.432	0.225	0.104	0.735	0.623	0.400
	β-glucosidase	0.015	0.084	0.016	0.164	0.119	0.081

Acro คือ *Acrophialophora* sp.



ภาพที่ 11. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดแต่ละองค์ประกอบที่ผลิตได้จาก *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

จากผลการทดลองในตารางที่ 5. จะพบว่าสายพันธุ์กลาย UV10-14 ให้ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase สูงที่สุด 0.076 U/ml ในวันที่ 3 สายพันธุ์กลาย UV10-07 ให้ค่า unit of enzyme ของ เอนไซม์ β-glucanase สูงที่สุด 0.189 U/ml ในวันที่ 6 และสายพันธุ์กลาย UV10-02 ให้ค่า unit of enzyme ของ เอนไซม์ endo-glucanase สูงที่สุด 0.735 U/ml ในวันที่ 3 จึงพิจารณานำทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการกลายซ้ำด้วย NTG แต่สายพันธุ์ UV10-14 นั้น ไม่สร้างสปอร์จึงไม่สามารถนำมากลายอีกระดับหนึ่งได้

5. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG

จากผลการทดลองตา**รางที่** 5. จึงเลือกสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุด 3 สายพันธุ์ คือ UV10-02 UV10-07 และ UV10-14 **มาปรับปรุง**สายพันธุ์โดยการทำการกลายซ้ำด้วย NTG แต่สายพันธุ์ UV10-14 ไม่สร้างสปอร์ จึง**ไม่สามารถนำมาทำการกลายซ้ำได้**อีก

ผลการทดลองการ**ปรับปรุงสายพันธุ์ UV10-02 ซ้ำด้**วย NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้สายพันธุ์กลายทั้งสิ้น 23 สายพันธุ์ แยกเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากความเข้มข้นต่างๆ คือ 50 100 150 200 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 15 6 และ 2 สายพันธุ์ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นของ NTG 200 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบว่ามีสปอร์เจริญรอดมาเป็นโคโลนี โดยให้**ชื่อสายพันธุ์กลายใหม่ตามความ**เข้มข้นของ NTG เรียงตามลำดับคือสายพันธุ์กลายที่ผ่านการกลายซ้ำด้วย **NTG ความเข้มข้น** 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 15 สายพันธุ์ ให้ชื่อ UV10-02-N050-01 ถึง UV1**0-02-N050-15 สายพันธุ์กลายที่ผ่าน**การกลายซ้ำด้วย NTG ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิล**ลิลิตร 6 สายพันธุ์ ให้ชื่อ UV10-02-**N100-01 ถึง UV10-02-N100-06 และสายพันธุ์กลายที่ผ่านการ**กลายซ้ำด้วย NTG** ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 2 สายพันธุ์ ให้ชื่อ UV10-02-N150-01 ถึง UV10-02-N150-02

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 23 สายพันธุ์มา**ทดสอ**บหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ตามวิธีการทดลองข้อ 1.2 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ UV10-02 และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย UV10-02 ซ้ำด้วย NTG

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
UV10-02	3.87	3.25	0.842[b]
UV10-02-N050-01	3.36	2.84	0.844
UV10-02-N050-02	3.18	2.85	0.892
UV10-02-N050-03	3.24	2.89	0.892
UV10-02-N050-04	3.11	2.70	0.870
UV10-02-N050-05	3.35	2.96	0.886
UV10-02-N050-06	3.15	2.75	0.870
UV10-02-N050-07	3.24	2.81	0.866
UV10-02-N050-08	3.29	3.00	0.908
UV10-02-N050-09	3.32	2.80	0.842
UV10-02-N050-10	3.16	2.67	0.844
UV10-02-N050-11	3.48	3.08	0.888
UV10-02-N050-12	3.56	3.14	0.880
UV10-02-N050-13	3.85	3.45	0.896
UV10-02-N050-14	3.35	2.89	0.862
UV10-02-N050-15	3.46	3.25	0.942
UV10-02-N100-01	3.61	2.68	0.742[a]
UV10-02-N100-02	3.58	3.00	0.842
UV10-02-N100-03	3.38	2.65	0.784[a]
UV10-02-N100-04	2.98	2.29	0.770[a]
UV10-02-N100-05	3.16	2.56	0.784[a]
UV10-02-N100-06	3.28	2.56	0.778[a]
UV10-02-N150-01	2.86	2.46	0.856
UV10-02-N150-02	3.22	2.80	0.868

หมายเหตุ ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าอัตราส่วนเฉลี่ยของความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์ ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

จากตารางที่ 6. จะพบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้น ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นได้สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ UV10-02 คือสายพันธุ์กลาย UV10-02-N100-01 UV10-02-N100-03 UV10-02-N100-04 UV10-02-N100-05 และ UV10-02-N100-06 ให้ค่าอัตราส่วนเฉลี่ย 0.742 0.784 0.770 0.784 และ 0.778 ตามลำดับ

จากการทดลองทำการกลาย UV10-07 ซ้ำด้วย NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้สายพันธุ์กลายทั้งสิ้น 127 สายพันธุ์ แยกเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากความเข้มข้นต่างๆ คือ 50 100 150 200 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 81 และ 46 สายพันธุ์ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นของ NTG 100 200 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบว่ามีสปอร์เจริญรอดมาเป็นโคโลนี โดยให้ชื่อสายพันธุ์กลายใหม่ตามความเข้มข้นของ NTG เรียงตามลำดับคือสายพันธุ์กลายที่ผ่านการกลายซ้ำด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 81 สายพันธุ์ ให้ชื่อ UV10-07-N050-01 ถึง UV10-07-N050-81 และสายพันธุ์กลายที่ผ่านการกลายซ้ำด้วย NTG ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 46 สายพันธุ์ ให้ชื่อ UV10-07-N100-01 ถึง UV10-07-N100-46

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 127 สายพันธุ์มาทดสอบหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น ตามวิธีการทดลองข้อ 1.2 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7.

ตารางที่ 7. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ UV10-07 และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย UV10-07 ซ้ำด้วย NTG

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
UV10-07	4.03	3.12	0.772
UV10-07-N050-01	3.05	2.75	0.902
UV10-07-N050-02	3.25	2.91	0.894
UV10-07-N050-03	3.22	2.89	0.890
UV10-07-N050-04	2.98	2.64	0.888
UV10-07-N050-05	3.34	3.03	0.908
UV10-07-N050-06	3.15	2.81	0.892
UV10-07-N050-07	3.04	2.68	0.882
UV10-07-N050-08	3.20	2.92	0.910
UV10-07-N050-09	2.94	2.57	0.876
UV10-07-N050-10	3.23	2.91	0.898
UV10-07-N050-11	3.28	2.88	0.880
UV10-07-N050-12	3.44	3.07	0.892

ตารางที่ 7. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ UV107 และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย UV107 ซ้ำด้วย NTG (ต่อ)

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
UV10-07-N050-13	3.65	3.35	0.916
UV10-07-N050-14	3.30	2.96	0.900
UV10-07-N050-15	3.40	3.16	0.932
UV10-07-N050-16	3.25	2.80	0.862
UV10-07-N050-17	3.47	2.71	0.848
UV10-07-N050-18	3.27	2.87	0.880
UV10-07-N050-19	3.36	2.92	0.868
UV10-07-N050-20	3.27	3.03	0.928
UV10-07-N050-21	3.56	3.36	0.940
UV10-07-N050-22	3.42	3.22	0.942
UV10-07-N050-23	3.52	3.30	0.936
UV10-07-N050-24	3.25	2.87	0.882
UV10-07-N050-25	3.30	2.96	0.896
UV10-07-N050-26	3.13	2.68	0.856
UV10-07-N050-27	2.83	2.56	0.904
UV10-07-N050-28	3.36	3.14	0.936
UV10-07-N050-29	3.44	3.18	0.926
UV10-07-N050-30	3.38	3.15	0.934
UV10-07-N050-31	3.26	2.93	0.900
UV10-07-N050-32	3.33	3.12	0.940
UV10-07-N050-33	2.86	2.41	0.842
UV10-07-N050-34	3.25	2.90	0.892
UV10-07-N050-35	3.70	3.28	0.882
UV10-07-N050-36	3.29	3.09	0.940
UV10-07-N050-37	3.28	2.96	0.900
UV10-07-N050-38	3.24	2.89	0.892
UV10-07-N050-39	3.34	3.10	0.924
UV10-07-N050-40	3.22	2.89	0.896

ตารางที่ 7. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ UV107 และสายพันธุ์กลาย ที่ได้จากการกลาย UV107 ซ้ำด้วย NTG (ต่อ)

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
UV10-07-N050-41	3.21	2.71	0.842
UV10-07-N050-42	3.63	3.43	0.946
UV10-07-N050-43	3.32	2.94	0.886
UV10-07-N050-44	3.36	2.96	0.876
UV10-07-N050-45	3.39	3.19	0.942
UV10-07-N050-46	3.52	3.26	0.926
UV10-07-N050-47	3.40	2.97	0.872
UV10-07-N050-48	3.22	2.92	0.910
UV10-07-N050-49	3.21	2.89	0.898
UV10-07-N050-50	3.30	3.02	0.916
UV10-07-N050-51	3.05	2.78	0.910
UV10-07-N050-52	3.34	2.99	0.898
UV10-07-N050-53	3.56	3.36	0.946
UV10-07-N050-54	3.07	2.85	0.924
UV10-07-N050-55	3.36	2.81	0.836
UV10-07-N050-56	3.25	2.78	0.856
UV10-07-N050-57	2.61	2.28	0.874
UV10-07-N050-58	3.63	3.24	0.890
UV10-07-N050-59	3.52	3.26	0.926
UV10-07-N050-60	3.52	3.30	0.938
UV10-07-N050-61	3.36	3.07	0.910
UV10-07-N050-62	3.38	3.15	0.932
UV10-07-N050-63	3.34	3.07	0.918
UV10-07-N050-64	3.41	3.17	0.928
UV10-07-N050-65	3.29	3.03	0.924
UV10-07-N050-66	3.31	2.92	0.880
UV10-07-N050-67	3.17	2.83	0.890
UV10-07-N050-68	3.35	3.15	0.942

ตารางที่ 7. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ UV107 และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย UV107 ซ้ำด้วย NTG (ต่อ)

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
UV10-07-N050-69	2.99	2.72	0.908
UV10-07-N050-70	3.53	3.33	0.944
UV10-07-N050-71	4.38	4.20	0.952
UV10-07-N050-72	3.31	2.96	0.894
UV10-07-N050-73	3.07	2.70	0.878
UV10-07-N050-74	4.24	4.05	0.938
UV10-07-N050-75	3.08	2.71	0.878
UV10-07-N050-76	3.40	3.20	0.941
UV10-07-N050-77	4.41	4.25	0.940
UV10-07-N050-78	3.27	3.03	0.926
UV10-07-N050-79	3.16	2.73	0.862
UV10-07-N050-80	3.29	2.94	0.892
UV10-07-N050-81	3.14	2.91	0.924
UV10-07-N050-01	3.17	2.93	0.926
UV10-07-N050-02	2.94	2.69	0.914
UV10-07-N050-03	3.79	3.47	0.924
UV10-07-N050-04	3.26	2.93	0.896
UV10-07-N050-05	3.02	2.80	0.928
UV10-07-N050-06	3.51	3.29	0.936
UV10-07-N050-07	2.98	2.60	0.868
UV10-07-N050-08	3.22	2.80	0.868
UV10-07-N050-09	2.53	2.28	0.902
UV10-07-N050-10	3.49	3.11	0.892
UV10-07-N050-11	2.66	2.43	0.914
UV10-07-N100-12	3.38	3.07	0.908
UV10-07-N100-13	3.28	2.98	0.908
UV10-07-N100-14	2.68	2.35	0.874
UV10-07-N100-15	3.31	3.05	0.918

ตารางที่ 7. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ UV107 และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย UV107 ซ้ำด้วย NTG (ต่อ)

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
UV10-07-N100-16	3.11	2.70	0.870
UV10-07-N100-17	3.58	3.30	0.910
UV10-07-N100-18	3.44	3.24	0.942
UV10-07-N100-19	3.36	3.06	0.906
UV10-07-N100-20	3.43	3.18	0.926
UV10-07-N100-21	3.72	3.42	0.920
UV10-07-N100-22	3.38	3.09	0.914
UV10-07-N100-23	3.28	3.05	0.926
UV10-07-N100-24	3.20	2.78	0.866
UV10-07-N100-25	4.18	3.93	0.940
UV10-07-N100-26	3.32	3.13	0.942
UV10-07-N100-27	2.78	2.48	0.894
UV10-07-N100-28	3.09	2.84	0.918
UV10-07-N100-29	3.26	2.96	0.904
UV10-07-N100-30	2.83	2.79	0.914
UV10-07-N100-31	3.14	2.92	0.926
UV10-07-N100-32	2.99	2.74	0.912
UV10-07-N100-33	3.36	3.02	0.894
UV10-07-N100-34	3.18	2.89	0.888
UV10-07-N100-35	3.45	3.25	0.930
UV10-07-N100-36	3.46	3.20	0.924
UV10-07-N100-37	3.46	3.21	0.924
UV10-07-N100-38	3.72	3.44	0.926
UV10-07-N100-39	3.28	3.00	0.914
UV10-07-N100-40	3.26	2.98	0.914
UV10-07-N100-41	3.43	3.22	0.940
UV10-07-N100-42	3.33	2.93	0.884
UV10-07-N100-43	3.51	3.28	0.936

ตารางที่ 7. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ UV107 และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย UV107 ซ้ำด้วย NTG (ต่อ)

สายพันธุ์	ความกว้างของวงใสเฉลี่ย: a (cms.)	ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย: b (cms.)	อัตราส่วนเฉลี่ย (b/a)
UV10-07-N100-44	3.12	2.81	0.914
UV10-07-N100-45	3.80	3.52	0.926
UV10-07-N100-46	3.18	2.78	0.880

จากตารางที่ 7. พบว่าการกลาย UV10-07 ซ้ำด้วย NTG นั้น ไม่พบว่ามีสายพันธุ์ใดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น UV10-07 เลย

6. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ *Trichoderma reesei* QM9414

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในแต่ละองค์ประกอบ ของสายพันธุ์กลายที่คัดแยกได้จากข้อ 1.3 3.3 และ 5.3 โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น *Acrophialophora* sp. และ *Trichoderma reesei* QM9414 ที่เลี้ยงตามวิธีการทดลองข้อ 4. โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 และ 30 องศาเซลเซียส ได้ผลความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในองค์ประกอบต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 8. และภาพที่ 12. 13. 14. 15.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละองค์ประกอบสูงสุดที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลายที่ปรับปรุงได้จากการกลายทั้ง 3 วิธี เทียบกับ *Acrophialophora* sp. และ *Trichoderma reesei* QM9414 ในแต่ละช่วงระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ

