

การเพิ่มเซลล์สแอกทีวิตีของ *Trichoderma reesei* TISTR 3081 โดยการกลายพันธุ์ที่ถูก  
เหนี่ยวนำด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต รังสีอัลตราไวโอเล็ต และโคลชิซิน

นางสาวมหัทธนี ภิญโญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CELLULASE ACTIVITY ENHANCEMENT OF *Trichoderma reesei* TISTR 3081 BY  
INDUCED MUTATION WITH ETHYLMETHANESULFONATE ULTRAVIOLET RADIATION  
AND COLCHICINE

Miss Mahattanee Phinyo

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University



มัทธนีย์ ภิญญา : การเพิ่มเซลลูเลสแอกทิวิตีของ *Trichoderma reesei* TISTR 3081 โดยการกลายพันธุ์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต รังสีอัลตราไวโอเลต และโคลชิซิน (CELLULASE ACTIVITY ENHANCEMENT OF *Trichoderma reesei* TISTR 3081 BY INDUCED MUTATION WITH ETHYLMETHANESULFONATE ULTRAVIOLET RADIATION AND COLCHICINE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล, 124 หน้า.

ลิกโนเซลลูโลซิก เอทานอลเป็นพลังงานหมุนเวียนทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจโดยอาศัยเซลลูเลสในการย่อยสลาย แต่ในขณะเดียวกันเอนไซม์ก็ยังคงมีราคาที่สูงอีกทั้งเชื้อ *Trichoderma reesei* ยังมีแอกทิวิตีไม่สูงมาก ในงานวิจัยนี้นำเชื้อ *Trichoderma reesei* TISTR 3081 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส รังสีอัลตราไวโอเลต และสารโคลชิซิน เพื่อเพิ่มแอกทิวิตีจำเพาะของเซลลูเลส หลังจากทำการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอสและกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่าไอโซเลต E45-UV26 มีแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.41, 1.69 และ 2.53 เท่า ตามลำดับ โดยทดสอบความสามารถในการผลิตเซลลูเลสในอาหารเหลวสูตรของแมนเดล ที่มีแอลฟา-เซลลูโลส เป็นแหล่งคาร์บอน และจากการนำ E45-UV26 มาทดสอบลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์ของ *cbh1* และ *cbh2* พบว่าลำดับเบสของ *cbh1* มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส 4 ตำแหน่ง คือบริเวณอินทรอน ตำแหน่งเบสที่ 710 และ 734 ในส่วนเอกซอนตำแหน่งเบสที่ 812 และ 924 การที่มีตำแหน่งเบสที่บริเวณเอกซอนทำให้มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงหนึ่งตัว คือเปลี่ยนจาก Asparagine ไปเป็น Threonine และหลังจากการใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารโคลชิซินในเชื้อ E45-UV24, E45-UV26 และ E45-UV39 เป็นเวลา 20 วัน พบว่า EV39-C69 มีแอกทิวิตีจำเพาะในหน่วยยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีนของเอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.16 และ 1.35 เท่า ตามลำดับ แต่เนื่องจากเชื้อที่ผ่านการใช้โคลชิซินส่วนใหญ่จะมีการผลิตโปรตีนที่เพิ่มสูงขึ้น ถ้าคำนวณเป็นค่าแอกทิวิตีในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่า EV24-C46 มีแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และ เบตา-กลูโคซิเดส สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.09, 2.20 และ 1.21 เท่า ตามลำดับ จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส ร่วมกับการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถใช้ในการเพิ่มการผลิตเซลลูเลสได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารอีเอ็มเอสเพียงอย่างเดียว ในเชื้อ *T. reesei* TISTR 3081

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อ.....  
ปีการศึกษา.....2551..... ลายมือชื่อ.....ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

# # 4972440223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : CELLULOLYTIC FUNGI / CELLULASE / MUTATION / *Trichoderma reesei*

MAHATTANEE PHINYO : CELLULASE ACTIVITY ENHANCEMENT OF *Trichoderma reesei* TISTR 3081 BY INDUCED MUTATION WITH ETHYLMETHANESULFONATE ULTRAVIOLET RADIATION AND COLCHICINE. ADVISOR: ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., 124 pp.

Lignocellulosic ethanol is one of the most promising renewable energy, but the high cost of enzyme is one of the major barriers. The enzyme cellulase from wild type *Trichoderma reesei* must be improved to make bioethanol more economical due to its low activity and concentration. To resolve this issue this research project aims to improve the cellulase activity by induce mutation on *Trichoderma reesei* TISTR 3081 via ethylmethanesulfonate (EMS), ultraviolet radiation (UV) and colchicine. After induced for double mutation with EMS treatment and ultraviolet radiation mutation, it was found that isolate E45-UV26 had higher specific activities of endoglucanase, exoglucanase, and  $\beta$ -glucosidase than those of wild type by 1.41, 1.69, and 2.53 times, respectively. Cellulase-producing ability was tested in Mandels' medium containing alpha-cellulose as the sole carbon source. Nucleotide base sequencing of *cbh1* and *cbh2* revealed that the base order of *cbh1* had mutations in 4 positions, i.e. base orders 719 and 734 of the intron and base orders 812 and 924 of the exon. The base order of the exon caused a change in the synthesis of an amino acid, from Asparagine to Threonine. After treating isolates E45-UV24, E45-UV26, and E45-UV39 with colchicine for 20 days, it was found that isolate EV39-C69 had higher specific activities than those of wild type by milligram of protein of endoglucanase and exoglucanase by 2.16 and 1.35 times, respectively. However, as most isolates would have higher protein production after treatment with colchicine, if the activities were calculated as units per millilitre, EV24-C46 would be revealed that the activities of endoglucanase, exoglucanase, and  $\beta$ -glucosidase were 2.09, 2.20, and 1.21 times higher than those of the wild type, respectively. This study found that mutation with EMS together with ultraviolet radiation can increase the production of cellulase more effectively than using EMS alone in *T. reesei* TISTR 3081.

Field of Study : .....BIOTECHNOLOGY..... Student's Signature .....

Academic Year : .....2008..... Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความสนับสนุน และช่วยเหลือ จาก รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือและตรวจทานรายละเอียดต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง ประธานกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ปกรณ์ วินะยานุวัตติคุณ ดร. กิตินันท์ โกมลภิส และ ดร. วรกันต์ บุรพาธนะ ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมให้ข้อเสนอแนะ รวมถึง ข้อคิดเห็นที่มีส่วนสำคัญในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะ ข้อคิดเห็นที่มีส่วน สำคัญการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและเทคโนโลยีการปิโตรเลียมแห่ง ประเทศไทย และหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ รวมถึง อำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ ในการวิจัยครั้งนี้ รวมถึงทีมงาน ด้านการวิจัยของสถาบันวิจัยและเทคโนโลยี ปตท. ที่ให้คำแนะนำที่ดี และเป็นประโยชน์ต่อ งานวิจัย

นอกจากนี้ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิง ชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ที่คอยเอื้อเฟื้อ และช่วยเหลือ ตลอดการทำงานวิจัย

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยให้ความรัก และ กำลังใจ ห่วงใย และสนับสนุนเงินทุน รวมทั้งพี่สาว และน้องสาว ที่ให้กำลังใจ และคอยช่วยเหลือ ข้ำพเจ้าเสมอมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เซลลูโลส.....	4
2.1.1 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส.....	4
2.1.2 ปริมาณเซลลูโลสในพืชชนิดต่าง ๆ.....	5
2.1.3 การย่อยสลายเซลลูโลส.....	6
2.2 เซลลูเลส.....	8
2.2.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการทำงานของเซลลูเลส.....	10
2.2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลส.....	10
2.3 เชื้อรา <i>T. reesei</i> .....	12
2.4 การกลายพันธุ์.....	13
2.4.1 ระดับของการกลายพันธุ์.....	14
2.4.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส.....	15
2.4.3 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต.....	16
2.4.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่กลายจากกราฟความอยู่รอด.....	19
2.4.5 ลักษณะสายพันธุ์ที่นิยมใช้ศึกษาทางพันธุศาสตร์.....	19

	หน้า
2.5 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารโคลชิซิน.....	20
2.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	21
3. วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย.....	25
3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	28
3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส.....	28
3.3 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต.....	30
3.3.1 กลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตของไอโซเลต EMS11.....	30
3.3.2 กลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตของไอโซเลต EMS45.....	30
3.4 การทดสอบความต้านทานยาปฏิชีวนะเพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์กลาย.....	30
3.5 การศึกษาเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาของ <i>T. reesei</i> TISTR 3081 และ E45-UV26.....	31
3.6 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>cbh1</i> และ <i>cbh2</i> ระหว่าง <i>T. reesei</i> TISTR 3081 และ E45-UV26.....	31
3.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสของสายพันธุ์กลายโดยใช้โคลชิซิน.....	33
4. ผลการทดลอง.....	34
4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	34
4.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส.....	35
4.3 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต.....	39
4.3.1 การกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตของไอโซเลต EMS11.....	39
4.3.2 การกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตของไอโซเลต EMS45.....	44
4.4 การทดสอบความต้านทานยาปฏิชีวนะเพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์กลาย.....	50
4.5 การศึกษาเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาของ <i>T. reesei</i> TISTR 3081 และ E45-UV26.....	52
4.6 การศึกษาความแตกต่างลำดับเบสระหว่าง <i>T. reesei</i> TISTR 3081 กับ E45-UV26.....	55
4.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสของสายพันธุ์กลายโดยใช้โคลชิซิน.....	57
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....	69
6. สรุปผลการทดลอง.....	78



	หน้า
รายการอ้างอิง.....	80
ภาคผนวก.....	88
ภาคผนวก ก.....	89
ภาคผนวก ข.....	93
ภาคผนวก ค.....	96
ภาคผนวก ง.....	98
ภาคผนวก จ.....	100
ภาคผนวก ฉ.....	107
ภาคผนวก ช.....	109
ภาคผนวก ซ.....	112
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	124

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	ปริมาณเซลล์ลูโลสในพืชและส่วนต่าง ๆ ของพืช.....	6
2-2	การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายเซลล์ลูโลสด้วยสารเคมี.....	7
2-3	การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายเซลล์ลูโลสด้วยเอนไซม์.....	8
2-4	ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลล์ลูโลส.....	11
2-5	ตัวอย่างเชื้อราที่มีการใช้โคคลิซีน.....	21
4-1	ความสามารถในการผลิตเซลล์ลูโลสบนอาหาร CMC agar ของ <i>T. reesei</i> TISTR 3081 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส.....	36
4-2	ความสามารถในการผลิตเซลล์ลูโลสบนอาหาร CMC agar ของ EMS 11 ที่กลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต.....	41
4-3	ความสามารถในการผลิตเซลล์ลูโลสบนอาหาร CMC agar ของ EMS 45 ที่กลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต.....	45
4-4	การเปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของสายพันธุ์ตั้งต้นกับไอโซเลต E45-UV26	50
4-5	ความสามารถในการผลิตเซลล์ลูโลสบนอาหาร CMC agar ของ E45-UV24 ที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ลูโลสด้วยโคคลิซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V) .....	58
4-6	ความสามารถในการผลิตเซลล์ลูโลสบนอาหาร CMC agar ของ E45-UV26 ที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ลูโลสด้วยโคคลิซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V).....	59
4-7	ความสามารถในการผลิตเซลล์ลูโลสบนอาหาร CMC agar ของ E45-UV39 ที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ลูโลสด้วยโคคลิซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V).....	60
4-8	การเปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของสายพันธุ์ตั้งต้นกับไอโซเลต EV39-C69	63
4-9	การเปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของสายพันธุ์ตั้งต้นกับไอโซเลต EV24-C46	66

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	การจัดเรียงตัวของเซลล์ลูลอส และโมเลกุลของกลูโคสในผนังเซลล์พืช.....	5
2-2	กลไกการทำงานของเซลล์เลสที่ผลิตจาก <i>Trichoderma</i> sp.....	9
2-3	ผลของเอทิลมีเทนซัลโฟเนตต่อโมเลกุลของเบสกำนีน.....	16
2-4	การเกิดไทมินไคเมอร์เมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต.....	17
2-5	ขั้นตอนการซ่อมแซมโดยไม่ใช้แสงในตำแหน่งที่เกิดไทมินไคเมอร์ของดีเอ็นเอ....	18
4-1	ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี <i>T. reesei</i> TISTR 3081 บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA.....	34
4-2	ลักษณะสัณฐานวิทยา เส้นใย และสปอร์ของ <i>T. reesei</i> 3081 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เจริญบนอาหารกึ่งแข็ง PDA อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส.....	34
4-3	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารอีเอ็มเอสกับเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด.	35
4-4	ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเอนโดกลูคาเนสของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส.....	37
4-5	ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเอกโซกลูคาเนสของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส .....	38
4-6	ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเบต้า-กลูโคซิเดสของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส.....	38
4-7	ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตกับเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด.....	40
4-8	ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเอนโดกลูคาเนสของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต.....	42
4-9	ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเอกโซกลูคาเนสของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต.....	43
4-10	ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเบต้า-กลูโคซิเดสของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต.....	43
4-11	ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตกับเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด.....	44

ภาพที่	หน้า
4-12 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเอนโดกลูคาเนสของราที่ถูก เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต.....	47
4-13 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเอกโซกลูคาเนสของราที่ถูก เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต.....	47
4-14 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเบต้า-กลูโคซิเดสของราที่ถูก เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต.....	48
4-15 แผนผังการกลายพันธุ์ของเชื้อ <i>T. reesei</i> TISTR 3081 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการ กลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส และกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต.....	49
4-16 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเฉลี่ยของเชื้อรา <i>T. reesei</i> TISTR 3081 บน อาหาร PDA ที่มีแอมโฟเทอรีซิน บี.....	50
4-17 ลักษณะโคโลนีเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง PDA ที่มีความเข้มข้น แอมโฟเทอรีซิน บี 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	51
4-18 ลักษณะโคโลนีเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง PDA.....	53
4-19 ลักษณะเส้นใยและสปอร์เชื้อราที่ย้อมด้วยสีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู.....	53
4-20 อัตราการเจริญเติบโตของรา <i>T.reesei</i> TISTR 3081 และ E45 UV 26 ที่เจริญใน อาหารเหลว PDB เป็นเวลา 24 วัน โดยเก็บน้ำหนักรวมทุก ๆ 3 วัน.....	54
4-21 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>cbh1</i> และ <i>cbh2</i> .....	55
4-22 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเอนโดกลูคาเนสของราที่เพิ่ม ประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสด้วยโคลชีซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V).....	61
4-23 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเอกโซกลูคาเนสของราที่เพิ่ม ประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสด้วยโคลชีซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V).....	62
4-24 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะของเบต้า-กลูโคซิเดส ของรา ที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสด้วยโคลชีซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V).....	62
4-25 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีเอนโดกลูคาเนสของราที่เพิ่ม ประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสด้วยโคลชีซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V).....	64
4-26 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีเอกโซกลูคาเนสของราที่เพิ่ม ประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสด้วยโคลชีซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V).....	64
4-27 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีของเบต้า-กลูโคซิเดส ของราที่เพิ่ม ประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสด้วยโคลชีซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V).....	65

ภาพที่		หน้า
4-28	แผนผังการกลายพันธุ์ของเชื้อ <i>T. reesei</i> TISTR 3081 ในงานวิจัย.....	66
4-29	ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับปริมาณโปรตีนระหว่างช่วงที่ 1 และช่วงที่ 5 ของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสด้วยโคเลซีสิน กับสายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลาย.....	67
4-30	อัตราการเจริญเติบโตของรา <i>T.reesei</i> TISTR 3081, E45-UV26 และ EV26-C37 ที่เจริญในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 24 วัน โดยเก็บน้ำหนักแห้ง ทุก ๆ 3 วัน.....	68

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอทานอลเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจ โดยเอทานอลสามารถผลิตได้โดยอาศัยกระบวนการทางชีวเคมีจากการใช้วัตถุดิบทางการเกษตร หรือวัสดุที่เหลือใช้จากธรรมชาติ เช่น พืช หรือวัชพืช วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรมาใช้ในการเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ในพืชและวัชพืชต่าง ๆ มีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส มีปริมาณเซลลูโลสมากถึง 35-50 เปอร์เซ็นต์ โดยเซลลูโลสสามารถเป็นสารตั้งต้นเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสสำหรับนำไปหมักเป็นเอทานอล ซึ่งการย่อยสลายเซลลูโลสสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การย่อยสลายโดยใช้สารเคมี ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีเป็นตัวย่อยสลายจะมีความไม่จำเพาะเจาะจง (nonspecificity) ต่อเซลลูโลส และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จะมีปริมาณน้อย อีกทั้งยังได้ผลิตภัณฑ์ร่วมที่ไม่จำเป็นเกิดขึ้นด้วย ส่วนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูงกว่า เนื่องจากเอนไซม์จะทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงกับซับสเตรท (Sivers และ Zacchi, 1995) เอนไซม์ที่ทำการย่อยสลายเซลลูโลสจะประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญ 3 ชนิดได้แก่ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) จะทำปฏิกิริยาบริเวณที่ไม่เกิดการรื้อตัวของเซลลูโลส ส่วนเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) จะตัดพันธะ  $\beta$ -glucosidic ของเซลลูโลส และ เบตา-กลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase) จะทำหน้าที่ในการย่อยสลายเซลโลไบโอสที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส (Domingues และ Queiroz, 2000)

ในส่วนของ การย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์จะนิยมใช้เชื้อรา ซึ่งสามารถหลั่งเซลลูเลสออกนอกเซลล์ โดยในการศึกษานิยมใช้ *Trichoderma* sp. เชื้อรานชนิดนี้สามารถพบมากในดิน เจริญได้ง่ายและรวดเร็ว (Saddler Hogan และ Louis, 1985) อีกทั้งมีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูเลสสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราและแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เซลลูเลสที่ผลิตได้จะมีความเสถียร และเนื่องจาก *T. reesei* สามารถเจริญได้รวดเร็ว และมีการผลิตเซลลูเลสที่เสถียร จึงนิยมนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายโดยใช้มิวตาเจนเพื่อเพิ่มแอกทิวิตีการผลิตเซลลูเลสให้สูงขึ้น รวมถึงมีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลลูเลสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสให้เพิ่มมากขึ้นด้วย (Toyama Yamagishi และ Toyama, 2002)

การกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์สามารถเกิดได้ 2 วิธี คือการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous mutation) โดยการกลายพันธุ์แบบนี้อาจเกิดจากการได้รับสารเคมี หรืออุณหภูมิที่มีอยู่ตามธรรมชาติเป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองมีน้อยมาก ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ (induced mutation) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือการเหนี่ยวนำทางกายภาพโดยใช้รังสีเป็นตัวกระตุ้น รังสีที่ใช้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) รังสีชนิดนี้จะมีพลังงานสูง ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม เกิดการขาดหายส่วนใดส่วนหนึ่งของโครโมโซมทำให้ยีนบริเวณนั้นขาดหายไป การใช้รังสีที่ก่อให้เกิดไอออนมักรุนแรงและส่วนใหญ่จุลินทรีย์จะมีอัตราการตายที่สูง ส่วนรังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (nonionizing radiation) ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีชนิดนี้จะให้พลังงานต่ำและไม่แตกตัว นิยมนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ในจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก มีประสิทธิภาพสูง และไม่ก่อให้เกิดการตายของจุลินทรีย์มากนัก ส่วนการเหนี่ยวนำโดยใช้สารเคมีให้ก่อการกลายพันธุ์จะนิยมใช้สารเอ็นทีจี (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) และเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่ม Alkylating agent โดยการใช้เอ็นทีจี จะมีการเติมหมู่เมทิล ของเบสกวีนีน ส่วนอีเอ็มเอสจะมีการเติมหมู่เอทิลของเบสกวีนีน ซึ่งสารทั้งสองชนิดจะทำให้ขณะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่และจะเกิดการจับเบสผิดไปจากเดิม (Gadgil และคณะ, 1995)

สารโคลชิซินมีคุณสมบัติเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างอ่อน ๆ สามารถละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม แอลกอฮอล์ และน้ำ ทำให้มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น 2 เท่าหรือมากกว่า เนื่องจากสารจะมีผลต่อสปินเดิลไฟเบอร์ในระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัว โดยสปินเดิลไฟเบอร์ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้โครโมโซมไม่ถูกดึงไปยังขั้วของเซลล์ ทำให้เกิดเป็นโพลีพลอยด์ โดยนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น และทำให้เกิด genetic diversity ซึ่งมีผลในการเปลี่ยนแปลงยีนภายในเซลล์ (Toyama และ Toyama, 2000)

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำเอาเอนไซม์จากเชื้อ *T. reesei* มาย่อยสลายเซลลูโลส เนื่องจากเซลลูโลสที่ผลิตได้มีความเสถียรต่อการนำไปใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ดั้งเดิมยังมีแอกทิวิตีที่สูงไม่มากดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจนำเชื้อ *T. reesei* TISTR 3081 มาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารอีเอ็มเอส ร่วมกับรังสีอัลตราไวโอเล็ต และโคลชิซิน

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเพิ่มแอกทิวิตีเซลล์ของ *T. reesei* TISTR 3081 โดยการกลายพันธุ์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอทิลมีเทนซัลไฟเนต รังสีอัลตราไวโอเล็ต และโคลชิซิน

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สายพันธุ์กลายของ *T. reesei* ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูเลสสูง

## วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา
2. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส
3. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต
4. การทดสอบความต้านทานยาปฏิชีวนะเพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์กลาย
5. การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *T. reesei* TISTR 3081 และ E45-UV26
6. การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *cbh 1* และ *cbh2* ระหว่าง *T. reesei* TISTR 3081 กับ E45-UV26
7. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสของสายพันธุ์กลายโดยใช้โคลชิซิน
8. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนวิทยานิพนธ์



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

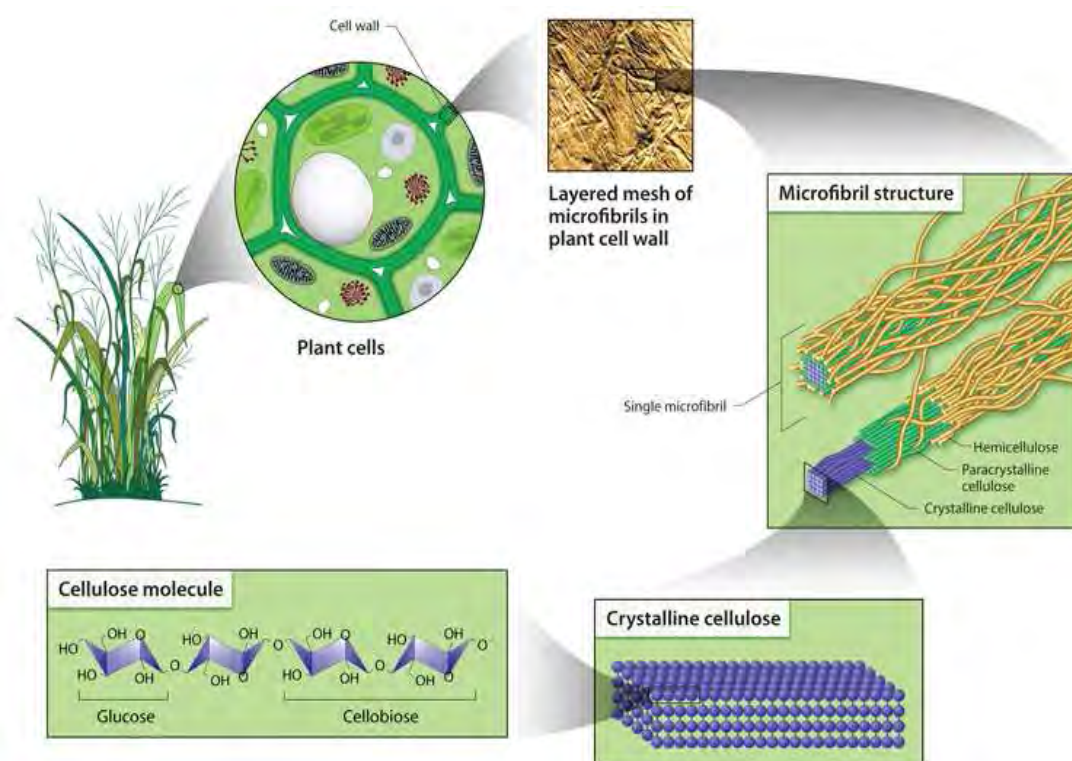
#### แนวคิดและทฤษฎี

##### 2.1 เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณมากที่สุดในเซลล์พืช โดยพบมากที่สุดที่ผนังเซลล์ของพืช มีหน้าที่ช่วยให้พืชมีโครงสร้างแข็งแรง ซึ่งอาจมีมากถึง 35-50 เปอร์เซ็นต์ และเป็นส่วนที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เนื่องจากเราสามารถปลูกพืชเพื่อทดแทนได้ในเวลาอันรวดเร็ว โดยมีการนำเซลลูโลสไปใช้ประโยชน์มากมายหลายด้าน อาทิเช่น ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมกระดาษ อีกทั้งยังเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลในการผลิตเชื้อเพลิง

##### 2.1.1 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

เซลลูโลสประกอบไปด้วยกลูโคสประมาณ 100-20,000 หน่วยเรียงต่อกันคล้ายลูกโซ่ แต่ละโมเลกุลจะจับกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) โดยคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 จะจับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของโมเลกุลถัดไป เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 อยู่ในตำแหน่งเบตาจึงเรียกพันธะนี้ว่า  $\beta$ -1, 4 glycosidic bond (ดังภาพที่ 1) ซึ่งรูปแบบของการจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคสจะอยู่ในลักษณะรูปเก้าอี้ (chair-form) การเรียงตัวของโมเลกุลของเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างตรงไม่มีแขนงย่อย โดยเซลลูโลสมีการจัดเรียงตัวภายในของโมเลกุล 2 แบบ ได้แก่ส่วนที่เป็น crystalline เป็นส่วนของเซลลูโลสที่มีการเรียงตัวต่อกันแบบเป็นระเบียบยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนหนาแน่น ซึ่งเป็นส่วนที่ยากต่อการสลาย และส่วนที่เป็น amorphous เป็นส่วนเซลลูโลสเรียงตัวต่อกันแบบไม่เป็นระเบียบยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นน้อย สามารถสลายได้ง่าย (Sun และ Cheng, 2002)



ภาพที่ 2-1 การจัดเรียงตัวของเซลลูโลส และโมเลกุลของกลูโคสในผนังเซลล์พืช (Rose และ Bennett, 1999)

### 2.1.2 ปริมาณเซลลูโลสในพืชชนิดต่าง ๆ

ในพืชแต่ละชนิดจะมีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งแล้วแต่ว่าเป็นพืชชนิดใด และอยู่ส่วนใดบริเวณใดของพืช ตัวอย่างเซลลูโลสที่พบในพืชชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ปริมาณเซลลูโลสในพืชและส่วนต่าง ๆ ของพืช

ชนิดหรือส่วนต่าง ๆ ของพืช	ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
พืชเนื้อแข็ง	40-45
พืชเนื้ออ่อน	45-50
ขังข้าวโพด	45
หญ้า	25-40
ฟางข้าว	30
ใยฝ้าย	80-95
ไม้ไผ่	26-43
ข้าวโอ๊ต	31-37
ชานอ้อย	32-44
ข้าวบาร์เลย์	31-34
ข้าวไรน์	33-35

(Reshamwala Shawky และ Dale, 1995; Howard และคณะ, 2003)

### 2.1.3 การย่อยสลายเซลลูโลส

การย่อยสลายเซลลูโลสเป็นการทำให้สายของเซลลูโลสสั้นลง โดยเมื่อมีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์แล้วผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมีเพียงชนิดเดียว ได้แก่ กลูโคส แต่ถ้าเกิดการย่อยสลายไม่สมบูรณ์จะได้เซลโลไบโอส หรือ โอลิโกแซคคาไรด์มาปะปนอยู่ด้วย ซึ่งกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสสามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่

1. การย่อยสลายด้วยสารเคมี (chemical hydrolysis) เป็นการอาศัยกรดหรือด่างในย่อยสลาย กรดที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) หรือกรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) ส่วนด่างที่นิยมใช้ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง แอมโมเนีย (ammonia) หรือเอทิลีนไดอะมีน (Sivers และ Zacchi, 1995)

2. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) โดยเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิบัติการย่อยสลายเซลลูโลส คือเซลลูเลส โดยสามารถผลิตได้จากเชื้อรา และแบคทีเรีย ในการย่อยสลาย

เซลลูโลสนั้นจะต้องใช้เอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกัน ได้แก่ เอกลิโกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อถัดไป (Kim และคณะ, 1993; Duff และ Murray, 1996)

## ตารางที่ 2-2 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยสารเคมี

ข้อดี	ข้อเสีย
1. สะดวกต่อการนำไปใช้	1. ต้องใช้อุณหภูมิสูงช่วยในสภาวะที่ใช้กรดหรือด่างอ่อน
2. สารเคมีหาได้ง่ายและมีราคาถูก	2. ในกรณีที่ใช้กรดอ่อน ผลจากการย่อยจะได้เซลลูโลสที่ยังคงมีโครงสร้างเป็นเส้นใยอยู่
3. เกิดปฏิกิริยารวดเร็ว	3. เกิดสารประกอบชนิดอื่นที่ไม่ต้องการปนเปื้อนมากับผลิตภัณฑ์
4. วัตถุดิบไม่ต้องผ่านการปรับสภาพ	4. ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่เฉพาะเจาะจง ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่บริสุทธิ์
5. สามารถเกิดปฏิกิริยาเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำในสภาวะที่ใช้กรดเข้มข้น	5. อุปกรณ์มีราคาสูง เนื่องจากต้องทนต่อการกัดกร่อนของกรด
6. หลังการย่อยสลายได้ปริมาณน้ำตาลสูง	6. เกิดของเสียที่เป็นสารเคมีมีสภาพเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

(Parisi, 1989; Blazej kosik และ Spilda, 1990)

### ตารางที่ 2-3 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

ข้อดี	ข้อเสีย
1. สภาพที่ใช้ทั้งอุณหภูมิและความเป็นกรดต่างไม่รุนแรง	1. เอนไซม์มีราคาสูง
2. การทำปฏิกิริยามีความเฉพาะเจาะจงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง	2. ถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น
3. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น	3. จำเป็นต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนนำมาย่อยสลาย
4. ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน	4. เอนไซม์รวมอยู่กับผลิตภัณฑ์ทำให้ยากต่อการนำมาใช้ใหม่ โดยบางส่วนอาจสูญเสียไปกับการติดในวัสดุ
	5. ต้องควบคุมสภาวะที่เหมาะสมแก่การทำหน้าที่ของเอนไซม์
	6. ถูกขัดขวางการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกิดจากบางองค์ประกอบในเซลลูโลส เช่น ลิกนิน

(Presscott และ Dunn, 1959; Parisi, 1989)

จากตารางเปรียบเทียบจะพบว่าการใช้สารเคมี และการใช้เอนไซม์มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป ในกรณีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ถ้าสามารถหาเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเซลลูโลส และสามารถพัฒนาสายพันธุ์ให้มีความสามารถในการย่อยสลายได้ดีขึ้น จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตอย่างมาก และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าการย่อยสลายด้วยสารเคมี

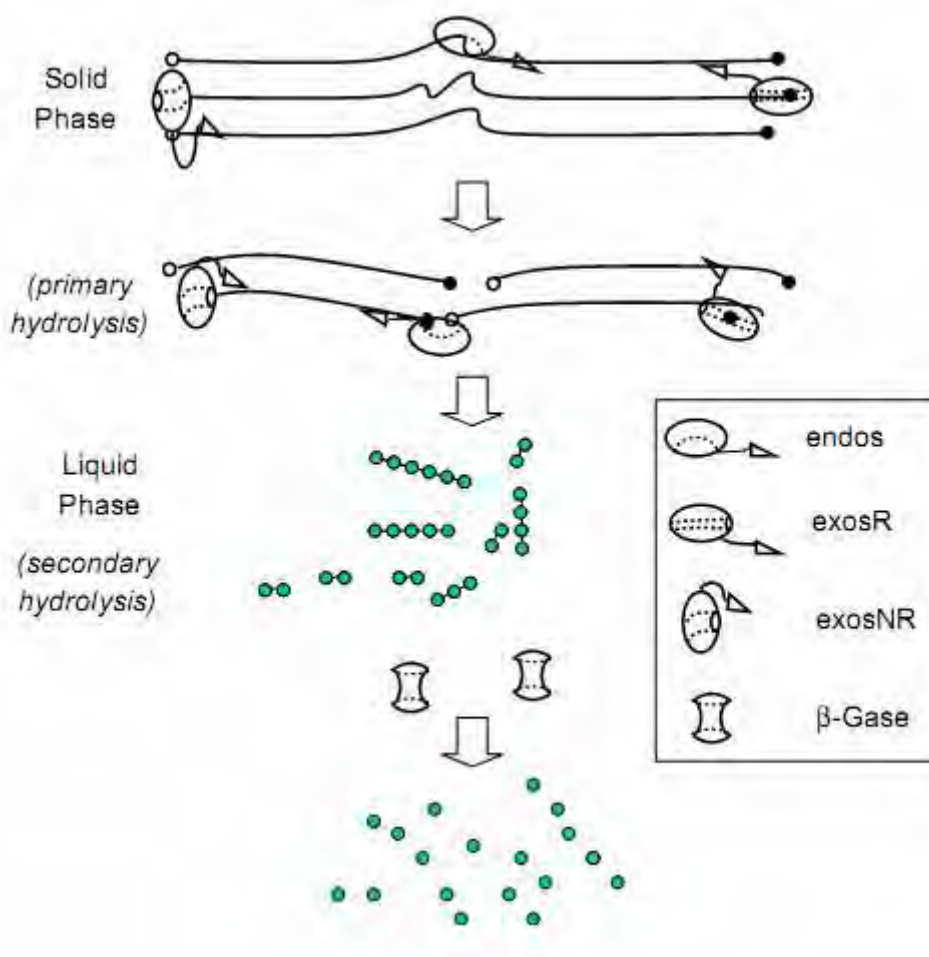
## 2.2 เซลลูเลส

เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยจะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ  $\beta$ -1, 4 glucosidic ภายในโมเลกุลของเซลลูโลส ซึ่งผลิตมาจากจุลินทรีย์จำพวก เชื้อรา และแบคทีเรีย หลายชนิด ซึ่งจะมีการผลิตเซลลูเลสออกสู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) โดยเซลลูเลสมีเอนไซม์ทำงานร่วมกันอย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่

1. เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) หรือ cellobiohydrolase ทำหน้าที่ตัดพันธะ  $\beta$ -1, 4 glucosidic ของสายเซลลูโลส จากปลายด้าน non reducing ของ crystalline cellulose ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลที่สั้นขึ้น เช่น ได้เป็นเซลโลไบโอส หรือถ้าเอกโซกลูคาเนสทำงานอย่างสมบูรณ์จะทำให้ได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์ (Eveleigh, 1987)

2. เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) หรือ CM-cellulase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยตัดที่พันธะ  $\beta$ -1, 4 glucosidic บริเวณที่เป็น amorphous cellulose อย่างสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลสั้น ๆ เช่น ได้เป็นเซลโลไบโอส หรือถ้าเอนโดกลูคาเนสทำงานอย่างสมบูรณ์จะทำให้ได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์ (Ilmen และคณะ, 1997)

3. เบตา-กลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase) หรือ เซลโลไบเอส จะทำหน้าที่ในการย่อยเซลโลไบโอสให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล (Zhang และ Lynd, 2004)



ภาพที่ 2-2 กลไกการทำงานของเซลลูเลสที่ผลิตจาก *Trichoderma* sp. (Zhang Himmel และ Mielenz, 2006)

โดยขั้นตอนในการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คือ เอนโดกลูคาเนสจะเข้าทำปฏิกิริยาตรงส่วนของเซลลูโลสที่เป็น amorphous cellulose ทำให้สายเซลลูโลสขาดออกจากกัน หลังจากนั้นจะเป็นการทำงานร่วมกันของเอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส โดยเอกโซกลูคาเนสจะเข้าทำปฏิกิริยาบริเวณปลายด้าน non reducing ของสายเซลลูโลสที่ถูกตัด ทำให้ได้เซลโลไบโอส และเบตา-กลูโคซิเดสจะทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้กลายเป็นกลูโคส (Zhang และคณะ, 2006) (ดังภาพที่ 2-2)

### 2.2.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการทำงานของเซลลูเลส

เซลลูเลสเป็นสารที่สิ่งมีชีวิตพวกจุลินทรีย์สร้างขึ้น เป็นสารประเภทโปรตีน ดังนั้นในการทำงานของเซลลูเลสจะต้องมีปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้องดังนี้