เวลา (วัน)	Cellulase	ค่า unit of enzyme ของแต่ละสายพันธุ์ (U/ml)							
		Acro	Tri40	Tri30	UV05-20	UV05-22	UV10-02	UV10-07	UV10-14
3	exoglucanase	0.021	0.010	0.071	0.019	0.064	0.041	0.029	0.076
	endoglucanase	0.317	0.004	0.350	0.143	0.218	0.254	0.097	0.183
	β-glucosidase	0.022	0.004	0.059	0.030	0.072	0.046	0.084	0.118
6	exoglucanase	0.039	0.005	0.084	0.049	0.060	0.028	0.041	0.051
	endoglucanase	0.334	0.030	0.228	0.276	0.252	0.357	0.590	0.325
	β-glucosidase	0.027	0.008	0.065	0.044	0.076	0.053	0.189	0.076
9	exoglucanase	00003	0.021	0.216	0.057	0.059	0.040	0.011	0.060
	endoglucanase	0.358	0.011	0.503	0.273	0.296	0.683	0.445	0.361
	β-glucoase	0.045	0.015	0.100	0.070	0.018	0.124	0.102	0.065
12	exoglucanase	0.011	0.006	0.131	0.043	0.037	0.023	0.024	0.049
	endoglucanase	0.432	0.020	0.379	0.225	0.104	0.735	0.623	0.400
	β-glucosidase	0.015	0.036	0.060	0.084	0.016	0.164	0.119	0.081

ตารางที่ 8. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละองค์ประกอบสูงสุดที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลายที่ปรับปรุงได้จากการกลายทั้ง 3 วิธี เทียบกับ *Acrophialophora* sp. และ *Trichoderma reesei* QM9414 ในแต่ละช่วงระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ต่อ)

เวลา (วัน)	Cellulase	ค่า unit of enzyme ของแต่ละสายพันธุ์ (U/ml)					
		N250-024	N250-026	N300-058	N300-065	N300-076	N300-100
3	Exoglucanase	0.033	0.051	0.032	0.056	0.055	0.050
	endoglucanase	0.200	0.162	0.274	0.353	0.293	0.343
	β-glucosidase	0.069	0.030	0.034	0.065	0.053	0.081
6	Exoglucanase	0.023	0.024	0.009	0.013	0.008	0.018
	endoglucanase	0.168	0.068	0.177	0.195	0.109	0.154
	β-glucosidase	0.051	0.027	0.046	0.046	0.042	0.044
9	exoglucanase	0.017	0.015	0.044	0.027	0.016	0.011
	endoglucanase	0.105	0.048	0.189	0.291	0.099	0.200
	β-glucoase	0.056	0.036	0.041	0.058	0.038	0.059
12	exoglucanase	0.008	0.005	0.020	0.026	0.006	0.027
	endoglucanase	0.087	0.028	0.181	0.289	0.087	0.181
	β-glucosidase	0.070	0.091	0.027	0.046	0.043	0.058

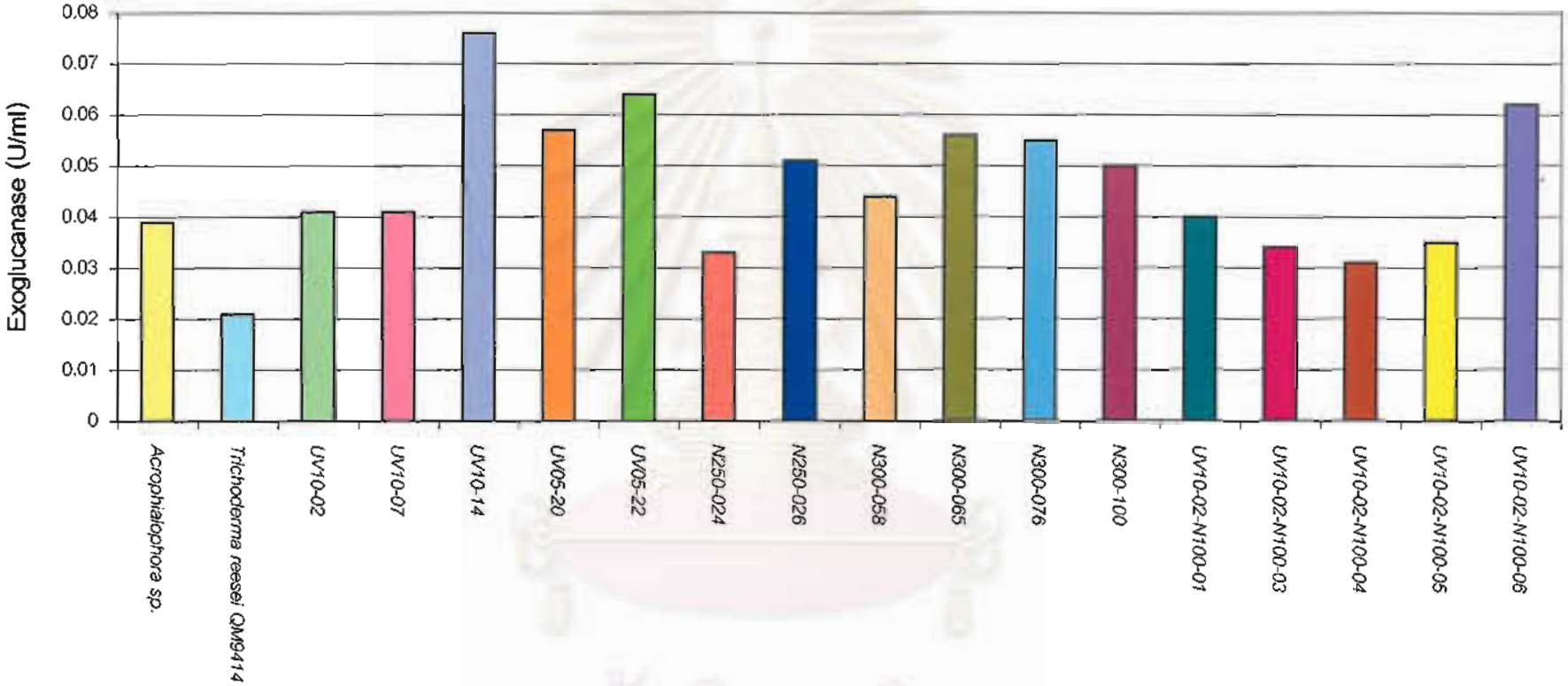
ตารางที่ 8. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละองค์ประกอบสูงสุดที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลายที่ปรับปรุงได้จากการกลายทั้ง 3 วิธี เทียบกับ *Acrophialophora* sp. และ *Trichoderma reesei* QM9414 ในแต่ละช่วงระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ต่อ)

เวลา (วัน)	Cellulase	ค่า unit of enzyme ของแต่ละสายพันธุ์ (U/ml)				
		UV10-02-N100-01	UV10-02-N100-03	UV10-02-N100-04	UV10-02-N100-05	UV10-02-N100-06
3	exoglucanase	0.040	0.012	0.031	0.014	0.062
	endoglucanase	0.292	0.295	0.342	0.308	0.235
	β-glucosidase	0.061	0.061	0.039	0.066	0.036
6	exoglucanase	0.004	0.006	0.004	0.006	0.004
	endoglucanase	0.255	0.204	0.207	0.237	0.181
	β-glucosidase	0.078	0.057	0.058	0.064	0.071
9	exoglucanase	0.009	0.023	0.015	0.035	0.005
	endoglucanase	0.316	0.211	0.287	0.211	0.237
	β-glucoase	0.046	0.043	0.058	0.043	0.088
12	exoglucanase	0.006	0.034	0.006	0.023	0.003
	endoglucanase	0.251	0.199	0.263	0.175	0.270
	β-glucosidase	0.051	0.038	0.071	0.036	0.133

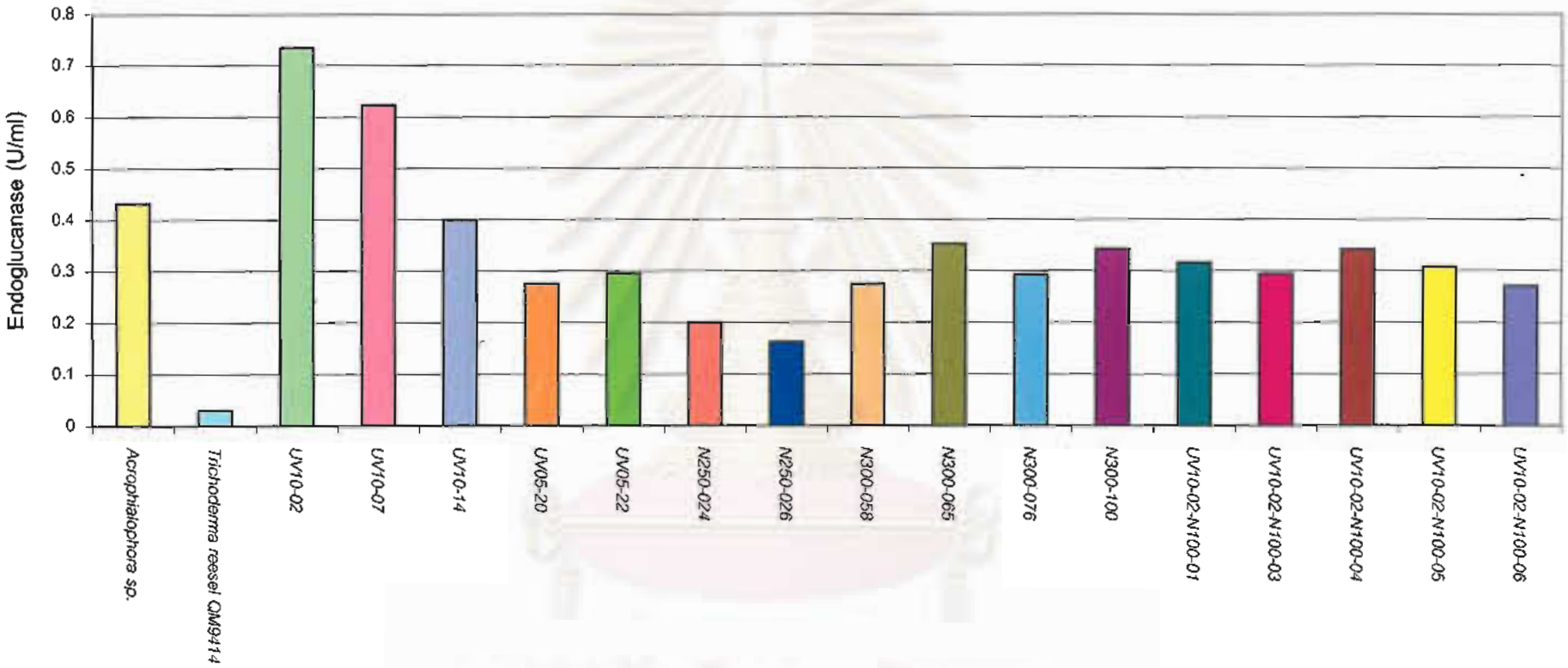
Acro คือ *Acrophialophora* sp.

Tri30 คือ *Trichoderma reesei* QM9414 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

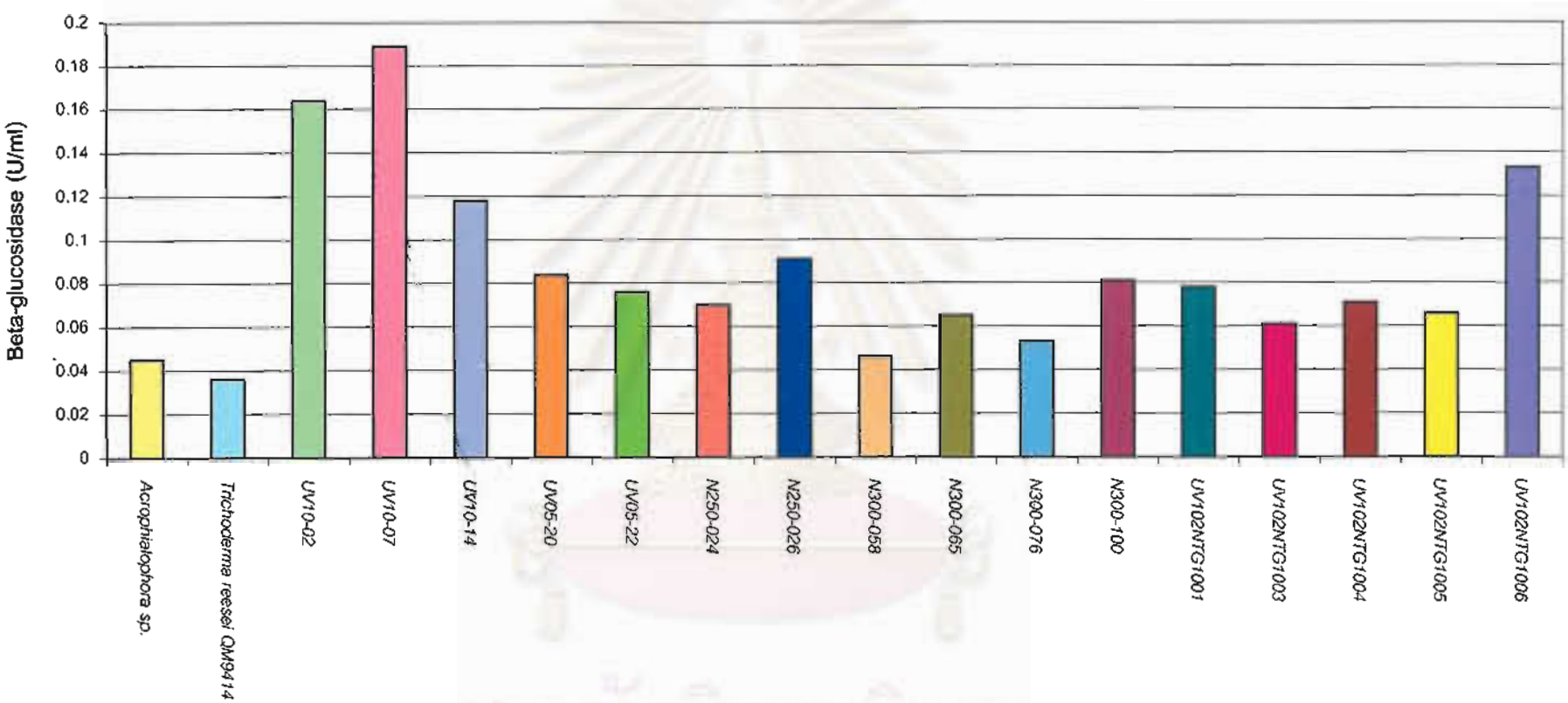
Tri40 คือ *Trichoderma reesei* QM9414 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