- อุณหภูมิ ความสามารถของเซลลูเลสสามารถทำงานได้ดีและเสถียรที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับเอนไซม์มาจากจุลินทรีย์ชนิดใด เช่น ถ้าเป็นเซลลูเลสที่มาจากจุลินทรีย์ที่ทนร้อนอุณหภูมิที่เหมาะสมจะสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Nevalainen และ Penttila, 1996)

- พีเอช เซลลูเลสสามารถทำงานและคงทนอยู่ในพีเอชช่วงกว้างประมาณ 4.0-8.0 แต่โดยทั่วไปแล้วจะสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5-7 (Yamanobe และ Mitsuishi, 1990)

- ไอออน โดยไอออนบางชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เช่น ไอออนพวก  $Hg^{2+}$  และ  $Pb^{2+}$  จะทำให้สามารถยับยั้งการทำงานของเซลลูเลส โดยสารดังกล่าวจะทำการออกซิไดซ์หมู่ฟังก์ชันของโปรตีน เช่น ซีสเทอีน ทริปโตเฟน ไทโรซีน ฮีสตีดีน และเมทไทโอนีน ทำให้เสียสภาพการทำงานของเอนไซม์ (Murashima และคณะ, 2002)

การเก็บรักษาเอนไซม์ สามารถเก็บเซลลูเลสที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 และ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาหลายปี หรือสามารถเก็บด้วยวิธี freeze dry หรือตกตะกอนด้วยอะซิโตน หรือเอทานอล โดยไม่เสียคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยา (Ryu และ Mandel, 1980)

### 2.2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลส

เซลลูเลสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา หรือแอคติโนมัยซิส โดยแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสแตกต่างกันออกไป ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ องค์ประกอบของอาหาร สภาพวะในการเลี้ยงจุลินทรีย์และการผลิตเอนไซม์ แต่โดยทั่วไปแล้วจะนิยมใช้เชื้อรา เนื่องจากสามารถเจริญได้ที่สภาพะกว้าง เจริญเติบโตรวดเร็ว และ

ทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงที่สูง และส่วนใหญ่มีการหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้ การที่สามารถผลิตเซลลูเลสให้มีปริมาณ และคุณภาพที่สูง จะต้องมีสภาวะที่เหมาะสม เช่น พีเอช อุณหภูมิ การปนเปื้อน ชนิดของสารอาหาร และแร่ธาตุที่จำเป็นต่อเชื้อจุลินทรีย์ (Mandels และ Weber, 1969)

#### ตารางที่ 2-4 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลส

ชนิด	รายการอ้างอิง
<b>แบคทีเรีย</b>	
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Kirby และคณะ, 1997
<i>Anaerocellum thermophilum</i>	Svetlichnyi และคณะ, 1990
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Shoseyov และ Doi, 1990; Tamaru และคณะ, 2000
<i>Eubacterium cellulolyticum</i>	Anderson และ Blair, 1996
<i>Bacillus</i> sp.	Sun และ Cheng, 2002
<i>Thermomonospora fusca</i>	Sun และ Cheng, 2002
<b>เชื้อรา</b>	
<i>Aspergillus niger</i>	Coral และคณะ, 2002
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Dohot และ Noomrio, 1996
<i>Fusarium oxysporum</i>	Kuhad Manchanda และ Singh, 1999
<i>Penicillium junthinellum</i>	Deshpande และคณะ, 1984
<i>Trichoderma reesei</i>	Acebal และคณะ, 1986; Nevalainen Suominen และ Taimisto, 1994
<i>Trichoderma harzianum</i>	Saddler และคณะ, 1985
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Whitaker, 1954
<i>Streptomyces</i> sp.	Mikan and Castellanos, 2004
<i>Xylaria hypoxylon</i>	Liers และคณะ, 2006
<i>Fomitopsis palustris</i>	Yoon และคณะ, 2007



จากตารางที่ 2-4 จะเห็นว่ามีจุลินทรีย์จำนวนมากที่สามารถสร้างเซลล์ได้ แต่อย่างไรก็ตามในหลายงานวิจัยนิยมที่จะเลือก *T. reesei* โดยเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อรา มีความทนทานมากกว่าแบคทีเรีย และมีความสามารถในการผลิตเซลล์ และไฮดรอกซีอะซิแลนเนสได้สูง

### 2.3 เชื้อรา *T. reesei*

เชื้อรา *T. reesei* เป็นเชื้อราชั้นสูงเป็นราที่อาศัยอยู่ในดิน และเศษซากอินทรีย์วัตถุธรรมชาติ มีการเจริญสร้างเส้นใยสีขาว โดยเส้นใยเจริญแบนราบติดผิวหน้าและแตกกิ่งก้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเส้นใยมีสองชนิด คือ vegetative mycelium เป็นส่วนที่ทำหน้าที่ยึดเกาะกับอาหาร และ aerial mycelium เป็นเส้นใยที่ขึ้นไปในอากาศ ทำหน้าที่นำอาหารไปสู่ส่วนต่าง ๆ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมีการสร้างสปอร์ ซึ่งสปอร์จะมีสีเขียว สามารถเจริญอยู่ในสภาพธรรมชาติได้ดี โดยจะอาศัยอาหารจากอินทรีย์วัตถุ เศษซากพืช นอกจากนี้ *T. reesei* มีความสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มเซลล์ และไฮดรอกซีอะซิแลนเนส ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายพืชที่มีเซลล์ และไฮดรอกซีอะซิแลนเนส เป็นองค์ประกอบหลัก โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้มีความเสถียร เมื่อเทียบกับเชื้อรา หรือแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ โดยเซลล์ที่ผลิตได้สามารถแยกออกจากเซลล์ได้ง่าย เนื่องจากมีการผลิตเซลล์หลังออกนอกเซลล์ จึงนิยมนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายโดยใช้มิวตาเจนเพื่อเพิ่มแอกทิวิตีการผลิตเซลล์ให้สูงขึ้น รวมถึงมีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ให้เพิ่มมากขึ้นด้วย (Durand และ Claret, 1987; Saddler และคณะ, 1985)

การจัดจำแนกของเชื้อรา *Trichoderma reesei*

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

Subdivision: Pezizomycetes

Class: Sordariomycetes

Order: Hypocreales

Family: Hypocreaceae

Genus: *Trichoderma*

Species: *T. reesei*

(Motenecourt, 1983; Domingues และคณะ, 2000)

โดยปกติแล้วจุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาตินั้นจะมีความสามารถในการผลิตสารที่ต้องการค่อนข้างต่ำ เช่นเดียวกับเชื้อ *T. reesei* ดังนั้นก่อนที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมจะต้องมีการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเพื่อให้มีผลผลิตที่สูงขึ้น โดยทั่วไปมักเลือกอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต รวมถึงการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ แต่การเพิ่มผลผลิตจะถูกจำกัดโดยขีดความสามารถสูงสุดในการสร้างของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ซึ่งจะถูกรับควบคุมโดยยีน (gene) ดังนั้นในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในระดับอุตสาหกรรมควรมีการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Baltz, 1986)

### เซลล์โลไลติกยีนของ *T. reesei*

เชื้อรา *T. reesei* เป็นหนึ่งในเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ 3 ชนิด คือ เอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และ เบตา-กลูโคซิเดส จากฐานข้อมูลใน The National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่าเชื้อราชนิดนี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสอย่างน้อย 8 ชนิด เซลโลไบโอไฮดรอลเลสอย่างน้อย 2 ชนิด และเบตา-กลูโคซิเดสอย่างน้อย 7 ชนิด ซึ่งเอนไซม์เซลโลไบโอไฮดรอลเลสชนิดที่ 1 เป็นเอนไซม์ที่ *T. reesei* ผลิตออกมามากที่สุดถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ของเอนไซม์เซลลูเลสทั้งหมด รองลงมาเป็นส่วนของเอนโดกลูคาเนสชนิดที่ 1 ผลิตออกมา 20-10 เปอร์เซ็นต์ และเบตา-กลูโคซิเดส ผลิตเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (Unsitalo และคณะ, 1991) โดยเอนไซม์เซลโลไบโอไฮดรอลเลสชนิดที่ 1 เป็นเอนไซม์หลักที่ทำการย่อยสลายเซลลูโลสในส่วนที่เป็นคริสตัลไลต์เซลลูโลส ที่มีโครงสร้างที่ย่อยสลายได้ยากในองค์ประกอบของเซลลูโลส (Teeri, 1997)

### 2.4 การกลายพันธุ์ (mutation)

การกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอ หรือโครงสร้างของสารพันธุกรรมและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไป สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ การกลายพันธุ์อาจเกิดขึ้นเองในธรรมชาติ และการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ (Snustad และ Simmons, 2000)

1. การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (spontaneous mutation) เป็นการกลายพันธุ์ชนิดนี้จะมีอัตราการเกิดต่ำมาก ซึ่งอาจเกิดจากการได้รับรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยจะเกิดในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงมากกว่าสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ แต่ไม่แสดงออกเนื่องจากการซ่อมแซมของยีนจึงไม่มีการแสดงออก ส่วนในการกลายของจุลินทรีย์ พบว่าจะสามารถเกิดการกลายได้ในช่วงเวลา

หนึ่งของการเจริญ ซึ่งโอกาสเกิดการกลายจะขึ้นกับจำนวนครั้งของการขยายพันธุ์ ถ้ามีการขยายพันธุ์มากขึ้นโอกาสที่จะมีการกลายก็จะมากขึ้นด้วย เรียกได้ว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเอง อาจเกิดได้จากความผิดพลาดในการถ่ายแบบดีเอ็นเอ (DNA replication error) เกิดจากเอนไซม์พอลิเมอเรสทำงานผิดพลาดมีการนำนิวคลีโอไทด์ผิดเข้าไปในสายดีเอ็นเอทำให้เกิดความผิดปกติ (Ramel, 1989)

2. การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ (induced mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่ไม่ได้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ทางกายภาพ ได้แก่ รังสี ซึ่งสามารถจำแนกได้ 2 ประเภท ได้แก่ รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) เช่น รังสีแกมมา รังสีเอกซ์ นิวตรอน รังสีประเภทเหล่านี้จะมีอำนาจทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อต่าง ๆ สูง ทำให้อิเล็กตรอนที่เรียงตัวอยู่นอกสุดในโครงสร้างอะตอมหลุดไป ทำให้ได้ไอออนที่มีประจุบวกเกิดขึ้น อิเล็กตรอนที่หลุดออกมาเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูง จากนั้นอิเล็กตรอนที่หลุดออกมาจะไปชนกับอิเล็กตรอนที่หลุดออกมาจากอะตอมอื่น ทำให้พลังงานของอิเล็กตรอนลดลง อิเล็กตรอนที่หลุดออกมาจะไปเกาะกับอะตอมอื่น ทำให้เกิดประจุลบ เกิดประจุบวกและประจุลบเกิดขึ้น รังสีที่ก่อให้เกิดไอออนจะมีการเหนี่ยวนำการเกิดการกลายพันธุ์ที่รุนแรงโดยมีผลทำให้โครโมโซมแตกหัก และรังสีอีกประเภท ได้แก่ รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (nonionizing radiation) มีอำนาจทะลุทะลวงต่ำกว่ารังสีที่ก่อให้เกิดไอออน โดยรังสีประเภทนี้จะไม่ก่อให้เกิดไอออนตามทางที่เคลื่อนผ่าน ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเล็ต และการเหนี่ยวนำอีกชนิดหนึ่งได้แก่ การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี โดยจะมีการนำสารเคมีมาช่วยทำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยจะมีผลไปเปลี่ยนลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อถัดไป (Drake, 1970)

#### 2.4.1 ระดับของการกลายพันธุ์

ระดับของการกลายพันธุ์ จะขึ้นอยู่กับสิ่งที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด (Snustad และ Simmons, 2000)

1. การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (Chromosome mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม โดยอาจเกิดจากมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนของโครโมโซม หรืออาจเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม

2. การกลายพันธุ์ระดับยีน (point mutation หรือ gene mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีนจากอัลลีลหนึ่งไปเป็นอัลลีลหนึ่ง ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ การแทนที่คู่เบส (base-pair

substitution) เป็นการแทนที่คู่เบสในสายนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ และการเกิดเฟรมชิฟท์มิวเทชัน (frameshift mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการมีการสูญเสียนิวคลีโอไทด์ 1 นิวคลีโอไทด์หรือมากกว่า หรือ การที่มีนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นมา 1 นิวคลีโอไทด์ หรือมากกว่า หรือมีการเพิ่มหรือการขาดของ นิวคลีโอไทด์ ในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ ทำให้กรอบของรหัสพันธุกรรม (genetic code) เปลี่ยนแปลงไป

#### 2.4.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส

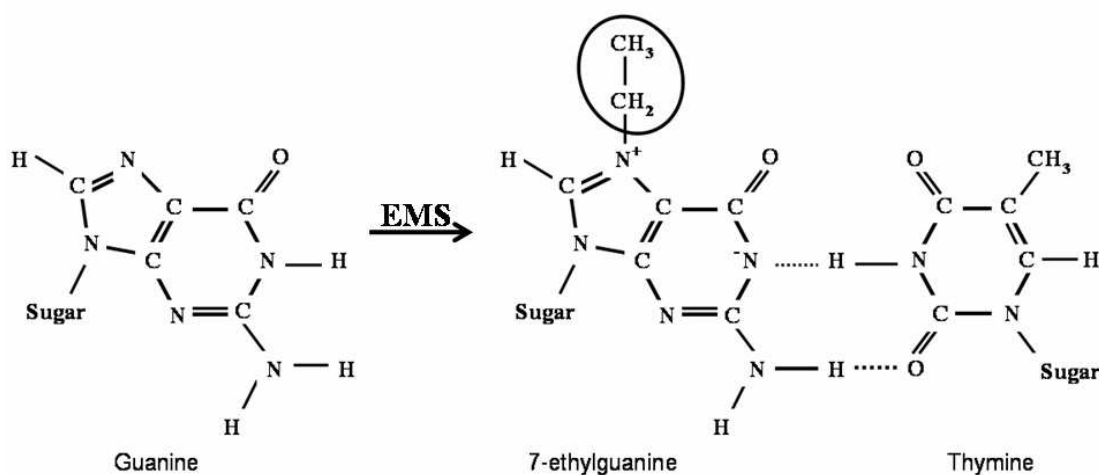
สารเคมีที่ช่วยในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์มีหลายกลุ่มด้วยกัน บางชนิดทำหน้าที่คล้ายเบสทำให้สามารถแทนที่เบสในขั้นตอนที่มีการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือสารเคมีบางกลุ่มทำให้เกิดการขาดหายหรือเพิ่มระหว่างเบสของสายดีเอ็นเอ ซึ่งแล้วแต่ลักษณะของสารเคมีแต่ละชนิด สุดท้ายแล้วจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส (Gardner Simmon และ Snustard, 1991) ส่วนสารอีเอ็มเอสจะมีผลต่อโครงสร้างของเบส โดยสารอีเอ็มเอสจะมีคุณสมบัติดังนี้

อีเอ็มเอสเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มของ alkylating agent อีเอ็มเอสมีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OC}_2\text{H}_5$  เป็นของเหลวใสไม่มีสี โดย  $\text{C}_2\text{H}_5$  จะถูกถ่ายให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาแอลคิเลชัน (alkylation) อีเอ็มเอสสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเบสพิวรีนไพริมิดีน รวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอ โดยอีเอ็มเอสสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ดังวิธีการนี้ (Snustad และ Simmons, 2000)

1. ทำให้เกิดการเข้าแทนที่คู่เบส (Single base substitution) จะเกิดมากที่สุดที่ตำแหน่งที่ N-7 ของเบสกวานีน จะเกิดเป็น 7-เอทิลกวานีน ซึ่งสามารถจับคู่กับเบสไทมีนได้ ดังนั้นจึงเกิดการกลายพันธุ์แบบทรานซิชัน (G-C ถูกแทนที่ด้วย A-T) (ดังภาพที่ 2-3)

2. ทำให้เบสพิวรีนหลุดหายไปจากสายดีเอ็นเอ (depurination) เกิดจากหมู่เอทิลเข้าไปจับอยู่ที่เบสพิวรีน เช่น N-7 ของกวานีน ตำแหน่ง N-3 ของอะดีนีน เป็นต้น จะเกิดการตัดขาดของพันธะเคมีที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับเบส ทำให้เบสหลุดออกไปจากดีเอ็นเอ เรียกการเกิดปฏิกิริยานี้ว่า depurination และจะเกิดการซ่อมแซมดีเอ็นเอโดยกระบวนการ Base excision repair โดยการเกิดการซ่อมแซมบางครั้งจะเกิดความผิดพลาดในเบสที่แตกต่างไปจากเดิมจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์

3. ทำให้เกิดการตัดขาดของดีเอ็นเอ เกิดจากเมื่อเบสพิวรีนหลุดหายไป ทำให้น้ำตาลเกิดการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) มีการตัดขาดของหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลทำดีเอ็นเอขาดจากกัน ทำให้เกิดการขาดหายไปของดีเอ็นเอและเกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด (Drake, 1970)

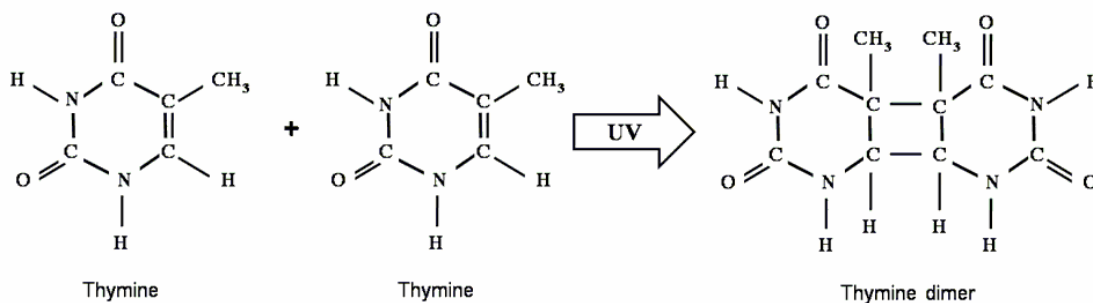


ภาพที่ 2-3 ผลของเอทิลมีเทนซัลโฟเนตต่อโมเลกุลของเบสกวีนีน (Gardner และคณะ, 1991)

### 2.4.3 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต

รังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet light) เป็นรังสีที่มีพลังงานต่ำ และเป็นชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดการแตกตัว นิยมใช้ในจุลชีววิทยาเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์เพราะไม่ทำให้เกิดการตายของจุลินทรีย์มากนัก โดยสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตจะมีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอกได้อย่างชัดเจน เช่นลักษณะของโคโลนี สี และอาจส่งผลให้มีการสร้างสปอร์ลดลงหรือไม่สร้างอีกเลย เมื่อแบ่งรังสีอัลตราไวโอเล็ตตามช่วงความยาวคลื่นจะมี 3 ชนิด ได้แก่ UV-A (320 nm-visible) UV-B (290-320 nm) และ UV-C (180-290 nm) โดย UV-C เป็นช่วงคลื่นที่นิยมนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเทชัน เนื่องจากมีพลังงานมากพอที่เหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายและไม่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตาย (Davies, 1964; Russel, 1996) โดยส่วนใหญ่จะใช้แสงช่วงคลื่น 254-260 นาโนเมตร เนื่องจากเบสพิวรีน และไพริมิดีนในสายของดีเอ็นเอสามารถดูดซับแสงได้ดีในช่วงคลื่นดังกล่าว โดยผลของรังสีอัลตราไวโอเล็ตนี้จะทำให้เกิดพันธะเคมีที่ผิดปกติระหว่างเบสไพริมิดีนที่อยู่บนสายเดียวกันของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดเป็นไทมีนไคเมอร์ (ดังภาพที่ 2-4) การเกิด ไทมีนไคเมอร์นี้จะทำให้มีผลต่อการจับคู่ปกติของไทมีนกับเบสอะดีนีน ในสายดีเอ็นเอ

ตรงข้ามกัน สายดีเอ็นเอเกิดเป็นวงห่วงและทำให้เกิดพันธะ T=A ในสายตรงข้ามอ่อนตัวลง โดยปกติการเกิดมิวเทชันที่ทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์นี้สามารถถูกซ่อมแซมให้กลับมาเป็นปกติเช่นเดิมได้ แต่ในขบวนการซ่อมแซมอาจเกิดการซ่อมแซมที่ผิดพลาดและความผิดพลาดนั้นส่งต่ออย่างรุ่นถัดไป ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด (วรวิมล จุฬาลักษณ์นกุล, 2551)

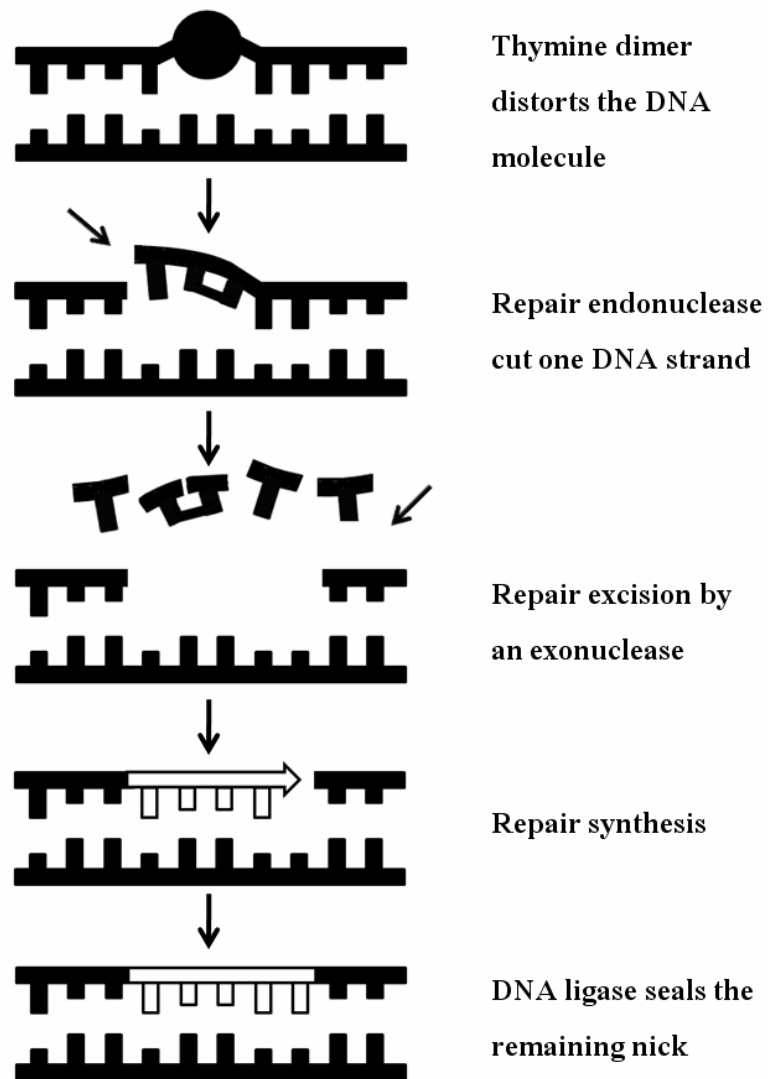


ภาพที่ 2-4 การเกิดไทมีนไดเมอร์เมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Gardner และคณะ, 1991)

กระบวนการซ่อมแซมที่บริเวณที่เกิดไดเมอร์ สามารถทำได้ 2 วิธี

1. กระบวนการซ่อมแซมที่ต้องใช้แสง (photoreactivation) โดยเอนไซม์ DNA photolyase มีหน้าที่ไปเกาะตำแหน่งที่เกิดไทมีนไดเมอร์ เมื่อเอนไซม์ดูดซับแสง (ช่วงความยาวคลื่น 320-370 นาโนเมตร) โดยแสงเป็นตัวกระตุ้นให้เอนไซม์ DNA photolyase ไปเกาะที่ตำแหน่งที่เกิดไดเมอร์ ทำให้มีการทำลายพันธะโควาเลนต์ที่ยึดเกาะระหว่างไดเมอร์ให้ขาดออกจากกัน ในกรณีที่เกิดไทมีนไดเมอร์จะทำให้ไทมีนสามารถจับคู่กับอะดีนีนของสายตรงข้ามได้ปกติ (Sinha และ Hader, 2002)

2. กระบวนการซ่อมแซมโดยไม่ต้องใช้แสง (dark repair หรือ excision repair) เป็นกระบวนการซ่อมแซมความผิดปกติทั่วไปของดีเอ็นเอ เริ่มจากการตัดส่วนของดีเอ็นเอที่ผิดปกติโดยอาศัยเอนไซม์ endonuclease ไปจับกับไดเมอร์และจะตัดพันธะระหว่างน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟสบริเวณก่อนถึงไดเมอร์ จากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase I และเอนไซม์ ligase จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ถูกต้องแทนส่วนที่ตัดออกไป ซึ่งในขั้นตอนนี้อาจเกิดการเติมเบสผิดพลาดทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (ดังภาพที่ 2-5) (Alan Jack และ John, 1999)



ภาพที่ 2-5 ขั้นตอนการซ่อมแซมโดยไม่ใช่แสงในตำแหน่งที่เกิดไทมีนไดเมอร์ของดีเอ็นเอ

การเกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอที่ไม่รุนแรงมาก จะสามารถซ่อมแซมให้กลับมาเป็นปกติได้ในขั้นตอนการซ่อมแซมอาจเกิดความผิดพลาดขึ้นได้ การซ่อมแซมที่นำเอานิวคลีโอไทด์ที่ต่างจากเดิมเข้ามา หรือทำให้เกิดการขาดหายของดีเอ็นเอ (deletion) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เรียกว่าการกลายพันธุ์ แต่ถ้าเกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอที่รุนแรงมาก และเป็นความเสียหายที่ซับซ้อนจนเซลล์ไม่สามารถซ่อมให้กลับมาเป็นปกติได้ ซึ่งอาจส่งผลให้เซลล์นั้นตายได้ (Brown, 1992)

#### 2.4.4 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากกราฟความอยู่รอด (Survival curve)

ในการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเทชันในสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของมิวทาเจนและอัตราการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต (survival curve) ชนิดนั้น ๆ เพื่อหาปริมาณของมิวทาเจนที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการได้รับมิวทาเจนและไม่ได้รับมิวทาเจน แล้วนับปริมาณสิ่งมีชีวิตที่สามารถมีชีวิตรอดภายหลังจากการได้รับมิวทาเจน จากนั้นเขียนกราฟความอยู่รอด ซึ่งเมื่อปริมาณของมิวทาเจนเพิ่มขึ้น จำนวนของสิ่งมีชีวิตที่มีชีวิตรอดจะน้อยลง ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความไว (sensitive) ต่อมิวทาเจนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด ปริมาณของมิวทาเจน และชนิดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดของส่วนที่นำมาเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเทชัน โดยวิธีการก่อการกลายพันธุ์ด้วยมิวทาเจนชนิดต่าง ๆ จะมีการกำหนดอัตราการอยู่รอดของเชื้อเพื่อสามารถคัดแยกเชื้อที่มีโอกาสที่สูงที่จะเกิดการกลายพันธุ์

#### 2.4.5 ลักษณะสายพันธุ์กลายที่นิยมใช้ศึกษาทางพันธุศาสตร์

ในการเกิดสายพันธุ์กลายนั้นบางครั้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะภายนอก หรือฟีโนไทป์ (phenotype) เนื่องจากเกิดมิวเทชันในบริเวณของยีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะฟีโนไทป์ โดยสายพันธุ์กลายที่นิยมใช้ในการศึกษาทางลักษณะทางพันธุศาสตร์ มีดังต่อไปนี้ (Brown, 1992)

- auxotrophic mutants สายพันธุ์กลายชนิดนี้จะขาดยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารที่จำเป็นในการเจริญ เช่น กรดอะมิโน โดยสายพันธุ์กลายชนิดนี้ยังสามารถเจริญได้ถ้ามีการเติมสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการลงในอาหาร

- antibiotics resistance mutants สายพันธุ์กลายชนิดนี้จะสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ได้ โดยปกติจะใช้ยาปฏิชีวนะที่สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ตั้งต้นได้

- condition – lethal mutants สายพันธุ์กลายชนิดนี้จะสามารถเจริญได้ในสภาวะที่เฉพาะเท่านั้น เช่น อาจเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิหนึ่งเท่านั้น และจะตายเมื่อได้รับอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่านั้น

- regulatory mutants สายพันธุ์กลายชนิดนี้จะสูญเสียความสามารถในการควบคุมการแสดงออก (expression) เช่น ปกติใน *E. coli* ยีน *lac operon* จะไม่แสดงออกเมื่อขาดแลคโตส (lactose) แต่เมื่อเกิดสายพันธุ์กลายแล้ว *E. coli* จะสามารถย่อยแลคโตสได้อย่างสม่ำเสมอ และมีการสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อย่อยแลคโตสอย่างสม่ำเสมอ แม้ว่าในระบบจะไม่มีแลคโตสก็ตาม



## 2.5 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารโคลชิซิน

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์หรือสารที่สนใจ นอกจากการทำให้เกิดสายพันธุ์กลายในส่วนของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมแล้ว ยังมีการเหนี่ยวนำให้เกิดพอลิพลอยด์เพื่อให้เกิดการผลิตเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย โดยการเกิดพอลิพลอยด์นั้นอาจเกิดได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากการได้รับสภาพแวดล้อมที่รุนแรงกว่าปกติ เช่น อุณหภูมิสูงหรือต่ำจนเกินไป หรือได้รับธาตุอาหารที่สูงหรือต่ำมากจนเกินไป แต่จะพบได้น้อยมาก ทำให้มีการนำเอาสารเคมีเข้ามาช่วยทำให้มีการเพิ่มโครโมโซมได้มีหลายชนิด ได้แก่ โคลชิซิน, อีเทอร์, คลอโรฟอร์ม แต่สารที่ทำให้ได้ผลที่ดีและนิยมใช้กันได้แก่สารโคลชิซิน โดยสารโคลชิซินมีคุณสมบัติดังนี้

โคลชิซินเป็นสารประเภทอัลคาลอยด์เป็นสารไม่มีสี มีลักษณะเป็นผลึกมีสูตรโครงสร้างโมเลกุล  $C_{22}H_{25}NO_6$  สามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และน้ำเย็น เป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าหรือมากกว่า สารโคลชิซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้าง spindle fiber ในขณะที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัวให้เซลล์หยุดอยู่ที่ระยะเมทาเฟส โดยจะเปลี่ยนรูปร่างจากลักษณะเป็นเส้น (fibriform elements) ไปเป็นลักษณะกลม (corpuscular elements) รวมตัวอยู่ที่ขั้วเซลล์ ทำให้ไม่เกิดการแยกตัวของโครโมโซมออกเป็นสองส่วน เซลล์จึงมีโครโมโซมเป็นสองเท่าหรือมากกว่า เรียกว่าการเกิดพอลิพลอยด์ซึ่งสามารถส่งทอดไปสู่รุ่นต่อไปได้โดยไม่เกิดความผิดปกติ (Eigsti Dustin และ Gay-Winn, 1949) โดยสารโคลชิซินจะมีผลกับเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวเท่านั้น ที่ผ่านมาได้มีการนำเอาสารโคลชิซินมาใช้กับจุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อราหลายชนิด โดยมากจะใช้กับเส้นใย หรือสปอร์ (แสดงดังตารางที่ 2-5) และมีการใช้ในพืชโดยส่วนใหญ่เป็นพืชผล และพืชดอก โดยจะใช้กับ เมล็ด ต้นอ่อน จุดเจริญของตายอด หรือตาข้าง จะใช้โคลชิซินด้วยวิธีการแช่ยอด การหยด และการป้าย ผลจากการใช้โคลชิซินกับพืชจะพบว่าจะมีการแบ่งเซลล์ช้ากว่าปกติ แต่ผลของพืชจะมีขนาดใหญ่ขึ้น (Huskin, 1941)

## ตารางที่ 2-5 ตัวอย่างเชื้อราที่มีการใช้โคลชิซิน

ชนิดเชื้อรา	เซลล์ที่นำมาใช้กับโคลชิซิน
<i>Allomyces arbuscula</i>	เส้นใย
<i>Allomyces macrogynus</i>	เส้นใย
<i>Achlya klebsiana</i>	สปอร์
<i>Comatricha niger</i>	สปอร์
<i>Didymium eunigripes</i>	สปอร์
<i>Didymium cancellalum</i>	สปอร์
<i>Fuligo septica</i>	สปอร์
<i>Hemitrichia vesparium</i>	สปอร์
<i>Saprolegnia ferax</i>	สปอร์

(Ross, 1960; Roger, 1972)

## 2.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mandel James และ Richard (1971) ได้นำเชื้อ *T. viride* QM 6a มาทำให้เกิดสายพันธุ์ กลายโดยการฉายด้วยอิเล็กตรอนพลังงานสูง (18 กิโลวัตต์) และผลิตเอนไซม์โดยให้เซลล์ลูโลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสายพันธุ์กลายให้ค่าเอกซอกลูคาเนส เท่ากับ 4.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 2.15 เท่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ได้เพียง 2.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Hayashida และ Flor (1981) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Aspergillus awamori* var. kawashi โดยใช้สปอร์มาเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายด้วยสารสารเอ็นทีจี ร่วมกับการฉายรังสี อัลตราไวโอเล็ต พบว่าไอโซเลต HF-10 มีการผลิตแอกทิวิตีของโปรตีนเนส เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ตั้ง ต้น 5 เท่า และมีไอโซเลต HF-15 มีการผลิตแอกทิวิตีของโปรตีนเนสลดลงมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 93 เปอร์เซ็นต์

Fennington Neubauer และ Stutzenberger (1984) ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์ กลายของเชื้อ *Thermomonospora curvata* โดยใช้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ร่วมกับรังสี อัลตราไวโอเล็ต เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอกซอกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนส พบว่า

ไอโซเลต G-11 มีแอกทิวิตีของเอกโซกลูคาเนส เท่ากับ 0.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเอนโดกลูคาเนส มีแอกทิวิตี เท่ากับ 36.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ตั้งต้นมีแอกทิวิตีของเอกโซกลูคาเนส เท่ากับ 0.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเอนโดกลูคาเนส มีแอกทิวิตีเท่ากับ 25.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยแอกทิวิตีเอกโซกลูคาเนสสูงจากสายพันธุ์ตั้งต้น 1.15 เท่า และแอกทิวิตีเอนโดกลูคาเนส สูงจากสายพันธุ์ตั้งต้น 1.42 เท่า

Sheir-Neiss และ Montenecourt (1984) ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายกับสปอร์ของเชื้อ *T. reesei* QM 6a เพื่อเพิ่มการผลิตเซลลูเลส โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต และสารสารเอ็นทีจี โดยไอโซเลต *T. reesei* Rut-C30 ได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายด้วยสารเอ็นทีจี และ *T. reesei* RL-P37 ได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายด้วยสารเอ็นทีจี ร่วมกับการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า *T. reesei* Rut-C30 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนส เท่ากับ 0.73 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.04 เท่า และเอนโดกลูคาเนส มีค่าแอกทิวิตีเท่ากับ 31.4 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.62 เท่า ส่วนไอโซเลต *T. reesei* RL-P37 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนส เท่ากับ 1.14 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.63 เท่า และเอนโดกลูคาเนส มีค่าแอกทิวิตีเท่ากับ 44.7 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 3.73 เท่า โดยใช้ 5 เปอร์เซ็นต์ Solka flocc เป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่ *T. reesei* QM 6a มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนส เท่ากับ 0.7 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเอนโดกลูคาเนส มีค่าแอกทิวิตีเท่ากับ 12.0 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Durand และ Clanet (1987) ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายกับสปอร์ของเชื้อ *T. reesei* QM 9114 ด้วยสารเอ็นทีจี อีเอ็มเอส และกรดไนตริก โดยเลือกที่ความอยู่รอดของเชื้อ 5-20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไอโซเลต CL 11 มีค่าแอกทิวิตีของเอกโซกลูคาเนส เท่ากับ 2.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีแอกทิวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส เท่ากับ 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ตั้งต้นมีค่าเท่ากับ 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์กลายให้ค่าแอกทิวิตีมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.5 เท่าของเอกโซกลูคาเนส และมากกว่าสายพันธุ์ ตั้งต้น 2 เท่าในเบตา-กลูโคซิเดส โดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

Gokhale และคณะ (1988) ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายของเชื้อ *Aspergillus niger* NCIM 1207 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต โดยใช้กับสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลือกเชื้อที่มีอัตราการตายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ทำการวัดแอกทิวิตีเอนไซม์ 3 ชนิด

ได้แก่ เอนโดกิลูคาเนส ไฮแลนเนส และเบตา-กลูโคซิเดส พบว่าสายพันธุ์ตั้งต้นมีแอกทิวิตี เท่ากับ 0.46, 1.6 และ 0.19 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ โดยที่ไฮโซเลต UV-52 มีแอกทิวิตีเท่ากับ 0.75, 14.0 และ 5.0 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.63, 8.75 และ 26.32 เท่าตามลำดับ

Kuhad Kumer และ Singh (1994) ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ สารละลายสปอร์ในเชื้อ *Fusarium oxysporum* โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต ที่มีกำลังของหลอด 6 วัตต์ เป็นเวลา 5-30 นาที ร่วมกับการใช้ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สารเอ็นทีจีเป็นเวลา 30-60 นาที มีการผลิต เอกโซกลูคาเนส เอนโดกิลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส คิดเป็น 2.89, 2.3 และ 4.25 เท่า ตามลำดับ ของสายพันธุ์ตั้งต้น

Sarangbin และคณะ (1994) ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยการใส่ 0.3 เปอร์เซ็นต์ สารโคเลซิทรีนในเชื้อ *Aspergillus niger* WU-2223L เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต กรดซิตริกพบว่าสามารถทำให้มีการผลิตกรดซิตริกได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นถึง 1.4 เท่า

Gadgil และคณะ (1995) ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายของ *T. reesei* QM 9414 โดยใช้  $\text{NaNO}_2$  ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ร่วมกับการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตในช่วงความยาวคลื่น 180-210 นาโนเมตร กำลัง 450 วัตต์ กับสารละลายสปอร์ พบว่า มีแอกทิวิตีของเอกโซกลูคาเนส เอนโดกิลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส เป็น  $0.54 \pm 0.11$ ,  $6.50 \pm 1.30$  และ  $0.32 \pm 0.06$  ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.5, 1.81, 1.07 เท่าตามลำดับ

Chand และคณะ (2004) ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายกับสปอร์ของ *Trichoderma* sp. และ *Aspergillus* sp. ด้วย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ของเอซีเดียมโบรไมด์ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ของสารเอ็นทีจี และรังสีอัลตราไวโอเลตโดยใช้เวลาในการฉายรังสี 30 นาที พบว่าไฮโซเลต CMV1-A3 ซึ่งเป็นเชื้อ *Trichoderma* สายพันธุ์กลาย โดยมีแอกทิวิตีของเอกโซกลูคาเนส เท่ากับ 0.275 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม ในเวลา 1 นาที โดยมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.02 เท่า และไฮโซเลต CMV5-A10 ซึ่งเป็นเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์กลาย โดยมีแอกทิวิตีของเอกโซกลูคาเนสเท่ากับ 0.411 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม ในเวลา 1 นาที มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.02 เท่า

Rajoka (2005) ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Cellulomonas biazotea* โดยใช้สารเอ็นทีจีที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารอีเอ็มเอสที่ระดับความเข้มข้น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำให้เชื้อที่มีอัตราการตาย 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แอกติวิตีของไซแลนเนส เบตา-ไซโลซิเดส เอกโซกลูคาเนส เบตา-กลูโคซิเดส และเอนโดกลูคาเนส เท่ากับ 451, 98, 80, 95 และ 143 ยูนิตต่อลิตร ในเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมมีเพียง 387, 17, 20, 6 และ 38 ยูนิตต่อลิตร ในเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ

Adsul และคณะ (2007) ได้ทำการทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายของ *Penicillium jarthinellum* NCIM 1171 โดยใช้สารอีเอ็มเอสที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในความเข้มข้นสารละลายสปอร์  $10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 3 นาที พบว่ามีแอกติวิตีของ เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส เบตา-กลูโคซิเดส และไซแลนเนส เป็น 3.4, 97, 6.1, 225 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นคิดเป็น 2.26, 2.52 และ 1.34 เท่า ส่วนเบตา-กลูโคซิเดส น้อยกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 0.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

### บทที่ 3

## วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

### วัสดุอุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์ (microscopes)	(Olympus, Japan)
กระดาษกรองเบอร์ 1	(Whatmann)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator)	(Vision Scientefic, Korea)
เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)	(Barnstead, U.S.A.)
เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	(Sartorius, Germany)
เครื่องปั่นเหวี่ยง (refrigerated centrifuge)	(Hettich, Germany)
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BJ 1000C	(Precisa, Switzerland)
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285	(Mettler Toledo, USA)
เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)	(Sturdy industrial, Taiwan)
เครื่องดูดสารแบบสุญญากาศ (suction)	(GAST, U.S.A.)
เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)	(Vision Scientefic, Korea)
เครื่องกำเนิดรังสีอัลตราไวโอเล็ต	(Vilber lourmat, Germany)
เครื่องตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอ ยี่ห้อ ABI รุ่น 3100	(Applied Biosystem U.S.A.)
เครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร (cork borer)	
เครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร (cork borer)	
ตู้บ่มเชื้อ (incubator)	(EHRET, Germany)
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)	(Mammert, Germany)
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	(Clean model, Lab service Ltd)
เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (water bath)	(Mammert, Germany)
เครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader)	(Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)
หลอดรังสีอัลตราไวโอเล็ต	(Sylvania, Japan)
อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemocytometer)	(Brand, Germany)

## สารเคมี

กรดบอริก (bolic acid)	(Fluka, Switzerland)
กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid)	(Sigma, U.S.A.)
กลูโคส (glucose)	(Fisher scientific, UK)
คลอโรฟอร์ม (chloroform)	(Labscan, Thailand)
โคลชิซีน (Colchicine)	(Fluka, Switzerland)
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	(Merck, Germany)
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	(Univar, Australia)
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	(Scharlau, Spain)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	(Univar, Australia)
3-โซเดียมซิเตรต (tri-sodium citrate)	(Univar, Australia)
โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	(Univar, Australia)
โซเดียมเมทาไบซัลไฟด์ ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )	(Univar, Australia)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Univar, Australia)
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb	(SibEnzyme, U.S.A.)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	(Scharlau, Spain)
ไตรตอน เอกซ์-100 (Triton x-100)	(Scharlau, Spain)
ทวิน-80 (Tween 80)	(Merck, Germany)
โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin = BSA)	(Merck, Germany)
เพปโตน (peptone)	(Scharlau, Spain)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	(Univar, Australia)
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	(Univar, Australia)
โพลีนีฟีนอลรีเอเจนท์ (folin phenol reagent)	(Carlo Erba, Italy)
ฟีนอล ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ )	(Merck, Germany)
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	(Univar, Australia)
แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $\text{MgCl}_2$ )	(Fermentas, USA)
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	(Merck, Germany)
2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-Mercaptoethanol)	(Sigma, U.S.A.)
ยูเรีย ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ )	(Univar, Australia)

วุ้นผง (agar)	(วุ้นบริสุทธิ, ประเทศไทย)
สารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนท์ (folin phenol reagent)	(Carlo Erba, Italy)
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	(Hi media, India)
สีย้อมคอนโกเรด (Congo red)	(Fluka, Switzerland)
สีย้อมแลคโตฟีนอล คอตตอนบลู (lactophenol cotton blue)	(Sigma,U.S.A.)
อะกาโรส (agarose)	(Sigma, U.S.A.)
เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethylmethanesulfonate = EMS)	(Sigma, U.S.A.)
เอนไซม์ย่อยอาร์เอ็นเอ (RNase)	(Fermentas, USA)
เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	(องค์การสุรา กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)
เอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ (absolute ethanol)	(Merck, Germany)
เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)	(Fermentas, USA)
แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B: C <sub>47</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>17</sub> )	(Bristol-Myers Squibb, France)
แอมโมเนียมซัลเฟต (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·SO <sub>4</sub>	(Scharlau, Spain)
แอลฟา-เซลลูโลส ( $\alpha$ -cellulose)	(Sigma, U.S.A.)
ไฮดรอนซัลเฟตเฮปทาไฮเดรต (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	(Univar, Australia)
ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol)	(Merck, Germany)
D-Salicin (C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> )	(Fluka, Switzerland)
Carboxymethylcellulose (CMC)	(Fluka, Switzerland)
3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)	(Fluka, Switzerland)
Potato Dextrose Agar (PDA)	(Difco Laboratories, U.S.A.)
Potato Dextrose Broth (PDB)	(Hi media, India)
Polyethylene glycol 6000 (PEG)	(Fluka, Switzerland)
CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide)	(Merck, Germany)
EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)	(Merck, Germany)
Deoxy ribonucleoside triphosphate (dNTP)	(Fermentas, USA)
Taq Buffer	(Fermentas, USA)
Taq Polymerase	(Fermentas, USA)



## วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเชื้อ *T. reesei* TISTR 3081 (ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) ทำการศึกษาลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar) โดยใช้มีดผ่าตัดตัดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร นำไปวางบนสไลด์ และนำไปวางในจานแก้วที่มีแท่งแก้วสามเหลี่ยม และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเขี่ยเชื้อไปวางด้านขอบทั้งสี่ด้านของอาหารแข็ง นำไปบ่มที่ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน นำชิ้นวุ้นออก และนำสไลด์มาหยดด้วยสีย้อม แลคโตฟีนอลคอตตอนบลู (Lactophenol cotton blue) แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 3.2 เหมียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส

1. ทำการเหนียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์ด้วยอีเอ็มเอส (ethylmethanesulfonate)

โดยใช้วิธีของ Tan และคณะ (2003) ทำการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ โดยการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารกึ่งแข็งเอียง PDA เป็นเวลา 7 วัน เติมสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 และ ทวิน-80 ในอัตราส่วน 5,000:1 เขย่าเพื่อให้สปอร์หลุดออกมา นำมากรองด้วยสำลีเพื่อคัดแยกเส้นใยออก นำสารแขวนลอยสปอร์ถ่ายใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สปอร์แยกออกจากกัน หลังจากนั้นทำการเหนียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส โดยนำสารแขวนลอยสปอร์ที่มีสปอร์  $10^5$ - $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร (นับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด) มาใส่ในหลอดทดลองที่มีสารอีเอ็มเอสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 0.12, 0.24, 0.36, 0.48, 0.60, 0.72 และ 0.84 กรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เพื่อให้สปอร์สัมผัสกับสารอีเอ็มเอสอย่างทั่วถึง นำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้รับสารอีเอ็มเอสแต่ละความเข้มข้นมา 100 ไมโครลิตร และทำการเจือจางสารแขวนลอยสปอร์ด้วยวิธี 10-fold serial dilution ตั้งแต่  $10^{-1}$ - $10^{-5}$  เท่า นำแต่ละความเข้มข้นมา 100 ไมโครลิตร จากนั้นเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA บ่มที่ 26 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนสปอร์ที่อยู่รอด เพื่อนำไปสร้างกราฟความอยู่รอด (survival curve) และนำไป

คำนวณหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้สำหรับการคัดเลือก และทำการตัดแยกโคโลนีลงเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง PDA นำไปบ่มที่ 26 องศาเซลเซียส

## 2. ทดสอบความสามารถในการผลิตเซลลูเลสขั้นต้นบนอาหารกึ่งแข็ง CMC agar

นำเชื้อราที่ได้จากข้อ 3.2.1 ที่เลี้ยงลงบนอาหารกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 3 วัน ตัดปลายเส้นใยด้วยคอร์กเบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร และย้ายมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar โดยบ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ราวทับด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ของ congo red ทิ้งไว้ 20 นาที แล้วล้างออกด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ ล้างซ้ำจนกระทั่งสีของ congo red จางไป จะปรากฏวงใส จากนั้นวัดขนาดความกว้างของวงใส และความกว้างของโคโลนี นำไปหาอัตราส่วนระหว่างความกว้างของโคโลนีกับความกว้างของวงใส ทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างของโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ เพื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

## 3. ทดสอบความสามารถในการผลิตเซลลูเลสในอาหารเหลว Mandels' medium

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นตัดปลายเส้นใยด้วยคอร์กเบอร์ 10 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ทำการผลิตเซลลูเลสโดยใช้อาหารเหลวสูตร Mandels' medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 นำไปนิ่งฆ่าเชื้อ ทำการถ่ายเชื้อ และบ่มเชื้อในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วเก็บตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ในกลุ่มของเซลลูเลส ดังนี้ คือวัดแอกทิวิตีของ exoglucanase ด้วยวิธี filter paper assay (Ghose, 1987) โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เป็นสารตั้งต้น วัดแอกทิวิตีของ endoglucanase ด้วยวิธี carboxymethyl cellulase assay (Ghose, 1987) โดยใช้ carboxymethylcellulose (CMC) เป็นสารตั้งต้นและวัดแอกทิวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส ใช้วิธีของ Sternberg, Vijayakumar และ Reese (1977) โดยใช้ salicin เป็นสารตั้งต้น (ภาคผนวก ง) (กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน) และหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Micro Lowry's assay โดยใช้วิธีของ Held และ Hurley (2001) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร โดยใช้โบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA) เป็นสารละลายมาตรฐาน (ภาคผนวก จ) และนำค่าน้ำตาลรีดิวซ์และค่าโปรตีนที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณแอกทิวิตีจำเพาะในหน่วยยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

### 3.3 เหนียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

#### 3.3.1 กลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตของไอโซเลต EMS11

#### 3.3.2 กลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตของไอโซเลต EMS45

นำไอโซเลต EMS11 และ EMS45 มาทำการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยการเลี้ยงเชื้อ ราบนอาหารกึ่งแข็งเอียง PDA เป็นเวลา 7 วัน เติมสารละลายฟอสเฟสฟิเฟอริ พีเอช 7.0 และ ทวิน-80 ในอัตราส่วน 5,000:1 เขย่าเพื่อให้สปอร์หลุดออกมา กรองด้วยสำลีเพื่อตัดแยกเส้นใย ออก นำสารแขวนลอยสปอร์ถ่ายใส่ ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สปอร์แยกออกจากกัน หลังจากนั้นทำการเหนียวนำไปเกิดการ กลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส โดยนำสารแขวนลอยสปอร์ที่มีสปอร์  $10^5$ - $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร (นับ ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด) ทำโดยการดูดสารแขวนลอยสปอร์ที่ผ่านการกรองเส้นใยออกปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร นำไปวาง ในตู้ฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่กำหนดระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดรังสีกับจานเพาะเชื้อเป็นระยะ 20 เซนติเมตร ทำการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตกำลัง 10 วัตต์ จำนวน 5 หลอด โดยเปิดฝาจานเพาะ เชื้อออกเพื่อให้สปอร์ได้รับรังสีโดยตรง ขณะทำการฉายรังสีทำการปั่นกววนโดยแท่งแม่เหล็ก ตลอดเวลา เพื่อให้สปอร์ได้รับรังสีอย่างทั่วถึง ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์ 100 ไมโครลิตร ของแต่ละระยะเวลา ทำการเจือจางสารแขวนลอยสปอร์ด้วยวิธี 10-fold serial dilution ตั้งแต่  $10^{-1}$ - $10^{-5}$  เท่า นำแต่ละความเข้มข้นมา 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA บ่มที่ 26 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนสปอร์ที่อยู่รอด เพื่อนำไปสร้างกราฟ ความอยู่รอด (survival curve) และตัดแยกโคโลนีที่ขึ้นเลี้ยงบนอาหารแข็งกึ่ง PDA ทดสอบ ความสามารถในการผลิตเซลล์เนสขึ้นต้นบนอาหารกึ่งแข็ง CMC agar ทำเช่นเดียวกับ 3.2 ข้อ 2 และ ทดสอบความสามารถในผลิต เซลล์เนสในอาหารเหลว Mandels' medium ทำเช่นเดียวกับ ข้อ 3.2 ข้อ 3

### 3.4 ทดสอบความต้านทานยาปฏิชีวนะเพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์กลาย

เพื่อคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย ทำการทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ โดยนำเชื้อ ที่เหนียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส และเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้นมาเลี้ยงบนอาหาร

เลี้ยงเชื้อกิ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายเชื้อโดยใช้คอร์กเบอร์ 10 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะปลายเส้นใยถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อกิ่งแข็ง PDA ที่มีแอมโฟเทอรีซิน บี ระดับความเข้มข้นที่ 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี นำไปสร้างกราฟ และเลือกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่สามารถฆ่าราสายพันธุ์ตั้งต้น เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ตาย

### 3.5 ศึกษาเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาของ *T. reesei* TISTR 3081 และ E45-UV26

ศึกษาลักษณะภายนอก ของเชื้อ *T. reesei* TISTR 3081 เปรียบเทียบกับ E45-UV26 โดยเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น และ E45-UV26 บนอาหารกิ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน นั้นตัดปลายเส้นใยด้วยคอร์กเบอร์ 10 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร มาลงเลี้ยงบนอาหารกิ่งแข็ง PDA โดยใช้มีดผ่าตัดตัดอาหารเลี้ยงเชื้อกิ่งแข็ง PDA ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร นำไปวางบนสไลด์ และนำไปวางในจานแก้วที่มีแท่งแก้วสามเหลี่ยมและน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเขี่ยเชื้อไปวางด้านขอบทั้งสี่ด้านของอาหารแข็ง นำไปบ่มที่ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน นำชิ้นวัฒนธรรม และนำสไลด์มาหยดด้วยสีย้อมแลคโตเฟินอลคอตตอนบลู (Lactophenol cotton blue) แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 3.6 เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *cbh 1* และ *cbh2* ระหว่าง *T. reesei* TISTR 3081 กับ E45-UV26

#### 1. สกัดดีเอ็นเอของ *T. reesei* TISTR 3081 กับ E45-UV26

โดยนำเส้นใยรามาสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ของ Zhou, Miwa และ Hogetsu (1999) โดยใช้โกรังบดเซลล์พร้อมเติมไนโตรเจนเหลวบดจนกว่าเซลล์ละเอียด เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร บดต่อไปอีกเล็กน้อย หลังจากนั้นถ่ายลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงซ้ำเพื่อล้างตัวอย่างจนของเหลวส่วนบนใส เติมสารละลาย 2X CTAB lysis buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (chloroform / isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 24:1 (v/v) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์หลอดใหม่ เติมสารละลาย คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตรอีกครั้ง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ หลอดใหม่เติมสารละลาย 2-โพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใช้ปิเปตดูดส่วนใสทิ้ง ให้เหลือแต่ตะกอน เติมเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร RNase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ PEG (Polyethylene glycol) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใช้ปิเปตดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือตะกอนของดีเอ็นเอ เติมเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ออก ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 2. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อราด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ในข้อ 3.6.1 ไปทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) ได้แก่

CBHI-F (forward) 5'-TAGGTACCCAGTCGGCCTGCACTCTCC-3'

CBHI-R (reverse) 5'-GCTCTAGATTCAGGCACTGAGAGTAGTAAGGGTTC-3'

CBHII-F (forward) 5'-CGAATTCATGATTGTCGGCATTCTCACC-3'

CBHII-R (reverse) 5'-ATGTAGTTGCGGCCGCCAGGAACGATGGGTTTGCG -3'

โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาจำนวนปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอประมาณ 10-100 นาโนกรัม, 10X PCR buffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP, 10 mM primer (CBHI-F และ CBHI-R, CBHII-F และ CBHII-R) และ 5 U/μl Taq polymerase (Fermentas)

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทำในเครื่อง Thermocycler (Takara PCR thermal cycler Model TP600, Japan) โดยได้กำหนดสภาวะไว้ดังต่อไปนี้

Initial denaturation	95	องศาเซลเซียส	4 นาที	
Amplification				
Denaturation	95	องศาเซลเซียส	30 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	54.5	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	2 นาที	
Final Extension	72	องศาเซลเซียส	7 นาที	
Hold	4	องศาเซลเซียส	∞	

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตร ใต้อะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

### 3.7 เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์กลายโดยใช้โคลชิซิน

ทำการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์กลายโดยใช้โคลชิซิน โดยใช้วิธีของ Toyama และคณะ (2000) ทำโดยการเตรียมอาหาร Mandels' medium ตามสูตรของ Mandels และ Weber (1969) ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ โคลชิซินที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการถ่ายสปอร์ของเชื้อราลงในอาหาร นำไปบ่มที่ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน หลังจากนั้นทำการคัดเลือกไฮโซเลตโดยใช้ selection medium (ภาคผนวก ก) โดยเตรียมอาหารชั้นล่างแล้วเกลี่ยเชื้อ 100 ไมโครลิตรลงบนอาหารชั้นล่างให้เห็นว่าอาหารแห้งสนิท นำไปบ่มที่ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการรดทับด้วยอาหารชั้นบน นำไปบ่มที่ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน คัดแยกเชื้อที่ขึ้นมาเลี้ยงลงบนอาหารกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน ทดสอบความสามารถในการผลิตเซลล์ชั้นต้นบนอาหารกึ่งแข็ง CMC agar ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.2 ข้อ 2 และ ทดสอบความสามารถในการผลิตเซลล์ในอาหารเหลว Mandels' medium ทำเช่นเดียวกับ 3.2 ข้อ 3

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

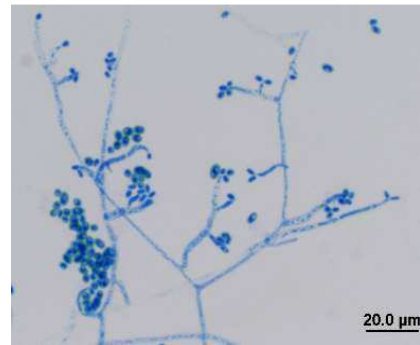
#### ผลการวิเคราะห์ปัจจัย

#### 4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารกึ่งแข็ง PDA ของเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 โดยศึกษาลักษณะภายนอกของโคโลนีที่เจริญบนอาหารกึ่งแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน มีลักษณะการสร้างเส้นใยสีขาว สีของสปอร์มีสีเขียวดังภาพที่ 4-1 และเมื่อเจริญจะมีการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง และเมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีสปอร์มีลักษณะค่อนข้างกลมและขนาดเล็กมาก แต่ละสปอร์มีเพียง 1 เซลล์ ดังภาพที่ 4-2



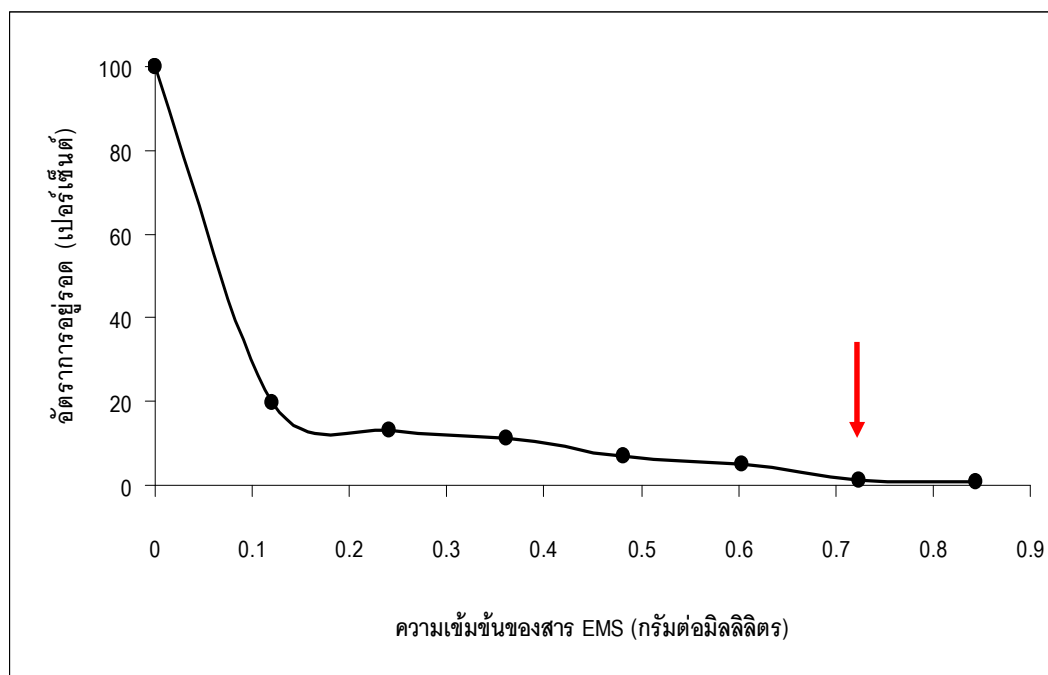
ภาพที่ 4-1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี *T. reesei* TISTR 3081 บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4-2 ลักษณะสัณฐานวิทยา เส้นใย และสปอร์ของ *T. reesei* TISTR 3081 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เจริญบนอาหารกึ่งแข็ง PDA อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

## 4.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส

นำเชื้อรามาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารอีเอ็มเอสที่ความเข้มข้น 0.12 - 0.84 กรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารอีเอ็มเอสที่ทำให้เชื้อราที่มีอัตราการรอดน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อคัดแยกไอโซเลตที่ได้มาทดสอบ



ภาพที่ 4-3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารอีเอ็มเอสกับเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด

จากภาพที่ 4-3 พบว่าความเข้มข้นของอีเอ็มเอส ที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.72 และ 0.84 กรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้มีอัตราการรอดของเชื้อน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (บริเวณลูกศร) โดยความเข้มข้นที่ 0.72 และ 0.84 กรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้มีอัตราการรอดเป็น 0.98 และ 0.65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยสามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลต ซึ่งไอโซเลต EMS1 ถึง EMS17 ได้จากระดับความเข้มข้นของอีเอ็มเอสที่ 0.72 กรัมต่อมิลลิลิตร และไอโซเลต EMS18 ถึง EMS50 ได้จากระดับความเข้มข้นของอีเอ็มเอสที่ 0.84 กรัมต่อมิลลิลิตร

นำไอโซเลตที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการผลิตเซลล์ขั้นต้นบนอาหาร CMC agar ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4-1



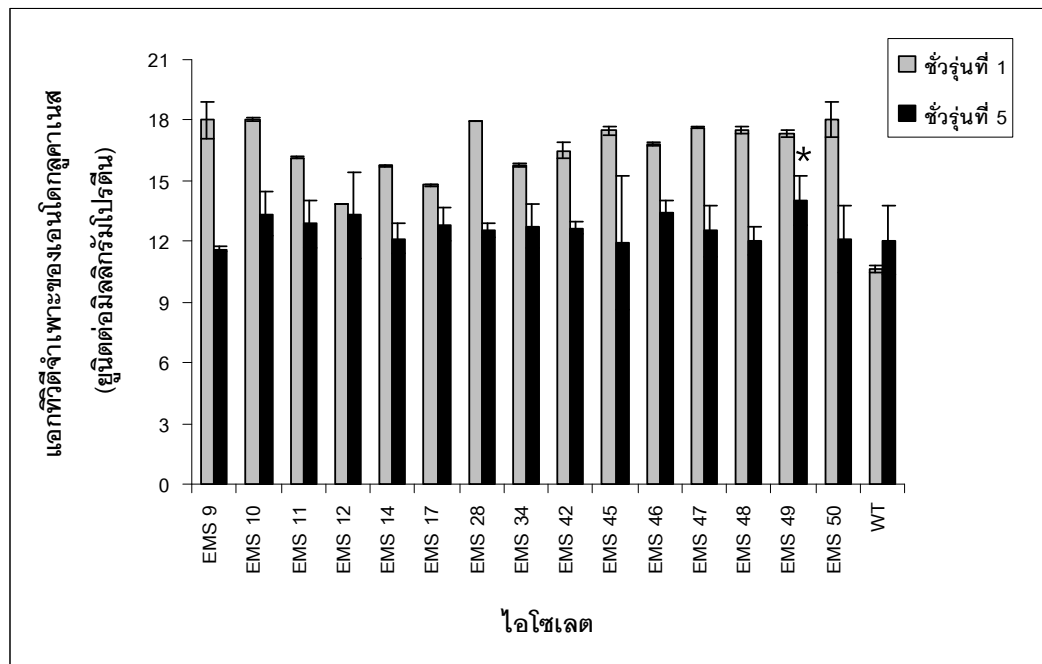
**ตารางที่ 4-1** ความสามารถในการผลิตเซลล์สบนอาหาร CMC agar ของ *T. reesei* TISTR 3081 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส ที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่มีค่าน้อย 15 อันดับแรก

ไอโซเลต	ความกว้างของวงใส เฉลี่ย [a] (mm)	ความกว้างของโคโลนี เฉลี่ย [b] (mm)	อัตราส่วนเฉลี่ย [b/a]
EMS9	35.897	22.747	0.634 <sup>ef</sup>
EMS10	35.473	22.770	0.642 <sup>ef</sup>
EMS11	35.580	23.017	0.647 <sup>f</sup>
EMS12	34.760	22.260	0.640 <sup>ef</sup>
EMS14	36.680	23.347	0.637 <sup>ef</sup>
EMS17	36.517	21.967	0.602 <sup>cd</sup>
EMS28	35.933	21.660	0.603 <sup>cd</sup>
EMS34	35.680	22.713	0.637 <sup>ef</sup>
EMS42	35.843	20.620	0.575 <sup>ab</sup>
EMS45	36.647	20.997	0.573 <sup>ab</sup>
EMS46	36.823	21.797	0.592 <sup>bc</sup>
EMS47	36.680	22.717	0.619 <sup>de</sup>
EMS48	36.690	20.627	0.562 <sup>a</sup>
EMS49	36.300	20.803	0.573 <sup>ab</sup>
EMS50	36.450	21.683	0.595 <sup>bc</sup>
WT	34.597	24.233	0.700

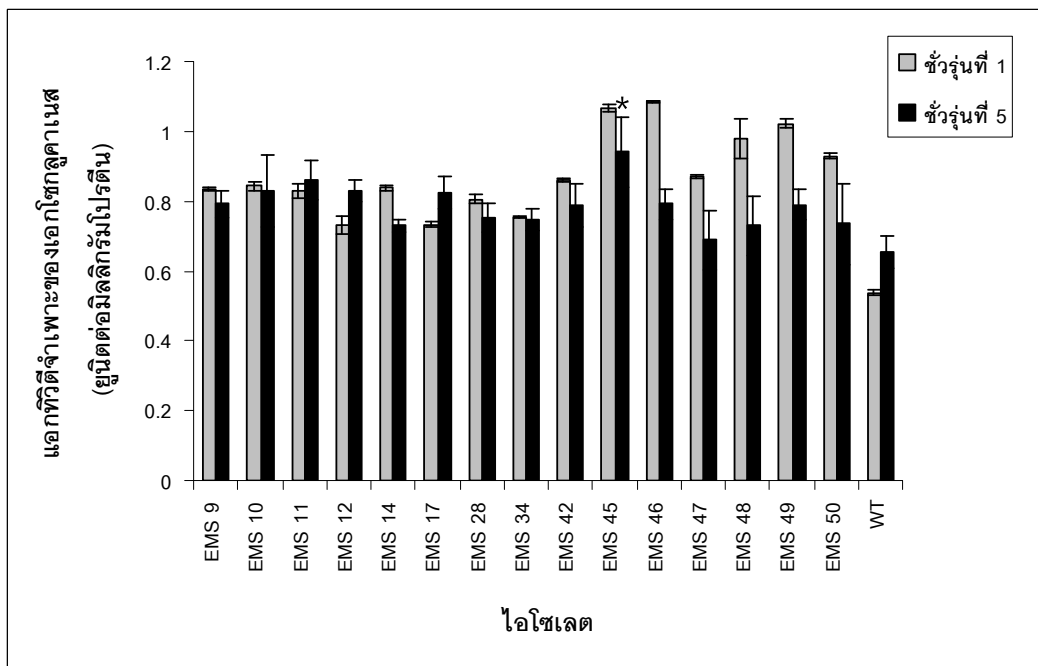
**หมายเหตุ** ตัวอักษรพิมพ์เล็ก หมายถึงค่าอัตราส่วนเฉลี่ยของความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่ได้จากแต่ละไอโซเลตที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (โดยทดสอบ ANOVA เพื่อหาความแตกต่าง และทดสอบเป็นคู่ ๆ โดย Duncan ใช้โปรแกรม SPSS version 15.0)

จากตารางที่ 4-1 ทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่มีค่าน้อย 15 อันดับแรก มาทดสอบความสามารถผลิตเซลล์สใน Mandels' medium

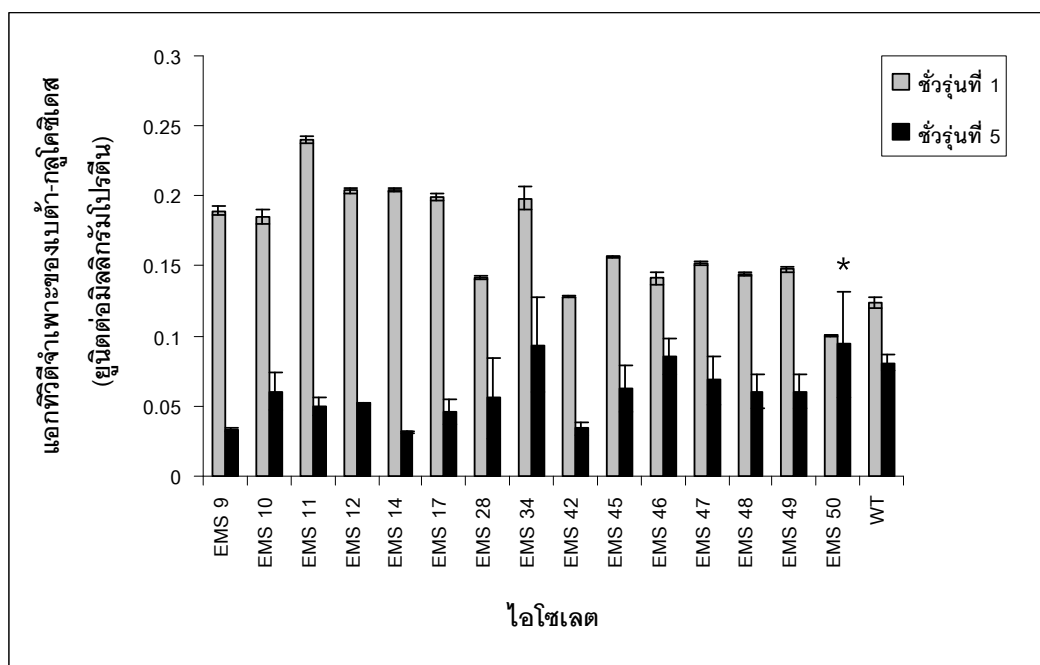
ทดสอบความสามารถการผลิตเซลล์เลสในอาหารเหลว Mandel's medium เพื่อนำมาวัด แอคติวิตี และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อ หน่วยมิลลิกรัมโปรตีนในชั่วโมงที่ 1 และที่ 5 โดยทำการวัดแอคติวิตีเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนโดกลูคาเนส ดังภาพที่ 4-4 เอกลิซอกลูคาเนส ดังภาพที่ 4-5 และเบตา-กลูโคซิเดส ดังภาพที่ 4-6 (ค่าแสดงในภาคผนวก ซ)



ภาพที่ 4-4 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอคติวิตีจำเพาะเอนโดกลูคาเนสของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส



ภาพที่ 4-5 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทีวิตีจำเพาะของไซโตไคน์ของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส



ภาพที่ 4-6 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทีวิตีจำเพาะเบตา-กลูโคซิเดสของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส

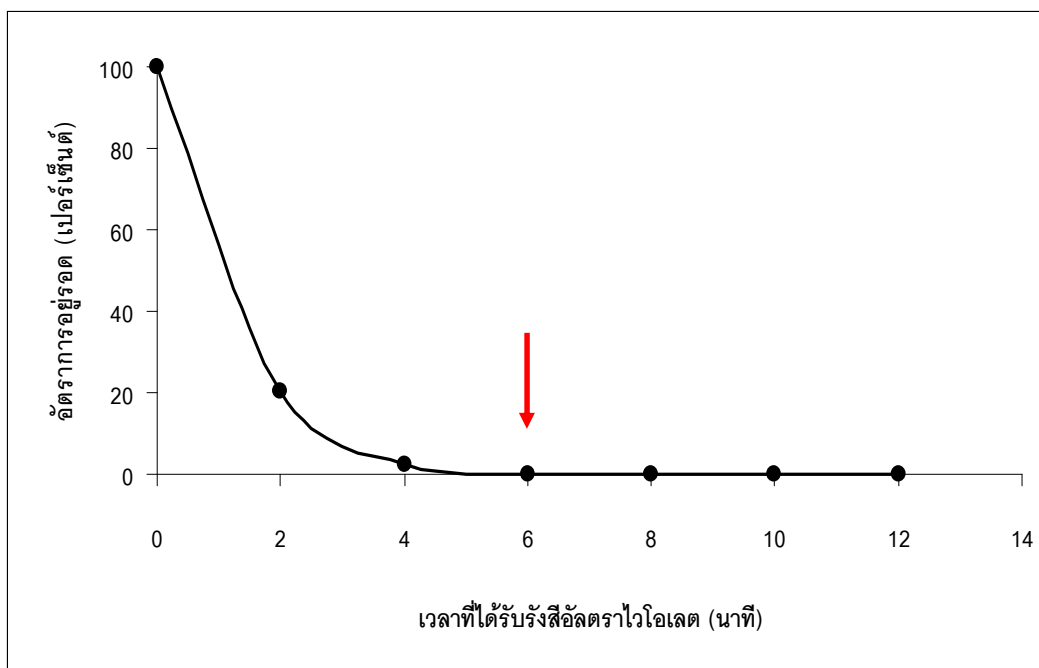
(ซึ่งกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็น น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที) (\* หมายถึง ไอโซเลตที่มีแอกทิวิตีจำเพาะในชั่วรุ่นที่ 5 สูงสุด)