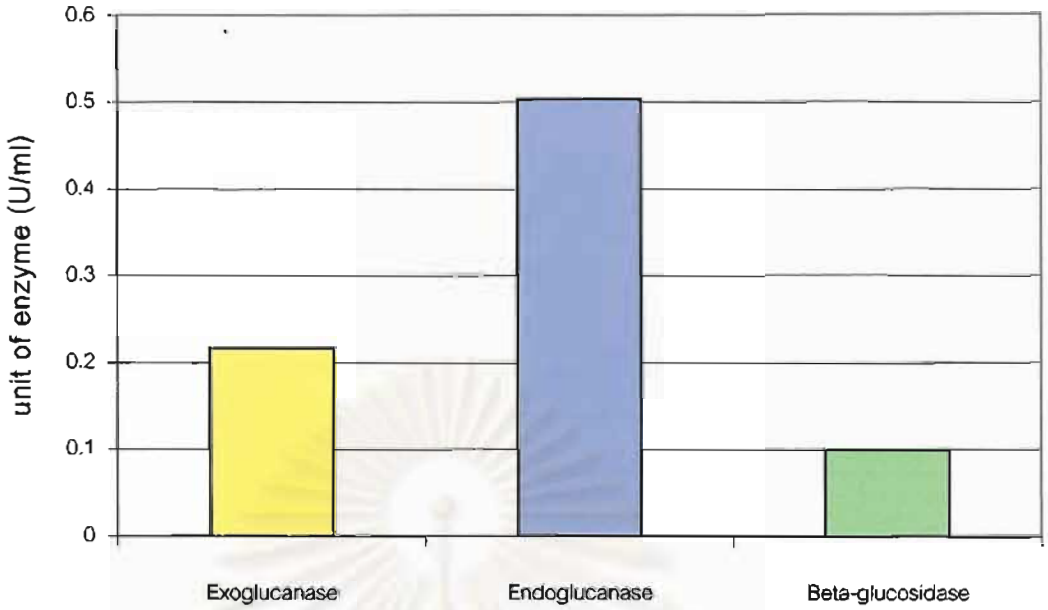
ภาพที่ 12. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase สูงสุดที่ผลิตได้จากทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ และสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดที่ปรับปรุงได้จากทั้ง 3 วิธี



ภาพที่ 13. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ endoglucanase สูงสุดที่ผลิตได้จากทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ และสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดที่ปรับปรุงได้จากทั้ง 3 วิธี



ภาพที่ 14. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ β-glucosidase สูงสุดที่ผลิตได้จากทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ และสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดที่ปรับปรุงได้จากทั้ง 3 วิธี



ภาพที่ 15. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละองค์ประกอบสูงสุด ที่ผลิตได้จาก *Trichoderma reesei* QM9414 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

7. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย

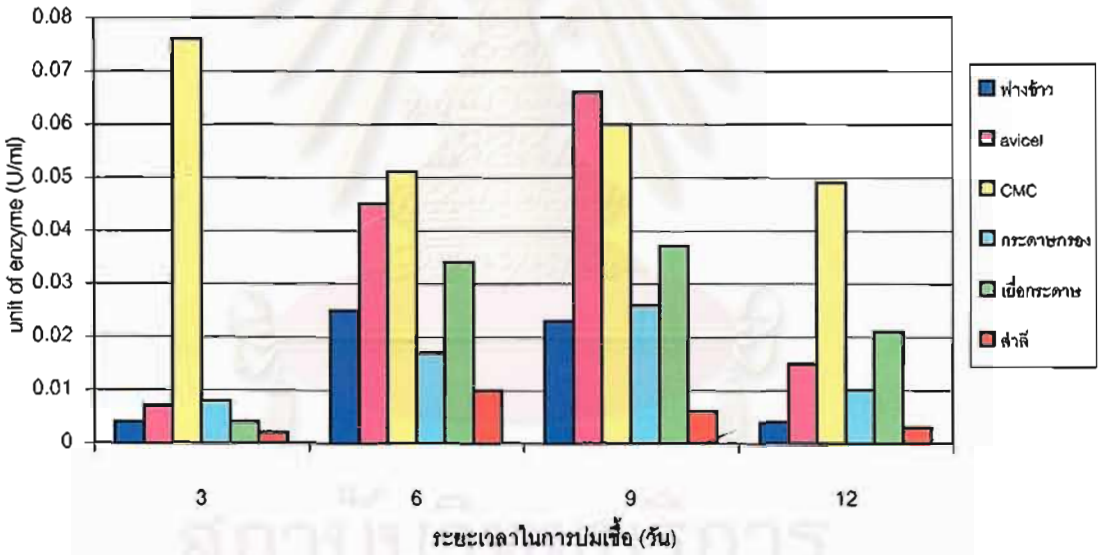
7.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลองความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับฟลาก์ส จึงเลือกสายพันธุ์กลาย UV10-14 มาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ exoglucanase ต่อไป โดยใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางกลร่วมกับทางเคมี avicel caboxymethylcellulose (CMC) กระดาษกรอง เยื่อกระดาษ และสำลี พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด คือ CMC รองลงมาเป็น avicel เยื่อกระดาษ กระดาษกรอง ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพทางกลร่วมกับทางเคมี และสำลี โดยให้ค่า unit of enzyme เท่ากับ 0.076 0.066 0.037 0.026 0.025 และ 0.010 U/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9. และภาพที่ 16.

ตารางที่ 9. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ

C-source	Unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
ฟางข้าว	0.004^{jkl}	0.025^{f}	0.023^{f}	0.004^{jkl}
Avicel	0.007^{jkl}	0.045^{d}	0.066^{b}	0.015^{hi}
CMC	0.076^{a}	0.051^{c}	0.060^{b}	0.049^{cd}
กระดาษกรอง	0.008^{jkl}	0.017^{gh}	0.026^{f}	0.010^{ij}
เยื่อกระดาษ	0.004^{jkl}	0.034^{e}	0.037^{e}	0.021^{fg}
สำลี	0.002^{l}	0.010^{ijk}	0.006^{jkl}	0.003^{kl}

หมายเหตุ ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



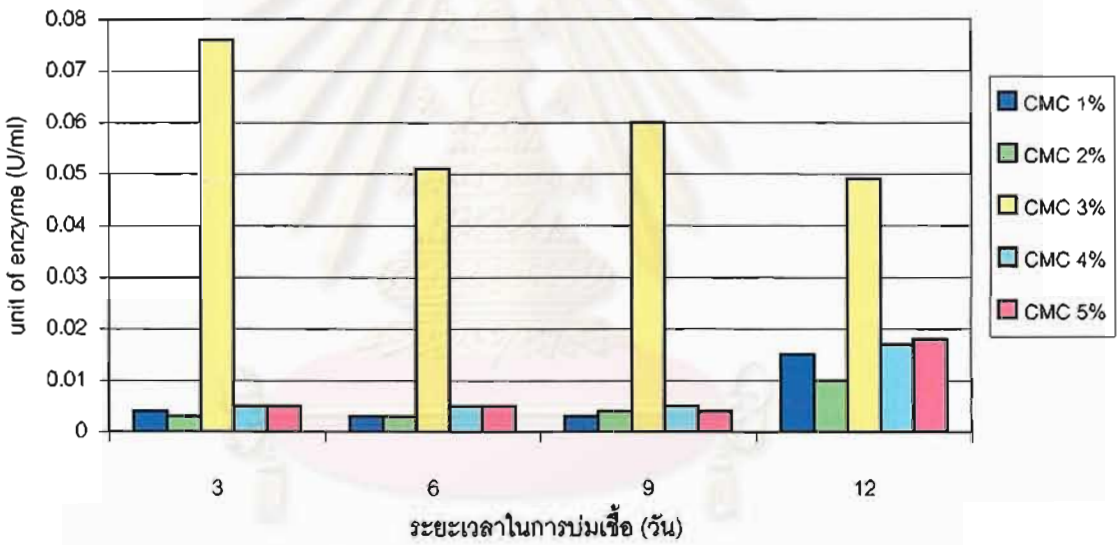
ภาพที่ 16. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ

จากผลการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจึงเลือก CMC มาหาค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ exoglucanase ต่อไป โดยใช้ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด คือ 3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น 5 4 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่า unit of enzyme เท่ากับ 0.076 0.018 0.017 0.015 และ 0.010 U/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10. และภาพที่ 17.

ตารางที่ 10. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยใช้ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

CMC (%)	unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
1	0.004^{d}	0.003^{d}	0.003^{d}	0.015^{d}
2	0.003^{d}	0.003^{d}	0.004^{d}	0.010^{d}
3	0.076^{a}	0.051^{c}	0.060^{b}	0.049^{bc}
4	0.005^{d}	0.005^{d}	0.005^{d}	0.017^{d}
5	0.005^{d}	0.005^{d}	0.004^{d}	0.018^{d}

หมายเหตุ ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 โดยใช้แหล่งคาร์บอน CMC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



ภาพที่ 17. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยใช้ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

7.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

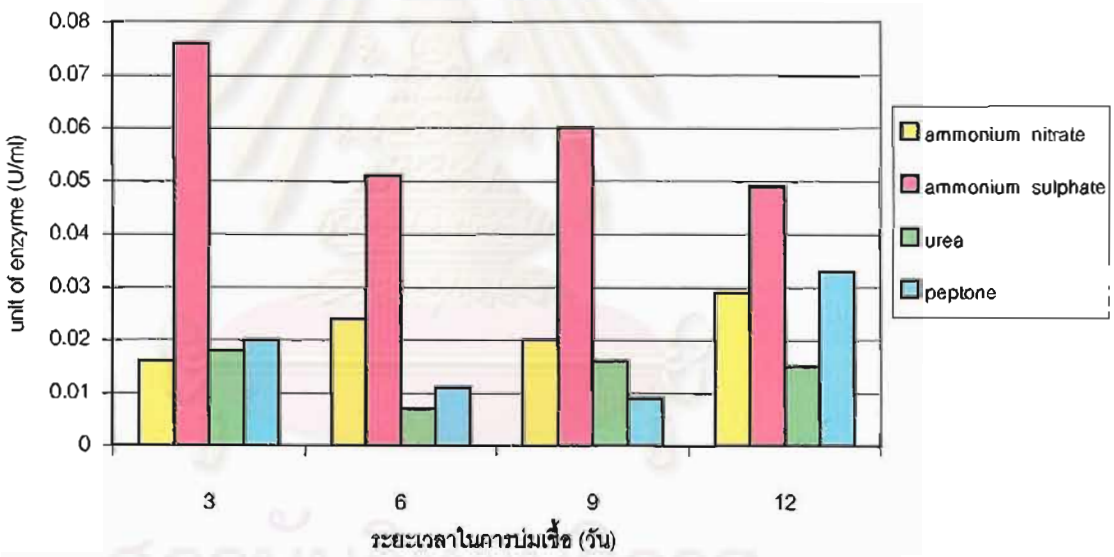
เมื่อได้แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแล้ว จึงนำมาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ exoglucanase ต่อไป โดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ได้แก่ ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) ammonium nitrate (NH_4NO_3) urea ($CO(NH_2)_2$) และ peptone ที่ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต รองลงมาเป็น เปปโตน แอมโมเนียมไน

เตรท และ ยูเรีย โดยให้ค่า unit of enzyme เท่ากับ 0.076 0.033 0.029 และ 0.018 U/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 11. และ ภาพที่ 18.

ตารางที่ 11. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงด้วยแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

N-source	unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
ammonium nitrate	0.016^{f-i}	0.024^{ef}	0.020^{fg}	0.029^{dc}
Ammonium sulphate	0.076^{a}	0.051^{c}	0.060^{b}	0.049^{c}
urea	0.018^{fgh}	0.007^{i}	0.016^{f-i}	0.015^{f-i}
peptone	0.020^{fg}	0.011^{ghi}	0.009^{hi}	0.033^{d}

หมายเหตุ ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



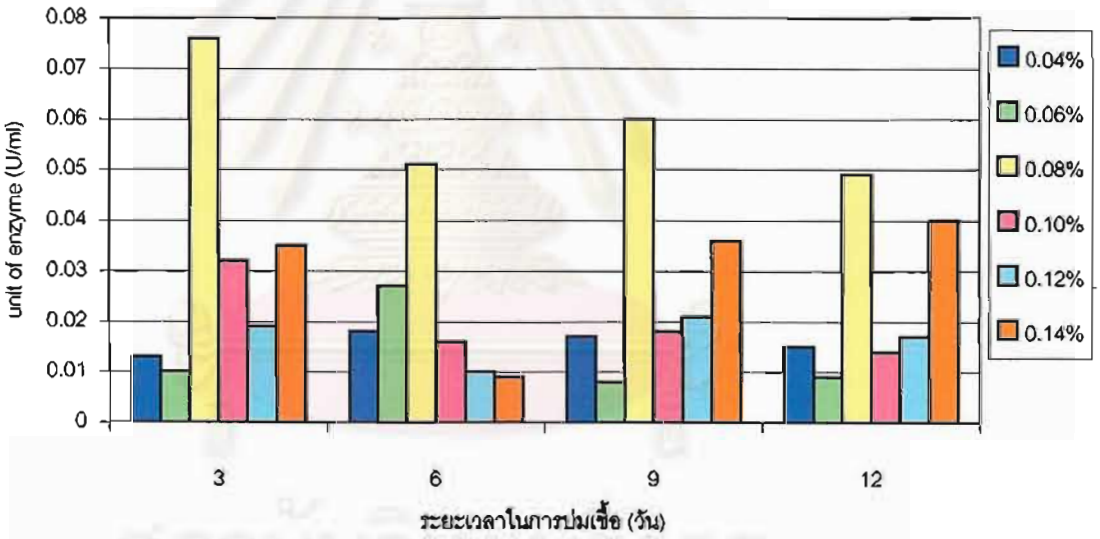
ภาพที่ 18. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงด้วยแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

จากผลการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจึงเลือก ammonium sulphate มาหาค่าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ exoglucanase ต่อไป โดยใช้ความเข้มข้น 0.04 0.06 0.08 0.10 0.12 และ 0.14 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด คือ 0.08 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น 0.14 0.10 0.06 0.12 และ 0.004 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่า unit of enzyme เท่ากับ 0.076 0.040 0.032 0.027 0.021 และ 0.018 U/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 12. และภาพที่ 19.

ตารางที่ 12. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยใช้ ammonium sulphate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Ammonium sulphate (%)	unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
0.04	0.013^{f}	0.018^{def}	0.017^{def}	0.015^{def}
0.06	0.010^{f}	0.027^{c-f}	0.008^{f}	0.009^{f}
0.08	0.076^{a}	0.051^{ab}	0.060^{a}	0.049^{ab}
0.10	0.032^{c-f}	0.016^{def}	0.018^{def}	0.014^{ef}
0.12	0.019^{def}	0.010^{f}	0.021^{c-f}	0.017^{def}
0.14	0.035^{b-e}	0.009^{f}	0.036^{bcd}	0.040^{bc}

หมายเหตุ ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 โดยใช้แหล่งไนโตรเจน ammonium sulphate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



ภาพที่ 19. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยใช้ ammonium sulphate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

7.3 การศึกษา pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

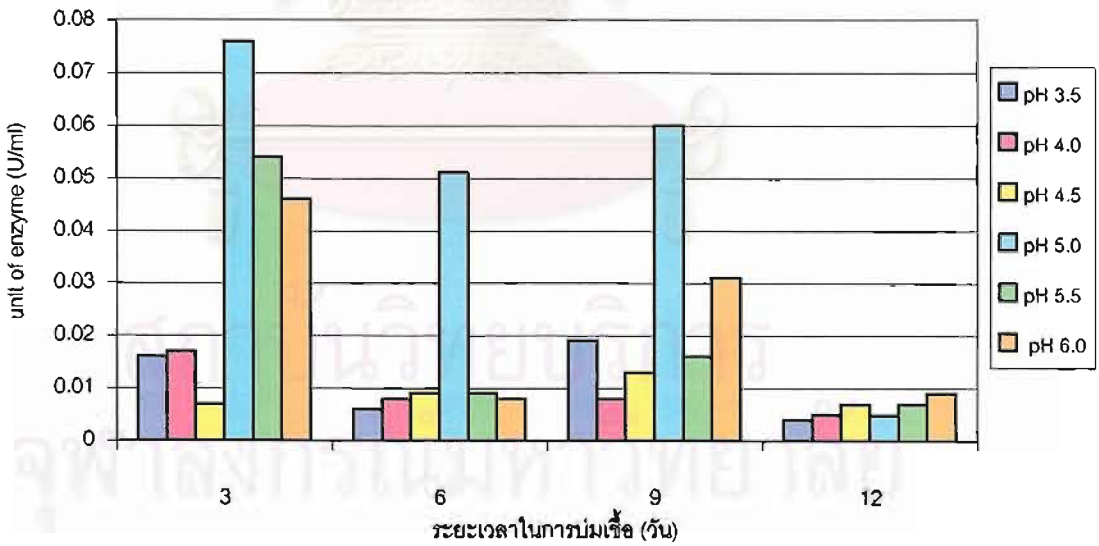
เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแล้ว จึงนำมาหาค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ exoglucanase ต่อไป โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีค่า pH เริ่มต้นต่างกัน 6 ระดับ คือ 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0

พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมที่สุด คือ 5.0 รองลงมาเป็น 5.5 6.0 3.5 4.0 และ 4.5 โดยให้ค่า unit of enzyme เท่ากับ 0.076 0.054 0.046 0.019 0.017 และ 0.013 U/ml ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 13. และภาพที่ 20.

ตารางที่ 13. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยปรับค่า pH เริ่มต้นต่าง ๆ

PH เริ่มต้น	unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
3.5	0.016^{fgh}	0.006^{ij}	0.019^{f}	0.004^{j}
4.0	0.017^{f}	0.008^{ij}	0.008^{ij}	0.005^{ij}
4.5	0.007^{ij}	0.009^{g-j}	0.013^{f-i}	0.007^{ij}
5.0	0.076^{a}	0.051^{cd}	0.060^{b}	0.0049^{cd}
5.5	0.054^{c}	0.009^{hij}	0.016^{fg}	0.007^{ij}
6.0	0.046^{d}	0.008^{ij}	0.031^{c}	0.009^{g-j}

หมายเหตุ ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยปรับค่า pH เริ่มต้นต่าง ๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



ภาพที่ 20. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงโดยปรับค่า pH เริ่มต้นต่าง ๆ

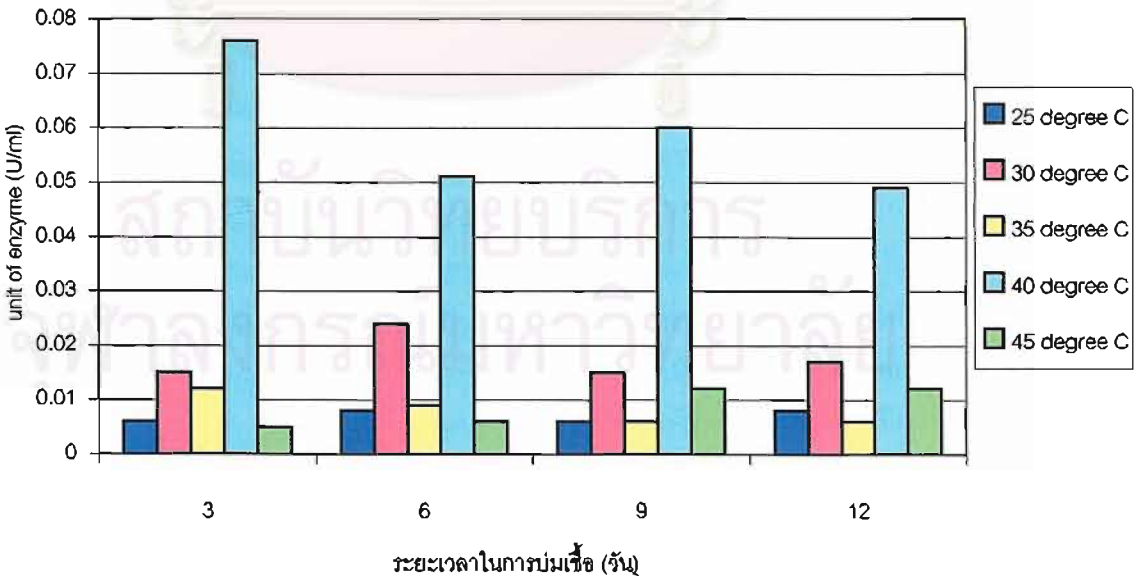
7.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการบ่มเชื้อ

เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จึงนำมาศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ exoglucanase ต่อไป โดยบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิต่างกัน 5 ระดับคือ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมที่สุดคือ 40 องศาเซลเซียส รองลงมาเป็น 30 45 35 และ 25 องศาเซลเซียส โดยให้ค่า unit of enzyme เท่ากับ 0.076 0.024 0.012 0.012 และ 0.008 U/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 14. และภาพที่ 21.

ตารางที่ 14. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
25	0.006^{e}	0.008^{e}	0.006^{e}	0.008^{e}
30	0.015^{cde}	0.024^{cd}	0.015^{c}	0.017^{cde}
35	0.012^{de}	0.009^{e}	0.006^{e}	0.006^{e}
40	0.076^{a}	0.051^{b}	0.060^{b}	0.049^{b}
45	0.005^{e}	0.006^{e}	0.012^{de}	0.012^{de}

หมายเหตุ ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



ภาพที่ 21. ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จาก UV10-14 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต มักนิยมใช้ในการทำการกลายเชื้อจุลินทรีย์ครั้งแรกและมักจะให้สายพันธุ์กลายที่ดี ในช่วงที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ 0.01-5.0 เปอร์เซ็นต์ (Fantini, 1975) จากผลการทดลองหลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน เพื่อป้องกันการเกิดปรากฏการณ์ photoreactivation พบว่าทุกระยะเวลาที่ใช้ในการฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ต่ำกว่า 0.25 เปอร์เซ็นต์ จึงพิจารณานำทุกสายพันธุ์กลายที่ได้มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น จากตารางที่ 2. พบว่ามีสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงกว่า *Acrophialophora* sp. ทั้งสิ้น 34 สายพันธุ์ ต่ำกว่า 11 สายพันธุ์ และเท่าเดิม 2 สายพันธุ์ ซึ่งจะสังเกตได้ว่าแม้คัดเลือกเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ในช่วง 0.01-5.0 เปอร์เซ็นต์แล้วก็ตาม แต่ก็ไม่ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นทั้งหมด เพราะการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการทำการกลายนั้น อาจให้ผลได้ทั้งสูงขึ้น เท่าเดิมหรืออาจต่ำลง (บุษบา ยง สมิทธ์, 2540) อันเนื่องจากการกลายด้วยแสงอัลตราไวโอเลตนั้น จะทำให้เกิด thymine dimer ในโมเลกุลของโพลินิวคลิโอไทด์ ทำให้ thymine ไม่สามารถจับคู่กับ adenine ของสายโพลินิวคลิโอไทด์ที่อยู่ตรงข้ามกันได้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลของโพลินิวคลิโอไทด์แบบสุ่ม เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA replication) ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมและเมื่อเกิดการพิมพ์รหัส (transcription) ขึ้นจะทำให้ได้รหัสพันธุกรรม (genetic code) ที่เปลี่ยนแปลงไป (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2541) หากเกิดการกลายแล้วรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นอยู่ในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ ก็จะทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป แต่ถ้าหากรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นเป็นบริเวณที่สังเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์แล้วเกิดการสูญเสียไป จนไม่สามารถสร้างโปรตีนชนิดนั้นขึ้นมาได้หรือสร้างขึ้นมาแล้วแต่มีองค์ประกอบที่เปลี่ยนแปลงไปจนไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อเซลล์ได้อีก เซลล์นั้นก็จะตายในที่สุด (อาทิตย์ ปุษยะนาวิน, 2539)

การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตนั้น นิยมที่จะเจือจางเชื้อจุลินทรีย์ด้วยบัฟเฟอร์ในจานแก้วโดยกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก แล้วจึงนำไปฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นจึงนำมาเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยง (Alberto Owen และ D'Souza, 1991) ซึ่งมีข้อเสียคือสปอร์จะได้รับแสงอัลตราไวโอเลตอย่างไม่ต่อเนื่อง และบางครั้งสปอร์อาจบังแสงกันเองอันเนื่องจาก

การกวน จึงอาจทำให้แต่ละสปอร์ได้รับแสงอัลตราไวโอเลตได้ไม่เท่ากัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเกลี่ยสปอร์ลงบนอาหาร CMC agar ที่มีส่วนผสมของ cycloheximide 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรก่อน จึงฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ดัดแปลงจาก Kuhad Kumar และ Singh, 1994) เพราะการเกลี่ยสปอร์ลงบนอาหารก่อน จะทำให้แต่ละสปอร์ได้รับแสงอัลตราไวโอเลตอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอกันทุกสปอร์ ทำให้ผลจากการฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเกิดขึ้นจากระยะเวลาในการฉายแสงเพียงอย่างเดียว การเกลี่ยเชื้อลงบนอาหาร CMC agar แทนอาหาร PDA เพื่อใช้อาหาร CMC agar เป็น selective media สำหรับคัดแยกเอาสายพันธุ์กลายที่สูญเสียความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกไป ดังนั้นสายพันธุ์กลายที่ได้ทุกสายพันธุ์ต้องผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จึงจะเจริญได้บนอาหาร CMC agar ส่วนการเติมส่วนผสมของ cycloheximide 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงไปนั้น เพื่อใช้ cycloheximide ซึ่งเป็น antibiotic ที่โดยปกติแล้ว *Acrophialophora* sp. ไม่มีคุณสมบัติในการต้านทานมาเป็น marker เพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าสายพันธุ์กลายที่ได้มีพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปในระดับชีวเคมีจริง ซึ่งด้วยวิธีการนี้ทำให้ลดระยะเวลาในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ไม่ต้องการออกไปได้อย่างมาก

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จากการวัดวงใสที่เกิดขึ้น เมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMC agar โดยเทียบอัตราส่วนระหว่างความกว้างของโคโลนีกับความกว้างของวงใสนั้น ถ้าอัตราส่วนที่ได้มีค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่าเชื้อมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูง เพราะแม้มีการเจริญเพียงเล็กน้อย แต่สามารถปลดปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสออกมาได้มาก ซึ่งเกิดจากการกลายนั้น อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับนิวคลิโอไทด์ที่อยู่ในบริเวณของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์ mRNA ทำให้มีการผลิต mRNA ได้มากขึ้น ดังนั้นจึงทำให้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มาก ซึ่งเทียบได้กับการทำงานของ operator ใน operon ของ *E. coli* หรือเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้นั้น มี active site ที่ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง อันเนื่องจากการกลายเกิดขึ้นในบริเวณที่เป็น active site ในโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้ active site ของเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานดีขึ้น จึงทำให้เกิดวงใสเป็นบริเวณกว้าง เมื่อนำมาเป็นตัวหารความกว้างของโคโลนีจึงทำให้ได้ค่าอัตราส่วนที่ต่ำ ในทางกลับกันหากอัตราส่วนที่ได้มีค่าเข้าใกล้ 1 ย่อมแสดงว่าค่าความกว้างของวงใสมีค่าใกล้เคียงกับค่าความกว้างของโคโลนี การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีนี้ ยังให้ผลไม่ชัดเจนนักเพราะเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีหลายองค์ประกอบ แต่การวัดด้วยวิธีนี้วัดได้แค่ความสามารถในการใช้สารตั้งต้นที่เป็นเซลลูโลสของเชื้อไปเท่านั้น จึงปรากฏเป็นบริเวณวงใส ดังนั้นจึงเป็นวิธีการวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นเท่านั้น จึงจำเป็นต้องมีการตรวจความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอย่างละเอียดต่อไป

จากผลการทดลองความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น พบว่ามีสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงขึ้น 34 สายพันธุ์ก็จริง แต่เมื่อพิจารณา

จากค่าทางสถิติแล้ว จะเห็นได้ว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ UV10-14 UV102 UV107 UV520 และ UV522 เท่านั้นที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในขั้นต้นสูงขึ้นอย่างชัดเจน

2. การทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

จากผลการทดลองตามตารางที่ 3. พบว่าสายพันธุ์กลาย UV10-14 UV102 UV107 UV520 และ UV522 ทั้ง 5 สายพันธุ์ ยังคงมีคุณสมบัติในการต้านทาน cycloheximide ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังคงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสตามการทดสอบขั้นต้นได้เหมือนเดิม อาจเนื่องจากขณะที่ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตนั้น เป็นช่วงที่ดีเอ็นเอมีการจำลองตัวเอง (replication) พอดี ฉะนั้นรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นจะถูกจำลองตัวเองไปแล้วในโมเลกุลดีเอ็นเอ จึงไม่มีการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมให้กลับไปเหมือนเดิม

3. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)

การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ NTG พบว่ามักคัดเลือกโคโลนีในช่วงที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ 0-50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นช่วงที่มีการกลายได้ดีที่สุด (Carlton และ Brown, 1981) จากผลการทดลองการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้สายพันธุ์กลายทั้งสิ้น 4185 สายพันธุ์ ซึ่งมากเกินไปต่อการนำไปทดสอบหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น เพราะต้องเสียค่าใช้จ่ายในการทดสอบสูง จึงคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์กลายที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ ต่ำกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์มา 623 สายพันธุ์ และโดยการพิจารณาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากการราดทับด้วย congo red และพิจารณาจากวงใสที่เกิดขึ้น ทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อราได้ทั้งสิ้น 142 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงขึ้น 59 สายพันธุ์ ต่ำลง 75 สายพันธุ์ และเท่าเดิม 8 สายพันธุ์ จะเห็นได้ว่าการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ NTG ก็ไม่ได้ผลสำเร็จ 100 เปอร์เซ็นต์ เพราะสาร NTG เป็นสารกลุ่ม alkylating agent ที่จะไปเติมหมู่เมธิลให้กับเบสทำให้เกิดการจับคู่เบสผิดปกติ เกิดเป็น base pair substitution ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลของโพลินิวคลิโอไทด์แบบสุ่ม เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Goodenough, 1978) เมื่อเกิดการพิมพ์รหัสขึ้นจะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป มีผลทำให้ได้ลำดับของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ถ้าการเปลี่ยนแปลงนี้อยู่ในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ ก็จะทำให้ได้สายพันธุ์กลาย

ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป โดยอาจทำให้ผลิตได้มากขึ้นหรือน้อยลงก็ได้ หรืออาจทำให้ชนิดของโปรตีนที่ผลิตได้นั้นเปลี่ยนไปได้ จึงทำให้เกิดสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป

การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ NTG นั้น นิยมที่จะทำสารละลายสปอร์ด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลาย NTG โดยจะใช้ความเข้มข้นของ NTG ที่ปริมาตรสุดท้ายแตกต่างกันออกไป และกำหนดระยะเวลาในการแช่ใน NTG เท่าๆ กัน คือประมาณ 15-20 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะเขย่าเพื่อให้แน่ใจว่าทุกๆ สปอร์ได้สัมผัสกับ NTG อย่างทั่วถึง (Carlton และ Brown, 1981) ล้างออกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าสปอร์ไม่ได้สัมผัสกับ NTG อีกต่อไป ดังนั้นความเข้มข้นของ NTG เท่านั้น ที่เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการกลายและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ จากนั้นนำสปอร์ที่ได้มาเกลี่ยลงบนอาหาร CMC agar ที่มีส่วนผสมของ cycloheximide 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้อาหาร CMC agar เป็น selective media สำหรับคัดแยกเอาสายพันธุ์กลายที่สูญเสียความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกไป ดังนั้นสายพันธุ์กลายที่ได้ทุกสายพันธุ์ต้องผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จึงจะเจริญได้บนอาหาร CMC agar ส่วนการเติมส่วนผสมของ cycloheximide 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงไปนั้น เพื่อใช้ cycloheximide ซึ่งเป็น antibiotic ที่โดยปกติแล้ว *Acrophialophora* sp. ไม่มีคุณสมบัติในการต้านทาน มาเป็น marker เพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าสายพันธุ์กลายที่ได้มีพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปในระดับชีวเคมีจริง ซึ่งด้วยวิธีการนี้ทำให้ลดระยะเวลาในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ไม่ต้องการออกไปได้อย่างมาก

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วย NTG จากการวัดวงใสที่เกิดขึ้น เมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMC agar โดยเทียบอัตราส่วนระหว่างความกว้างของโคโลนีกับความกว้างของวงใสนั้น ถ้าอัตราส่วนที่ได้มีค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่าเชื้อมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูง เพราะแม้มีการเจริญเพียงเล็กน้อย แต่สามารถปลดปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสออกมาได้มาก ซึ่งเกิดจากการกลายนั้นไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับนิวคลิโอไทด์ที่อยู่ในบริเวณของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์ mRNA ทำให้มีการผลิต mRNA ได้มากขึ้น ดังนั้นจึงทำให้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มาก ซึ่งเทียบได้กับ operator ใน operon ของ *E. coli* หรือเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้นั้น มี active site ที่ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง อันเนื่องจากการกลายเกิดขึ้นในบริเวณที่เป็น active site ในโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานดีขึ้น จึงทำให้เกิดวงใสเป็นบริเวณกว้าง เมื่อนำมาเป็นตัวหารความกว้างของโคโลนีจึงทำให้ได้ค่าอัตราส่วนที่ต่ำ ในทางกลับกันหากอัตราส่วนที่ได้มีค่าเข้าใกล้ 1 ย่อมแสดงว่าค่าความกว้างของวงใสมีค่าใกล้เคียงกับค่าความกว้างของโคโลนี การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีนี้ ยังให้ผลไม่ชัดเจนนักเพราะเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีหลายองค์ประกอบ แต่การวัดด้วยวิธีนี้วัดได้แค่ความสามารถในการใช้สารตั้งต้นที่เป็นเซลลูโลสของเชื้อไปเท่านั้น จึงปรากฏเป็น

บริเวณวงใส ดังนั้นจึงเป็นวิธีการวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นเท่านั้น จึงจำเป็นต้องมีการตรวจความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอย่างละเอียดต่อไป

จากผลการทดลองความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้น พบว่ามีสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงขึ้น 59 สายพันธุ์ก็จริง แต่เมื่อพิจารณาจากค่าทางสถิติแล้ว จะเห็นได้ว่ามีเพียง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ NTG25024 NTG25026 NTG30058 NTG30065 NTG30076 และ NTG300100 เท่านั้น ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในขั้นต้นสูงขึ้นอย่างชัดเจน

4. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

จากเหตุผลในข้อ 1. การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับ plate นั้นไม่เพียงพอและไม่เป็นที่ยอมรับในระดับอุตสาหกรรม ต่อการตัดสินว่าสายพันธุ์ใดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด จึงจำเป็นต้องนำแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร production ซึ่งเป็นสูตรที่ใช้ชักนำให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเก็บตัวอย่าง crude enzyme ไปตรวจสอบดูแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสทุกองค์ประกอบทุก ๆ 3 วัน เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 12 วัน เหตุที่ต้องเก็บเอนไซม์ไปตรวจสอบทุก ๆ 3 วัน เพราะเชื้อราจะมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าแบคทีเรีย จึงจำเป็นต้องให้ระยะเวลาในการพิจารณาความเปลี่ยนเล็กน้อย และการสิ้นสุดการตรวจสอบแอคติวิตีที่ 12 วัน เพราะในทางอุตสาหกรรมนั้น หากต้องใช้ระยะเวลาในการผลิตผลิตภัณฑ์ยาวนานเกินไปจะไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน ฉะนั้นหากเชื้อสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้ในระยะเวลาอันสั้น จึงเป็นที่ต้องการในทางอุตสาหกรรม (สมใจ ศิริโภค, 2537) การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสทุกองค์ประกอบทำให้เราทราบว่าสายพันธุ์กลายใดให้ค่าแอคติวิตีขององค์ประกอบใดสูง จึงสะดวกต่อการเลือกใช้ให้เหมาะสมกับงานที่ต้องการใช้แต่ละองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่แตกต่างกันออกไป

จากผลการทดลองในตารางที่ 5. จะเห็นว่าสายพันธุ์กลายแต่ละตัวให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดในแต่ละองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสแตกต่างกัน จึงเป็นข้อดีที่จะใช้ในการเลือกใช้เชื้อในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้เหมาะสมกับประเภทของงานแต่ละชนิด เช่น หากต้องการผลิตน้ำตาลเพื่อนำไปใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ ก็จำเป็นต้องใช้องค์ประกอบที่เป็น exoglucanase และ β-glucosidase เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคสอย่างสมบูรณ์ หรือหากต้องการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำยาปรับผ้านุ่มหรือกระดาษชำระชนิดที่เหนียวนุ่ม ก็ควรเลือกสายพันธุ์ที่ให้องค์ประกอบที่เป็น exoglucanase สูง เพราะจะช่วยย่อยเซลลูโลสให้ได้เส้นใยที่อ่อนนุ่ม แต่ไม่ทำลายเส้นใยจนกลายเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย อีกทั้งการปรับสภาพเส้นใยด้วยวิธีทางชีวภาพนี้ยังช่วยลดการแพ้ผ้าอันเนื่องจากสารเคมีที่ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์และลดต้นทุนในการกำจัดสารตกค้างต่าง ๆ ทั้งจากผลิตภัณฑ์และน้ำทิ้งที่จะเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

5. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG

จากผลการทดลองในตารางที่ 5. เชื้อสายพันธุ์กลายที่ให้ค่าแอคติวิตีของแต่ละองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดคือ สายพันธุ์กลาย UV10-14 ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase สูงสุด 0.076 U/ml สายพันธุ์กลาย UV102 ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ endoglucanase สูงสุด 0.735 U/ml และ สายพันธุ์กลาย UV107 ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ β-glucosidase สูงสุด 0.189 U/ml แต่จากการเปลี่ยนแปลงในทางพันธุกรรมทำให้สายพันธุ์ UV10-14 ไม่สร้างสปอร์ จึงเลือกเอาเฉพาะสายพันธุ์กลาย UV102 และ UV107 มาทำการกลายซ้ำด้วย NTG เพราะหากต้องการได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นมากๆ จำเป็นจะต้องทำการกลายอย่างต่อเนื่อง (อรพิน ภูมิภมร, 2527) อีกทั้งการกลายด้วยแสงอัลตราไวโอเลตนั้น มีโอกาสที่จะไม่มีความเสถียรของสายพันธุ์ได้สูงเนื่องจากกระบวนการ photoreactivation ที่อาจซ่อมแซมดีเอ็นเอให้กลับไปเหมือนเดิมได้ การกลายซ้ำด้วย NTG จึงเป็นสิ่งจำเป็น

การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG นั้น จำเป็นต้องเปลี่ยน marker จาก cycloheximide 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร amphotericin B ที่ความเข้มข้นเดียวกัน เพราะสายพันธุ์กลาย UV102 และ UV107 นั้น ได้ถูกปรับปรุงพันธุกรรมให้เปลี่ยนแปลงไป ให้มีความสามารถต้านทานต่อ cycloheximide ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแล้ว จึงจำเป็นต้องเปลี่ยน marker ที่เป็น antibiotic ตัวใหม่ที่สายพันธุ์กลาย UV102 และ UV107 ไม่มีพันธุกรรมที่ต้านทาน antibiotic ชนิดนี้ นั่นก็คือ amphotericin B ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดลองการกลายซ้ำด้วย NTG ของสายพันธุ์กลาย UV102 พบว่าทั้ง 6 ระดับความเข้มข้นของ NTG ให้สายพันธุ์กลายทั้งสิ้นเพียง 23 สายพันธุ์ ซึ่งเกิดจากการกลายซ้ำด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 15 สายพันธุ์ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 6 สายพันธุ์ และความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 2 สายพันธุ์ ซึ่งทำให้เห็นว่าการกลายซ้ำนั้นมีข้อดีก็จริง แต่ก็มีข้อเสียคือเชื้อจะมีความอ่อนแอลงมาก อันพิจารณาได้จากค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ที่มีค่าเป็น 0 ตั้งแต่ค่าความเข้มข้นของ NTG 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจเกิดจากการทำการกลายซ้ำที่กระทำต่อ genome เดิมของจุลินทรีย์ จึงมีผลให้เกิดการกลายที่อิ่มตัว ซึ่งจะสังเกตได้จากประสิทธิภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อสายพันธุ์กลายใหม่ที่ได้จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยหรือไม่เพิ่มเลย (อรพิน ภูมิภมร, 2527) เช่นเดียวกับการกลายซ้ำด้วย NTG ของสายพันธุ์กลาย UV102 การกลายซ้ำด้วย NTG ของสายพันธุ์กลาย UV107 ก็ให้สายพันธุ์กลายทั้งสิ้นเพียง 127 สายพันธุ์ ซึ่งเกิดจากการกลายซ้ำด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 81 สายพันธุ์ และความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 46 สายพันธุ์ ส่วนที่ความเข้มข้นอื่นไม่ปรากฏสปอร์ที่เจริญมาเป็นโคโลนีได้

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการทำการกลายด้วยแสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG ของสายพันธุ์กลาย UV102 และ UV107 จากการวัดวงใสที่เกิดขึ้น เมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMC agar โดยเทียบอัตราส่วนระหว่างความกว้างของโคโลนีกับความกว้างของวงใส โดยพิจารณาจากอัตราส่วนที่เข้าใกล้ 0 มากที่สุดนั้น กระทำด้วยเหตุผลเดียวกับการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่ามีสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากการทดสอบขั้นต้นได้สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ UV102 ทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์ ได้แก่ UV102NTG1001 UV102NTG1003 UV102NTG1004 UV102NTG1005 และ UV102NTG1006 ส่วนในสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลาย UV107 ซ้ำด้วย NTG ทั้ง 127 สายพันธุ์นั้น ไม่มีสายพันธุ์ใดที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากการทดสอบขั้นต้นได้สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ UV107

6. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ *Trichoderma reessei* QM9414

การนำผลการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสในทุกองค์ประกอบ ของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ NTG และการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG มาเทียบกับสายพันธุ์ดั้งต้น *Acrophialophora* sp. และ *Trichoderma reesei* QM9414 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าสายพันธุ์กลายที่ปรับปรุงได้นั้น มีคุณลักษณะที่ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น และเมื่อเทียบกับ *Trichoderma reesei* QM9414 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพราะเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตใช้ในอุตสาหกรรมปัจจุบัน มักผลิตจาก *Trichoderma reesei* QM9414 ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส แต่ในทางอุตสาหกรรมการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนั้น เป็นปัญหาอย่างยิ่งเพราะจำเป็นจะต้องใช้ระบบหล่อเย็น เพื่อควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส จึงต้องสิ้นเปลืองงบประมาณเป็นจำนวนมาก หากพัฒนาให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้นเพียง 5 องศาเซลเซียส ก็ช่วยประหยัดงบประมาณไปได้มาก (บุษบา ยงสมิทธ์, 2540) การเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสกับ *Trichoderma reesei* QM9414 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าสายพันธุ์กลายที่ได้มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงในภาวะที่มีอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม จึงน่าจะเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระบบอุตสาหกรรมมากกว่า *Trichoderma reesei* QM9414

จากผลการทดลองในตารางที่ 7. พบว่าสายพันธุ์กลาย UV10-14 ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase สูงสุด 0.076 U/ml ในวันที่ 3 ซึ่งเป็นค่า unit of enzyme ที่ค่อนข้างสูงและ

ใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้น จึงพิจารณานำสายพันธุ์กลาย UV10-14 มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป โดยจะวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเพียงองค์ประกอบเดียว คือ exoglucanase ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในการวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสโดยรวม เพราะการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้เข้าตัดพันธะอย่างสุ่ม การจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายในปริมาณมาก เพื่อส่งผลให้มีแอคติวิตีสูงจึงเป็นเรื่องยาก ดังนั้นหากวัดค่าแอคติวิตีของ exoglucanase ได้สูง แนวโน้มที่เอนไซม์เซลลูเลสองค์ประกอบอื่นๆ อาจจะสูงด้วยจึงมีมาก อีกทั้งวิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase ใช้เพียงกระดาษกรองเป็นสารตั้งต้น จึงทำให้การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase มีค่าใช้จ่ายถูกกว่าการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสอีก 2 องค์ประกอบที่เหลือ

7. การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย

7.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดได้พลังงานในการดำรงชีวิตแตกต่างกันไป จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้จะได้รับพลังงานจากแสง แต่จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองเป็นกลุ่ม chemoorganotroph ที่ได้พลังงานจากสารประกอบคาร์บอน ดังนั้นการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากปัจจัยภายนอก ในการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนนั้นจำเป็นจะต้องพิจารณาถึง ราคา ความบริสุทธิ์ ผลผลิตที่ต้องการ กฎหมาย วิธีการทำให้ปราศจากเชื้อของอาหาร (สมใจ ศิริโภค, 2537)

จากผลการทดลองพบว่า CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด อาจเนื่องจาก CMC เป็นเซลลูโลสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ที่ถูกปรับสภาพทางเคมีให้สามารถละลายได้ในน้ำ จึงมีการแตกตัวได้เป็นสารโมเลกุลเล็กลง เช่น เซลโลไบโอสและกลูโคส ซึ่งง่ายต่อการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ และอาจมีผลเข้าไปกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้เร็วและดีกว่าแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ที่ไม่ละลายน้ำ (Mandels, 1960)

การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นนั้นเป็นสิ่งสำคัญ เพราะคาร์บอนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ ดังนั้นหากปริมาณของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นน้อยไป อาจทำให้เชื้อตายได้ ส่วนหากมีความเข้มข้นมากเกินไป เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงแหล่งคาร์บอนก็จะเหลือและสูญเสียไปโดยเปล่าประโยชน์

จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 3 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์สูงสุด อาจเป็นเพราะที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับความเข้มข้นกลางๆ เพราะหากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงกว่านี้ อาหารจะหนืดมากเนื่องจาก CMC

ละลายได้ค่อนข้างยาก เมื่อเลี้ยงเชื้อไปความหนืดอาจทำให้การให้อากาศกับเชื้อเป็นไปได้ยาก เชื้อจึงอาจตายได้ในที่สุด

7.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเริ่มต้นนั้นเป็นสิ่งสำคัญเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน ในเซลล์ของจุลินทรีย์นั้นมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ตามปกติแล้วจะทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อ NH_4^+ ถูกใช้ไป และจะเกิด SO_4^{-2} ขึ้น ในทางตรงกันข้ามเมื่อ NH_4^+ และ SO_4^{-2} ถูกเปลี่ยนแปลงในกระบวนการเมตาบอลิซึมแล้ว ตามปกติจะทำให้เกิดสภาพที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับแอมโมเนียมไนเตรท นั้นมีความสามารถในการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ nitrate reductase ดังนั้นในระยะแรกแอมโมเนียจะถูกใช้ไปก่อน ทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรด จนกระทั่งแอมโมเนียหมด จุลินทรีย์จึงจะเปลี่ยนไปใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนแทน ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นเบสเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่อาจอยู่ในรูปของกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย เป็นต้น โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญได้ดีในอาหารที่เป็นอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และโดยเฉพาะพวกสายพันธุ์กลายที่เจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีกรดอะมิโนที่ต้องการเท่านั้น (สมใจ ศิริโภค, 2534) แต่ UV10-14 นั้นให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase สูงสุดเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต อาจเป็นเพราะเป็นสายพันธุ์กลายที่ไม่ขาดกรดอะมิโนสำคัญใด จึงผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตนั้น ตอนแรกจะทำให้ภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรด ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

ความเข้มข้นของไนโตรเจนนั้นมีค่าเหมาะสมคือ 0.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่น้อยเกินไปจนไม่เพียงพอต่อการเจริญ และไม่มากเกินไปจนทำให้ระบบของการเลี้ยงเชื้อเสียไป เพราะเมื่อ NH_4^+ และ SO_4^{-2} ถูกเมแทบอไลซ์หมดแล้ว จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพที่เป็นด่าง ซึ่งไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อราและความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส ที่อยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5-6.0 (Kishen Harvey และ Charless, 1981)

7.3 การศึกษา pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์กลาย UV10-14 ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase สูงสุดเมื่อเลี้ยงในค่า pH เริ่มต้น 5.0 อันอาจเนื่องมาจาก UV10-14 เป็นเชื้อรา จึงค่อนข้างที่จะชอบเจริญใน pH ที่มีค่าต่ำ อีกทั้งเอนไซม์เซลลูเลสยังสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วงค่า pH 4.5-6.0 โดยมีรายงานว่าหากค่า pH สุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีค่าสูงกว่า 6.0 จะส่งผลให้เอนไซม์เซลลูเลสมีปริมาณน้อยลง เพราะที่ค่า pH 6.0 อาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ (Kishen Harvey และ Charless, 1981)

7.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการบ่มเชื้อ

เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลัก ในการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงนำมาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ exoglucanase พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด อันเนื่องมาจากตลอดระยะเวลาในการคัดเลือกจะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียสทุกครั้ง และสายพันธุ์ *Acrophialophora* sp. ที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อตั้งต้นนั้น เป็นเชื้อราสายพันธุ์พื้นเมืองที่คัดแยกได้จากดินในประเทศไทย ซึ่งมีอุณหภูมิโดยเฉลี่ยค่อนข้างสูงอยู่แล้ว จึงอาจทำให้สายพันธุ์ UV10-14 มีคุณสมบัติในการทนร้อนได้ในระดับหนึ่ง

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

จากผลการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ *Acrophialophora* sp. โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่างจากแหล่งแสง 30 เซนติเมตร ด้วยเทคนิคการเกลี่ยโคนิเดียลงบนอาหารก่อนฉายแสง โดยใช้ CMC agar เป็น selective media และใช้ cycloheximide ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น marker พบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 10 นาที ให้ผลในการปรับปรุงสายพันธุ์ดีที่สุด คือ ให้สายพันธุ์กลายที่ให้ค่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงสุด 3 อันดับแรก คือ สายพันธุ์กลาย UV10-14 UV10-07 และ UV10-02 โดยให้ค่าอัตราส่วนเฉลี่ยระหว่างความกว้างของโคโลนีกับความกว้างของวงใส 0.716 0.772 และ 0.842 ตามลำดับ รองลงมาเป็นระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 5 นาที ให้ค่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงสุดเป็นลำดับที่ 4 และ 5 คือสายพันธุ์ UV05-20 และ UV05-22 โดยให้ค่าอัตราส่วนเฉลี่ยระหว่างความกว้างของโคโลนีกับความกว้างของวงใส 0.858 และ 0.870 ตามลำดับ โดยที่ระยะเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 10 และ 5 นาทีนี้ มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของโคนิเดีย 0.10 และ 0.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. การทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

จากผลการทดลองตามตารางที่ 3. พบว่าสายพันธุ์กลาย UV10-14 UV10-02 UV10-07 UV05-20 และ UV05-22 ทั้ง 5 สายพันธุ์ ยังคงมีคุณสมบัติในการต้านทาน cycloheximide ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังคงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสตามการทดสอบขั้นต้นได้เหมือนเดิม

3. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)

จากผลการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ *Acrophialophora* sp. โดยใช้ NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ชักนำให้เกิดการกลายนั้น ความเข้มข้นของ NTG ที่เหมาะสมที่สุด ที่ทำให้ได้สายพันธุ์

กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงที่สุด คือ การใช้ NTG เข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแช่โคนิเดียไว้ในสารละลาย NTG นาน 15-20 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะเขย่า โดยสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงที่สุด คือ สายพันธุ์กลาย N300-100 ให้ค่าอัตราส่วนเฉลี่ยระหว่างความกว้างของโคโลนีกับความกว้างของวงใสต่ำที่สุดเท่ากับ 0.656 โดยสายพันธุ์กลายอีก 5 สายพันธุ์ ที่ให้ค่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงสุดรองลงมาคือ N300-058 N250-024 N300-065 N300-076 และ N250-026 ตามลำดับ โดยให้ค่าอัตราส่วนเฉลี่ยระหว่างความกว้างของโคโลนีกับความกว้างของวงใสเท่ากับ 0.752 0.830 0.834 0.842 และ 0.844 ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นของ NTG 300 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของโคนิเดีย 0.04 และ 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

จากผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในแต่ละองค์ประกอบ ของสายพันธุ์กลายที่ปรับปรุงได้จากการฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 5 สายพันธุ์ คือ UV10-14 UV10-07 UV10-02 UV05-20 และ UV05-22 เทียบกับ *Acrophialophora* sp. พบว่า สายพันธุ์กลาย UV10-14 ให้ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase สูงที่สุด 0.076 U/ml ที่ระยะเวลาการผลิต 3 วัน โดยมีค่าสูงกว่าก่อนปรับปรุงสายพันธุ์ 1.95 เท่า สายพันธุ์กลาย UV10-02 ให้ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ edoglucanase สูงที่สุด 0.735 U/ml ที่ระยะเวลาการผลิต 12 วัน โดยมีค่าสูงกว่าก่อนปรับปรุงสายพันธุ์ 1.70 เท่า และสายพันธุ์กลาย UV10-07 ให้ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ β-glucosidase สูงที่สุด 0.189 U/ml ที่ระยะเวลาการผลิต 6 วัน โดยมีค่าสูงกว่าก่อนปรับปรุงสายพันธุ์ 4.20 เท่า

5. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG

จากผลการศึกษาในข้อ 4. จึงพิจารณานำสายพันธุ์กลาย UV10-14 UV10-02 และ UV10-07 มาปรับปรุงสายพันธุ์ต่อโดยการชักนำให้เกิดการกลายซ้ำด้วย NTG แต่จากการเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมจากการฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ทำให้สายพันธุ์กลาย UV10-14 สูญเสียความสามารถในการสร้างโคนิเดียไป จึงเลือกเพียงสายพันธุ์กลาย UV10-02 และ UV10-07 มาทำการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป

จากผลการปรับสายพันธุ์ของสายพันธุ์กลาย UV10-02 โดยการชักนำให้เกิดการกลายซ้ำด้วย NTG พบว่าความเข้มข้นของ NTG ที่เหมาะสมที่สุด ที่ทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีประ

สิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงที่สุด คือ การใช้ NTG ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงที่สุด 5 ลำดับแรก คือ สายพันธุ์กลาย UV10-02-N100-01 UV10-02-N100-04 UV10-02-N100-06 UV10-02-N100-03 และ UV10-02-N100-05 ให้ค่าอัตราส่วนเฉลี่ยระหว่างความกว้างของโคโลนีกับความกว้างของวงใสเท่ากับ 0.742 0.770 0.778 0.784 และ 0.784 ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของโคนิเดียเท่ากับ 0.004 เปอร์เซ็นต์

จากผลการปรับสายพันธุ์ของสายพันธุ์กลาย UV10-07 โดยการชักนำให้เกิดการกลายซ้ำด้วย NTG พบว่าไม่มีสายพันธุ์ใดที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงกว่าสายพันธุ์กลาย UV10-07 เลย

6. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ *Trichoderma reessei* QM9414

จากผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในแต่ละองค์ประกอบของสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุด ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วย NTG และที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG รวมทั้งสิ้น 16 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับ *Acrophialophora* sp. และ *Trichoderma reesei* QM9414 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า สายพันธุ์กลาย UV10-14 ให้ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase สูงที่สุด 0.076 U/ml ที่ระยะเวลาการผลิต 3 วัน โดยมีค่าสูงกว่า *Trichoderma reesei* QM9414 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 3.62 เท่า สายพันธุ์กลาย UV10-02 ให้ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ endoglucanase สูงที่สุด 0.735 U/ml ที่ระยะเวลาการผลิต 12 วัน โดยมีค่าสูงกว่า *Trichoderma reesei* QM9414 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24.5 เท่า และสูงกว่า *Trichoderma reesei* QM9414 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 1.46 เท่า สายพันธุ์กลาย UV10-07 ให้ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ β-glucosidase สูงที่สุด 0.189 U/ml ที่ระยะเวลาการผลิต 6 วัน โดยมีค่าสูงกว่า *Trichoderma reesei* QM9414 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 5.25 เท่า และสูงกว่า *Trichoderma reesei* QM9414 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 1.89 เท่า

7. การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย

จากผลการทดลองข้อ 6. พิจารณาเลือกสายพันธุ์กลาย UV10-14 มาทดสอบหาภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ exoglucanase คือ การเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบ

ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ CMC .เป็นแหล่งคาร์บอน 0.08 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมี pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองทำให้สามารถเลือกใช้สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในแต่ละองค์ประกอบให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ในแต่ละอุตสาหกรรม เช่น การเลือกใช้สายพันธุ์กลาย UV10-02 ในการผลิตเอนไซม์ endoglucanase เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำน้ำยาปรับผ้านุ่ม การเลือกใช้สายพันธุ์กลาย UV10-07 ในการผลิตเอนไซม์ β-glucosidase เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกลูโคส และการเลือกใช้สายพันธุ์กลาย UV10-14 ในการผลิตเอนไซม์ exoglucanase เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

บุษบา ยงสมิทธ์. 2540 จุลชีววิทยาการหมักวิตมินและสารสี. กรุงเทพฯ.: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2541. พันธุ์ศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2534. เอนไซม์ทางอาหารตอนที่ 2. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรเทพ ถนนแก้ว. 2538. ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* Perrine. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. สหมิตรออฟเซท. กรุงเทพฯ. 250 หน้า.

อรพิน ภูมิภมร. 2527. ระบบชีวภาพที่สำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพเล่มที่ 3: การควบคุมระบบจุลินทรีย์อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิต. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อาทิตย์ ปุษยะนาวิน. 2539. การคัดเลือกมิวแตนท์ของ *Pachysolen tanophilus* ที่หมักไซโลสโดยการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

AbdElNasser, N. H., Helmy, S. M., and ElGammal, A. A. 1997. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi. Polymer Degradation and Stability. vol. 55 (3) pp. 249-255.