จากภาพที่ 4-4, 4-5 และ 4-6 พบว่าไอโซเลต EMS49 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของ เอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $14.0279 \pm 1.246$  หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไอโซเลต EMS45 มีค่า แอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $0.9421 \pm 0.100$  หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ ไอโซเลต EMS50 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุด คือ  $0.0941 \pm 0.038$  หน่วยต่อ มิลลิกรัมโปรตีน

### 4.3 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

#### 4.3.1 การกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตของไอโซเลต EMS11

โดย EMS11 ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส และมีแอกทิวิตีจำเพาะของเบตา- กลูโคซิเดสในชั่วรุ่นที่ 1 สูงที่สุด มาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่ ช่วงระยะเวลา 0 - 12 นาที เพื่อหาระยะเวลาในการให้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ทำให้มีอัตราการอยู่ รอดน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อคัดแยกไอโซเลตมาทดสอบ ดังภาพที่ 4-7 พบว่าช่วงระยะเวลา 6 และ 8 นาที มีอัตราการอยู่รอด 0.16 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ



ภาพที่ 4-7 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตกับเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด

จากภาพที่ 4-7 พบว่าช่วงระยะเวลา 6 และ 8 นาที ทำให้มีอัตราการอยู่รอดของเชื้อน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (บริเวณลูกศร) มีอัตราการอยู่รอด 0.16 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 58 ไอโซเลต โดยไอโซเลต E11-UV1 ถึง E11-UV15 ได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 6 นาที ไอโซเลต E13-UV16 ถึง E11-UV32 ได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 8 นาที ไอโซเลต E13-UV33 ถึง E11-UV47 ได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 10 นาที และไอโซเลต E13-UV48 ถึง E11-UV58 ได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 12 นาที

นำไอโซเลตที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการผลิตเซลล์เนสชันต้นบนอาหาร CMC agar ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4-2

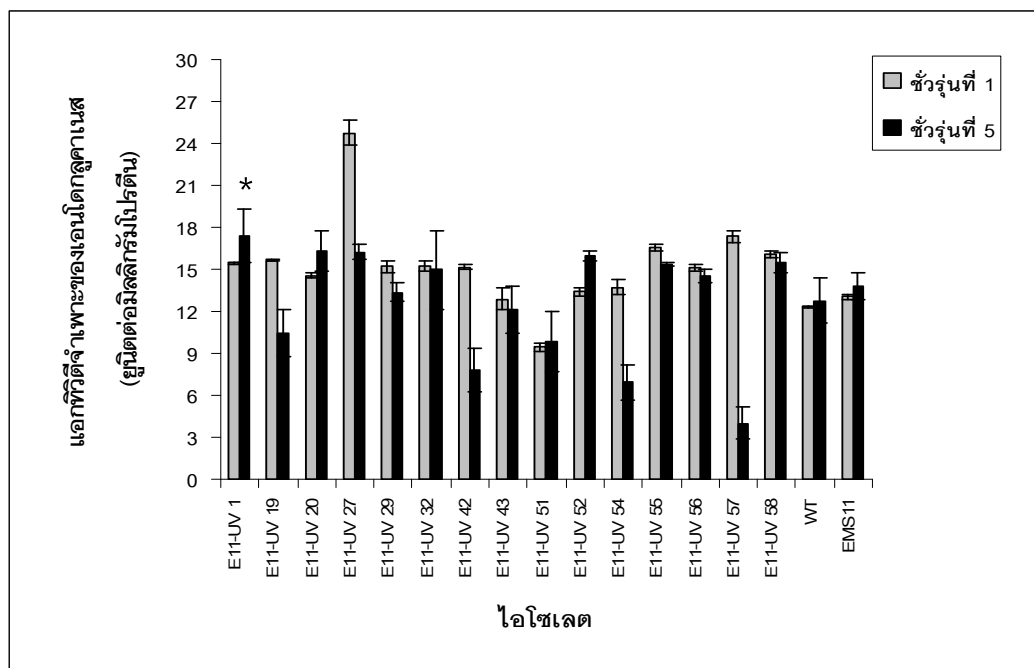
**ตารางที่ 4-2** ความสามารถในการผลิตเซลล์สบนอาหาร CMC agar ของ EMS11 ที่กลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่มีค่าน้อย 15 อันดับแรก

ไอโซเลต	ความกว้างของวงใส เฉลี่ย [a] (mm)	ความกว้างของโคโลนี เฉลี่ย [b] (mm)	อัตราส่วนเฉลี่ย [b/a]
E11-UV1	43.177	25.690	0.586 <sup>a-c</sup>
E11-UV19	34.697	19.340	0.558 <sup>a-b</sup>
E11-UV20	40.993	26.147	0.638 <sup>c-j</sup>
E11-UV27	36.113	19.700	0.546 <sup>a</sup>
E11-UV29	39.697	23.443	0.591 <sup>a-d</sup>
E11-UV32	37.507	21.977	0.587 <sup>a-c</sup>
E11-UV42	38.343	24.580	0.642 <sup>d-l</sup>
E11-UV43	36.407	22.630	0.622 <sup>c-h</sup>
E11-UV51	37.957	23.810	0.627 <sup>c-i</sup>
E11-UV52	40.300	24.260	0.602 <sup>b-e</sup>
E11-UV54	37.223	23.733	0.639 <sup>c-k</sup>
E11-UV55	39.810	24.913	0.625 <sup>c-i</sup>
E11-UV56	35.490	21.743	0.613 <sup>c-f</sup>
E11-UV57	41.913	26.037	0.620 <sup>c-g</sup>
E11-UV58	39.013	23.560	0.604 <sup>b-e</sup>
WT	33.530	22.630	0.675
EMS11	34.263	24.113	0.704

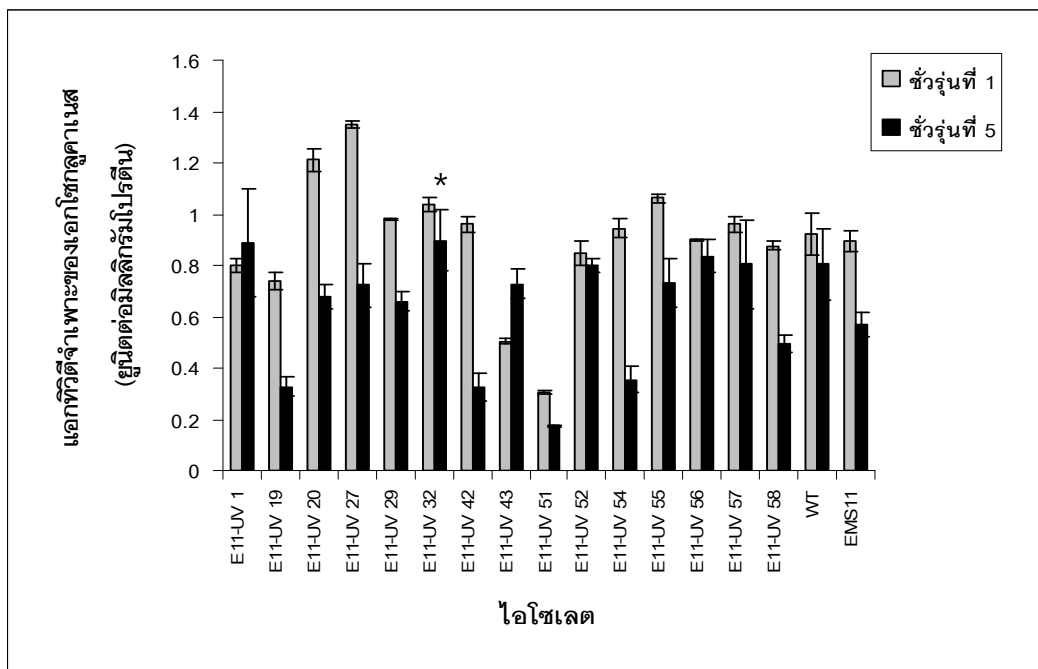
**หมายเหตุ** ตัวอักษรพิมพ์เล็ก หมายถึงค่าอัตราส่วนเฉลี่ยของความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่จากแต่ละไอโซเลตที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากตารางที่ 4-2 ทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่มีค่าน้อย 15 อันดับแรก มาทดสอบความสามารถผลิตเซลล์เลสในอาหาร Mandels' medium

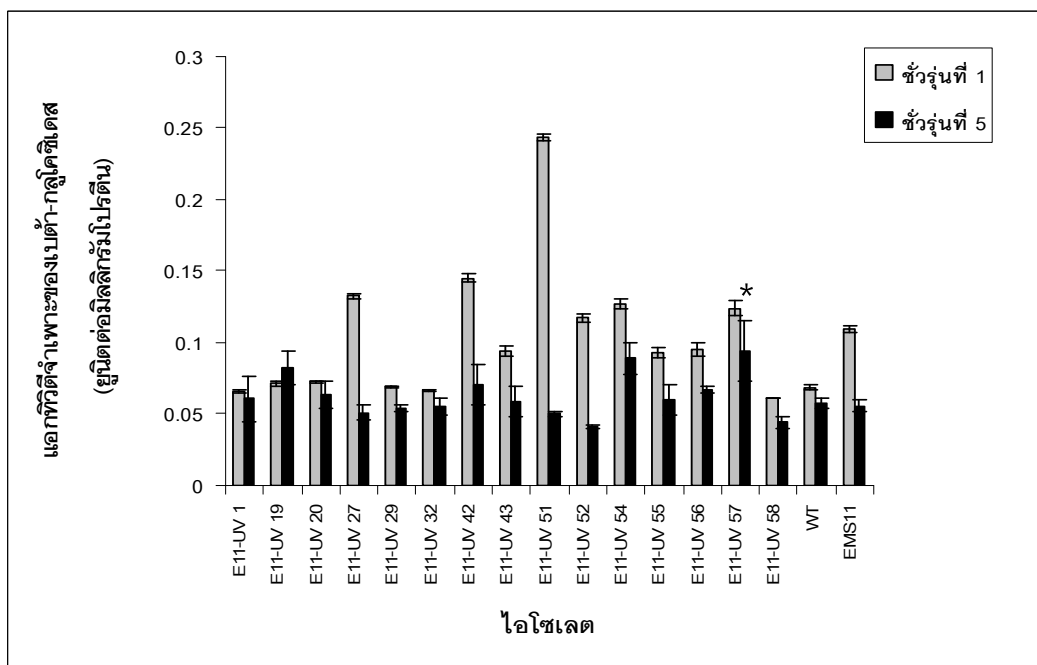
ทดสอบความสามารถการผลิตเซลล์เลสในอาหารเหลว Mandels' medium เพื่อนำมาวัด แอคติวิตี และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อหน่วยมิลลิกรัมโปรตีนในชั่วโมงที่ 1 และที่ 5 โดยทำการวัดแอคติวิตีเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนโดกลูคาเนสดังภาพที่ 4-8 เอกโซกลูคาเนสดังภาพที่ 4-9 และเบตา-กลูโคซิเดสดังภาพที่ 4-10 (ค่าแสดงในภาคผนวก ข)



ภาพที่ 4-8 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอคติวิตีจำเพาะเอนโดกลูคาเนสของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่ช่วงระยะเวลา 6 - 12 นาที



ภาพที่ 4-9 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทีวิตีจำเพาะเอกโซกลูคาเนสของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่ช่วงระยะเวลา 6 - 12 นาที



ภาพที่ 4-10 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทีวิตีจำเพาะเบตา-กลูโคซิเดสของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่ช่วงระยะเวลา 6 -12 นาที

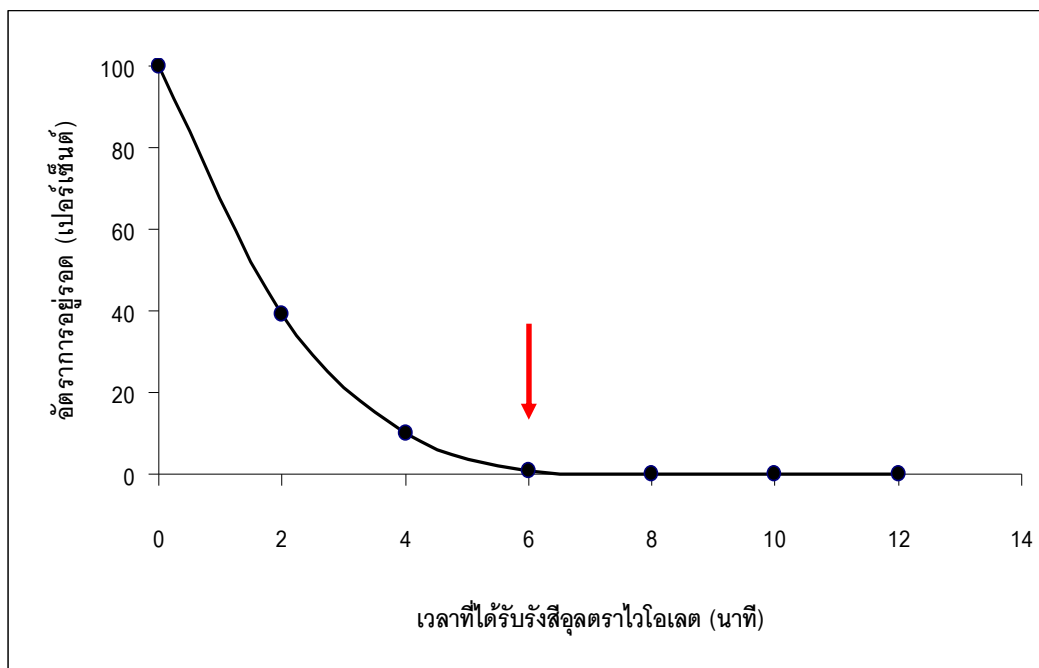


(ซึ่งกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็น น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที) (\* หมายถึง ไอโซเลตที่มีแอกทิวิตีจำเพาะในชั่วรุ่นที่ 5 สูงสุด)

จากภาพที่ 4-8, 4-9 และ 4-10 พบว่าไอโซเลต E11-UV1 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $17.379 \pm 1.954$  หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไอโซเลต E11-UV32 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $0.8974 \pm 0.117$  หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไอโซเลต E11-UV57 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุด คือ  $0.094 \pm 0.022$  หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

#### 4.3.2 การกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตของไอโซเลต EMS45

ไอโซเลต EMS45 ได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายด้วยสารอีเอ็มเอส และมีแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนสสูงในชั่วรุ่นที่ 1 มาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่ช่วงระยะเวลา 0-12 นาที เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารอีเอ็มเอสที่ทำให้เชื้อรามีอัตราการรอดน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อคัดแยกไอโซเลตมาทดสอบ



ภาพที่ 4-11 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตกับเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด

จากภาพที่ 4-11 พบว่าระยะเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตในช่วงระยะเวลา 6, 8 และ 10 นาที ทำให้มีอัตราการอยู่รอดของเชื้อน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (บริเวณลูกศร) โดยช่วงระยะเวลา 6, 8, 10 และ 12 นาที ทำให้มีอัตราการอยู่รอด 0.77, 0.12 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 53 ไอโซเลต โดยไอโซเลต E45-UV1 ถึง E45-UV12 ได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 6 นาที ไอโซเลต E45-UV13 ถึง E45-UV28 ได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 8 นาที ไอโซเลต E45-UV29 ถึง E45-UV50 ได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 10 นาที และไอโซเลต E45-UV50 ถึง E45-UV53 ได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 12 นาที

นำไอโซเลตที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการผลิตเซลลูเลสขั้นต้นบนอาหาร CMC agar ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4-3

**ตารางที่ 4-3** ความสามารถในการผลิตเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar ของ EMS45 ที่กลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่มีค่าน้อย 15 อันดับแรก

ไอโซเลต	ความกว้างของวงใส เฉลี่ย [a] (mm)	ความกว้างของโคโลนี เฉลี่ย [b] (mm)	อัตราส่วนเฉลี่ย [b/a]
E45-UV8	35.120	20.507	0.584 <sup>b-d</sup>
E45-UV12	35.020	18.590	0.531 <sup>a</sup>
E45-UV24	33.213	18.750	0.564 <sup>b</sup>
E45-UV25	36.497	22.633	0.621 <sup>e-g</sup>
E45-UV26	41.070	24.633	0.602 <sup>c-e</sup>
E45-UV27	34.610	19.637	0.567 <sup>bc</sup>
E45-UV29	37.827	20.783	0.550 <sup>ab</sup>
E45-UV30	35.513	20.773	0.585 <sup>b-d</sup>
E45-UV31	34.817	20.337	0.584 <sup>b-d</sup>
E45-UV32	35.800	20.797	0.581 <sup>b-d</sup>
E45-UV35	36.743	21.203	0.577 <sup>b-d</sup>
E45-UV36	35.807	21.647	0.605 <sup>d-f</sup>
E45-UV37	37.603	21.467	0.571 <sup>b-d</sup>

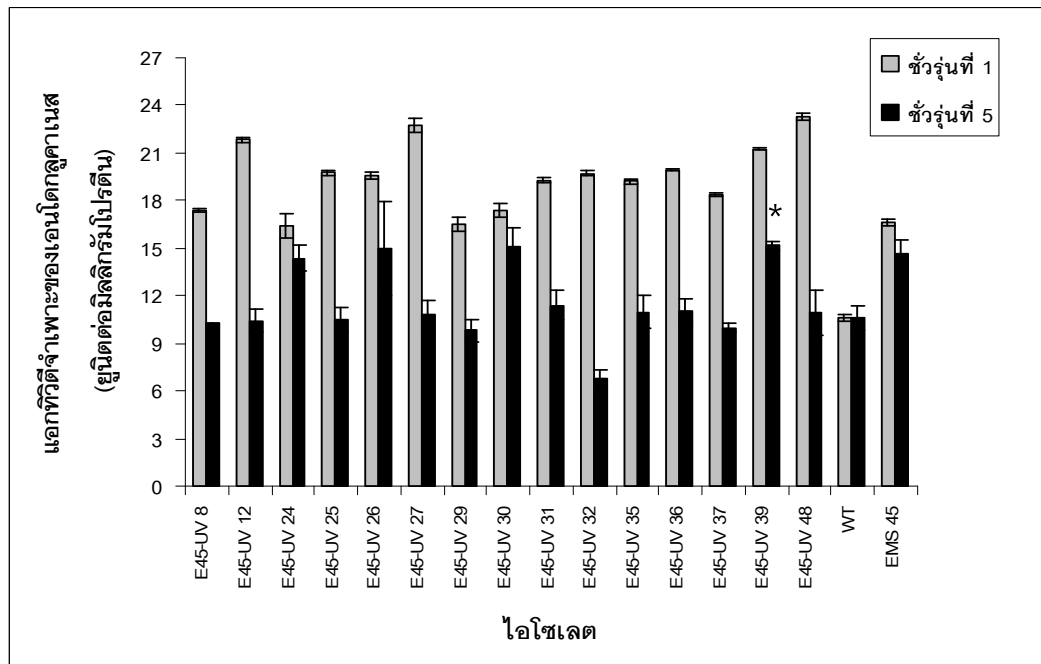
**ตารางที่ 4-3** ความสามารถในการผลิตเซลล์สบนอาหาร CMC agar ของ EMS45 ที่กลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่มีค่าน้อย 15 อันดับแรก (ต่อ)

ไอโซเลต	ความกว้างของวงใส เฉลี่ย [a] (mm)	ความกว้างของโคโลนี เฉลี่ย [b] (mm)	อัตราส่วนเฉลี่ย [b/a]
E45-UV39	36.333	22.750	0.626 <sup>e-h</sup>
E45-UV48	37.620	22.717	0.604 <sup>d-f</sup>
WT	36.340	25.470	0.701
EMS45	35.720	23.727	0.664

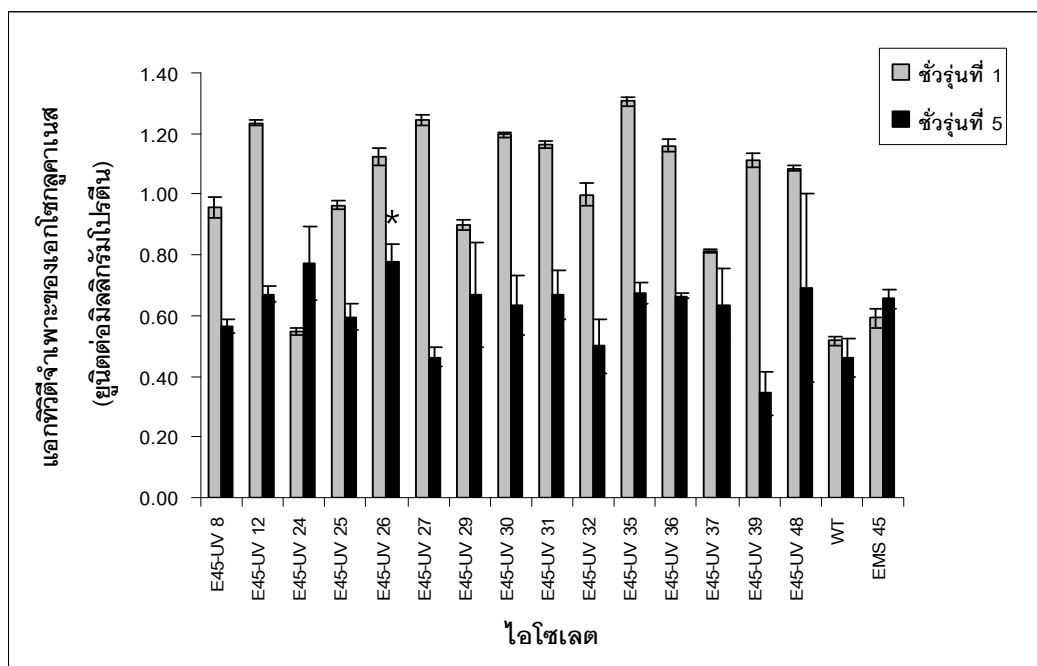
**หมายเหตุ** ตัวอักษรพิมพ์เล็ก หมายถึงค่าอัตราส่วนเฉลี่ยของความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่จากแต่ละไอโซเลตที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากตารางที่ 4-3 ทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่มีค่าน้อย 15 อันดับแรก มาทดสอบความสามารถผลิตเซลล์สบนอาหาร Mandels' medium

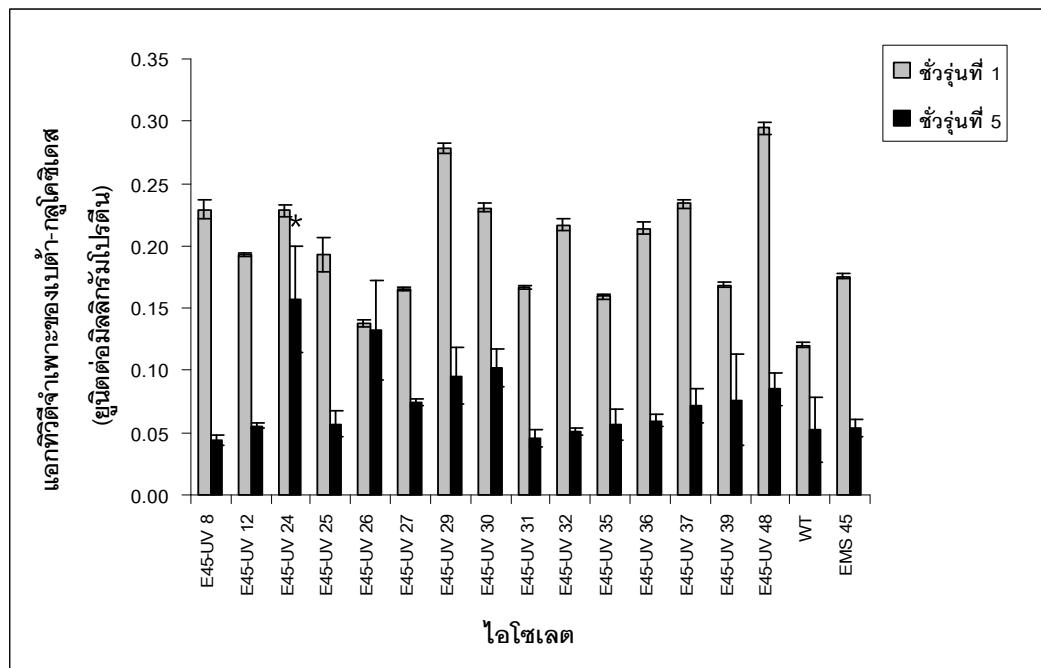
ทดสอบความสามารถการผลิตเซลล์สบนอาหารเหลว Mandels' medium เพื่อนำมาวัดแอกทิวิตี และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อหน่วยมิลลิกรัมโปรตีนในชั่วโมงที่ 1 และที่ 5 โดยทำการวัดแอกทิวิตีเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนโดกลูคาเนส ดังภาพที่ 4-12 เอ็กโซกลูคาเนส ดังภาพที่ 4-13 และ เบตา-กลูโคซิเดส ดังภาพที่ 4-14 (ค่าแสดงในภาคผนวก ซ)



ภาพที่ 4-12 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดทอกซินของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่ช่วงระยะเวลา 6 - 12 นาที

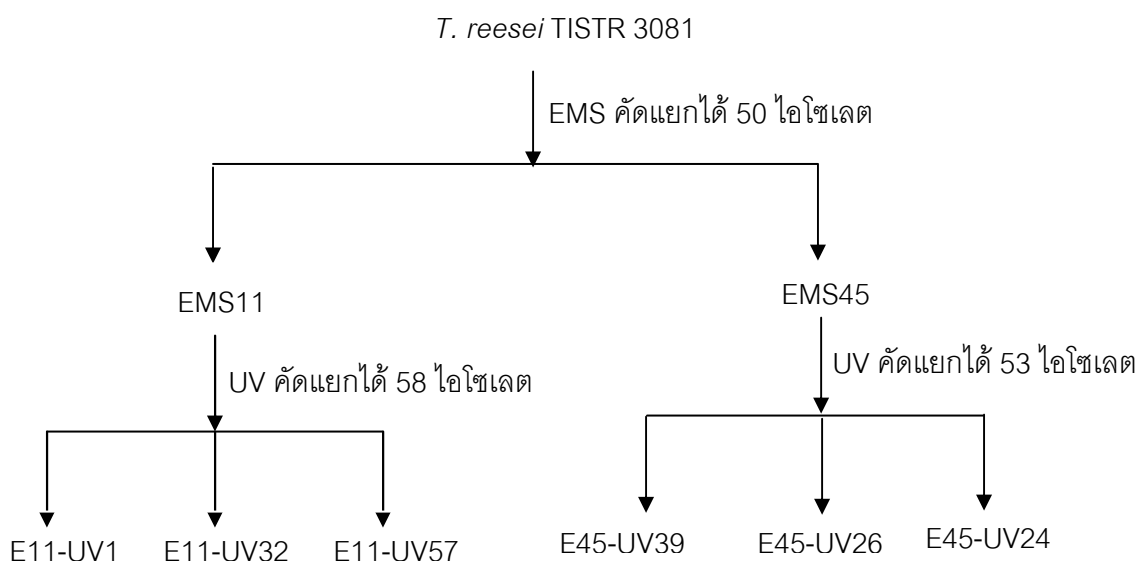


ภาพที่ 4-13 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซทอกซินของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่ช่วงระยะเวลา 6 - 12 นาที



**ภาพที่ 4-14** ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเบตา-กลูโคซิเดสของราที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่ช่วงระยะเวลา 6 -12 นาที (ซึ่งกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลรีดิวิซ์ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที) (\* หมายถึง ไอโซเลตที่มีแอกทิวิตีจำเพาะในชั่วรุ่นที่ 5 สูงสุด)

จากภาพที่ 4-12, 4-13 และ 4-14 พบว่าไอโซเลต E45-UV39 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $15.145 \pm 0.266$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไอโซเลต E45-UV26 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $0.778 \pm 0.056$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไอโซเลต E45-UV 24 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุด คือ  $0.157 \pm 0.04$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน



ภาพที่ 4-15 แผนผังการกลายพันธุ์ของเชื้อ *T. reesei* TISTR 3081 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส และกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

จากภาพที่ 4-15 ไอโซเลต EMS11 และ EMS45 ได้มาจากการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายด้วยสารอีเอ็มเอส โดย EMS11 มีแอกทิวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดส ในช่วงวันที่ 1 สูงสุด ส่วน EMS45 มีแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนส ในช่วงวันที่ 1 สูง เมื่อนำ EMS11 มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ได้ E11-UV1, E11-UV32 และ E11-UV57 ซึ่งมีแอกทิวิตีจำเพาะของ เอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส สูงตามลำดับ จากการนำ EMS45 มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ได้ E45-UV39, E45-UV26 และ E45-UV24 ซึ่งมีแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดสสูงตามลำดับ

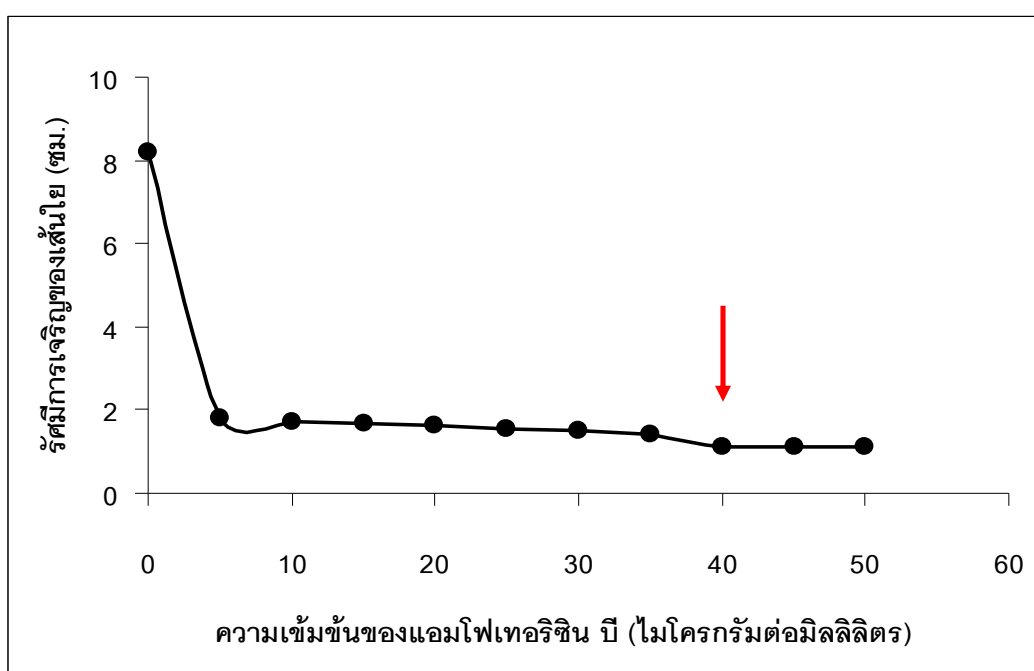
จากการที่ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส และกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตสามารถคัดแยกเชื้อที่ดีที่สุด โดยมีเอนไซม์โดยรวมทั้ง 3 ชนิดที่ดีที่สุด คือ ไอโซเลต E45-UV26 โดยมีแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น (ดังตารางที่ 4-4) ซึ่งคิดเป็น 1.41, 1.69 และ 2.53 เท่าตามลำดับ จึงเลือกนำมาศึกษาต่อเพื่อตรวจสอบว่ามีการกลายพันธุ์จริง

ตารางที่ 4-4 การเปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของสายพันธุ์ตั้งต้นกับไอโซเลต E45-UV26

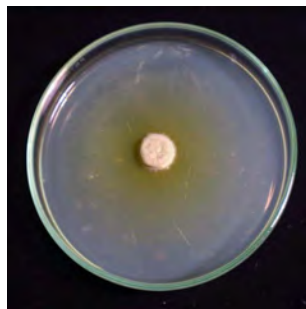
Strain	Specific activity (U/mg protein)			Protein (mg/ml)
	Endoglucanase	Exoglucanase	$\beta$ -glucosidase	
E45-UV26	14.977 $\pm$ 2.97	0.778 $\pm$ 0.06	0.132 $\pm$ 0.04	0.889 $\pm$ 0.07
WT	10.621 $\pm$ 0.78	0.461 $\pm$ 0.07	0.052 $\pm$ 0.03	1.958 $\pm$ 0.22

#### 4.4 การทดสอบความต้านทานยาปฏิชีวนะเพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์กลาย

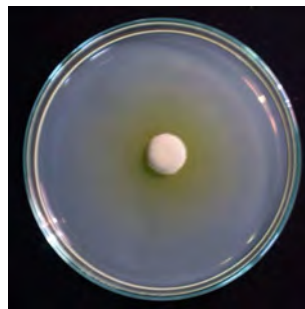
นำเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้นมาหา Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์กลาย โดยใช้อาหารกึ่งแข็ง PDA ที่มีแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร



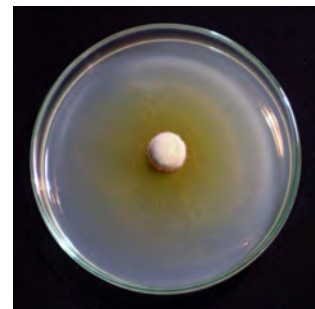
ภาพที่ 4-16 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 บนอาหารกึ่งแข็ง PDA ที่มีแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน



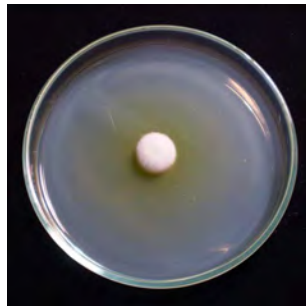
*T. reesei* TISTR 3081



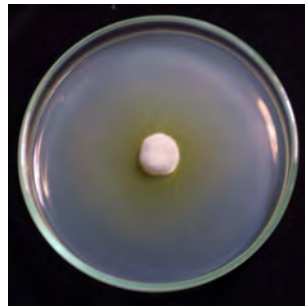
EMS 45



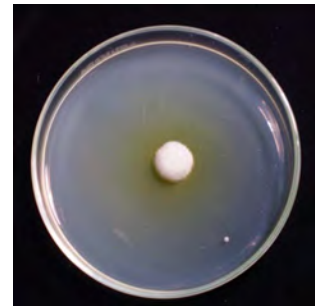
EMS 49



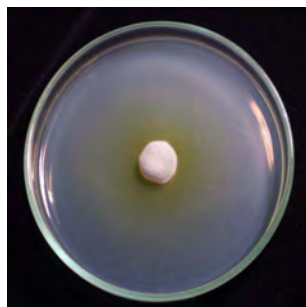
EMS 50



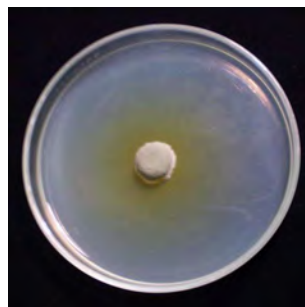
E45-E10



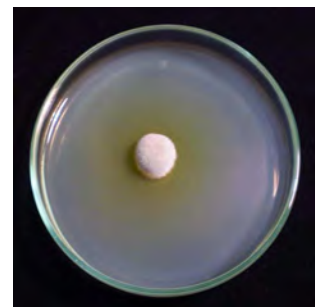
E45-E62



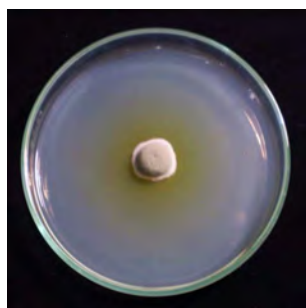
E11-UV1



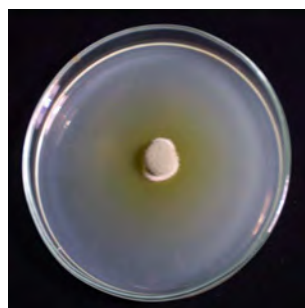
E11-UV32



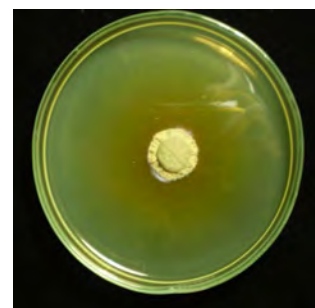
E11-UV57



E45-UV24



E45-UV26



E45-UV39

ภาพที่ 4-17 ลักษณะโคโคนีเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง PDA ที่มีความเข้มข้นแอมโฟเทอรีซิน บี 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



จากภาพที่ 4-16 เมื่อทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของสายพันธุ์ตั้งต้นพบว่า ความเข้มข้นของ แอมพิเทอริซิน ปี ที่ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (บริเวณลูกศร) เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้นได้ จึงใช้ความเข้มข้นที่ระดับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร มาทดสอบสายพันธุ์กลาย 11 ไอโซเลต ได้แก่ EMS45, EMS49 EMS50, E45-UV24, E45-UV26, E45-UV39, E11-UV1, E11-UV32, E11-UV57, E45-E10 และ E45-E62 (11 ไอโซเลตได้มาจากการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายในแต่ละครั้งที่มีแอกทิวิตีจำเพาะต่อละอองไซม์ที่สูง) พบว่าไอโซเลต E45-UV39 สามารถเจริญได้เล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น ๆ ดังภาพที่ 4-17

#### 4.5 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *T. reesei* TISTR 3081 และ E45-UV 26

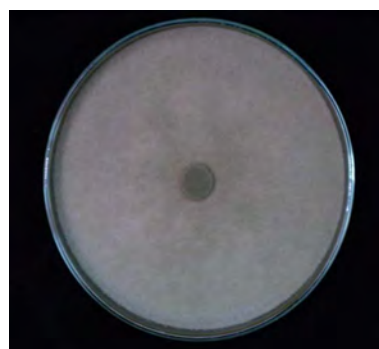
จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส และกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต พบว่าไอโซเลต E45-UV26 มีแอกทิวิตีจำเพาะโดยรวมของทั้งสามเอนไซม์ คือ เอนโดกลูคาเนส เอ็กโซกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส โดยสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.41, 1.69 และ 2.53 เท่า ตามลำดับ จึงนำ E45-UV26 มาศึกษาความแตกต่างของ *T.reesei* TISTR 3081 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น และ E45-UV26 เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการยืนยันว่าเป็นสายพันธุ์กลาย

#### การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *T. reesei* TISTR 3081 และ E45-UV26

การศึกษาลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยานอาหารกึ่งแข็ง PDA เชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 และ E45-UV26 โดยศึกษาลักษณะภายนอกของโคโลนีที่เจริญบนอาหารกึ่งแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และลักษณะของสปอร์ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งเป็นเวลา 3 วัน ย้อมด้วยสีย้อมแลดโดฟีนอลคอตตอนบลู และสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ดังภาพที่ 4-18 และ 4-19)

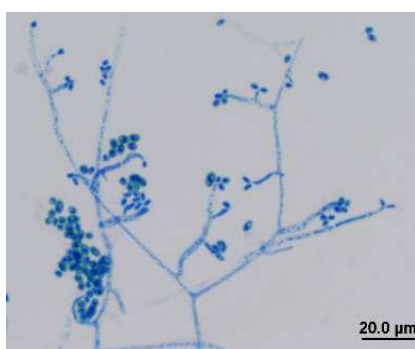


สายพันธุ์ตั้งต้น

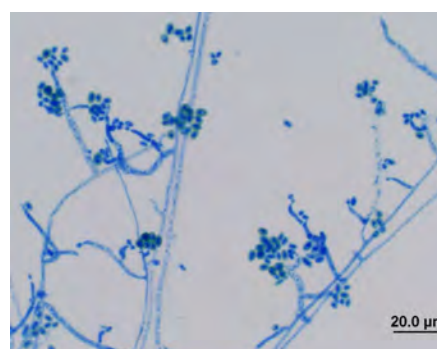


ไอโซเลต E45 UV 26

ภาพที่ 4-18 ลักษณะโคโลนีเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง PDA



สายพันธุ์ตั้งต้น



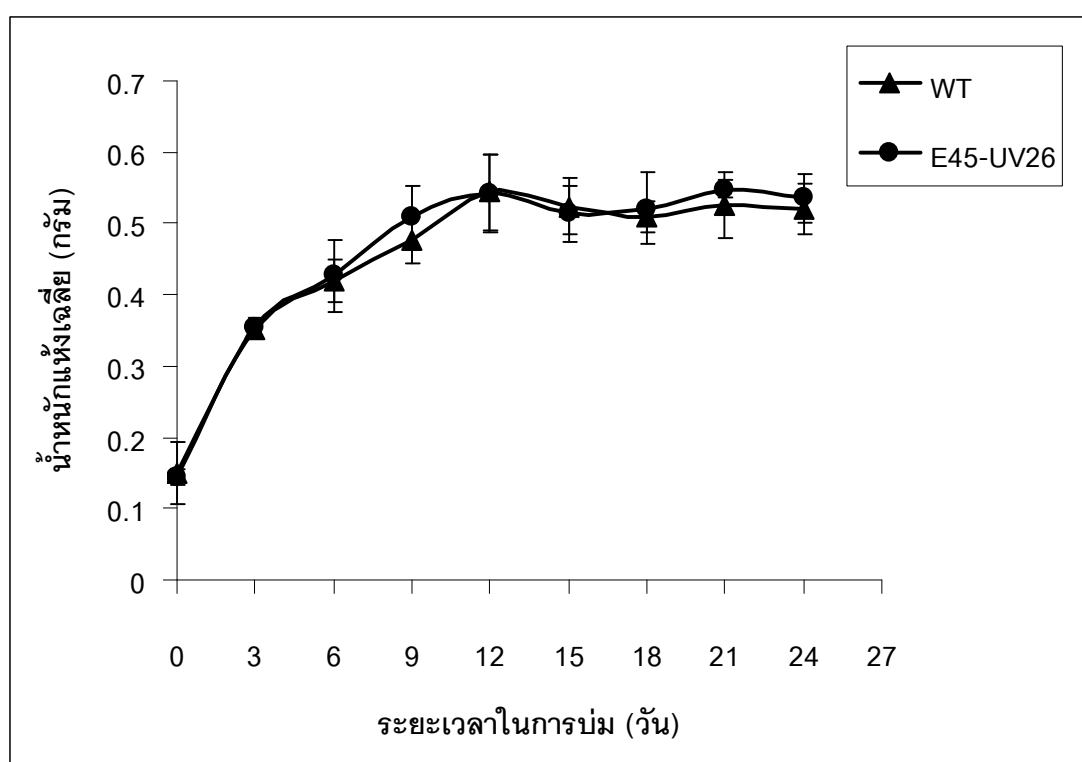
ไอโซเลต E45-UV26

ภาพที่ 4-19 ลักษณะเส้นใยและสปอร์เชื้อราที่ย้อมด้วยสีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารกึ่งแข็ง PDA ของเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 เปรียบเทียบกับ E45-UV26 โดยศึกษาลักษณะภายนอกของโคโลนีที่เจริญบนอาหารกึ่งแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน มีลักษณะการสร้างเส้นใยสีขาว สีของสปอร์มีสีเขียว และเมื่อเจริญจะมีการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง ดังภาพที่ 4-18 โดยสายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ตั้งต้นไม่มีความแตกต่างกัน และเมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีสปอร์มีลักษณะค่อนข้างกลมและขนาดเล็กมาก แต่ละสปอร์มีเพียง 1 เซลล์ ดังภาพที่ 4-19 พบว่า โดยสายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ตั้งต้นไม่มีความแตกต่างกัน

### การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ *T. reesei* TISTR 3081 และ E45-UV26

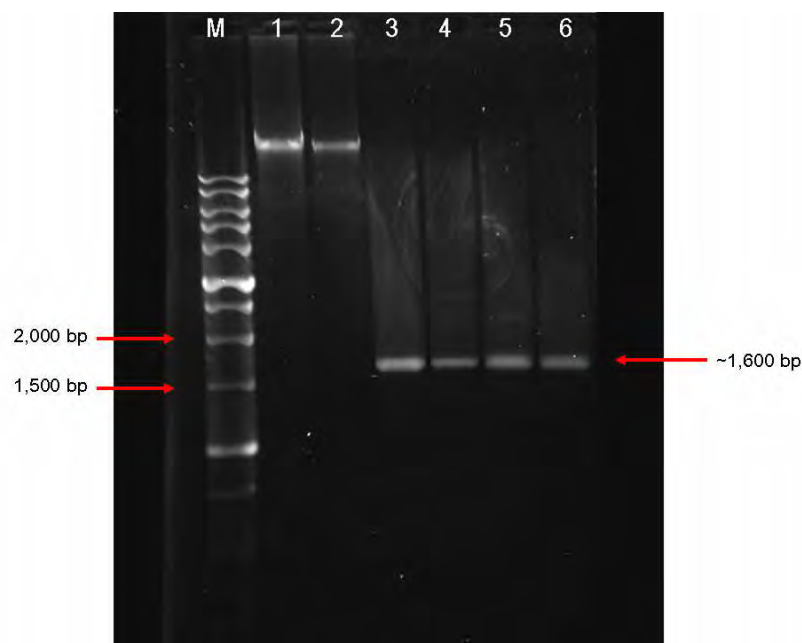
การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของ *T. reesei* TISTR 3081 และ E45-UV26 โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหารกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน ตัดเส้นใยด้วยเครื่องตัดจุกคออร์กเบอร์ 10 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 วัน และเก็บผลน้ำหนักแห้งทุก ๆ 3 วัน ดังภาพที่ 4-20



ภาพที่ 4-20 อัตราการเจริญเติบโตของรา *T. reesei* TISTR 3081 และ E45-UV26 ที่เจริญในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 24 วัน โดยเก็บน้ำหนักแห้งทุก ๆ 3 วัน

#### 4.6 การศึกษาความแตกต่างลำดับเบสระหว่าง *T. reesei* TISTR 3081 กับ E45-UV26

ทำการสกัดดีเอ็นเอ จากเชื้อ *T. reesei* TISTR 3081 และ E45-UV26 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 7 วัน และขึ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน *cbh1* และ *cbh2*



ภาพที่ 4-21 ขึ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน *cbh1* (ขนาด 1,616 bp) และ *cbh2* (ขนาด 1,611 bp) บน 1 เปอร์เซ็นต์ เจลอะกาโรส ที่มี 0.004 เปอร์เซ็นต์ เอธิเดียมโบไมด์ ที่กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้ไพรเมอร์ CBHIF CBHIR CBHIIF และ CBHIIR

ช่องที่ 1 เป็นดีเอ็นเอของ *T. reesei* TISTR 3081

ช่องที่ 2 เป็นดีเอ็นเอของ E45-UV26

ช่องที่ 3 เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน *cbh1* ของ *T. reesei* TISTR 3081

ช่องที่ 4 เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน *cbh1* ของ E45-UV26

ช่องที่ 5 เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน *cbh2* ของ *T. reesei* TISTR 3081

ช่องที่ 6 เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน *cbh2* ของ E45-UV26

ผลการตรวจสอบลำดับเบสบางส่วนในยีน *cbh1* บริเวณเบสที่มีการเปลี่ยนแปลง

661	710
WT-CGCAGCTGCC GTAAGTGACT TACCATGAAC CCCTGACGTA TCTTCTTGTG	
MT-CGCAGCTGCC GTAAGTGACT TACCATGAAC CCCTGACGTA TCTTCTTGT <b>T</b>	
711	760
WT-GGCTCCCAGC TGACTGGCCA ATTTAAGGTG CGGCTTGAAC GGAGCTCTCT	
MT-GGCTCCCAGC TGACTGGCCA AT <b>T</b> CAAGGTG CGGCTTGAAC GGAGCTCTCT	
761	810
WT-ACTTCGTGTC CATGGACGCG GATGGTGGCG TGAGCAAGTA TCCCACCAAC	
MT-ACTTCGTGTC CATGGACGCG GATGGTGGCG TGAGCAAGTA TCCCACCAAC	
811	860
WT-AACGCTGGCG CCAAGTACGG CACGGGGTAC TGTGACAGCC AGTGTCCCCG	
MT-A <b>C</b> CGCTGGCG CCAAGTACGG CACGGGGTAC TGTGACAGCC AGTGTCCCCG	
861	910
WT-CGATCTGAAG TTCATCAATG GCCAGGCCAA CGTTGAGGGC TGGGAGCCGT	
MT-CGATCTGAAG TTCATCAATG GCCAGGCCAA CGTTGAGGGC TGGGAGCCGT	
911	960
WT-CATCCAACAA CGCAAACACG GGCATTGGAG GACACGGAAG CTGCTGCTCT	
MT-CATCCAACAA CGC <b>G</b> AACACG GGCATTGGAG GACACGGAAG CTGCTGCTCT	

จากผลการตรวจสอบเบสบริเวณเบสลำดับที่ 661-960 ของ WT (*T. reesei* TISTR 3081) เปรียบเทียบกับ MT (E45-UV26) พบว่าสายพันธุ์กลายมีการเปลี่ยนเบส 4 ตำแหน่ง (ตัวอักษรสีแดง) คือส่วนที่เป็นอินทอรอน 2 เบส คือที่ตำแหน่งเบสที่ 710 คือเปลี่ยนจาก G เป็น T และตำแหน่งเบสที่ 734 คือเปลี่ยนจาก T เป็น C ส่วนที่เป็นเอกซอนมีการเปลี่ยน 2 เบส คือตำแหน่งเบสที่ 812 เปลี่ยนจาก A เป็น C และตำแหน่งเบสที่ 924 เปลี่ยนจาก A เป็น G

#### 4.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ของสายพันธุ์กลายโดยใช้โคลชิซิน

นำเชื้อราไอโซเลต E45-UV24, E45-UV26, E45-UV39 ที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุดของเบตา-กลูโคซิเดส เอกโซกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนส ตามลำดับ มาเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์โดยใช้สารโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V) โดยไอโซเลต E45-UV24 สามารถคัดแยกไอโซเลตได้ 51 ไอโซเลต ไอโซเลต E45-UV26 สามารถคัดแยกไอโซเลตได้ 59 ไอโซเลต และไอโซเลต E45-UV39 สามารถคัดแยกไอโซเลตได้ 69 ไอโซเลต

นำไอโซเลตที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการผลิตเซลล์ชั้นต้นบนอาหาร CMC agar ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4-5, 4-6 และ 4-7

**ตารางที่ 4-5** ความสามารถในการผลิตเซลล์สบนอาหาร CMC agar ของ E45-UV24 ที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ด้วยโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่มีค่าน้อย 15 อันดับแรก

ไอโซเลต	ความกว้างของวงใส เฉลี่ย [a] (mm)	ความกว้างของโคโลนี เฉลี่ย [b] (mm)	อัตราส่วนเฉลี่ย [b/a]
EV24-C1	32.710	21.080	0.644 <sup>d-i</sup>
EV24-C4	31.867	20.550	0.645 <sup>d-j</sup>
EV24-C8	35.880	20.153	0.538 <sup>a</sup>
EV24-C23	35.533	20.167	0.557 <sup>a-c</sup>
EV24-C24	34.523	18.783	0.544 <sup>ab</sup>
EV24-C25	33.630	20.573	0.612 <sup>c-e</sup>
EV24-C27	32.443	20.040	0.618 <sup>c-f</sup>
EV24-C31	45.713	29.413	0.644 <sup>d-i</sup>
EV24-C33	34.663	18.387	0.530 <sup>a</sup>
EV24-C34	36.650	22.160	0.604 <sup>b-d</sup>
EV24-C37	30.773	19.593	0.636 <sup>d-h</sup>
EV24-C44	32.897	20.750	0.631 <sup>d-g</sup>
EV24-C46	32.290	20.803	0.645 <sup>d-j</sup>
EV24-C50	30.823	19.603	0.642 <sup>d-h</sup>
EV24-C51	31.083	19.640	0.632 <sup>d-g</sup>
WT	32.653	23.843	0.730
E45-UV24	35.570	25.830	0.726

**หมายเหตุ** ตัวอักษรพิมพ์เล็ก หมายถึงค่าอัตราส่วนเฉลี่ยของความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่จากแต่ละไอโซเลตที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ตารางที่ 4-6** ความสามารถในการผลิตเซลล์สบนอาหาร CMC agar ของ E45-UV26 ที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ด้วยโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่มีค่าน้อย 15 อันดับแรก

ไอโซเลต	ความกว้างของวงใส เฉลี่ย [a] (mm)	ความกว้างของโคโลนี เฉลี่ย [b] (mm)	อัตราส่วนเฉลี่ย [b/a]
EV26-C5	32.777	20.830	0.636 <sup>a-c</sup>
EV26-C6	37.403	23.137	0.619 <sup>ab</sup>
EV26-C7	33.243	20.020	0.602 <sup>a</sup>
EV26-C9	35.453	22.253	0.628 <sup>a-c</sup>
EV26-C11	36.650	23.353	0.637 <sup>a-d</sup>
EV26-C18	40.813	26.573	0.648 <sup>a-g</sup>
EV26-C20	31.990	19.543	0.611 <sup>ab</sup>
EV26-C21	35.243	22.593	0.641 <sup>a-e</sup>
EV26-C23	36.897	22.637	0.614 <sup>ab</sup>
EV26-C25	34.770	22.160	0.637 <sup>a-d</sup>
EV26-C26	38.273	23.647	0.618 <sup>ab</sup>
EV26-C33	38.370	24.993	0.650 <sup>a-h</sup>
EV26-C37	36.080	23.117	0.641 <sup>a-e</sup>
EV26-C43	34.837	22.610	0.649 <sup>a-g</sup>
EV26-C52	37.560	24.137	0.642 <sup>a-f</sup>
WT	36.070	25.540	0.708
E45-UV26	35.453	24.770	0.699

**หมายเหตุ** ตัวอักษรพิมพ์เล็ก หมายถึงค่าอัตราส่วนเฉลี่ยของความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่จากแต่ละไอโซเลตที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



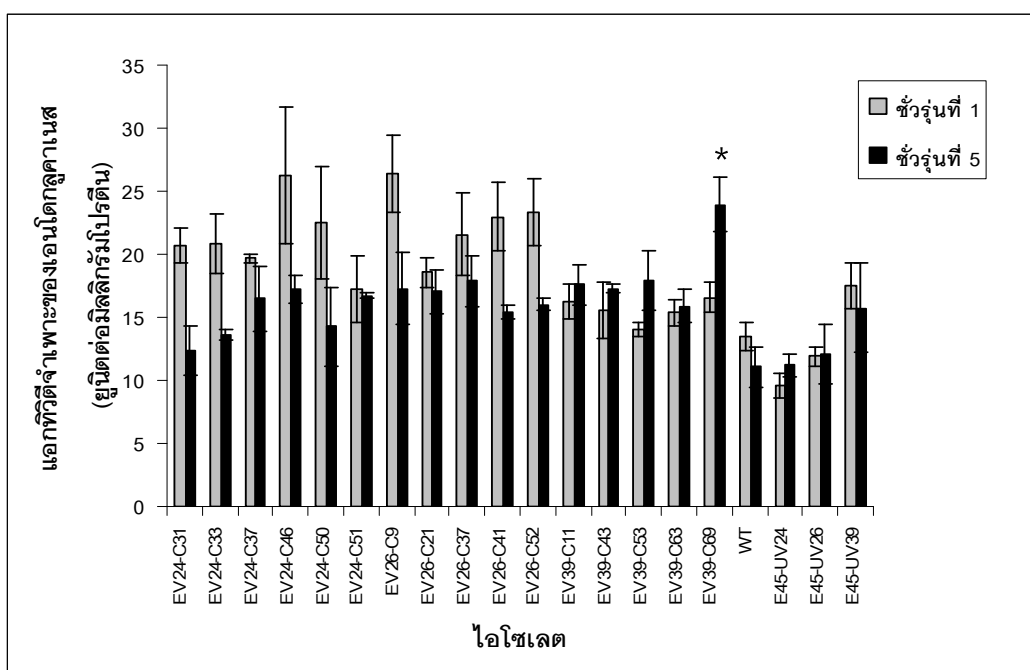
**ตารางที่ 4-7** ความสามารถในการผลิตเซลล์บนอาหาร CMC agar ของ E45-UV39 ที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ด้วยโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่มีค่าน้อย 15 อันดับแรก

ไอโซเลต	ความกว้างของวงใส เฉลี่ย [a] (mm)	ความกว้างของโคโลนี เฉลี่ย [b] (mm)	อัตราส่วนเฉลี่ย [b/a]
EV39-C1	37.060	19.747	0.533 <sup>ab</sup>
EV39-C3	41.240	21.560	0.523 <sup>a</sup>
EV39-C4	32.630	18.150	0.556 <sup>a-d</sup>
EV39-C5	40.577	23.427	0.577 <sup>e-f</sup>
EV39-C10	38.367	21.543	0.562 <sup>a-e</sup>
EV39-C11	35.980	20.837	0.580 <sup>b-g</sup>
EV39-C19	33.823	19.593	0.579 <sup>b-g</sup>
EV39-C24	37.620	22.257	0.592 <sup>c-j</sup>
EV39-C36	38.070	22.403	0.589 <sup>c-h</sup>
EV39-C43	38.810	21.593	0.556 <sup>a-d</sup>
EV39-C53	37.533	22.117	0.590 <sup>c-h</sup>
EV39-C57	37.520	22.247	0.594 <sup>c-j</sup>
EV39-C61	35.990	19.173	0.534 <sup>ab</sup>
EV39-C67	37.783	21.660	0.574 <sup>a-f</sup>
EV39-C69	37.877	20.847	0.551 <sup>a-c</sup>
WT	35.817	24.783	0.692
E45-UV39	37.160	22.950	0.609

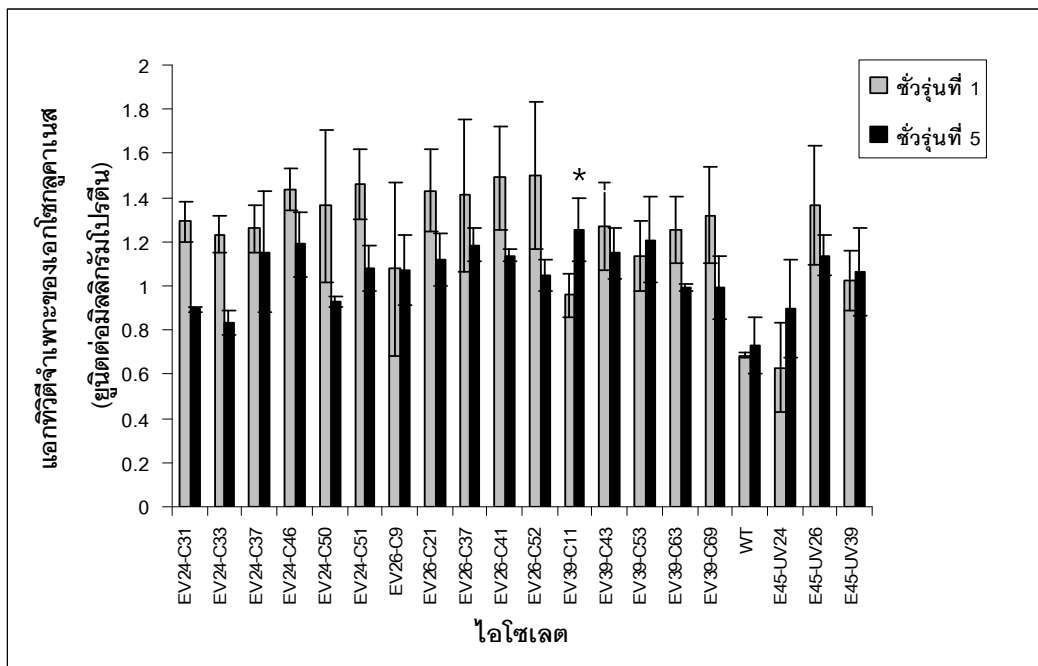
**หมายเหตุ** ตัวอักษรพิมพ์เล็ก หมายถึงค่าอัตราส่วนเฉลี่ยของความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่จากแต่ละไอโซเลตที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากตารางที่ 4-5, 4-6 และ 4-7 ทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโคโลนีต่อความกว้างของวงใสที่มีค่าน้อย 5 อันดับแรก มาทดสอบความสามารถผลิตเซลล์ูเลสในอาหาร Mandels' medium

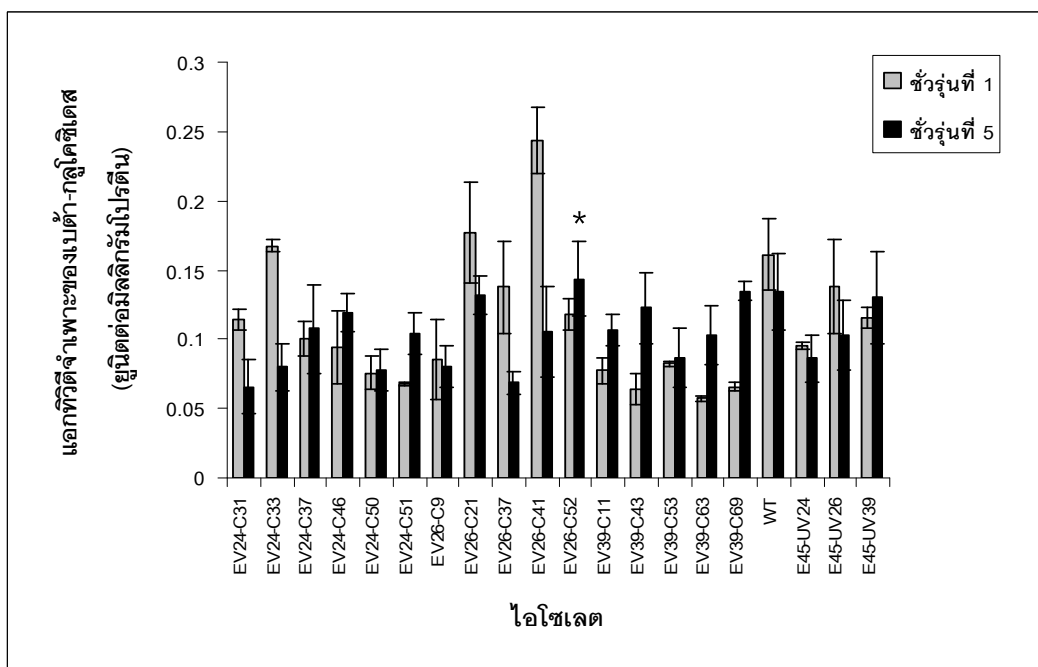
ทดสอบความสามารถการผลิตเซลล์ูเลสในอาหารเหลว Mandels' medium เพื่อนำมาวัดแอกทิวิตี และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อหน่วยมิลลิกรัมโปรตีนในชั่วโมงที่ 1 และที่ 5 โดยทำการวัดแอกทิวิตีเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนโดกลูคาเนส ดังภาพที่ 4-22 เอกโซกลูคาเนส ดังภาพที่ 4-23 และ เบตา-กลูโคซิเดส ดังภาพที่ 4-24 (ค่าแสดงในภาคผนวก ข)



ภาพที่ 4-22 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีจำเพาะเอนโดกลูคาเนสของราที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ูเลสด้วยโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V)



ภาพที่ 4-23 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดสของราที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ด้วยโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V)



ภาพที่ 4-24 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตี้จำเพาะของเบตา-กาแลคโตซิเดส ของราที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ด้วยโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V)

(ซึ่งกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที) (\* หมายถึง ไอโซเลตที่มีแอกทิวิตีจำเพาะในช่วงวันที่ 5 สูงสุด)

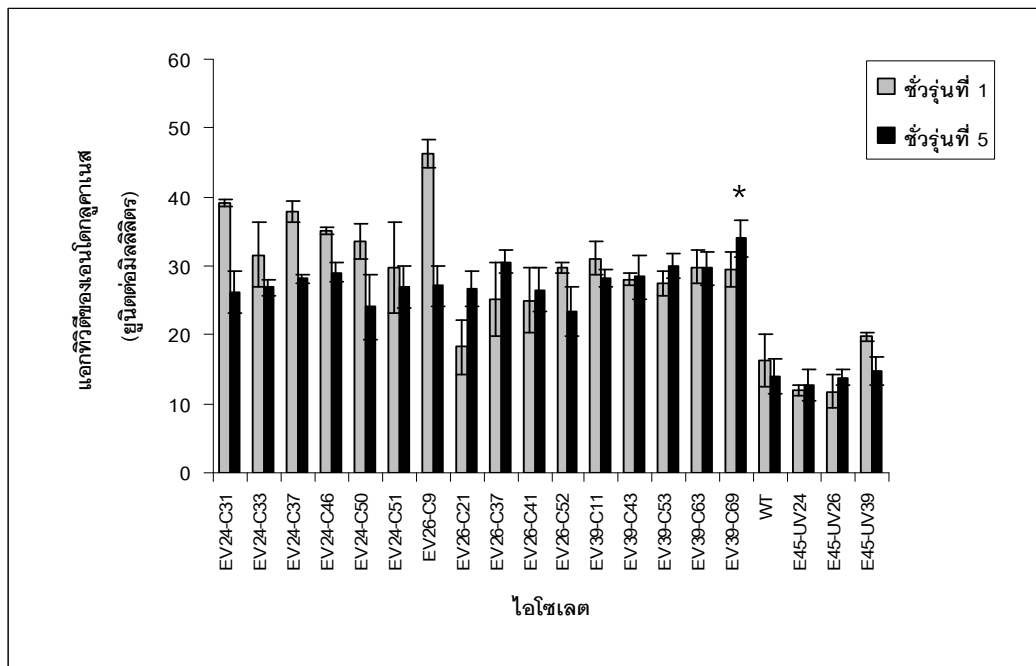
จากภาพที่ 4-22, 4-23 และ 4-24 พบว่าไอโซเลต EV39-C69 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $23.9380 \pm 2.138$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไอโซเลต EV26-C11 มีค่าแอกทิวิตีของจำเพาะเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $1.2538 \pm 0.145$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไอโซเลต EV26-C52 มีค่าแอกทิวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุด คือ  $0.1436 \pm 0.027$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

จากการใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์สารโคลชิซิน พบว่าไอโซเลต E39-C69 มีแอกทิวิตีจำเพาะเอนไซม์โดยรวมดีที่สุดคือ โดยมีแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนสสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น (ดังตารางที่ 4-8) ซึ่งคิดเป็น 2.16 และ 1.35 เท่าตามลำดับ

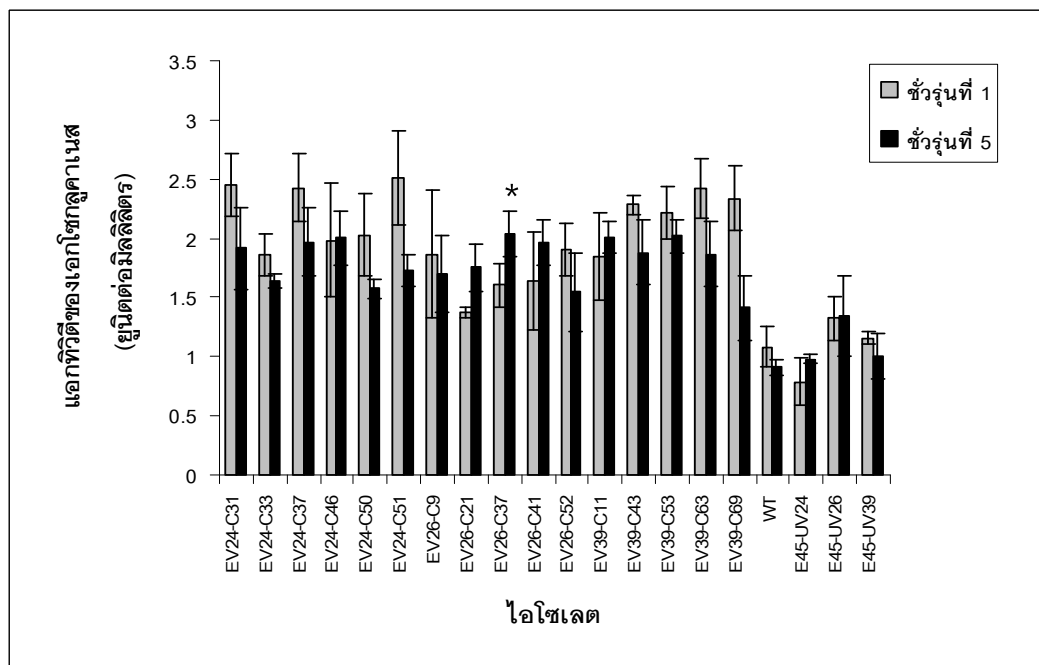
**ตารางที่ 4-8** การเปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของสายพันธุ์ตั้งต้นกับไอโซเลต EV39-C69

Strain	Specific activity (U/mg protein)			Protein (mg/ml)
	Endoglucanase	Exoglucanase	$\beta$ -glucosidase	
EV39-C69	23.938 $\pm$ 2.14	0.991 $\pm$ 0.14	0.135 $\pm$ 0.01	1.422 $\pm$ 0.07
WT	11.074 $\pm$ 1.62	0.733 $\pm$ 0.13	0.134 $\pm$ 0.03	1.258 $\pm$ 0.16

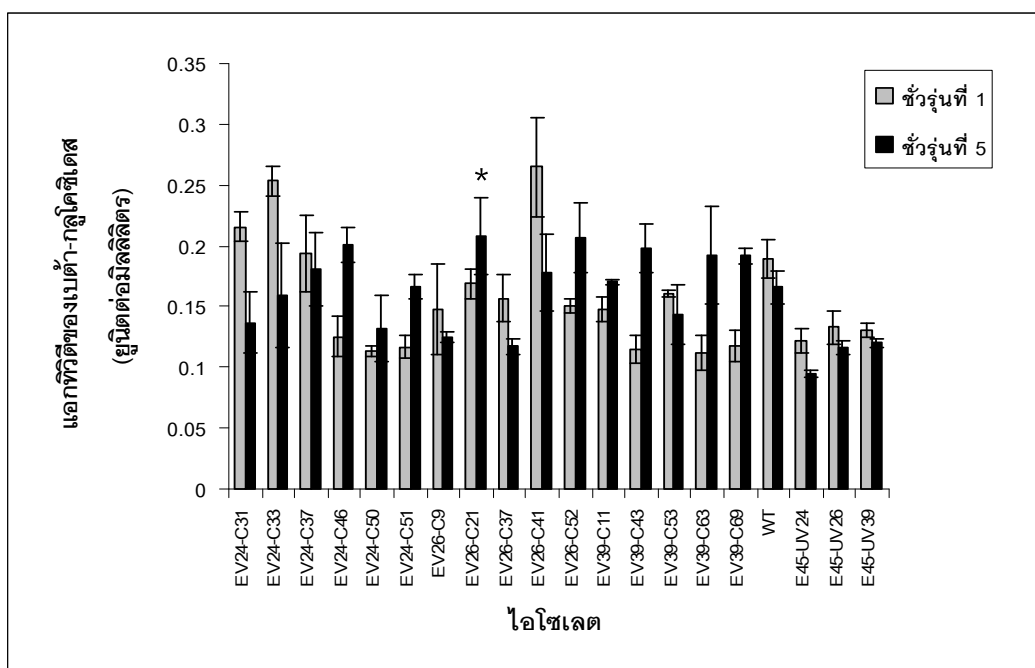
ทดสอบความสามารถการผลิตเซลลูเลสในอาหารเหลว Mandels' medium เพื่อนำมาวัดแอกทิวิตี เพื่อนำไปคำนวณหาแอกทิวิตีของเอนไซม์แต่ละชนิดในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร ในช่วงวันที่ 1 และที่ 5 โดยทำการวัดแอกทิวิตีเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนโดกลูคาเนส ดังภาพที่ 4-25 เอกโซกลูคาเนส ดังภาพที่ 4-26 และ เบตา-กลูโคซิเดส ดังภาพที่ 4-27 (ค่าแสดงในภาคผนวก ซ)



ภาพที่ 4-25 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีเอนโดไกลูคาเนสของราที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ด้วยโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V)



ภาพที่ 4-26 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีเอนโดไกลูคาเนสของราที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ด้วยโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V)



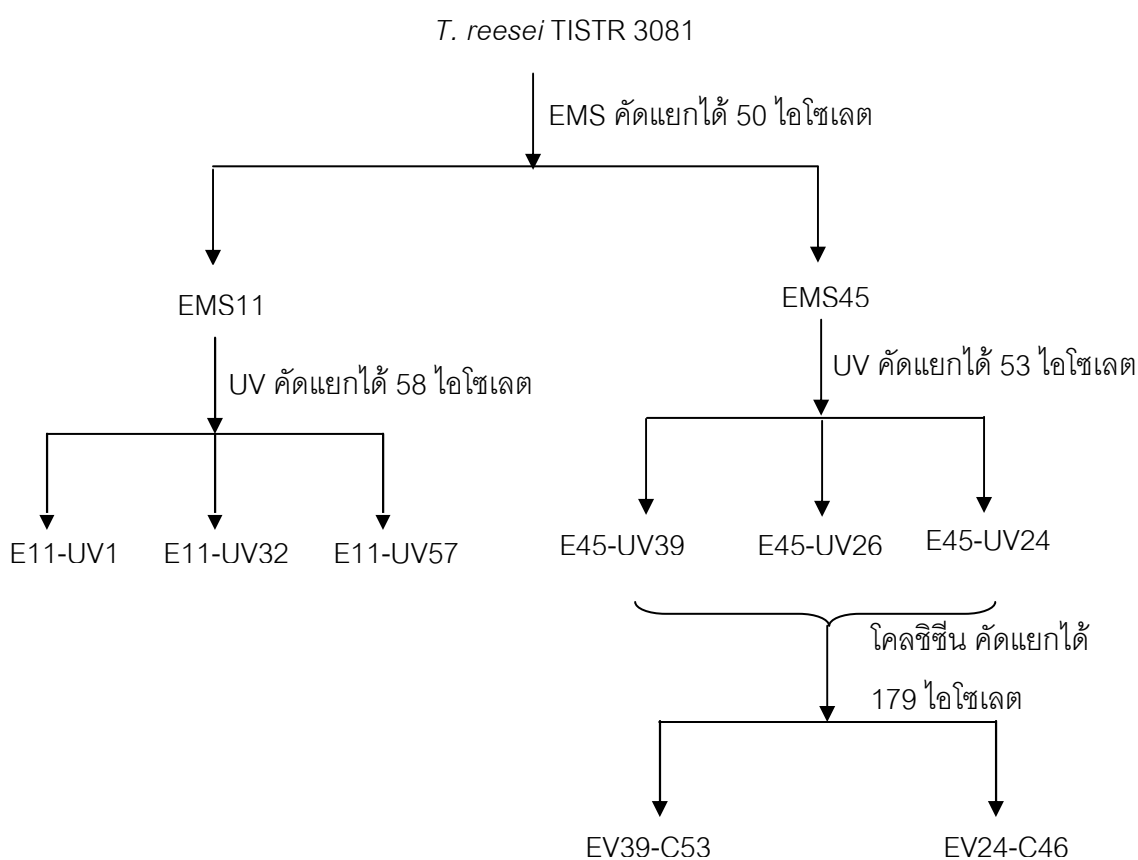
ภาพที่ 4-27 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับแอกทิวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส ของราที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ด้วยโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V)

จากการเปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตรพบว่ามีความต่ำเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนที่เป็นตัวหารสูง เนื่องจากการทำโคลชิซินเป็นการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่า ทำให้มีการผลิตเอนไซม์ หรือโปรตีนเพิ่มมากขึ้นด้วย เมื่อคำนวณในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร จากภาพที่ 4-25, 4-26 และ 4-27 พบว่าไอโซเลต EV39-C69 มีค่าแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $33.9778 \pm 2.658$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนไอโซเลต EV26-C37 มีค่าแอกทิวิตีของเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $2.0369 \pm 0.197$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนไอโซเลต EV26-C21 มีค่าแอกทิวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุด คือ  $0.2079 \pm 0.031$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์สารโคลชิซิน พบว่าไอโซเลต E39-C69 มีแอกทิวิตีในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตรเอนไซม์โดยรวมดีที่สุดคือ โดยมีแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดสสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (ดังตารางที่ 4-9) ซึ่งคิดเป็น 2.09, 2.20 และ 1.21 เท่าตามลำดับ

ตารางที่ 4-9 การเปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของสายพันธุ์ตั้งต้นกับไอโซเลต EV24-C46

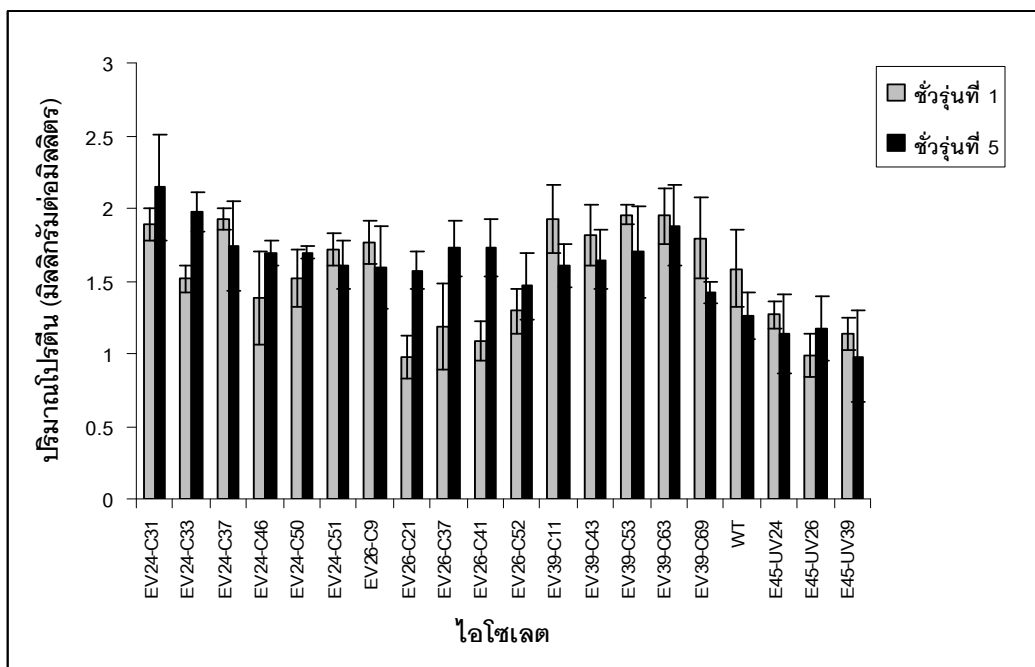
Strain	Specific activity (U/mg protein)			Protein (mg/ml)
	Endoglucanase	Exoglucanase	$\beta$ -glucosidase	
EV24-C46	29.090 $\pm$ 1.46	2.003 $\pm$ 0.23	0.200 $\pm$ 0.02	1.690 $\pm$ 0.09
WT	13.934 $\pm$ 2.60	0.909 $\pm$ 0.07	0.166 $\pm$ 0.01	1.258 $\pm$ 0.16



ภาพที่ 4-28 แผนผังการกลายพันธุ์ของเชื้อ *T. reesei* TISTR 3081 ในงานวิจัย

จากภาพที่ 4-28 เลือกไอโซเลต E45-UV39, E45-UV26 และ E45-UV24 เนื่องจากมีแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดสสูงตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น ๆ โดยใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์สารโคลิซินกับไอโซเลต 3 ไอโซเลต พบว่า EV39-C53 มีแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนสสูง เมื่อคำนวณแอกทิวิตีในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร จะได้ไอโซเลต EV24-C46 มีแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดสสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของเชื้อที่ผ่านการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต  
เซลล์ด้วยโคลชิซินกับสายพันธุ์ตั้งต้น



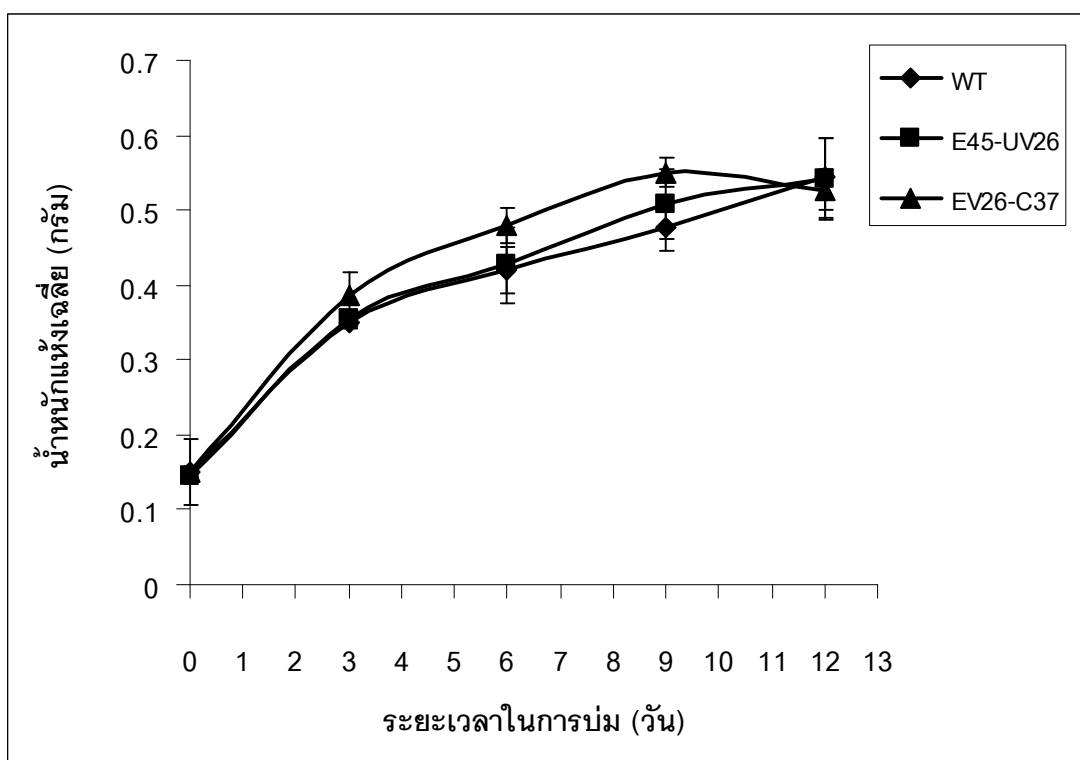
ภาพที่ 4-29 ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตกับปริมาณโปรตีนระหว่างชั่วรุ่นที่ 1 และชั่วรุ่นที่ 5 ของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ด้วยโคลชิซิน กับสายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลาย

จากภาพที่ 4-29 ทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของเชื้อที่ผ่านการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ด้วยโคลชิซิน กับสายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลาย พบว่า ไอโซเลตที่ผ่านการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลาย (ค่าแสดงในภาคผนวก ข)



### การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ *T. reesei* TISTR 3081 และ E45-UV26 และ EV26-C37

การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของ *T. reesei* TISTR 3081, E45-UV26 (เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายด้วยสารอีเอ็มเอสร่วมกับการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต) และ EV26-C37 (ได้มาจากการใช้สารโคลชิซินกับไอโซเลต E45-UV26) โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหารกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน ตัดเส้นใยด้วยเครื่องตัดจุกคอรัคเบอร์ 10 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวPDB ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 วัน และเก็บผลน้ำหนักรวมทุก ๆ 3 วัน ดังภาพที่ 4-30



ภาพที่ 4-30 อัตราการเจริญเติบโตของรา *T. reesei* TISTR 3081, E45-UV26 และ EV26-C37 ที่เจริญในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 24 วัน โดยเก็บน้ำหนักแห้งทุก ๆ 3 วัน

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

#### การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารกึ่งแข็ง PDA เชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 โดยศึกษาลักษณะภายนอกของโคโลนีที่เจริญบนอาหารกึ่งแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน มีลักษณะการสร้างเส้นใยสีขาว สีของสปอร์มีสีเขียว และเมื่อเจริญจะมีการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง และเมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีสปอร์มีลักษณะค่อนข้างกลมและขนาดเล็กมาก แต่ละสปอร์มีเพียง 1 เซลล์ จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของรา *T. reesei* TISTR 3081 ทำให้ทราบว่าเชื้อราชนิดนี้มีการผลิตสปอร์จำนวนมาก สังเกตได้จากการเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 2-3 วัน จะเห็นว่าการสร้างสปอร์เกิดขึ้น รวมถึงภายในสปอร์มีเพียงเซลล์เดียว ทำให้ง่ายต่อการนำสปอร์ของราชนิดนี้มาหลายพันธุ์ เนื่องจากสปอร์เป็นส่วนที่นำออกมาได้ง่าย สามารถตัดแยกสปอร์เดี่ยวออกมาได้ ทำให้ง่ายต่อการตัดแยกโคโลนีเดี่ยวและมีความไวต่อการกระตุ้นจากรังสีหรือสารเคมี ในงานทั่วไปจึงนิยมนำสปอร์ของเชื้อรามาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่นเดียวกับงานศึกษาของ Kuhad และคณะ (1994) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สปอร์ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* ซึ่งใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตร่วมกับการใช้สารเอ็นทีจี และการศึกษาของ Gadgil และคณะ (1995) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สปอร์ของเชื้อ *T. reesei* QM 9414 โดยใช้  $\text{NaNO}_2$  ร่วมกับการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต

#### การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส

จากการนำ *T. reesei* TISTR 3081 มาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เนื่องจากใช้ส่วนของสปอร์มาทำการกลายพันธุ์ โดยนำสปอร์มาละลายด้วย 0.02 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 กับ ทวิน-80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 5,000:1 โดยสารทวิน-80 เป็นสารที่ช่วยลดแรงตึงผิว เนื่องจากที่ผิวของสปอร์มีส่วนใหญ่จะมีองค์ประกอบที่เป็นไข เมื่อใช้ทวิน-80 แล้วจะทำให้สปอร์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อนจะกระจายตัวออกจากกันได้ดียิ่งขึ้น โดยความเข้มข้นของสปอร์ไม่ควรมากกว่า  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งถ้าความเข้มข้นของสปอร์มาก ก็จะทำให้โอกาสที่สารจะ

สัมผัสกับสปอร์ลดลง (Clowes และ Hay, 1968) จากการใช้สารอีเอ็มเอสมาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ในการทดลองจะกำหนดเวลาในการใช้สารอีเอ็มเอสกับสปอร์ 30 นาที สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เพื่อให้สปอร์กับสารอีเอ็มเอสสัมผัสกันอย่างทั่วถึง เริ่มแรกจะต้องมีการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอีเอ็มเอสที่ใช้ โดยการทำการกราฟอัตราการอยู่รอด (survival curve) จากการศึกษาของ Chand และคณะ (2004) อัตราการอยู่รอดที่ 0-50 เปอร์เซ็นต์ เป็นช่วงที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม ในการกลายพันธุ์ด้วยสารเอ็นทีจี แต่ช่วงอัตราการรอดกว้างมาก ในการกลายพันธุ์แบบสุ่มจะได้เซลล์ลูกหลานมากมาย และไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของเชื้อโดยสังเกตจากลักษณะภายนอกได้ ซึ่งการจำกัดอัตราการรอดที่น้อยลงเพื่อสามารถทำให้คัดเลือกได้ง่ายยิ่งขึ้น ผู้ทดลองจึงสนใจเชื้อที่มีอัตราการรอดอยู่ที่ 0-1 เปอร์เซ็นต์ ช่วงความเข้มข้นที่ใช้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต 0, 0.12, 0.24, 0.36, 0.48, 0.60, 0.72 และ 0.84 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นของสารอีเอ็มเอสอยู่ที่ 0.72 และ 0.84 กรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้มีอัตราการอยู่รอดของเชื้อน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นจุดที่คาดว่าสปอร์ได้รับสารเคมีในระดับความเข้มข้นสูง และยังสามารถอยู่รอดได้ ดังนั้นจึงมีโอกาสที่จะเป็นเชื้อที่กลายพันธุ์สูง ในการทดลองกลายพันธุ์สายพันธุ์ตั้งต้น พบว่าที่ความเข้มข้นของสารอีเอ็มเอส 0.72 กรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการอยู่รอด 0.98 เปอร์เซ็นต์ และ 0.84 กรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการอยู่รอด 0.65 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารอีเอ็มเอสจะทำให้อัตราการอยู่รอดของเชื้อน้อยลง ซึ่งมีปัจจัยมาจากความเข้มข้นของสารอีเอ็มเอสความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ และระยะเวลาในการให้สารละลายสปอร์สัมผัสกับสารอีเอ็มเอส จากงานวิจัยพบว่าไอโซเลต EMS49 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $14.0279 \pm 1.246$  หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.16 เท่า ส่วนไอโซเลต EMS45 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $0.9421 \pm 0.1002$  หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.44 เท่า และ ไอโซเลต EMS50 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุด คือ  $0.0941 \pm 0.038$  หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.16 เท่า ซึ่งสารอีเอ็มเอสสามารถทำให้เชื้อมีแอกทิวิตีจำเพาะที่สูงขึ้น โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Durand และ Clanet (1987) ที่ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอสกับ *T. reesei* QM 9414 กับสารละลายสปอร์ โดยเลือกอัตราการรอดของเชื้อที่ 5-20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้สาร 0.1 มิลลิลิตร ต่อ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายสปอร์ พบว่าได้สายพันธุ์กลายที่มีแอกทิวิตีเอกโซกลูคาเนสสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.5 เท่า และแอกทิวิตีเบตา-กลูโคซิเดสสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2 เท่า โดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์โลสเป็นแหล่งคาร์บอน

## การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ในการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ส่วนใหญ่เลือกไอโซเลตที่มีอัตราการรอดอยู่ที่ 0.1-5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นช่วงที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีที่สุดสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย (Fantini, 1975) อัตราการรอดของจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับ ระยะห่างระหว่างหลอดกำเนิดแสงกับจานที่บรรจุสปอร์ขณะทำการกลายพันธุ์ กำลังของหลอดรังสีอัลตราไวโอเล็ต ลักษณะและความแข็งแรงของเชื้อจุลินทรีย์ ในการทดลองนี้จึงเลือกอัตราการรอดน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการคัดเลือก โดยใช้หลอดฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตขนาดหลอด 10 วัตต์ จำนวน 5 หลอด และระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดแสง กับสปอร์ 20 เซนติเมตร ซึ่งในขณะที่ทำการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตจำเป็นต้องเปิดฝาจานออก และกวนสารละลายสปอร์ด้วยแท่งแม่เหล็กเพื่อให้สปอร์ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตอย่างทั่วถึง และเท่า ๆ กัน ความเข้มข้นของสปอร์ไม่ควรมากกว่า  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งถ้าความเข้มข้นของสปอร์มาก ก็จะทำให้โอกาสที่แสงอัลตราไวโอเล็ตจะสัมผัสกับสปอร์ลดลง และอาจจะไม่ได้รับแสงอย่างทั่วถึง รวมถึงในการเตรียมสารละลายสปอร์เพื่อใช้ในการฉายรังสีควรละลายสปอร์ในบัฟเฟอร์ หรือน้ำเกลือ เนื่องจากถ้าทำการละลายสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อสามารถดูดซับแสงอัลตราไวโอเล็ตได้มาก ทำให้รังสีอัลตราไวโอเล็ตผ่านไปสู่สปอร์ได้ลดลง นอกจากนี้อาจทำให้เกิดการสร้างสารพิษ หรือสารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่สามารถรบกวนทำให้ระยะเวลาในการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตต้องยาวออกไป (Clowes และ Hay, 1968) ในงานวิจัยใช้ระยะเวลาที่ทำให้อัตราการรอดน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์อยู่ที่ 6, 8, 10 และ 12 นาที ในการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตของ EMS45 ที่มีการผลิตเอนโดทอกซิน และเอกโซทอกซินสูง โดยที่ช่วงเวลา 6 นาที อัตราการรอดของเชื้ออยู่ที่ 0.77 เปอร์เซ็นต์ ช่วงเวลา 8 นาที อัตราการรอดของเชื้ออยู่ที่ 0.12 เปอร์เซ็นต์ และช่วงเวลา 10 นาที อัตราการรอดของเชื้ออยู่ที่ 0.01 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้เวลาในการฉายรังสีให้มีมากขึ้น อัตราการรอดของเชื้อจะมีน้อยลง ซึ่งเกิดมาจากจำนวนหลอด และกำลังของหลอดกำเนิดรังสีอัลตราไวโอเล็ต รวมถึงความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ ดังนั้นในการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตควรนึกถึงปัจจัยต่าง ๆ และหาสภาวะที่เหมาะสมที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยข้างต้น เพื่อเพิ่มโอกาสการได้เชื้อสายพันธุ์กลายเพิ่มมากขึ้น ผลจากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตจะทำให้เกิดไดเมอร์ โอกาสที่พบมากที่สุดคือ ไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) ทำให้ไทมีนไม่สามารถจับคู่กับอะดีนีนที่อยู่สายตรงข้ามได้ จึงต้องมีการซ่อมแซมซึ่งมี 2 วิธี คือ การซ่อมแซมที่ไม่ใช้แสง (excision repair) และการซ่อมแซมที่ต้องอาศัยแสง (photoreactivation) ดังนั้นหลังจากทำการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตจำเป็นต้องนำไปไว้ในที่มีดอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิดการซ่อมแซมแบบใช้แสง

(Sinha และ Hader, 2002) ซึ่งในบางกรณีเซลล์ที่เกิดการกลายบริเวณที่จำเป็นต่อการอยู่รอด เช่น เกิดบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นเอนไซม์ ทำให้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเอนไซม์นั้นที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตก็สามารถทำให้เซลล์นั้นอ่อนแอและตายได้ และเนื่องจากการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส หรือการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นการกลายพันธุ์แบบสุ่ม ดังนั้นอาจมีบางไอโซเลตทำให้แอกทิวิตีจำเพาะลดลงหรือแอกทิวิตีเพิ่มขึ้นก็ได้ และในบางครั้งอาจทำให้แอกทิวิตีสูงเพียงรุ่นแรก แต่เมื่อทดลองรุ่นต่อไปอาจมีการซ่อมแซมตัวเองเพื่อให้กลับมาเป็นเหมือนเดิม หรือลดลง เพื่อจะสามารถมีชีวิตอยู่รอดต่อไป จากผลการทดลองความสามารถในการผลิตเซลล์สูงจะใช้การคำนวณแอกทิวิตีจำเพาะ ที่มีหน่วยเป็น ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน พบว่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนสของไอโซเลต E45-UV32 เมื่อวัดแอกทิวิตีจำเพาะรุ่นที่ 1 พบว่ามีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ  $19.7205 \pm 0.179$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.86 เท่า แต่เมื่อวัดแอกทิวิตีจำเพาะรุ่นที่ 5 ไอโซเลต E45-UV32 มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ  $6.7674.0 \pm 0.597$  ยูนิตต่อมิลลิกรัม ซึ่งน้อยกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นถึง 1.57 เท่า จะเห็นได้ว่าในบางครั้งการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตจะทำให้เชื้อมีแอกทิวิตีที่สูงขึ้นในช่วงแรก แต่เมื่อเป็นรุ่นต่อไปก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลงอาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ดีขึ้นหรือด้อยลงก็เป็นได้ ซึ่งเป็นปกติสำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายด้วยวิธีแบบสุ่ม ซึ่งไม่สามารถรู้ได้ว่าเชื้อไอโซเลตไหนจะมีการกลายพันธุ์ และกลายในทางที่ดีขึ้นหรือด้อยลง จนกว่าจะมีการทดสอบกับอาหารเหลว และวัดค่าแอกทิวิตีจำเพาะ การที่แอกทิวิตีลดลงจนต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นก็เป็นส่วนหนึ่งเท่านั้น ในการทดลองยังพบว่าการกลายพันธุ์ซ้ำที่ทดสอบในช่วงที่ 5 ก็ยังมีความสามารถผลิตเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ยกตัวอย่างการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส และกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ไอโซเลต E45-UV39 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของ เอนโดกลูคาเนสสูงที่สุดคือ  $15.1447 \pm 0.266$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 1.43 เท่า ของสายพันธุ์ตั้งต้น ส่วนไอโซเลต E45-UV26 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $0.7777 \pm 0.056$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 1.69 เท่า ของสายพันธุ์ตั้งต้น ส่วนไอโซเลต E45-UV 24 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุดคือ  $0.1568 \pm 0.043$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 3.00 เท่าของสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่งมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น สอดคล้องกับงานทดลองของ Morikawa และคณะ (1985) ได้ทำการทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต 30-40 นาที ร่วมกับการใช้ 0.25 มิลลิกรัม ของสารเอ็นทีจีกับเชื้อ *T. reesei* พบว่ามีการผลิตเอนโดกลูคาเนส, Avi-ase และ FPase สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2 เท่า เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kuhad และคณะ (1994) ได้ใช้สารละลายสปอร์ของ *Fusarium oxysporum* มา

เหนียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต 5-30 นาที ร่วมกับการใช้ 100 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30-60 นาที ของสารเอ็นทีจี พบว่ามีการผลิตเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส คิดเป็น 2.89, 2.3 และ 4.25 เท่า ตามลำดับ ของสายพันธุ์ ตั้งต้น

ในการคัดเลือกไฮโซเลตที่ได้จากการเหนียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์ทั้ง ด้วยสารอีเอ็มเอส และรังสีอัลตราไวโอเล็ต จะใช้อาหารกึ่งแข็ง CMC agar ที่มี carboxymethylcellulose เป็นซับสเตรท โดย carboxymethylcellulose จะทำปฏิกิริยากับสี congo red ทำให้ในบริเวณที่ carboxymethylcellulose ถูกนำไปใช้จะไม่ติดสีแดงทำให้เกิดเป็นวงใส จากนั้นวัดขนาดโคโลนี และขนาดของวงใส เพื่อนำไปคำนวณอัตราส่วนระหว่างความกว้างโคโลนีกับวงใสที่เกิดขึ้น ซึ่งถ้า ค่าใกล้ค่า 0 แสดงว่า มีการเจริญของเชื้อน้อย แต่มีการผลิตเอนไซม์มาก ในอาหาร CMC agar นั้น จำเป็นต้องใส่ไทรตอน เอกซ์-100 เพื่อยับยั้งการเจริญของรา เนื่องจากเชื้อราที่มีการเจริญเติบโตที่ รวดเร็วมาก โดยมีการผลิตเส้นใยขึ้นมามาก สังเกตได้จากการทำการเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อ 3-4 วัน โคโลนีราได้เจริญเกือบเต็มจานเพาะเชื้อ ทำให้ในขั้นตอนการย้อมด้วยสี congo red ทำให้ไม่เห็น วงใส และเอนไซม์จะสามารถเห็นชัดในวันที่ 5 จึงต้องใช้ไทรตอน เอกซ์-100 เพื่อยับยั้งการเจริญ ของ เส้นใย โดยจากการศึกษาของ Morikawa และคณะ (1985) ได้ใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไทรตอน เอกซ์-100 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ L-sorbose ผสมลงในอาหารกึ่งแข็งที่มี rose bengal ที่ใช้สำหรับ คัดเลือกเชื้อที่ผ่านการเหนียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต และสารเอ็นทีจี โดยไทรตอน เอกซ์-100 ยับยั้งการเจริญของเส้นใย ซึ่งไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม การใช้ CMC agar เป็นวิธีการวัดปริมาณเอนไซม์อย่างประมาณเท่านั้น ไม่สามารถบอกปริมาณ เอนไซม์ที่แน่นอนได้ ซึ่งเหมาะสำหรับการคัดเลือกในขั้นต้น และใช้เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มี จำนวนมาก ให้เกิดการทดลองที่รวดเร็วขึ้น ซึ่งสามารถคัดแยกให้มีจำนวนลดลง จากนั้นต้องนำรา ที่ผ่านการเหนียวนำมาลงเลี้ยงในอาหารเหลว Mandels' medium เพื่อหาเอกลักษณ์ที่แน่นอนใน แต่ละเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส เบตา-กลูโคซิเดส การวัดเอกลักษณ์ของเซลล์ูลเลส จะวัดเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง 3 ชนิด ได้แก่ เอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส โดยเอนโดกลูคาเนสจะใช้ carboxymethylcellulose เป็นซับสเตรท ซึ่ง carboxymethylcellulose มีโครงสร้างและการจัดเรียงตัวคล้ายกับ amorphous cellulose ส่วนเอกโซกลูคาเนสจะใช้ กระดาษกรองเบอร์ 1 เป็นซับสเตรทเนื่องจากกระดาษกรองเป็นเซลล์ูลโลสประเภท crystalline cellulose ส่วนเบตา-กลูโคซิเดสจะใช้ salicin เป็นซับสเตรท เนื่องจาก salicin มีลักษณะคล้ายกับ เซลโลไบโอส การเลี้ยงเพื่อวัดเอกลักษณ์จะเลี้ยงในอาหารสูตรของ Mandels' medium โดยอาหารมี การปรับค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 5 เนื่องจากค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้สำหรับ

การผลิตเซลล์เลส (Duff และ Murray, 1996) การวัดแอกทิวิตีเอนไซม์แต่ละชนิดจะให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากเซลล์เลสสามารถทำงานดี และเสถียรที่สุดในการย่อยสลายเซลล์เลส (Nevalainen และคณะ, 1994)

### การทดสอบความต้านทานยาปฏิชีวนะเพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์กลาย

ความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ หรือความไวต่อสารเคมีบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของราที่สนใจ เป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้กันในการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย สารเหล่านี้ได้แก่ คีโตโคนาโซล แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) ไนสเตติน (nystatin) และมาลาไชท์ กรีน (malachite-green) (Perlman, 1979) จากการศึกษาของ Li และ Chang (1991) ใช้มาลาไชท์ กรีน และ คริสตัลไวโอเล็ต มาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *Volvariella volvacea* และจากการศึกษาของ Schimenti (1983) ได้ใช้ ไนสเตตินความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมในอาหาร Vogel's salt agar medium การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย *T. reesei* ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต และจากการศึกษาของ Chand และคณะ (2005) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายของ *Trichoderma* และ *Aspergillus* ด้วยสารเอ็นทีจี และเอซิเดียมโบไมด์ โดยใช้ยาปฏิชีวนะแอมโฟเทอริซิน บี มาคัดเลือกสายพันธุ์กลาย จากการทดลองนี้จึงเลือกใช้แอมโฟเทอริซิน บี เนื่องจากหาซื้อได้ง่าย และง่ายต่อการนำมาใช้ สามารถทำให้เชื้อตั้งต้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงความเข้มข้นอยู่ที่ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงใช้ระดับความเข้มข้นเดียวกันมาใช้กับเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลาย และพบว่าไอโซเลต E45-UV39 สามารถเจริญในอาหารกึ่งแข็ง PDA ที่มีแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้เล็กน้อย โดยยาปฏิชีวนะชนิดแอมโฟเทอริซิน บี จะมีผลต่อเซลล์เมมเบรน ในกระบวนการ active transport ที่ใช้พลังงานเข้าช่วยและมีการขับสารบางอย่างออกนอกเซลล์ เช่น เอนไซม์สำหรับการสร้างผนังเซลล์ ยาปฏิชีวนะมีผลไปขัดขวางหน้าที่ของเซลล์เป็นผลทำให้การนำสารเข้าสู่เซลล์ออกจากเซลล์ปกติ ทำให้เซลล์ตายได้ (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) แต่ในความเป็นจริงแล้วการกลายพันธุ์แบบใช้สารเคมี และการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นการกลายพันธุ์แบบสุ่ม และมีผลต่อลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์ โดยไม่สามารถทราบได้ว่าทำให้ยีนบริเวณใดเกิดการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งถ้าไม่ได้เปลี่ยนในยีนที่สามารถย่อยสลายยาปฏิชีวนะ หรือสารที่ยับยั้งการเจริญ ก็ไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าจะมีการกลายพันธุ์หรือไม่ เพราะลักษณะของโคโลนี ก็อาจจะไม่แตกต่างกับสายพันธุ์ตั้งต้น อาจกล่าวได้ว่าสายพันธุ์กลายนี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ใช่ตำแหน่งที่ต้านทานยาปฏิชีวนะ

## การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *T. reesei* TISTR 3081 และ E45-UV 26

การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์กลาย วิธีที่ง่ายที่สุดคือการสังเกตลักษณะภายนอก และลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น ลักษณะโคโลนี ลักษณะของสปอร์ และปริมาณการผลิตสปอร์ รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเหลว ว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นหรือไม่ จากการทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตพบเพียง 2 ไอโซเลต ที่สังเกตได้ชัดเจนว่ามีการเจริญเติบโตต่างจากสายพันธุ์ตั้งต้น เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง PDA มีการเจริญที่ช้าลง และมีการสร้างสปอร์น้อยลงมาก และทั้ง 2 ไอโซเลตมีการผลิตเซลลูเลสต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จากงานทดลองและในการทดลองอื่น ๆ พบน้อยมากที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างเด่นชัดที่สังเกตได้จากลักษณะดังกล่าว และจากการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ตั้งต้น และ E45-UV26 พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารกึ่งแข็ง PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะไม่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ตั้งต้น และไอโซเลต E45-UV26 จากการศึกษาของ Agrawal Deepika และ Joseph (1998) ได้ทำเนื้อมันทำให้เกิดสายพันธุ์กลายของ *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ด้วยสารอีเอ็มเอส และรังสีอัลตราไวโอเล็ต พบว่าเมื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ตั้งต้นกับสายพันธุ์กลายไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อทดสอบอัตราการเจริญเติบโตพบว่า สายพันธุ์ตั้งต้นมีน้ำหนักแห้งของเซลล์ 96 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในระหว่างที่เชื้อที่มีการกลายด้วยสารอีเอ็มเอสมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 100 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และเชื้อที่มีการกลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 78 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร อาจกล่าวได้ว่าสายพันธุ์กลายที่มีการกลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตจะมีผลต่อการเจริญของเซลล์ ซึ่งอาจจะทำให้มีการเจริญของจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ในงานวิจัยจากการสังเกตลักษณะทางภายนอก และลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถระบุได้ว่ามีการกลายพันธุ์หรือไม่ เนื่องจากไม่พบความแตกต่าง จึงต้องมีวิธีในการพิสูจน์ว่ามีการกลายพันธุ์จริง

## การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *cbh1* และ *cbh2* ระหว่าง *T. reesei* TISTR 3081 กับ E45-UV26

การศึกษาหาความแตกต่างของลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์ เป็นวิธีการหาลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ที่สนใจว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ ซึ่งจากการทดลองสนใจ *cbh1* และ *cbh2* ซึ่งเป็นยีนที่มีผลต่อการสร้างเอกโซกลูคาเนส และในการทดลองไอโซเลต



E45-UV26 มีการเปลี่ยนแปลงในการผลิตเอกโซกลูคาเนสที่เพิ่มสูงขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้น จึงนำ E45-UV26 มาหาลำดับเบสบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอกโซกลูคาเนส คือ *cbh1* และ *cbh2* โดยพบว่าไอโซเลต E45-UV26 มีการเปลี่ยนแปลงเบสในนิวคลีโอไทด์ 4 เบส ใน *cbh1* คือ ส่วนที่เป็นอินทรอน 2 เบส คือที่ตำแหน่งเบสที่ 710 คือเปลี่ยนจาก G เป็น T และตำแหน่งเบสที่ 734 คือเปลี่ยนจาก T เป็น C ส่วนที่เป็นเอกซอน มีการเปลี่ยน 2 เบส คือตำแหน่งเบสที่ 812 เปลี่ยนจาก A เป็น C และตำแหน่งเบสที่ 924 เปลี่ยนจาก A เป็น G อาจกล่าวได้ว่าสายพันธุ์กลาย E45-UV26 ที่มีการผลิตเซลลูเลสที่เพิ่มขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากสารอีเอ็มเอส หรือรังสีอัลตราไวโอเล็ต มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในยีนที่ควบคุมการผลิตเซลลูเลส ซึ่งการใช้สิ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์หลายชนิดร่วมกัน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมได้หลายรูปแบบ ได้สายพันธุ์กลายที่มีสารพันธุกรรมแตกต่างจากสายพันธุ์ตั้งต้นมากขึ้น และทำให้โอกาสที่มีการกลายพันธุ์กลับ (reverse mutation) ที่มีสารพันธุกรรมเหมือนสายพันธุ์ตั้งต้นน้อยลง (Fantini, 1975) โดยสอดคล้องกับงานวิจัยซึ่งมีการทำการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายด้วยสารอีเอ็มเอส ร่วมกับการใช้การฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต จากการที่มีเบสเปลี่ยนไป 4 ตำแหน่ง จะนำส่วนของเอกซอนมาพิจารณาเนื่องจากมีบทบาทในการสังเคราะห์โปรตีน และจากการทดสอบการสังเคราะห์โปรตีนพบว่าจากการที่เบสตำแหน่งของเอกซอนเปลี่ยนไป 2 ตำแหน่งทำให้มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนเปลี่ยนไป 1 กรด คือเปลี่ยนจาก Asparagine ไปเป็น Threonine

### การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสของสายพันธุ์กลายโดยใช้โคลชิซิน

จากการเพิ่มประสิทธิภาพโดยใช้สารโคลชิซิน โดยสารโคลชิซินเป็นสารที่ทำให้เกิดพอลิพลอยด์ ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำหน้าที่ของ spindle fiber ที่มีหน้าที่ดึงโครโมโซมไปยังขั้วของเซลล์ในขบวนการแบ่งเซลล์ระยะเมทาเฟส ทำให้โครโมโซมไม่ถูกดึงไปยังขั้วเซลล์มีผลทำให้เซลล์มีจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่าหรือมากกว่า การใช้สารโคลชิซินนั้นไม่สามารถหาเปอร์เซ็นต์การรอดได้ เนื่องจากสารนี้ไม่ก่อให้เกิดการตาย โดยสารโคลชิซินไม่ก่อให้เกิดการตายของเชื้อจุลินทรีย์ ในการทดลองจึงใช้ความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 วัน และจะใช้อาหาร selection medium (Toyama และคณะ, 2000) ในการคัดเลือกเซลล์ โดยเป็นอาหารกึ่งแข็งโดยอาหารมีลักษณะเป็น 2 ชั้น คืออาหารชั้นล่างมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร และทำการเกลี่ยเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเทชันด้วย โคลชิซิน 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 26 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วรดทับด้วยอาหารชั้นบน 100 มิลลิลิตร โดยอาหารชั้นบนมีแอลฟา-เซลลูโลส เชื้อที่สามารถเจริญขึ้นมาได้ต้องมีความสามารถใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

ได้ดี ดังนั้นจะต้องมีการผลิตเซลล์สูง จึงใช้วิธีนี้ในการคัดเลือกเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสารโคลชิซิน สามารถคัดเลือกเชื้อได้ทั้งหมด 179 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต EV39-C69 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $23.9380 \pm 2.138$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไอโซเลต EV26-C11 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $1.2538 \pm 0.145$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไอโซเลต EV26-C52 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุด คือ  $0.1436 \pm 0.027$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยเมื่อมีการเปรียบเทียบแอกทิวิตีต่อปริมาณโปรตีนแล้วพบว่าไอโซเลตมีแอกทิวิตีจำเพาะต่ำ บางไอโซเลตมีแอกทิวิตีจำเพาะต่ำกว่าสายพันธุ์ควบคุม เนื่องจากปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้นั้นมีปริมาณที่สูง ดังนั้นเวลานำไปคำนวณหาแอกทิวิตีจำเพาะในหน่วยยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จึงมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะต่ำ แต่เมื่อไม่นำปริมาณโปรตีนมาคำนวณ โดยคิดเป็นค่าแอกทิวิตีในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าไอโซเลต EV39-C69 มีค่าแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $33.9778 \pm 2.658$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 2.44 เท่า ส่วนไอโซเลต EV26-C37 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด คือ  $2.0369 \pm 0.197$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 2.24 เท่า ส่วนไอโซเลต EV26-C21 มีค่าแอกทิวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุด คือ  $0.2079 \pm 0.031$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 1.25 เท่า ซึ่งการใช้โคลชิซินมีผลทำให้มีการผลิตเอนไซม์ที่สูงขึ้น และสังเกตว่าอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นในช่วง exponential phase เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sarangbin และคณะ (1994) ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยดีโดยการใช้สารโคลชิซินในเชื้อ *Aspergillus niger* WU-2223L เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริกพบว่าสามารถทำให้มีการผลิตกรดซิตริกได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 1.4 เท่า และอัตราการเจริญของเส้นใยไอโซเลตที่ได้รับสารโคลชิซินเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลอง

จากการทำการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายในสปอร์ของ *T. reesei* TISTR 3081 ด้วยการใช้สารอีเอ็มเอส สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต EMS49 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของ เอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.16 เท่า ไอโซเลต EMS45 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.44 เท่า และ ไอโซเลต EMS50 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุด มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.16 เท่า และ ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้จากการใช้สารอีเอ็มเอส 0.84 กรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเลือกไอโซเลต EMS11 ที่มีแอกทิวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุดในช่วงวันที่ 1 และไอโซเลต EMS45 ที่มีแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนสสูงในช่วงวันที่ 1 มาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

จากการทำการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลายซ้ำในสปอร์ของไอโซเลต EMS11 ด้วยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 58 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต EMS11-UV1 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.36 เท่า ไอโซเลต EMS11-UV32 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.12 เท่า และไอโซเลต EMS11-UV57 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุด มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.63 เท่า ซึ่งไอโซเลต EMS11-UV1 ได้มาจากการฉายรังสีเป็นเวลา 6 นาที ส่วนไอโซเลต EMS11-UV32 ได้มาจากการฉายรังสีเป็นเวลา 8 นาที และ EMS11-UV57 ได้มาจากการฉายรังสีเป็นเวลา 12 นาที และจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตของไอโซเลต EMS45 สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 53 ไอโซเลต พบว่า ไอโซเลต E45-UV39 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.43 เท่า ส่วนไอโซเลต E45-UV26 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.69 เท่า ส่วนไอโซเลต E45-UV24 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุด มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 3.00 เท่า ซึ่งจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยวิธีการใช้สารอีเอ็มเอส และรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่าไอโซเลต E45-UV26 มีแอกทิวิตีของเอนไซม์โดยรวมทั้ง 3 ชนิดสูง โดยมีแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนสมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.41 เท่า เอกโซกลูคาเนส มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.69 เท่า และเบตา-กลูโคซิเดส มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.53 เท่า

จากการทดสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะในอาหารกึ่งแข็ง ที่มีแอมโฟเทอริซิน บี 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการเจริญเติบโตบนอาหารไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ไอโซเลต E45-UV39 สามารถเจริญได้เล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น ๆ ในการทดลองสนใจนำเอา ไอโซเลต E45-UV26 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.69 เท่า มาทดสอบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่งสังเกตการเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง รวมทั้งการนำไปดูลักษณะของเส้นใย และสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่ย้อมด้วยสีย้อมแลตโตฟีนอลคอตตอนบลู พบว่าไม่มีความแตกต่างกับสายพันธุ์ตั้งต้น จึงนำไปทดสอบหาลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเบส 4 เบส คือ ส่วนที่เป็นอินทรอน 2 เบส คือที่ตำแหน่งเบสที่ 710 คือเปลี่ยนจาก G เป็น T และตำแหน่งเบสที่ 734 คือเปลี่ยนจาก T เป็น C ส่วนที่เป็นเอกซอนมีการเปลี่ยน 2 เบส คือตำแหน่งเบสที่ 812 เปลี่ยนจาก A เป็น C และตำแหน่งเบสที่ 924 เปลี่ยนจาก A เป็น G จากการที่เอกซอนเปลี่ยนไป 2 ตำแหน่งทำให้มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนเปลี่ยนไป 1 กรด คือเปลี่ยนจาก Asparagine ไปเป็น Threonine

จากการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์โดยใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารโคเลซิทินกับ ไอโซเลต E45-UV24, E45-UV26 และ E45-UV39 สามารถคัดเลือกเชื้อได้ 179 ไอโซเลต พบว่า ไอโซเลต EV39-C69 มีค่าแอกทิวิตีของเอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.44 เท่า ไอโซเลต EV26-C37 มีค่าแอกทิวิตีของเอกโซกลูคาเนสสูงที่สุด มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.24 เท่า และไอโซเลต EV26-C21 มีค่าแอกทิวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสสูงที่สุด มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.25 เท่า

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. จุลชีวะวิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีวะวิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา.  
วรวิมล จุฬาลักษณ์นกุล. 2551. พันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

- Acebal, C., Castillon, M. P., Estrada, P., Mata, I., Costa, E., Aguado, J., Romero, D., and Jimenez, F. 1986. Enhanced cellulose production from *Trichoderma reesei* QM 9414 on physically treated wheat straw. Applied Microbiology and Biotechnology 24: 218-223.
- Adsul, M. G., Bastawde, K. B., Varma, A. J., and Gokhale, D. V. 2007. Strain improvement of *Penicillium jarthinellum* NCIM 1171 for increased cellulose production. Bioresource Technology 98: 1467-1473.
- Agrawal, R., Deepika, N., and Joseph, R. 1998. Strain improvement of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. by induced mutation for biotransformation of  $\alpha$ -pinene to verbenol. Biotechnology and Bioengineering 63: 249-252.
- Alan, G. A., Jack, R. G., and John, F. M. 1999. Mutation and repair. In B. B. Edith (ed.), The Science of Genetic, pp. 508-535. Fort Worth: Saunders College Publishing.
- Anderson, K. L., and Blair, B. G. 1996. Regulation of the cellulolytic activity of *Eubacterium cellulolyticum* 5494. SAAS Bull Biochemistry Biotechnology 9: 57-62.
- Baltz, R. H. 1986. Strain improvement. In A. L. Demain, and N. A. Solomon (eds.), Manual of industrial microbiology and biotechnology, pp. 154-169. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.

- Blazej, A., Kosik, M., and Spilda, I. 1990. The degradation of cellulose by thermal, chemical and biochemical techniques. In J. F. Kenedy, and G. O. Phillips (eds.), Cellulose sources and exploitation industrial utilization biotechnology and physico-chemical properties, pp. 385-396. England: Ellis Horwood LTD.
- Brown, T. A. 1992. Genetics a molecular approach. 2<sup>nd</sup> ed. London: Chapman & Hall.
- Chand, P., Aruna, A., Maqsood, A. M., and Rao, L. V. 2005. Novel mutation method for increased cellulose production. Journal of Applied Microbiology 98: 318-323.
- Clowes, A. F., and Hayes, W. 1968. Mutation. Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific.
- Coral, G., Akikan, B., Unaldi, M. N., and Guvenmez, H. 2002. Some properties of crude carboxymethyl cellulose of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain. Journal of Biology 26: 209-213.
- Davies, O. L. 1964. Screening for improved mutants in antibiotic research. Biometrics 20: 576-591.
- Deshpande, M. V., Eriksson, K. E., and Pettersson, L. G. 1984. An assay for selective determination of exo-1,4-beta-glucanases in a mixture of cellulolytic enzyme. Analytical Biochemistry 138: 481-487.
- Domingues, F. C., Queiroz, J. A., Cabral, J. M. S., and Fonseca, L. P. 2000. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Enzyme and Microbial Technology 26: 394-401.
- Dohot, M. U., and Noomrio, M. H. 1996. Microbial production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* using wheat straw as a carbon source. Journal Islamic Academy of Sciences 9: 1-7.
- Duff, S. J. B., and Murray, W. D. 1996. Bioconversion of forest production industry waste celluloses to fuel ethanol: a review. Bioresource Technology 55: 1-33.
- Durand, H., and Clanet, M. 1987. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. Enzyme and Microbial Technology 10: 341-346.
- Drake, J. W. 1970. The Molecular Basis of Mutation. California: Holden-day.

- Eigsti, O. J., Dustin, J., and Gay-Winn, N. 1949. Comments and communications on the discovery of the action of colchicines on mitosis in 1889. Science 110: 692-672.
- Eveleigh, D. E. 1987. Cellulase: a perspective. Mathematical and Physical Sciences 321: 435-447.
- Fantini, A. A. 1975. Strain development. In H. H. John (ed.), Method in enzymology. Antibiotic, pp. 24-41. New York: Academic.
- Fennington, G., Neubauer, D., and Stutzenberger, F. 1984. Cellulase Biosynthesis in a catabolite repression-resistant mutant of *Thermomonospora curvata*. Applied and Environmental Microbiology 47: 201-204.
- Gadgil, N. J., Dagainawala, H. F., Chakrabarti, T., and Khanna, P. 1995. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma reesei*. Enzyme and Microbial Technology 17: 942-946.
- Gardner, E. J., Simmon, M. J., and Snustard, D. P. 1991. In principles of genetic. 8<sup>th</sup> ed. New York: Willey and Sons.
- Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. International Union of Pure and Applied Chemistry 59: 257-268.
- Gokhale, D. V., Puntambekar, U. S., Deobagkar, D. N., and Peberdy, J. F. 1988. Production of cellulolytic enzymes by mutants of *Aspergillus niger* NCIM 1207. Enzyme Microbial Technology 10: 442-445.
- Hayashida, S., and Flor, P. Q. 1981. Raw starch-digestive glucoamylase productivity of protease-less mutant from *Aspergillus awamori* var. kawashi. Agriculture Biology Chemistry 45: 2675-2681.
- Held, P., and Hurley, J. 2001. Determination of total protein by the Lowry method using the BioTek instruments' ELx808 microplate reader. BioTek instruments. USA.
- Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen, E. L., and Howard, S. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology 2: 602-619.
- Huskin, C. L. 1941. Polyploidy and mutations. The American Naturalist 75: 329-346.

- Ilmen, M., Saloheimo, A., Onnela, M., and Penttila, M. E. 1997. Regulation of cellulose gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Applied and Environmental Microbiology 63: 1298-1306.
- Kim, D. W., Jeong, Y. K., Jang, Y. H., and Lee, J. K. 1993. Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*. Journal of Fermentation and Bioengineering 77: 363-369.
- Kirby, J., Martin, J. C., Daniel, A. S., and Flint, H. J. 1997. Dockerin-like sequences in cellulases and xylanases from the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. FEMS Microbiology Letters 149: 213-219.
- Kuhad, R. C., Kumer, M., and Singh, A. 1994. A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. Letters in Applied Microbiology 19: 397-400.
- Kuhad, R. C., Manchanda, M., and Singh, A. 1999. Hydrolytic potential of extracellular enzymes from a mutant strain of *Fusarium oxysporum*. Bioprocess Engineering 20: 133-135.
- Li, S., and Chang, S. T. 1991. Selection and characterization of crystal violet and malachite green resistant mutants in *Volvariella volvacea*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 7: 113-126.
- Liers, C., Ullrich, R., Steffen, K. T., Hatakka, A., and Hofrichter, M. 2006. Mineralization of <sup>14</sup>C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. Applied Microbiology Biotechnology 69: 573-579.
- Mandels, M., and Weber, J. 1969. Production of cellulases. Advances in Chemistry Series 95: 391-414.
- Mandels, M., James, W., and Richard, P. 1971. Enhance cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. Applied Microbiology 21: 152-154.
- Mikan, V. J., and Castellanos, S. D. 2004. Screening for isolation and characterization of microorganisms and enzymes with useful potential for degradation of cellulose and hemicellulose. Revista Colombiana de Biotecnología 6: 58-67.
- Montenecourt, B. S. 1983. *Trichoderma reesei* cellulases. Trends in Biotechnology 1: 156-161.



- Morikawa, Y., Kawamori, M., Ado, Y., Shinsha, Y., Oda, F., and Takasawa, S. 1985. Improvement of cellulose production in *Trichoderma reesei*. Agricultural and Biology Chemistry 6: 1869-1871.
- Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, N., Yguchi, T., and Kono, T. 2002. Purification and characterization of new endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. Enzyme and Microbial Technology 30: 319-326.
- Nevalainen, H., Suominen, P., and Taimisto, K. 1994. On the safety of *Trichoderma reesei*. Journal of Biotechnology 37: 193-200.
- Nevalainen, H., and Penttila, M. 1996. In the mycota II genetics and biotechnology. In B. Kuck (ed.), Molecular biology of cellulolytic fungi, pp. 134-167. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Parisi, F. 1989. Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilization of the hydrolyzate. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology 38: 53-87.
- Perlman, D. 1979. Uses of antibiotics in culture media. Methods in Enzymology 58: 110-116.
- Prescott, R. P., and Dunn, C. G. 1959. Industrial Microbiology. 3<sup>rd</sup> ed. Tokyo: Kogakusha Ltd.
- Rajoka, M. I. 2005. Double mutants of *Cellulomonas biazotea* for production of cellulases and hemicellulases following growth on straw of a perennial grass. Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 1063–1066.
- Ramel, C. 1989. The nature of spontaneous mutations. Mutation Research 212: 33-42.
- Reshamwala, S., Shawky, B. T., and Dale, B. E. 1995. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass. Applied Biochemistry and Biotechnology 43-55.
- Rose, J. K. C., and Bennett, A. B. 1999. Parallels Between Cell Expansion and Fruit Ripening. Trends Plant Science 4: 83–176.
- Ross, I. K. 1960. Sporangial development in *Lamproderma arcyronema*. Mycologia 52: 621-627.
- Russel, P. J. 1996. Genetic. 4<sup>th</sup> ed. New York: Harper Collins College.

- Ryu, D., and Mandels, M. 1980. Cellulase: biosynthesis and applications. Enzyme and Microbial Technology 2: 91-102.
- Saddler, J. N., Hogan, C. M., and Louis-Seize, G. 1985. A comparison between the cellulose systems of *Trichoderma harzianum* E58 and *Trichoderma reesei* C30. Applied Microbiology and Biotechnology 22: 139-145.
- Sarangbin, S. 1994. Formation of autodiploid strains *Aspergillus niger* and their application to citric acid production from starch. Journal of Fermentation Bioengineering 77: 474-478.
- Schimenti, J., Garrett, T., Montenecourt, S. B., and Eveleigh, D. E. 1983. Selection of hypercellulolytic mutants of *Trichoderma reesei* based on resistance to nystatin. Mycologia 75: 876-880.
- Sinha, R. P., and Hader, D. P. 2002. UV induced DNA damage and repair: a review. Photochemistry and Photobiology Science 1: 225-236.
- Sivers, M. V., and Zacchi, G. 1995. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. Bioresource Technology 51: 43-52.
- Sheir-Neiss, G., and Montenecourt, B. S. 1984. Characterization of the secreted cellulases of *Trichoderma reesei* wild type and mutants during controlled fermentations. Applied Microbiology and Biotechnology 20: 46-53.
- Shoseyov, O., and Doi, R. H. 1990. Essential 170-kDa subunit for degradation of crystalline cellulose by *Clostridium cellulovorans* cellulose. National Academy of Sciences USA 87:2192-2195.
- Snustad, D. P., and Simmons, M. J. 2000. Mutation DNA repair and recombination. In H. David (ed.), Principles of genetics, pp. 358-390. New York: John Wiley & Sons.
- Sternberg, D., Vijayakumar, P., and Reese, E. T. 1977.  $\beta$ -glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Canadian Journal of Microbiology 23: 139-147.
- Sun, Y., and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology 83: 1-11.

- Svetlichnyi, V. A., Svetlichnaya, T. P., Chernykh, N. A., and Zavarzin, G. A. 1990. *Anaerocellum thermophilum* an extremely thermophilic cellulolytic eubacterium isolated from hot springs in the valley of geyser (in Russian). Microbiology 59: 598-604.
- Tamaru, Y., Karita, S., Ibrahim, A., Chan, H., and Doi, R. H. 2000. A large gene cluster for the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. Journal of Bacteriology 182: 5906-5910.
- Tan, T., Zhang, M. Wang, B., Ying, C., and Deng, L. 2003. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. Process Biochemistry 39: 459-465.
- Teeri, T. T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight in to the function of cellobiohydrolases. Trends in Biotechnology 15: 160-167.
- Toyama, H., Yamagishi, N., and Toyama, N. 2002. Construction of cellulose hyper-producers of *Trichoderma reesei* Rut C-30 for utilization of waste paper using colchicines and benomyl. Journal of Molecular Catalysis B 17: 175-178.
- Toyama, H., and Toyama, N. 2000. Successive construction of cellulose hyperproducers of *Trichoderma* using hyperpolyploids. Food Science and Technology 84-86.
- Unsitolo, J. M., Helena, K. M., Harkki, A. M., Knowles, J. K. C., and Penttilii, M. E. 1991. Enzyme production by recombinant *Trichoderma reesei* strains. Journal of Biotechnology 17: 35-50.
- Whitaker, D. R. 1954. Mutarotation after hydrolysis of cellopentaose by *Myrothecium verrucaria* cellulase. Archives of Biochemistry and Biophysics 53: 436-438.
- Yamanobe, T., and Mitsushi, Y. 1990. Some enzymatic properties of endo-1, 4- $\beta$ -glucanases components from fungal strain Y-94. Agricultural Biology and Chemistry 54: 309-317.
- Yoon, J. J., Cha, C. J., Son, D. W., and Kim, Y. S. 2007. The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. Journal of Microbiology and Biotechnology 5: 800-805.

- Zhang, H. P., and Lynd, L. R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose system. Biotechnology Bioengineering 88: 797-824.
- Zhang, H. P., Himmel, M. E., and Mielenz, J. R. 2006. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology Advances 24: 452-481.
- Zhou, Z., Miwa, M., and Hogetsu, T. 1999. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). New Phytologist 144: 55-63.

ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**  
**วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

**1. อาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)**

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco Laboratories โดยชั่ง PDA 39 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**2. อาหารแข็ง PDB (Potato Dextrose Broth)**

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Hi media โดยชั่ง PDB 24 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**3. อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลล์เลส (Mandels' medium)**

- ยูเรีย	0.3	กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	1.4	กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2	กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.4	กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.3	กรัม
- ไอรอนซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	5	มิลลิกรัม
- แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	1.6	มิลลิกรัม
- ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1.4	มิลลิกรัม
- โคบอลต์คลอไรด์ ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	2	มิลลิกรัม
- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.25	กรัม
- เพปโตน (peptone)	0.75	กรัม
- แอลฟา-เซลลูโลส ( $\alpha$ -cellulose)	10	กรัม
- น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 5 ถ่ายในพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร พลาสติกละ 20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทรีดโคลชิซิน

- ยูเรีย	0.3	กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	1.4	กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2	กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.4	กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.3	กรัม
- ไอรอนซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	5	มิลลิกรัม
- แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ )	1.6	มิลลิกรัม
- ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1.4	มิลลิกรัม
- โคบอลต์คลอไรด์ ( $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	2	มิลลิกรัม
- น้ำตาลกลูโคส (glucose)	10	กรัม
- เพปโตน (peptone)	5	กรัม
- สารโคลชิซิน (colchicine)	1	กรัม
- น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 6 ถ่ายในพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร พลาสติกละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

### 4. Selection medium

#### ชั้นบน

- ยูเรีย	0.3	กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	1.4	กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2	กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.4	กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.3	กรัม
- ไอรอนซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	5	มิลลิกรัม
- แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ )	1.6	มิลลิกรัม
- ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1.4	มิลลิกรัม
- โคบอลต์คลอไรด์ ( $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	2	มิลลิกรัม
- เพปโตน (peptone)	5	กรัม

- ไตรรตอน เอกซ์-100 (triton x-100)	1	มิลลิลิตร
- ไข่แดง	15	กรัม
- น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 6 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

### ชั้นล่าง

- ยูเรีย	0.3	กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	1.4	กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2	กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.4	กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.3	กรัม
- ไอรอนซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	5	มิลลิกรัม
- แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	1.6	มิลลิกรัม
- ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1.4	มิลลิกรัม
- โคบอลต์คลอไรด์ ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	2	มิลลิกรัม
- เพปโตน (peptone)	5	กรัม
- ไตรรตอน เอกซ์-100 (triton x-100)	1	มิลลิลิตร
- แอลฟา-เซลลูโลส ( $\alpha$ -cellulose)	10	กรัม
- ไข่แดง	15	กรัม
- น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 6 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

### 5. Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมโฟเทอริซิน บี

- PDA สำเร็จรูปของ Difco Laboratories	0.78	กรัม
- น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
- แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น	5	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ละลายผง PDA สำเร็จในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรแล้วนำไปต้มจนเดือด ด้วยเครื่องไมโครเวฟเพื่อให้  
 ฝุ่นละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15  
 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำอาหารไปเทในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 50  
 องศาเซลเซียส เติมสารปฏิชีวนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูพรุน 0.2  
 ไมครอน

**หมายเหตุ :** PDA สำเร็จรูป 20 มิลลิลิตรต่อหนึ่งจานเพาะเชื้อ และควรระวังในขั้นตอนการเติมยา  
 ปฏิชีวนะไม่ควรให้อุณหภูมิอาหารเกิน 50 องศาเซลเซียสเพราะจะทำให้ยาเสื่อมสภาพ

## 5. CMC agar

- ยูเรีย	0.3	กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	1.4	กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2	กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.4	กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.3	กรัม
- ไอรอนซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	5	มิลลิกรัม
- แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	1.6	มิลลิกรัม
- ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1.4	มิลลิกรัม
- โคบอลต์คลอไรด์ ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	2	มิลลิกรัม
- เพปโตน (peptone)	5	กรัม
- ไตรตอน เอกซ์-100 (triton x-100)	1	มิลลิลิตร
- CMC	10	กรัม
- ฝุ่นผง	15	กรัม
- น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นยกเว้น CMC และฝุ่นผง นำไปตั้งไฟให้พออุ่น ค่อย ๆ เติม CMC  
 ทีละน้อย บั่นกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก พอ CMC ละลายหมดให้ค่อย ๆ เติมฝุ่นผง อุณหภูมิเดือด ปรับค่า  
 พีเอชให้ได้เท่ากับ 6 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อ  
 ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**ภาคผนวก ข**  
**วิธีการเตรียมสารเคมี**

**1. สารละลายตรวจวัดปริมาณโปรตีน**

1.1 สารละลายไบยูเรต (biuret reagent)

- 1% คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.5	มิลลิลิตร
- 2% โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ )	0.5	มิลลิลิตร
- 2% โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 M NaOH)	50	มิลลิลิตร

1.2 สารละลายโฟลีนฟีนอลรีเอเจนท์ (folin phenol reagent)

- สารละลายโฟลีนฟีนอลรีเอเจนท์	1	ส่วน
- น้ำกลั่น	1	ส่วน

**2. สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ**

2.1 ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0

- ทริส เบส	121	กรัม
- น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลายทริส เบส ให้เข้ากันกับน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

- EDTA	186.10	กรัม
- น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 8 ด้วย NaOH จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 Washing buffer

- PVP (polyvinylpyrrolidone)	2	กรัม
------------------------------	---	------

- กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid)	1.76	กรัม
- ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	20	มิลลิลิตร
- 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol)	4	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อปรับปริมาตรเท่ากับ 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หุ้มภาชนะที่เก็บด้วยฟลอยด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 2.4 2X CTAB lysis buffer

- CTAB	4	กรัม
- ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	20	มิลลิลิตร
- EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	8	มิลลิลิตร
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	16.36	กรัม
- 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol)	1	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อปรับปริมาตรเท่ากับ 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 2.5 คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (24: 1, v/v)

- คลอโรฟอร์ม (chloroform)	192	มิลลิลิตร
- ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol)	8	มิลลิลิตร

#### 2.6 20 % Polyethylene glycol 6000 (PEG)

- PEG 6000 (Polyethylene glycol)	20	กรัม
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	14.61	กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อปรับปริมาตรเท่ากับ 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 2.7 Tris-EDTA buffer (TE buffer)

- ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	10	มิลลิลิตร
- EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	2	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

### 3. สารเคมีในการทำพีซีอาร์ และอิเล็กโตรโฟรีซิส

#### 3.1 Bovine serum albumin

- Bovine serum albumin	20	มิลลิกรัม
- น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.2 10X Tris-boric acid EDTA (10X TBE)

- Tris (hydroxymethyl) amino methane	54	กรัม
- EDTA	4.65	กรัม
- กรดบอริก (boric acid)	27.50	กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 3.3 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)

-เอธิเดียมโบรไมด์	0.2	กรัม
-น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.4 1% Agarose gel (w/w)

- อะกาโรส (agarose)	1	กรัม
- 0.5 X TBE	100	มิลลิลิตร
- เอธิเดียมโบรไมด์	4	ไมโครลิตร



เท่ากับ  $0.02 \text{ เซนติเมตร} \times 0.02 \text{ เซนติเมตร} \times 0.01 \text{ เซนติเมตร} = 0.000004 \text{ ลูกบาศก์เซนติเมตร}$   
หรือ  $0.000004 \text{ มิลลิลิตร}$

ค่าเฉลี่ยสปอร์ในช่องเท่ากับ  $(1+2+3+4+5)/5 \times 1/4 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร

### วิธีการใช้ haemocytometer

- วาง cover glass บน haemocytometer โดยแผ่น cover glass จะอยู่เหนือผิวตาราง  $0.1 \text{ มิลลิเมตร}$
- ใช้ปิเปตดูดสารละลายสปอร์ประมาณ 9-10 ไมโครลิตร วางปลายปิเปตที่บริเวณระหว่างสไลด์และ cover glass ค่อย ๆ หยดสารละลายสปอร์จนกระทั่งเต็มพื้นที่ตาราง
- วาง haemocytometer บนที่วางวัตถุบนกล้องจุลทรรศน์ ปรับกำลังขยายให้เหมาะสม โดยถ้าสปอร์มีขนาดใหญ่ให้ใช้กำลังขยาย 40X (ในกรณีที่ใช้ช่องใหญ่) ถ้าสปอร์ขนาดเล็กใช้กำลังขยาย 100X (ในกรณีที่ใช้ช่องเล็ก)
- นำสปอร์ที่นับได้มาคำนวณหาความเข้มข้นสปอร์

**หมายเหตุ** cover glass ที่ใช้จะต้องเป็น cover glass ที่ใช้เฉพาะกับ haemocytometer เท่านั้น

**ภาคผนวก ง**  
**วิธีการวัดแอกทีวิตีเอนไซม์**

**1. การวัดแอกทีวิตีเอนโดกลูคาเนส ดัดแปลงจากวิธีของ Ghose (1987)**

- 1.1 นำ crude enzyme 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ ถ้าเป็นหลอดควบคุมให้เติม 0.05 citrate buffer pH 4.8 แทน crude enzyme
- 1.2 เติม 2% CMC ที่ละลายใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- 1.3 นำไปป่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 1.4 เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทันที เขย่าให้เข้ากัน นำไปป่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็น
- 1.5 นำสารที่ทำปฏิกิริยาในข้อ 1.4 มาใส่ในหลอดของไมโครเพลต 100 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 150 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร ในการสร้างกราฟมาตรฐานใช้น้ำตาลกลูโคส เพื่อนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณหาค่าแอกทีวิตีจำเพาะของเอนไซม์

**2. การวัดแอกทีวิตีเอกโซกลูคาเนส ดัดแปลงจากวิธีของ Ghose (1987)**

- 2.1 นำ crude enzyme 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ ถ้าเป็นหลอดควบคุมให้เติม 0.05 M citrate buffer pH 4.8 แทน crude enzyme
- 2.2 เติม 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 1.0 x 6.0 เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน
- 2.3 นำไปป่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
- 2.4 เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทันที เขย่าให้เข้ากัน นำไปป่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็น
- 2.5 นำสารที่ทำปฏิกิริยาในข้อ 2.4 มาใส่ในหลอดของไมโครเพลต 100 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 150 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร ในการสร้างกราฟมาตรฐานใช้น้ำตาลกลูโคส เพื่อนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณหาค่าแอกทีวิตีจำเพาะของเอนไซม์

### 3. การวัดแอกทิวิตีเบต้า-กลูโคซิเดส ดัดแปลงจากวิธีของ Sternberg, Vijayakumar และ Reese (1977)

3.1 นำ crude enzyme 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ ถ้าเป็นหลอดควบคุมให้เติม 0.025 M citrate buffer pH 4.5 แทน crude enzyme

3.2 เติม 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ salicin ที่ละลายใน 0.025 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.4 เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทันทีเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็น

3.5 นำสารที่ทำปฏิกิริยาในข้อ 3.4 มาใส่ในหลอดของไมโครเพลต 100 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 150 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร ในการสร้างกราฟมาตรฐานใช้น้ำตาลกลูโคส เพื่อนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณหาค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์



**ภาคผนวก จ**  
**กราฟมาตรฐาน**

1. ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาล สำหรับนำไปคำนวณแอกทิวิตีของ เอนโดกลูคาเนสและเฮกโซกลูคาเนส

**ตารางแสดง** ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานกลูโคส เพื่อใช้ในการคำนวณแอกทิวิตีของ เอนโดกลูคาเนส และเฮกโซกลูคาเนส

ปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	สารละลายกลูโคสใน 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8 (10 mg/ml)	0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8
0	0	500
0.3	15	485
0.6	30	470
0.9	45	455
1.2	60	440
1.5	75	425
1.8	90	410
2.1	105	395
2.4	120	380

### วิธีการทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาล เพื่อสำหรับการคำนวณหาแอกทิวิตีของ เอนโดกลูคาเนส

1. เตรียมสารละลายกลูโคสใน 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางกลูโคสด้วย 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8 ดังตารางที่ ๑-1
2. เติม 2% CMC ที่ละลายใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทันที เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็น
4. นำสารที่ทำปฏิกิริยาในข้อ 3 มาใส่ในหลอดของไมโครเพลต 100 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 150 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร

### วิธีการทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาล เพื่อสำหรับการคำนวณหาแอกทิวิตีของ เอกไซกลูคาเนส

1. เตรียมสารละลายกลูโคสใน 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางกลูโคสด้วย 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8 ดังตารางที่ ๑-1
2. เติม 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
3. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทันที เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็น
4. นำสารที่ทำปฏิกิริยาในข้อ 3 มาใส่ในหลอดของไมโครเพลต 100 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 150 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร

2. ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาล สำหรับนำไปคำนวณแอกทिवิตีของเบต้า-กลูโคซิเดส

**ตารางแสดง** ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานกลูโคส เพื่อใช้ในการคำนวณแอกทिवิตีของเบต้า-กลูโคซิเดส

ปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	สารละลายกลูโคสใน 0.025 M sodium citrate buffer pH 4.5 (10 mg/ml)	0.025 M sodium citrate buffer pH 4.5
0	0	500
0.2	10	490
0.4	20	480
0.6	30	470
0.8	40	460
1.0	50	450
1.2	60	440
1.4	70	430

**วิธีการทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาล เพื่อสำหรับการคำนวณหาแอกทिवิตีของเอนโดกลูคาเนส**

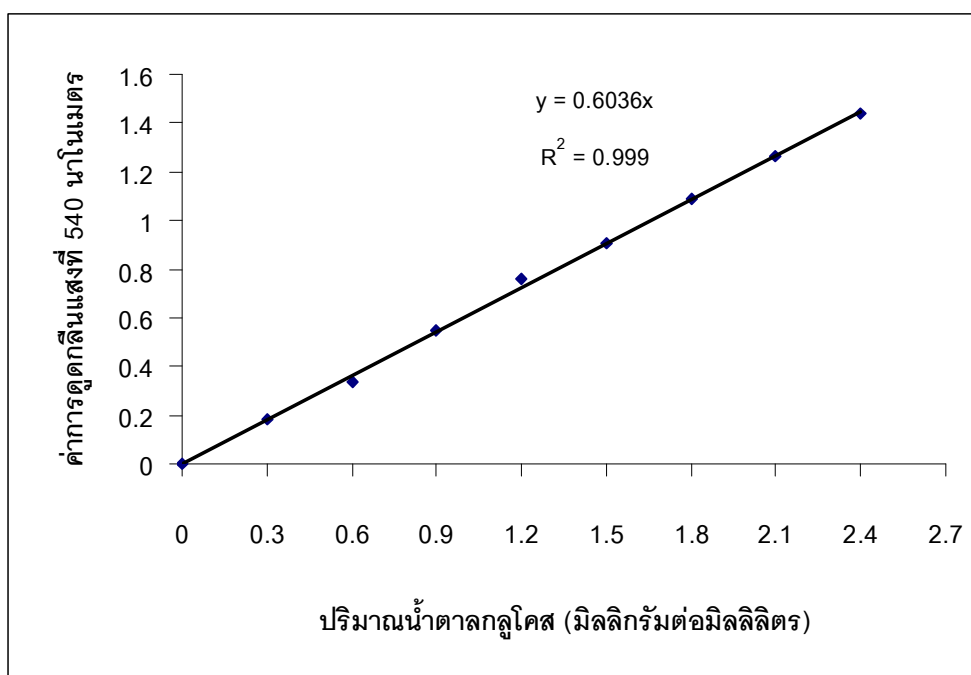
1. เตรียมสารละลายกลูโคสใน 0.025 M sodium citrate buffer pH 4.5 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางกลูโคสด้วย 0.025 M sodium citrate buffer pH 4.5 ดังตารางที่ ๑-1

2. เติม 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ salicin ที่ละลายใน 0.025 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

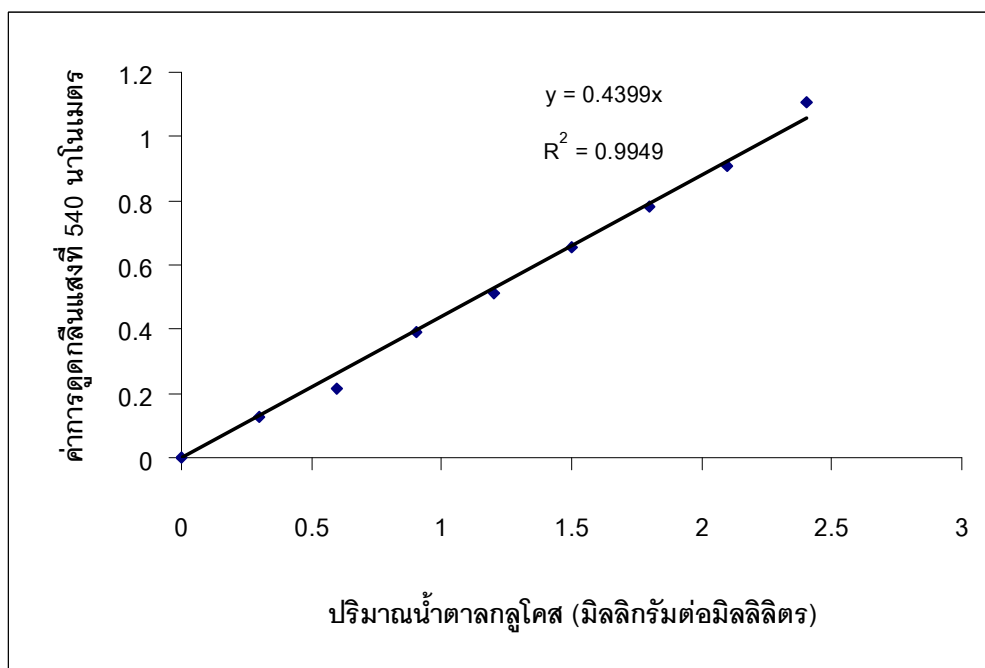
3. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทันที เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็น

4. นำสารที่ทำปฏิกิริยาในข้อ 3 มาใส่ในหลอดของไมโครเพลต 100 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 150 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร

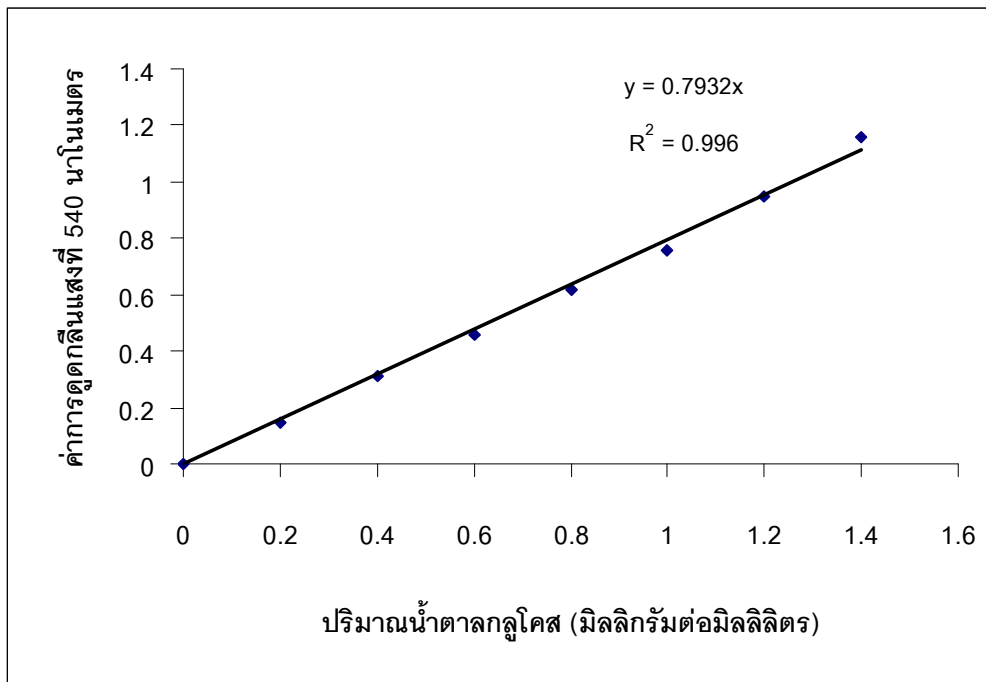
### 3. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



ภาพแสดง กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส เพื่อการคำนวณหาแอกทिवิตีของเอนโดกลูคาเนส



ภาพแสดง กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส เพื่อการคำนวณหาแอกทिवิตีของเอนไซกกลูคาเนส



ภาพแสดง กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส เพื่อการคำนวณหาแอกทิวิตีของเบต้า-กลูโคซิเดส

#### 4. กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม

**ตารางแสดง** ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานโปรตีน

ปริมาณ BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	ความเข้มข้นของ BSA (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำกลั่น
0	0	100
0.05	5	95
0.10	10	90
0.15	15	85
0.20	20	80
0.25	25	75
0.30	30	70
0.35	35	65
0.40	40	60

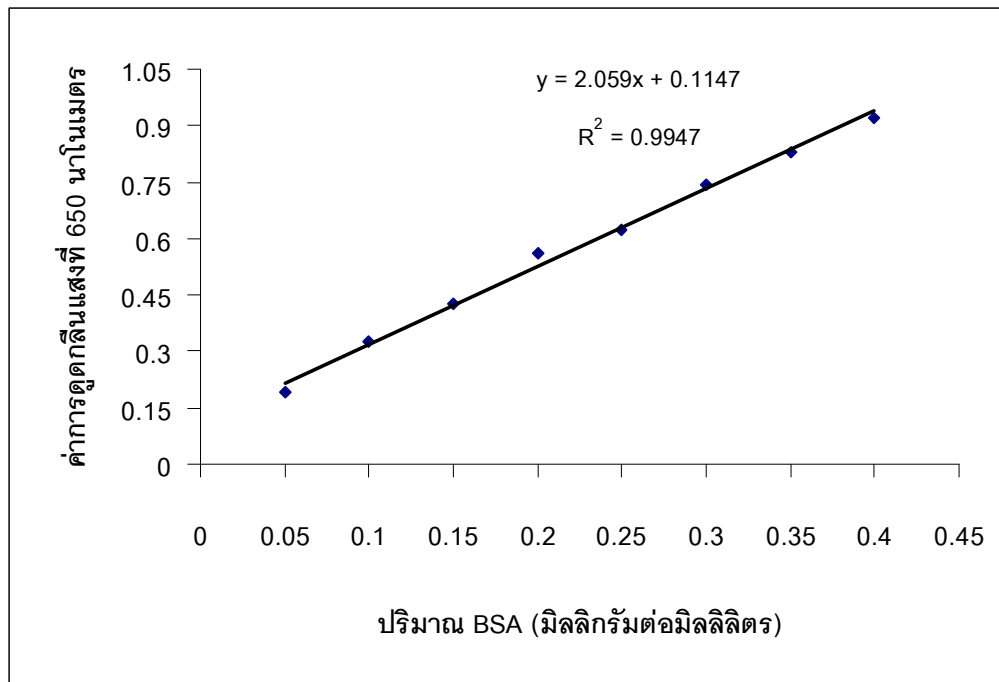
#### วิธีการทำกราฟมาตรฐาน BSA

1.เตรียมสารละลายไบยูเรต (biuret reagent) ซึ่งประกอบด้วย 2% โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 0.5 มิลลิลิตร 2% โซเดียมคาร์บอเนต ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิลิตร 1% คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 มิลลิลิตร

2.เตรียมสาร BSA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางปริมาณโปรตีนด้วยน้ำกลั่นดังตารางที่ ๑-3

3.นำสารละลายไบยูเรตปริมาตร 200 ไมโครลิตรดูดลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลตและบ่มกับ BSA 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10-15 นาที ที่อุณหภูมิห้องโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.เตรียมสารละลายฟิลาอินฟีนอลรีเอเจนท์ โดยใช้สารละลายฟิลาอินฟีนอลรีเอเจนท์ 1 ส่วน และน้ำกลั่น 1 ส่วน (1:1) และดูดลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลตปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร นำไปสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน



ภาพแสดง กราฟมาตรฐานโปรตีนที่ใช้ BSA ที่ระดับความเข้มข้น 0-0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

**ภาคผนวก จ**  
**วิธีการคำนวณแอกทิวิตีของเอนไซม์**

**1. การคำนวณหาแอกทิวิตีของเอนไซม์กลูคาเนส**

น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ ) มีค่าเท่ากับ 0.18 มิลลิกรัมต่อไมโครโมล

$$\begin{aligned} \text{จาก 1 ยูนิตของเอนไซม์} &= 1 \text{ ไมโครโมลของซับสเตรทที่ถูกย่อยภายในเวลา 1 นาที} \\ &= 0.18 \text{ มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที} \end{aligned}$$

ในการทดลองเวลาในการทำปฏิกิริยาของซับสเตรทกับเอนไซม์ใช้เวลา 60 นาที ได้ว่า

0.18 มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า 1 ยูนิต

1.00 มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 60 นาที =  $1/(0.18 \times 60)$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ในการทดลองใช้เอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จะได้ว่า มิลลิกรัมของกลูโคส  $\times 0.185$

ค่าที่ได้จะมีหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร

**2. การคำนวณหาแอกทิวิตีของเอนไซม์โดกลูคาเนส**

น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ ) มีค่าเท่ากับ 0.18 มิลลิกรัมต่อไมโครโมล

$$\begin{aligned} \text{จาก 1 ยูนิตของเอนไซม์} &= 1 \text{ ไมโครโมลของซับสเตรทที่ถูกย่อยภายในเวลา 1 นาที} \\ &= 0.18 \text{ มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที} \end{aligned}$$

ในการทดลองเวลาในการทำปฏิกิริยาของซับสเตรทกับเอนไซม์ใช้เวลา 30 นาที ได้ว่า

0.18 มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า 1 ยูนิต

1.00 มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 30 นาที =  $1/(0.18 \times 30)$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ในการทดลองใช้เอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จะได้ว่า มิลลิกรัมของกลูโคส  $\times 0.37$

ค่าที่ได้จะมีหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร



### 3. การคำนวณหาแอกทิวิตีของเบต้า-กลูโคซิเดส

น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ ) มีค่าเท่ากับ 0.18 มิลลิกรัมต่อไมโครโมล

$$\begin{aligned} \text{จาก 1 ยูนิตของเอนไซม์} &= 1 \text{ ไมโครโมลของซับสเตรทที่ถูกย่อยภายในเวลา 1 นาที} \\ &= 0.18 \text{ มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที} \end{aligned}$$

ในการทดลองเวลาในการทำปฏิกิริยาของซับสเตรทกับเอนไซม์ใช้เวลา 30 นาที ได้ว่า

0.18 มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า 1 ยูนิต

1.00 มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 30 นาที =  $1/(0.18 \times 30)$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ในการทดลองใช้เอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จะได้ว่า มิลลิกรัมของกลูโคส  $\times 0.37$

ค่าที่ได้จะมีหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร

**ภาคผนวก ช**  
**การวิเคราะห์ทางสถิติ**

**ตารางแสดง** ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าอัตราส่วนระหว่างโคโลนีและวงใส ในอาหาร CMC agar ของ T. reesei TISTR 3081 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์ที่กลายด้วยสารเคทิลมีเทนซัลโฟเนต

ANOVA

Ratio

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.060	15	.004	25.408	.000
Within Groups	.005	32	.000		
Total	.065	47			

**ตารางแสดง** ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าอัตราส่วนระหว่างโคโลนีและวงใส ในอาหาร CMC agar ของ EMS11 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ANOVA

Ratio

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.640	59	.011	14.626	.000
Within Groups	.089	120	.001		
Total	.729	179			

**ตารางแสดง** ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าอัตราส่วนระหว่างโคโลนีและวงใส ในอาหาร CMC agar ของ EMS45 ที่เหนียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

## ANOVA

Ratio

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.573	54	.011	30.514	.000
Within Groups	.038	110	.000		
Total	.611	164			

**ตารางแสดง** ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าอัตราส่วนระหว่างโคโลนีและวงใส ในอาหาร CMC agar ของ E45-UV24 ที่ใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์โคโคชิซิน

## ANOVA

Ratio

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.052	52	.020	14.995	.000
Within Groups	.143	106	.001		
Total	1.195	158			

**ตารางแสดง** ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าอัตราส่วนระหว่างโคโลนีและวงใส ในอาหาร CMC agar ของ E45-UV26 ที่ใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์โคลชิซิน

## ANOVA

Ratio

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.366	60	.006	2.427	.000
Within Groups	.307	122	.003		
Total	.673	182			

**ตารางแสดง** ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าอัตราส่วนระหว่างโคโลนีและวงใส ในอาหาร CMC agar ของ E45-UV39 ที่ใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์โคลชิซิน

## ANOVA

Ratio

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.288	70	.004	5.473	.000
Within Groups	.107	142	.001		
Total	.395	212			

ภาคผนวก ซ

ข้อมูล

ตารางแสดง ความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนสของ *T. reesei* TISTR 3081 ที่เหนียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต

ไอโซเลต	ชั่วรุ่นที่ 1			ชั่วรุ่นที่ 5		
	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
EMS9	25.7456 ± 1.293	1.4298 ± 0.004	18.0067 ± 0.904	31.9061 ± 0.363	2.7473 ± 0.027	11.6137 ± 0.117
EMS10	28.2703 ± 0.078	1.5669 ± 0.010	18.0421 ± 0.050	24.7132 ± 0.818	1.8547 ± 0.096	13.3616 ± 1.110
EMS11	28.1765 ± 0.107	1.7432 ± 0.010	16.1635 ± 0.061	30.3498 ± 0.921	2.3741 ± 0.255	12.8662 ± 1.192
EMS12	27.1018 ± 0.039	1.9587 ± 0.020	13.8365 ± 0.020	30.5655 ± 1.368	2.3299 ± 0.355	13.3272 ± 2.137
EMS14	28.6200 ± 0.026	1.8186 ± 0.027	15.7377 ± 0.014	31.6072 ± 1.223	2.6047 ± 0.095	12.1494 ± 0.757
EMS17	24.1592 ± 0.039	1.6347 ± 0.015	14.7788 ± 0.024	30.2111 ± 1.189	2.3596 ± 0.164	12.8373 ± 0.846
EMS28	30.2320 ± 0.026	1.6829 ± 0.032	17.9638 ± 0.015	30.7813 ± 1.552	2.4535 ± 0.146	12.5534 ± 0.372
EMS34	30.3941 ± 0.165	1.9241 ± 0.013	15.7969 ± 0.086	22.6083 ± 1.246	1.7789 ± 0.141	12.7514 ± 1.072
EMS42	23.6559 ± 0.554	1.4358 ± 0.007	16.4757 ± 0.386	32.7998 ± 0.954	2.5921 ± 0.071	12.6557 ± 0.301
EMS45	30.8120 ± 0.341	1.7628 ± 0.030	17.4789 ± 0.193	19.7392 ± 2.698	1.6915 ± 0.223	11.9537 ± 3.308
EMS46	28.9270 ± 0.117	1.7221 ± 0.007	16.7973 ± 0.068	24.3865 ± 2.732	1.8156 ± 0.225	13.4499 ± 0.550
EMS47	25.7200 ± 0.039	1.4584 ± 0.001	17.6357 ± 0.027	21.2369 ± 6.817	1.6804 ± 0.472	12.5316 ± 1.271
EMS48	27.7671 ± 0.256	1.5880 ± 0.008	17.4855 ± 0.161	22.7193 ± 0.547	1.8879 ± 0.079	12.0522 ± 0.698
EMS49	27.0250 ± 0.271	1.5549 ± 0.003	17.3811 ± 0.174	26.9228 ± 0.505	1.9321 ± 0.217	14.0279 ± 1.246
EMS50	22.8968 ± 1.100	1.2685 ± 0.008	18.0498 ± 0.867	20.2939 ± 8.677	1.6312 ± 0.509	12.0986 ± 1.681
WT	18.5640 ± 0.320	1.7432 ± 0.008	10.6492 ± 0.183	18.9102 ± 4.436	1.5564 ± 0.199	12.0518 ± 1.707

ตารางแสดง ความสามารถในการทำงานของเอกโซกลูคาเนสของ *T. reesei* TISTR 3081 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลไฟเนต

ไอโซเลต	ช่วงรุ่นที่ 1			ช่วงรุ่นที่ 5		
	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
EMS9	1.1909 ± 0.009	1.4298 ± 0.004	0.8329 ± 0.006	2.1775 ± 0.088	2.7473 ± 0.027	0.7928 ± 0.039
EMS10	1.3214 ± 0.020	1.5669 ± 0.010	0.8433 ± 0.013	1.5361 ± 0.144	1.8547 ± 0.096	0.8308 ± 0.103
EMS11	1.4443 ± 0.038	1.7432 ± 0.010	0.8285 ± 0.022	2.0343 ± 0.120	2.3741 ± 0.255	0.8606 ± 0.058
EMS12	1.4333 ± 0.047	1.9587 ± 0.020	0.7318 ± 0.024	1.9260 ± 0.231	2.3299 ± 0.355	0.8297 ± 0.032
EMS14	1.5226 ± 0.015	1.8186 ± 0.027	0.8372 ± 0.009	1.9019 ± 0.106	2.6047 ± 0.095	0.7299 ± 0.017
EMS17	1.1971 ± 0.012	1.6347 ± 0.015	0.7323 ± 0.007	1.9411 ± 0.087	2.3596 ± 0.164	0.8243 ± 0.046
EMS28	1.3543 ± 0.021	1.6829 ± 0.032	0.8047 ± 0.012	1.8417 ± 0.156	2.4535 ± 0.146	0.7504 ± 0.041
EMS34	1.4512 ± 0.007	1.9241 ± 0.013	0.7542 ± 0.004	1.3267 ± 0.106	1.7789 ± 0.141	0.7462 ± 0.032
EMS42	1.2342 ± 0.005	1.4358 ± 0.007	0.8596 ± 0.004	2.0427 ± 0.187	2.5921 ± 0.071	0.7878 ± 0.063
EMS45	1.8790 ± 0.015	1.7628 ± 0.030	1.0659 ± 0.009	1.5794 ± 0.082	1.6915 ± 0.223	0.9421 ± 0.100
EMS46	1.8673 ± 0.002	1.7221 ± 0.007	1.0843 ± 0.001	1.4408 ± 0.238	1.8156 ± 0.225	0.7914 ± 0.044
EMS47	1.2671 ± 0.008	1.4584 ± 0.001	0.8688 ± 0.006	1.1570 ± 0.337	1.6804 ± 0.472	0.6895 ± 0.084
EMS48	1.5542 ± 0.088	1.5880 ± 0.008	0.9787 ± 0.055	1.3723 ± 0.104	1.8879 ± 0.079	0.7291 ± 0.084
EMS49	1.5892 ± 0.018	1.5549 ± 0.003	1.0221 ± 0.012	1.5233 ± 0.131	1.9321 ± 0.217	0.7905 ± 0.044
EMS50	1.1765 ± 0.010	1.2685 ± 0.008	0.9274 ± 0.008	1.2363 ± 0.563	1.6312 ± 0.509	0.7345 ± 0.114
WT	0.9368 ± 0.014	1.7432 ± 0.008	0.5374 ± 0.008	1.0115 ± 0.067	1.5564 ± 0.199	0.6536 ± 0.045

ตารางแสดง ความสามารถในการทำงานของเบตา-กลูโคซิเดสของ *T. reesei* TISTR 3081 ที่เหนียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลไฟเนต

ไอโซเลต	ชั่วรุ่นที่ 1			ชั่วรุ่นที่ 5		
	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
EMS9	0.2710 ± 0.005	1.4298 ± 0.004	0.1895 ± 0.003	0.0919 ± 0.003	2.7473 ± 0.027	0.0335 ± 0.001
EMS10	0.2903 ± 0.008	1.5669 ± 0.010	0.1853 ± 0.005	0.1108 ± 0.019	1.8547 ± 0.096	0.0602 ± 0.013
EMS11	0.4184 ± 0.005	1.7432 ± 0.010	0.2400 ± 0.003	0.1162 ± 0.009	2.3741 ± 0.255	0.0493 ± 0.006
EMS12	0.3998 ± 0.004	1.9587 ± 0.020	0.2041 ± 0.002	0.1205 ± 0.017	2.3299 ± 0.355	0.0518 ± 0.001
EMS14	0.3712 ± 0.003	1.8186 ± 0.027	0.2041 ± 0.002	0.0824 ± 0.001	2.6047 ± 0.095	0.0317 ± 0.001
EMS17	0.3258 ± 0.004	1.6347 ± 0.015	0.1993 ± 0.003	0.1081 ± 0.014	2.3596 ± 0.164	0.0462 ± 0.009
EMS28	0.2382 ± 0.002	1.6829 ± 0.032	0.1415 ± 0.001	0.1343 ± 0.061	2.4535 ± 0.146	0.0557 ± 0.028
EMS34	0.3815 ± 0.016	1.9241 ± 0.013	0.1983 ± 0.008	0.1679 ± 0.070	1.7789 ± 0.141	0.0935 ± 0.034
EMS42	0.1838 ± 0.001	1.4358 ± 0.007	0.1280 ± 0.001	0.0879 ± 0.012	2.5921 ± 0.071	0.0339 ± 0.004
EMS45	0.2766 ± 0.001	1.7628 ± 0.030	0.1569 ± 0.001	0.1041 ± 0.017	1.6915 ± 0.223	0.0628 ± 0.016
EMS46	0.2437 ± 0.007	1.7221 ± 0.007	0.1415 ± 0.004	0.1552 ± 0.027	1.8156 ± 0.225	0.0856 ± 0.013
EMS47	0.2214 ± 0.002	1.4584 ± 0.001	0.1518 ± 0.001	0.1104 ± 0.019	1.6804 ± 0.472	0.0686 ± 0.017
EMS48	0.2290 ± 0.001	1.5880 ± 0.008	0.1442 ± 0.001	0.1136 ± 0.020	1.8879 ± 0.079	0.0605 ± 0.012
EMS49	0.2301 ± 0.003	1.5549 ± 0.003	0.1480 ± 0.002	0.1153 ± 0.015	1.9321 ± 0.217	0.0603 ± 0.012
EMS50	0.1274 ± 0.001	1.2685 ± 0.008	0.1004 ± 0.001	0.1449 ± 0.043	1.6312 ± 0.509	0.0941 ± 0.038
WT	0.2157 ± 0.007	1.7432 ± 0.008	0.1237 ± 0.004	0.1269 ± 0.025	1.5564 ± 0.199	0.0811 ± 0.006

ตารางแสดง ความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส ของ EMS 11 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ไอโซเลต	ชั่วรุ่นที่ 1			ชั่วรุ่นที่ 5		
	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
E11-UV1	23.9798 ± 0.073	1.5549 ± 0.018	15.4225 ± 0.047	22.8134 ± 3.819	1.3208 ± 0.228	17.3788 ± 1.954
E11-UV19	27.7647 ± 0.123	1.7749 ± 0.007	15.6433 ± 0.069	10.3656 ± 2.790	0.9837 ± 0.112	10.4152 ± 1.662
E11-UV20	21.9821 ± 0.265	1.5096 ± 0.003	14.5611 ± 0.176	20.8956 ± 5.943	1.2645 ± 0.253	16.3299 ± 1.487
E11-UV27	24.3302 ± 0.929	0.9822 ± 0.007	24.7707 ± 0.946	23.7996 ± 2.334	1.4644 ± 0.101	16.2301 ± 0.540
E11-UV29	21.0943 ± 0.590	1.3876 ± 0.015	15.2022 ± 0.425	17.6435 ± 0.271	1.3248 ± 0.055	13.3355 ± 0.665
E11-UV32	23.9914 ± 0.513	1.5729 ± 0.019	15.2527 ± 0.326	20.2993 ± 4.035	1.3544 ± 0.038	14.9665 ± 2.821
E11-UV42	14.8561 ± 0.161	0.9792 ± 0.007	15.1716 ± 0.164	8.8862 ± 0.358	1.1731 ± 0.247	7.7947 ± 1.568
E11-UV43	13.2673 ± 0.778	1.0304 ± 0.016	12.8754 ± 0.755	17.8336 ± 2.575	1.4810 ± 0.225	12.1416 ± 1.700
E11-UV51	10.6739 ± 0.333	1.1329 ± 0.254	9.4217 ± 0.294	12.6089 ± 2.686	1.2896 ± 0.054	9.8031 ± 2.173
E11-UV52	10.5220 ± 0.214	0.7848 ± 0.012	13.4071 ± 0.273	27.2677 ± 1.508	1.7111 ± 0.058	15.9285 ± 0.336
E11-UV54	10.9893 ± 0.467	0.7999 ± 0.034	13.7387 ± 0.583	6.6880 ± 1.802	0.9551 ± 0.111	6.9278 ± 1.247
E11-UV55	26.7134 ± 0.375	1.6181 ± 0.007	16.5086 ± 0.232	21.1051 ± 3.781	1.3735 ± 0.240	15.3570 ± 0.119
E11-UV56	21.5616 ± 0.272	1.4253 ± 0.027	15.1282 ± 0.191	20.8440 ± 1.186	1.4358 ± 0.036	14.5106 ± 0.514
E11-UV57	12.9636 ± 0.280	0.7471 ± 0.005	17.3510 ± 0.375	4.1127 ± 1.867	1.0008 ± 0.172	4.0095 ± 1.177
E11-UV58	22.1807 ± 0.350	1.3800 ± 0.015	16.0724 ± 0.254	28.5634 ± 2.746	1.8417 ± 0.130	15.4965 ± 0.677
WT	19.9611 ± 0.073	1.6181 ± 0.016	12.3358 ± 0.045	16.9505 ± 2.880	1.3263 ± 0.091	12.7490 ± 1.593
EMS11	21.3163 ± 0.268	1.6362 ± 0.055	13.0517 ± 0.164	20.9375 ± 0.968	1.5197 ± 0.149	13.8334 ± 0.972



ตารางแสดง ความสามารถในการทำงานของเอกซิกลูคาเนส ของ EMS 11 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ไอโซเลต	ชั่วรุ่นที่ 1			ชั่วรุ่นที่ 5		
	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
E11-UV1	1.2466 ± 0.044	1.5549 ± 0.018	0.8017 ± 0.028	1.1409 ± 0.050	1.3208 ± 0.228	0.8882 ± 0.212
E11-UV19	1.3134 ± 0.056	1.7749 ± 0.007	0.7400 ± 0.032	0.3238 ± 0.070	0.9837 ± 0.112	0.3271 ± 0.036
E11-UV20	1.8271 ± 0.071	1.5096 ± 0.003	1.2103 ± 0.047	0.8643 ± 0.229	1.2645 ± 0.253	0.6773 ± 0.048
E11-UV27	1.3225 ± 0.013	0.9822 ± 0.007	1.3465 ± 0.013	1.0641 ± 0.197	1.4644 ± 0.101	0.7227 ± 0.086
E11-UV29	1.3598 ± 0.003	1.3876 ± 0.015	0.9800 ± 0.002	0.8743 ± 0.049	1.3248 ± 0.055	0.6604 ± 0.040
E11-UV32	1.6333 ± 0.041	1.5729 ± 0.019	1.0384 ± 0.026	1.2172 ± 0.178	1.3544 ± 0.038	0.8974 ± 0.117
E11-UV42	0.9411 ± 0.030	0.9792 ± 0.007	0.9611 ± 0.031	0.3737 ± 0.054	1.1731 ± 0.247	0.3244 ± 0.054
E11-UV43	0.5179 ± 0.011	1.0304 ± 0.016	0.5026 ± 0.011	1.0873 ± 0.242	1.4810 ± 0.225	0.7285 ± 0.060
E11-UV51	0.3462 ± 0.006	1.1329 ± 0.254	0.3056 ± 0.005	0.2247 ± 0.003	1.2896 ± 0.054	0.1744 ± 0.005
E11-UV52	0.6661 ± 0.037	0.7848 ± 0.012	0.8487 ± 0.047	1.3693 ± 0.076	1.7111 ± 0.058	0.8000 ± 0.026
E11-UV54	0.7557 ± 0.030	0.7999 ± 0.034	0.9448 ± 0.037	0.3415 ± 0.081	0.9551 ± 0.111	0.3546 ± 0.053
E11-UV55	1.7176 ± 0.024	1.6181 ± 0.007	1.0615 ± 0.015	1.0168 ± 0.296	1.3735 ± 0.240	0.7299 ± 0.096
E11-UV56	1.2815 ± 0.006	1.4253 ± 0.027	0.8991 ± 0.004	1.2020 ± 0.102	1.4358 ± 0.036	0.8371 ± 0.066
E11-UV57	0.7170 ± 0.023	0.7471 ± 0.005	0.9596 ± 0.031	0.7941 ± 0.150	1.0008 ± 0.172	0.8041 ± 0.173
E11-UV58	1.2070 ± 0.023	1.3800 ± 0.015	0.8746 ± 0.017	0.9096 ± 0.009	1.8417 ± 0.130	0.4954 ± 0.031
WT	1.4943 ± 0.129	1.6181 ± 0.016	0.9234 ± 0.080	1.0645 ± 0.179	1.3263 ± 0.091	0.8046 ± 0.138
EMS11	1.4669 ± 0.065	1.6362 ± 0.055	0.8965 ± 0.040	0.8637 ± 0.091	1.5197 ± 0.149	0.5694 ± 0.050

ตารางแสดง ความสามารถในการทำงานของเบตา-กลูโคซิเดส ของ EMS 11 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ไอโซเลต	ชั่วรุ่นที่ 1			ชั่วรุ่นที่ 5		
	ค่าแอกทिवิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทिवิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ค่าแอกทिवิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทिवิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
E11-UV1	0.1029 ± 0.002	1.5549 ± 0.018	0.0662 ± 0.001	0.0780 ± 0.005	1.3208 ± 0.228	0.0608 ± 0.016
E11-UV19	0.1272 ± 0.003	1.7749 ± 0.007	0.0717 ± 0.002	0.0809 ± 0.010	0.9837 ± 0.112	0.0828 ± 0.012
E11-UV20	0.1093 ± 0.001	1.5096 ± 0.003	0.0724 ± 0.001	0.0787 ± 0.006	1.2645 ± 0.253	0.0634 ± 0.009
E11-UV27	0.1300 ± 0.001	0.9822 ± 0.007	0.1324 ± 0.001	0.0739 ± 0.003	1.4644 ± 0.101	0.0507 ± 0.005
E11-UV29	0.0958 ± 0.001	1.3876 ± 0.015	0.0690 ± 0.001	0.0719 ± 0.001	1.3248 ± 0.055	0.0544 ± 0.002
E11-UV32	0.1049 ± 0.001	1.5729 ± 0.019	0.0667 ± 0.001	0.0749 ± 0.006	1.3544 ± 0.038	0.0554 ± 0.006
E11-UV42	0.1421 ± 0.003	0.9792 ± 0.007	0.1451 ± 0.003	0.0802 ± 0.001	1.1731 ± 0.247	0.0704 ± 0.014
E11-UV43	0.0965 ± 0.004	1.0304 ± 0.016	0.0937 ± 0.004	0.0850 ± 0.002	1.4810 ± 0.225	0.0585 ± 0.011
E11-UV51	0.2757 ± 0.002	1.1329 ± 0.254	0.2434 ± 0.002	0.0648 ± 0.001	1.2896 ± 0.054	0.0503 ± 0.002
E11-UV52	0.0919 ± 0.002	0.7848 ± 0.012	0.1171 ± 0.003	0.0705 ± 0.002	1.7111 ± 0.058	0.0412 ± 0.001
E11-UV54	0.1014 ± 0.003	0.7999 ± 0.034	0.1268 ± 0.003	0.0845 ± 0.010	0.9551 ± 0.111	0.0890 ± 0.011
E11-UV55	0.1504 ± 0.005	1.6181 ± 0.007	0.0930 ± 0.003	0.0807 ± 0.002	1.3735 ± 0.240	0.0600 ± 0.011
E11-UV56	0.1353 ± 0.007	1.4253 ± 0.027	0.0949 ± 0.005	0.0959 ± 0.006	1.4358 ± 0.036	0.0668 ± 0.002
E11-UV57	0.0925 ± 0.004	0.7471 ± 0.005	0.1238 ± 0.006	0.0916 ± 0.007	1.0008 ± 0.172	0.0940 ± 0.022
E11-UV58	0.0846 ± 0.004	1.3800 ± 0.015	0.0613 ± 0.001	0.0816 ± 0.003	1.8417 ± 0.130	0.0445 ± 0.004
WT	0.1111 ± 0.002	1.6181 ± 0.016	0.0687 ± 0.001	0.0760 ± 0.003	1.3263 ± 0.091	0.0575 ± 0.003
EMS11	0.1236 ± 0.003	1.6362 ± 0.055	0.1096 ± 0.003	0.0844 ± 0.004	1.5197 ± 0.149	0.0558 ± 0.004

ตารางแสดง ความสามารถในการทำงานของเอนโดกดูคาเนส ของ EMS 45 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ไอโซเลต	ชั่วรุ่นที่ 1			ชั่วรุ่นที่ 5		
	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
E45-UV8	21.8597 ± 0.157	1.2580 ± 0.039	17.3767 ± 0.125	19.2550 ± 1.093	1.8778 ± 0.119	10.2566 ± 0.066
E45-UV12	29.7152 ± 0.259	1.3620 ± 0.018	21.8179 ± 0.190	23.5225 ± 1.532	2.2566 ± 0.089	10.4323 ± 0.729
E45-UV24	12.7957 ± 0.581	0.7803 ± 0.006	16.3986 ± 0.745	10.0852 ± 1.599	0.7070 ± 0.135	14.3330 ± 0.811
E45-UV25	22.9314 ± 0.169	1.1615 ± 0.008	19.7422 ± 0.145	19.6128 ± 0.604	1.8773 ± 0.085	10.4685 ± 0.745
E45-UV26	32.2348 ± 0.366	1.6438 ± 0.005	19.6104 ± 0.222	13.3341 ± 3.007	0.8893 ± 0.065	14.9766 ± 2.967
E45-UV27	23.7409 ± 0.437	1.0440 ± 0.007	22.7403 ± 0.418	12.8700 ± 1.384	1.1877 ± 0.080	10.8345 ± 0.834
E45-UV29	16.0564 ± 0.455	0.9717 ± 0.005	16.5246 ± 0.469	15.2744 ± 3.354	1.5749 ± 0.441	9.8293 ± 0.709
E45-UV30	22.1219 ± 0.526	1.2746 ± 0.003	17.3565 ± 0.413	19.6321 ± 1.409	1.3007 ± 0.051	15.1100 ± 1.224
E45-UV31	28.4268 ± 0.258	1.4765 ± 0.018	19.2529 ± 0.175	23.4967 ± 1.914	2.0582 ± 0.016	11.4176 ± 0.947
E45-UV32	22.9656 ± 0.209	1.1646 ± 0.014	19.7205 ± 0.179	12.5767 ± 1.207	1.8593 ± 0.101	6.7674 ± 0.597
E45-UV35	28.7688 ± 0.247	1.4961 ± 0.021	19.2295 ± 0.165	22.8327 ± 0.812	2.0883 ± 0.124	10.9728 ± 1.020
E45-UV36	27.5603 ± 0.142	1.3816 ± 0.009	19.9488 ± 0.103	23.7191 ± 1.476	2.1521 ± 0.156	11.0458 ± 0.808
E45-UV37	25.9185 ± 0.154	1.4117 ± 0.014	18.3599 ± 0.109	18.6039 ± 3.004	1.8653 ± 0.330	9.9958 ± 0.250
E45-UV39	23.8549 ± 0.071	1.1224 ± 0.006	21.2542 ± 0.063	19.0906 ± 3.098	1.2610 ± 0.208	15.1447 ± 0.266
E45-UV48	20.7766 ± 0.172	0.8933 ± 0.001	23.2580 ± 0.193	14.9715 ± 1.229	1.3886 ± 0.223	10.9165 ± 1.390
WT	17.0027 ± 0.427	1.6031 ± 0.006	10.6063 ± 0.266	20.6796 ± 0.862	1.9577 ± 0.217	10.6205 ± 0.777
EMS45	22.1561 ± 0.274	1.3333 ± 0.003	16.6171 ± 0.206	24.2541 ± 2.008	1.6598 ± 0.045	14.6031 ± 0.948

ตารางแสดง ความสามารถในการทำงานของเอกซิกลูแคนเนส ของ EMS 45 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ไอโซเลต	ชั่วรุ่นที่ 1			ชั่วรุ่นที่ 5		
	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
E45-UV8	1.2033 ± 0.042	1.2580 ± 0.039	0.9565 ± 0.033	1.0609 ± 0.089	1.8778 ± 0.119	0.5648 ± 0.025
E45-UV12	1.6819 ± 0.013	1.3620 ± 0.018	1.2349 ± 0.009	1.5132 ± 0.079	2.2566 ± 0.089	0.6706 ± 0.024
E45-UV24	0.4259 ± 0.009	0.7803 ± 0.006	0.5458 ± 0.012	0.5369 ± 0.016	0.7070 ± 0.135	0.7747 ± 0.121
E45-UV25	1.1181 ± 0.017	1.1615 ± 0.008	0.9626 ± 0.014	1.1174 ± 0.060	1.8773 ± 0.085	0.5962 ± 0.045
E45-UV26	1.8481 ± 0.044	1.6438 ± 0.005	1.1243 ± 0.027	0.6926 ± 0.087	0.8893 ± 0.065	0.7777 ± 0.056
E45-UV27	1.2994 ± 0.020	1.0440 ± 0.007	1.2446 ± 0.019	0.5523 ± 0.072	1.1877 ± 0.080	0.4638 ± 0.035
E45-UV29	0.8750 ± 0.017	0.9717 ± 0.005	0.9005 ± 0.017	1.0103 ± 0.157	1.5749 ± 0.441	0.6695 ± 0.172
E45-UV30	1.5253 ± 0.010	1.2746 ± 0.003	1.1967 ± 0.008	0.8221 ± 0.129	1.3007 ± 0.051	0.6323 ± 0.097
E45-UV31	1.7197 ± 0.015	1.4765 ± 0.018	1.1647 ± 0.010	1.3749 ± 0.162	2.0582 ± 0.016	0.6683 ± 0.082
E45-UV32	1.1627 ± 0.045	1.1646 ± 0.014	0.9984 ± 0.039	0.9343 ± 0.213	1.8593 ± 0.101	0.4999 ± 0.089
E45-UV35	1.9531 ± 0.020	1.4961 ± 0.021	1.3055 ± 0.013	1.4074 ± 0.102	2.0883 ± 0.124	0.6742 ± 0.036
E45-UV36	1.6029 ± 0.026	1.3816 ± 0.009	1.1602 ± 0.019	1.4324 ± 0.113	2.1521 ± 0.156	0.6654 ± 0.006
E45-UV37	1.1463 ± 0.011	1.4117 ± 0.014	0.8120 ± 0.008	1.2026 ± 0.370	1.8653 ± 0.330	0.6358 ± 0.121
E45-UV39	1.2479 ± 0.028	1.1224 ± 0.006	1.1118 ± 0.025	0.4234 ± 0.014	1.2610 ± 0.208	0.3438 ± 0.073
E45-UV48	0.9691 ± 0.007	0.8933 ± 0.001	1.0848 ± 0.008	0.9164 ± 0.249	1.3886 ± 0.223	0.6928 ± 0.