Abrha, B., and Gashe, B. A. 1992. Cellulase production and activity in a species of Cladosporium. World Journal of Microbiology and Biotechnology. vol. 8 pp. 164-166.

Aiba Shuichi, Humphrey E. Arthur and Millis F. Nancy. 1973. Biochemical Engineering. Secound Edition. Academic Press Inc. New York. pp. 39-44.

Alberto., A., Owen., P., W., and D'Souza., J. 1991. Use of mutation strategies applied to *Aspergillus torreus* ATCC 52430 to obtain mutants with improved cellulase productivity. Biotechnology Technology 5: 283-288.

Ali, S., and Sayed, A. 1992. Regulation of cellulase biosynthesis in *Aspergillus terreus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 80: 73-75.

Anne, B. Bjerre, Anne B. Olesen, Tomas, F., Annette, P., and Anette, S. Schmidt. 1996. Pretreatment of Wheat Straw Using Combined Wet Oxidation and Alkaline Hydrolysis Resulting in Convertible Cellulose and Hemicellulose. Biotechnology and Bioengineering. vol 49 pp. 568-577.

Auerbach, C. 1976. Mutation research. Champ & Hall. London. 504 pp.

Basil, J. M. 1984. Production and characterization of cellulase and β-glucosidase from a mutant of *Alternaria alternata*. Applied Environmental Microbiology. vol. 47 pp. 560-565.

Bastawde, K. B. 1992. Cellulolytic enzymes of a thermotolerant *Aspergillus terreus* strain and their action on cellulosic substrates. World Journal of Microbiology and Biotechnology. vol. 8 pp. 45-49.

Beldman, G., Veragon, A. G., Rombout, F. M., Searle-vanleevwen, M. F., and Pilnic. 1987. Adsorption and kinetic behavior of purified endoglucanase and exoglucanases from *Trichoderma viride*. Biotechnology and Bioengineering. vol. 30 pp. 251-257.

Blazej, A., Kosik, M., and Spilda, I. 1990. The degradation of cellulose by thermal, chemical and biochemical techniques. In Cellulose Sources and Exploitation Industrial Utilization, Biotechnology and Physico-chemical Properties. Kennedy, J. F., Phillips, G. O., and Williams, P. A. (Eds.) Ellis Horwood LTD. England. pp. 385-396.

Brown, T. A. 1992. Genetic a Molecular Approcah. 2nd edition. London : Chapman & Hall.

Cai, Y. J., Buswell, J. A., and Chang, S. T. 1998. beta-glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. Enzyme and Microbial Technology. vol 22 (2) pp. 122-129.

Carton, B. C., and Brown, B. J. 1981. Gene Mutation. Nester, E. W. (ed.) Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington, D. C. pp. 221-227.

Cess, J. Bos, and David Stadler. 1996. Mutation. In Fungal Genetic: Principles and Practice. Cess J., Bos (Eds) Marcel Dekker, Inc. New York. 442 p.

Cowling, E. B., and Kirk, T. K. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. Biotechnology and Bioengineering Symp. No. 6 : pp. 95-123.

Crueger W. and A. Crueger. 1984. Strain Development. Biotechnology. (Brock, D., ed). Chep. 3. Science Techno, Inc. U.S.A. pp. 9-15.

Davies, O. L. 1964. Screening for Improved Mutants in Antibiotic Reasearch. Biometrics. 20. pp. 576-591.

Ericksson, K. E. L., Blanchette, R. A., and Ander, P. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. Ozach Gmbh and Co., Berlin Germany. pp. 181-222.

Esterbauer., H., Steiner., W., Labudova., I., Hemann., A., and Hayn., M. 1991. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. Bioresource Technology 36: 37-50.

Fantini, A. A. 1975. Strain Developnent. John, H. H. (ed.) Method in Enzymology. vol. 43. Antibiotic. Academic Press. New York. pp. 24-41.

Ferchak, J. D., and Pye, E. K. 1983. Effect of cellobiose, glucose, ethanol and metal ions on the cellulase enzyme complex of *Thermomonospora fusca*. Biotechnology and Bioengineering. 25: 2865-2872.

Fogarty., W., M. 1983. Microbial Enzymes and Biotechnology. London: Applied science publishers Ltd.

Gash, B. A. 1992. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. Journal of Applied Bacteriology. vol. 73 pp. 79-82.

Ghose., T., K. 1987. Measurement of cellulase activities. International Union of Pure and Applied Chemistry 59: 257-268.

Goksoyr, J. and Eriksen, J. 1980. Microbial Enzyme and Bioconversion. In Economic Micobiology. Rose, A. H. Ed. Acadamic Press. vol. 5 pp. 283-330.

Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W., and Esterbauer, H. 1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. Applied Microbiology and Biotechnology. vol. 36 pp. 701-707.

Gomes, J., Gomes, I., Esterbauer, H., Kreiner, W., and Steiner, W. 1989. Production of cellulase by a wild strain of *Gliocladium virens*: optimization of the enzyme. Applied Microbiology and Biotechnology. vol. 31 pp. 601-608.

Goodenough, U. 1978. Genetics. 2nd edition. London: Holt, Rinehart and Winston.

Goodenough, U. 1984. Genetics. CBS college Publishing. USA. pp. 230-257.

Goyal., A., Ghosh., B., and Eveleigh., D. 1991. Charateristies of fungal cellulases. Bioresource Technology 36: 37-50.

Inagaki, H., and Phillips, O. G. 1989. Cellulosics Utilization: Researce and Rewards in Cellulosics. The Universities Press (Belfast) Ltd. 271 p.

Jana., S., K., Ghosh., V., K., and Singh., A. 1994. Production and hydrolytic potential of cellulase enzymes from a mutant strain of *Trichoderma reesei*. Biotechnology and Applied Biochemistry 20: 233-239.

Jin, F., and Toda, K. 1989. Nutrient effects on cellulase production by the new species, *Clostridium thermocopriae*. Applied Microbiology and Biotechnology. vol. 31 pp. 579-600.

Kawamori, M., Morikawa, Y., Ado, Y., and Takasawa, S. 1986. Production of cellulases from alkali-treated bagasse in *Trichoderma reesei*. Applied Microbiology and Biotechnology. vol. 24 pp. 454-458.

Kesdar, S. S. 1992. Cellulase production by *Penicillium janthinellum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. vol. 8 pp. 534-535.

Kirk, T. K. 1983. Degradaton and Conversion of lignocellulosic. In Smith, J. E., Berry, D. R., and Kristiansen, B. (eds.), The filamentous fungi. vol. 4. Edward Arnold. New York.

Kirk, T. K, and Farrel, R. L. 1987. Enzymatic combustion the microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol. 41: 465-505.

Kishen, S. T., Harvey, W. B., and Charles. R. W. 1981. Enhanced production of cellulase, hemicellulase, β-glucosidase by *Trichoderma reesei* (Rut C-30). Biotechnology and Bioengineering. vol. 13 pp. 1837-1849.

Kuhad., R., C., Kumar., M., and Singh., A. 1994. A hyper cellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. Letters in Applied Microbiology 19: 397-400.

Labudova., I., Czajkowska., D., Hayn., M., Steiner., W., and Esterbauer., H. 1989. Investigations on the physiology, mutagenesis and cellulase production of *Gliocladium virens*. Journal of Biotechnology 12: 123-134.

Lee, S. B., Shin, H. S., and Ryu, D. D. Y. 1982. Adsorption of cellulase on cellulose: Effect of Physiochemial Properties of Cellulose on Adsorption and Rate of Hydrolysis. Biotechnol. & Bioeng. 25: pp. 2137-2153.

Lloyd, J. R. 1986. Gene and Chromosomes. The Camelot Press Ltd. Southampton. 109 p.

Macris, B. J., Kekos, D., and Evangelidou, X. 1989. A simple and inexpensive method for cellulase and β-glucosidase by *Neurospora crassa*. Applied Microbiology and Biotechnology. vol. 31 pp. 150-151.

Maglione, G. Russell, B. James, and Wilson, B. David. 1997. Kinetics of Cellulose Digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. Applied and Environmental Microbiology. vol. 63: (2) pp. 665-669.

Maheswari, D. K., Jahan, H., Paul, J., and Varma, A. 1993. Wheat straw, a potential substrate for cellulase production using *Trichoderma reesei*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. vol. 9 pp. 120-121.

Mandels, M. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. Journal of Bacteriology. 79: pp. 816-826.

Mandels, M., James, W., and Richard, P. 1971. Enhance cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. Applied Microbiology. vol. 21 (1) pp. 152-154.

Nisizawa, K. 1973. Mode of the action of cellulase. J. Ferment. Technol. 51(4) pp. 267-304.

Norkrans, B. 1967. Cellulose and Cellulolysis. In W. W. Umbreit. (ed.), Adv. Appl. Microbiol. 9: 91-13.

Okeke, B. C., and Obi, S. K. C. 1993. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an *Arthrographis* species. World Journal of Microbiology and Biotechnology. vol. 9 pp. 345-349.

Paturau, J. M. 1989. Bagasse by Production of the Cane Sugar Industry. 3rd Elsevier Science Publisher Ltd. Great Britain.

Prasertsan, P., and Doelle, H.W. 1986. Separation and characterization of endoglucanase from culture filtrates of *Cellulomonas* sp.. Applied Microbiology and Biotechnology 24: 326-333.

Prescott, R. P., and Dunn, C. G. 1959. Industrial Microbiology. 3rd Kogakusha Ltd. Tokyo. 900 pp.

Raimo, Alen. 1990. Conversion of cellulose-containing materials into useful products. In J. F. Kennedy, G. O. Phillips, and P. A. Williams. (ed.), Cellulose Sources Exploitation Industrial Utilization, Biotechnology and Physico-chemical Propertics. Ellis Horwood Limited. England.

Rao, M. N. A., and Mithal, B. M. 1983. Productions of cellulase from *Pestalotiopsis versicolor*. Biotechnology and Bioengineering. vol. 25 pp. 2395-2398.

Robinson, D. G. 1977. Plant cell wall synthesis. Adv. Bot. Res. 5: pp. 300-312.

Ryu., D., and Mandels., M. 1980. Cellulsae: biosynthesis and applications. Enzyme and Microbial Technology 2: 91-102.

Sandana, J. C., Shewele, J. G., and Deshpande, M. V. 1979. Enhanced of cellulase production by mutant of *Sclerotium rolfsii*. Applied and Environmental Microbiology. vol. 38 pp. 730-733.

Sandhu, D. K., and Arora, D. S. 1985. Cellulase production by species of Acrophialophora & Thielavia. Indian Phytopathology. vol. 38 pp. 267-269.

Schafner, D. W., and Toledo, R. T. 1992. Cellulase production in continuous culture by *Trichoderma reesei* on xylose-based media. Biotechnology and Bioengineering. vol. 39 pp. 865-869.

Sikyta, B. 1983. Methods in Industrial Microbiology. John willey & sons, New York pp. 214-249.

Siu, R. G. H. and Reese, E. T. 1953. Botany Review. 19: pp. 377-416.

Soundar, S., and Chandra, T. S. 1988. Production of cellulase and detection of avicel-adsorbing carboxymethylcellulase from a mesophilic fungus *Humicola grisea* Fb. Enzyme Microbiology Technology. vol. 10 pp. 368-374.

Sterberg., D., Vijayakumar., P., and Reese., E., T. 1977. β-Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Canadian Journal of Microbiology 23: 139-147.

Svetlana,V., Mark, R. M., and David, F. O. 1997. Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30. Journal of Biotechnology vol. 54 pp. 83-94.

Tan, T. K., Yeoh, H. H., and Tian, K. E. 1985. Cellulolytic fungi isolated from wood shavings. Mycopathologia. vol. 90. pp. 97-99.

Tony, G. and John, r. 1983. The application of enzymes in industry. Industrial Enzymology. Great Britain.

Viikari, L., Kantelinen, A., Ratto, M., and Sundquist, J. 1991. Enzyme in Pulp and Paper Processing. In Gary, F. Leatham and Michael, E. Himmel, (ed.), Enzyme in Biomass Conversion. American Chemical Society. Washington D. C. 520 pp.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

1. Potato dextrose agar (PDA) ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลแดร็กโตส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำมันฝรั่งที่ล้างสะอาดแล้วมาหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไปต้มในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุกโดยสังเกตได้จากเมื่อใช้มือบีบแล้ว มันฝรั่งจะแตกออกโดยง่าย จากนั้นใช้ผ้าขาวบางกรองเอาแต่ส่วนน้ำ เติมส่วนประกอบที่เหลือลงไป คนให้ละลายหมด ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 5.0-5.5 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. Carboxymethyl cellulose agar (Hankin and Anagnostakis, 1977) ประกอบด้วย

$(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัม
Carboxymethyl cellulose	5.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
agar	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลาย carboxymethyl cellulose (CMC) ในน้ำอุ่น 500 มิลลิลิตร โดยใส่ CMC ทีละน้อย พร้อมกับการคนตลอดเวลา จนกระทั่ง CMC ละลายหมด จึงละลายส่วนผสมที่เหลือแล้วเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. **Production medium** (Punnapayak and Emert, 1986) ประกอบด้วย

$MgSO_4$	1.0	กรัม
$CaHPO_4$	5.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	4.0	กรัม
Cornsteep liquor	7.0	กรัม
Microcrystalline cellulose	30.0	กรัม
Tween 80	2.0	มิลลิลิตร
$FeSO_4$	5.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	1.4	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	1.6	มิลลิกรัม
$CoCl_2$	3.6	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้ได้ 5.0 ถ่ายใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

หมายเหตุ : microcrystalline cellulose ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงต้องชั่งใส่ฟลาสก์ก่อน แล้วจึงเติมสารอาหารลงไปให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ซ

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid) (Miller, 1959)

1.1 เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย phenol 10 กรัม เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 96 มิลลิลิตร เติม $NaHSO_3$ 9.6 กรัม คนให้เข้ากัน

1.2 เตรียมสารละลาย DNS 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 880 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย Rochell salt 255 กรัม ด้วยสารละลาย NaOH 4.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเทรวมกับสารละลาย DNS 1 เปอร์เซ็นต์ คนให้เข้ากัน

1.3 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1.1 และ 1.2 เทรวมกัน จะได้เป็นสารละลาย DNS สารละลายนี้ต้องใส่ไว้ในขวดสีชา แล้วนำไปใส่ในตู้เย็นก่อนอย่างน้อย 1 คืน จึงนำไปใช้ได้

2. การเตรียม 0.05 M citrate buffer pH 4.8

ชั่ง sodium citrate มา 14.71 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย เติม 1 M HCl ลงไป 70 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้เกือบครบปริมาตร 1 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 4.8 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ถ้าต้องการเตรียม 0.025 M citrate buffer pH 4.8 ให้ชั่ง sodium citrate มา 7.35 กรัม

3. การเตรียมสารละลาย phosphate buffer pH 7.0

3.1 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M โดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3.2 เตรียมสารละลายโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต 0.1 M โดยละลาย KH_2PO_4 13.62 กรัม ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3.3 เตรียมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 M โดยละลาย KCl 7.46 กรัม ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3.4 ผสมสาระลายทั้ง 3 ในอัตราส่วน 3.1: 3.2 : 3.3 เท่ากับ 291: 500: 209 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0

4. การเตรียมสารละลาย **Tris-maleate buffer pH 6.0** ประกอบด้วย

Tris-maleate	6.0	กรัม
maleic acid	5.8	กรัม
ammonium sulfate	1.0	กรัม
ferrous sulfate	0.25	มิลลิกรัม
magnesium sulfate	0.1	กรัม
calcium nitrate	0.005	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.0 จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การป้องกันอันตรายจากสารกลายพันธุ์

แสงอัลตราไวโอเลต

เป็นรังสีที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ที่อาจส่งผลให้เกิดมะเร็งผิวหนังกับมนุษย์ได้ การปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับแสงอัลตราไวโอเลตจึงควรสวมถุงมือตลอดเวลาที่ทำงานภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และไม่ควรมองแสงจากหลอดแสงอัลตราไวโอเลตโดยตรง ควรมีการสวมแว่นป้องกันหรือใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่อยู่ภายใต้ตู้เขี่ยเชื้อที่มีกระจกกั้น เพราะแสงอัลตราไวโอเลตเป็นแสงที่มีอันตรายต่อสายตา แต่มีความสามารถในการทะลุทะลวงต่ำจึงผ่านกระจกได้ไม่ดี

สารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)

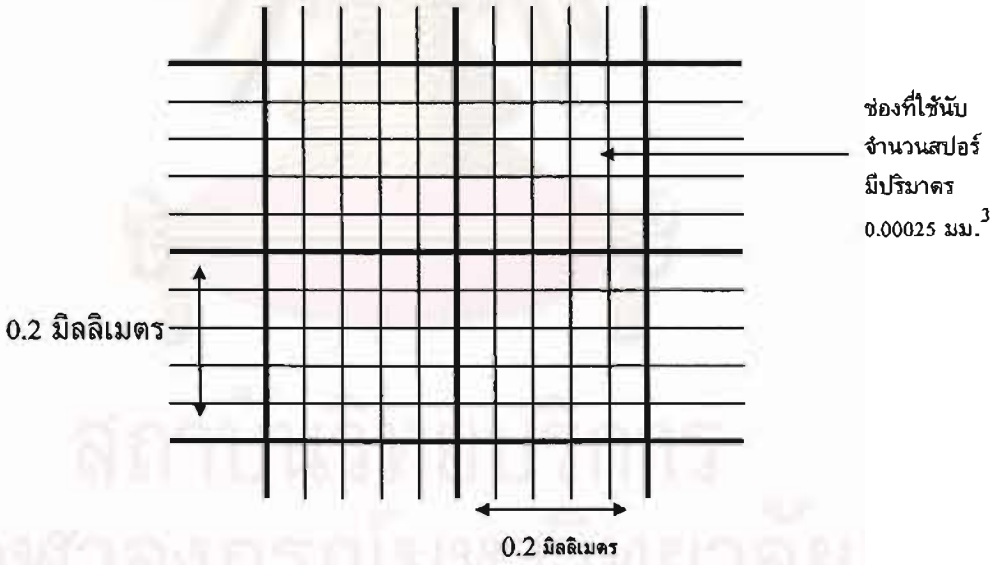
สาร NTG เป็นสารที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต และเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ด้วย ดังนั้นในการวิจัยจึงจำเป็นต้องทำด้วยความระมัดระวังอย่างยิ่ง เพราะ NTG เป็นสารที่อันตรายต่อการสัมผัสและการสูดดม การวิจัยที่ต้องใช้ NTG ทั้งในลักษณะผลึกของแข็งหรือสารละลาย จึงควรสวมถุงมือยางป้องกันตลอดเวลาและควรสวมผ้าปิดปากและจมูก เพื่อป้องกันละอองหรือไอระเหยของสาร ห้ามใช้ปากในการดูดปิเปตสารนี้เด็ดขาด การชั่ง NTG ควรทำในที่ไม่มีลมพัด ไม่ควรชั่งบนกระดาษ เพราะอาจปลิวไปทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ทดลองหรือผู้ที่อยู่บริเวณใกล้เคียงได้ อย่าเปิดขวดสาร NTG ค้างทิ้งไว้ ภาชนะที่ใช้ในการชั่ง NTG ควรเป็นภาชนะปลอดเชื้อ (sterilized) ที่แห้งและมีฝาปิดมิดชิด โดยชั่งน้ำหนักภาชนะเปล่าก่อน แล้วจึงใช้ช้อนตักสารตัก NTG ลงในภาชนะปิดฝาให้มิดชิด นำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง นำไปคำนวณน้ำหนักของ NTG ทำเป็นสารละลายในรูปของ stock solution ซึ่งควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้

อุปกรณ์ทุกชนิดที่สัมผัสกับ NTG ต้องนำไปแช่ใน 1 N NaOH ในตู้ควัน เปิดเครื่องให้ดูดไอระเหยออก ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง จึงนำมาล้าง ขณะล้างต้องสวมถุงมือทุกครั้ง ถุงมือที่ใช้กับงานวิจัย NTG ควรเป็นชนิดที่ใช้ครั้งเดียวทิ้งไม่ควรนำกลับมาใช้ใหม่อีก

ภาคผนวก ง

การตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยวิธี Direct Microscopic Count โดยใช้ Counting chamber ของ Haemacytometer

Haemacytometer เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือด แต่ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนจุลินทรีย์และสปอร์ของเชื้อรา เครื่องมือนี้เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้แน่นอนและมีขอบยกสูงจากบริเวณที่ขีดไว้ เมื่อปิดด้วย cover glass และสไลด์ ในบริเวณที่มีขีดคิดเป็นความลึก 0.1-0.2 มิลลิเมตร แล้วแต่บริษัทผู้ผลิต ขีดแบ่งที่กำหนดไว้ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่ 25 ช่องแต่ละช่องมีขนาด 0.2 x 0.2 ตารางมิลลิลิตร ในแต่ละช่องใหญ่นี้มีขีดแบ่งเป็นช่องเล็กอีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีเนื้อที่ 0.05 x 0.05 ตารางมิลลิลิตร ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในช่องจะมีปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (0.05 x 0.05 x 0.1) เครื่องมือนี้จะมี cover glass ที่มีขนาดและความหนาเฉพาะ จึงไม่ควรใช้ cover glass อื่นปิดแทน เนื่องจากน้ำหนักของกระจกจะมีผลทำให้ปริมาตรภายในช่องสไลด์กับกระจกปิดนี้ผิดไปได้ อีกประการหนึ่ง ถ้ากระจกหนาเกินไปจะมีปัญหาต่อการโฟกัสกล้อง



ตัวอย่างช่องสี่เหลี่ยมภายในสไลด์

การตรวจนับ : ตัวอย่างสปอร์ ควรเจือจางในระดับที่สามารถจะตรวจนับจำนวนได้สะดวกในแต่ละช่องเล็ก ควรมีจำนวนอยู่ระหว่าง 1-10 เซลล์ เมื่อตรวจนับให้ปฏิบัติดังนี้

- ล้างเครื่องมือให้สะอาดและเช็ดให้แห้ง
- ปิดทับบริเวณสี่เหลี่ยมซึ่งมีช่องแบ่ง ด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) ที่จำเพาะเจาะจง

- ใช้ปิเปตที่มีความจำเพาะกับเครื่องนี้ โดยแตะปลายปิเปตที่ช่องว่างระหว่างสไลด์และกระจกปิด โดยปล่อยให้ตัวอย่างค่อยๆ ซึมผ่านเข้าไปในบริเวณช่องซึ่งกำหนดปริมาตรดังกล่าวไว้ข้างต้น

- ตรวจนับโดยใช้ objective กำลังขยาย 40 เท่า

- นับจำนวนสปอร์ในแต่ละช่องเล็ก การตรวจนับควรตรวจนับทั้งสิ้นมากกว่า 10 ช่องขึ้นไป

การคำนวณ : ปริมาตรของสปอร์คำนวณหาจากจำนวนที่นับได้จากแต่ละช่องเล็กหารด้วยจำนวนช่อง จะได้ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์**ต่อหน่**วยช่องเล็ก สมมติเป็น N เซลล์ต่อช่องเทียบหาค่าใน 1 มิลลิเมตร ดังนี้

ตัวอย่าง 0.00025 **มม.^{3} มี**จำนวนสปอร์ = N เซลล์

ตัวอย่าง 1.0 มม.^{3} มีจำนวนสปอร์ = $\frac{N \times 10^3}{0.00025}$ เซลล์

= $4N \times 10^6$ เซลล์

ภาคผนวก จ

การวัดปริมาณเอนไซม์

1. การวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยการวิเคราะห์หา FPA ตามวิธีการของ Ghose (1987)

1.1 นำ crude enzyme มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ

1.2 เติม 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 1.0 x 6.0 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) เขย่าให้เข้ากัน

1.3 นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

1.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

1.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M citrate buffer pH 4.8 เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน

2. การวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยการวิเคราะห์หา CMCase ตามวิธีการของ Ghose (1987)

2.1 นำ crude enzyme มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ

2.2 เติม 2% CMC ที่ละลายใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.3 นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M citrate buffer pH 4.8 เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน

3. การวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยการวิเคราะห์หา β-glucosidase ตามวิธีการของ Sternberg และคณะ (1976)

3.1 นำ crude enzyme มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ

3.2 เติมสารละลาย salicin ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน 0.025 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3 นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.025 M citrate buffer pH 4.5 เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน

4. การคำนวณหาค่า unit of enzyme ตามวิธีการของ The International Union of Biochemistry

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ นั่นคือ

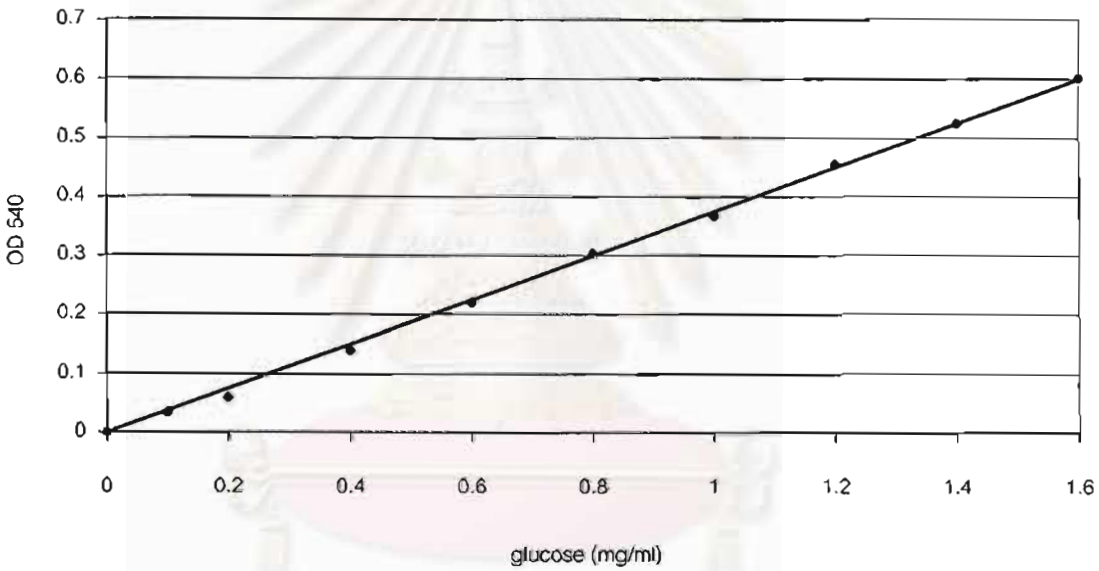
1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 μM ของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที
= 1 μM ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที
= 0.180 มิลลิกรัม ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐาน

การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐานทำได้โดย เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปตั้งในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 20 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสดังแสดงในภาพที่ 22.



ภาพที่ 22. กราฟน้ำตาลมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช

ตาราง ANOVA

ตารางที่ 15. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงกว่า *Acrophialophora* sp. ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	34	0.3408	0.0100	17.27**
Error	140	0.0813	0.0006	
Total	174	0.4221		

** significant at 1% level

CV = 2.7%

ตารางที่ 16. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงกว่า *Acrophialophora* sp. ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ NTG

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	58	0.6467	0.0112	16.77**
Error	236	0.1569	0.0007	
Total	294	0.8036		

** significant at 1% level

CV = 2.8%

ตารางที่ 17. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นของ *Acrophialophora* sp. และสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขั้นต้นสูงกว่า *Acrophialophora* sp. ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	0.0268	0.0054	3.98**
Error	24	0.0323	0.0013	
Total	29	0.0591		

** significant at 1% level

CV = 4.7%

ตารางที่ 18. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย UV10-14 ในอาหารสูตร production ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	23	0.1023	0.004	127.86**
Error	192	0.0067	0.0000	
Total	215	0.1090		

** significant at 1% level

CV = 23.4%

ตารางที่ 19. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย UV10-14 ในอาหารสูตร production ที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	19	0.0267	0.0014	17.42**
Error	40	0.0032	0.0000	
Total	59	0.0299		

** significant at 1% level

CV = 53.2%

ตารางที่ 20. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย UV10-14 ในอาหารสูตร production ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	15	0.0557	0.0037	50.34**
Error	128	0.0094	0.0001	
Total	143	0.0651		

** significant at 1% level

CV = 30.16%

ตารางที่ 21. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย UV10-14 ในอาหารสูตร production ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	23	0.0188	0.0008	6.94**
Error	48	0.0056	0.0001	
Total	71	0.0244		

** significant at 1% level

CV = 43.50%

ตารางที่ 22. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย UV10-14 ในอาหารสูตร production ที่ปรับค่า pH เริ่มต้นต่าง ๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	23	0.0943	0.0041	80.16**
Error	192	0.0098	0.0001	
Total	215	0.1042		

** significant at 1% level

CV = 31.83%

ตารางที่ 23. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน unit of enzyme ของเอนไซม์ exoglucanase ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย UV10-14 ในอาหารสูตร production ที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	19	0.0258	0.0014	20.09**
Error	40	0.0027	0.0001	
Total	59	0.0285		

** significant at 1% level

CV = 39.60%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นายพิสุทธิ์ พวงนาค เกิดเมื่อวันที่ 6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2516 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยาทั่วไป ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในปีการศึกษา 2538 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย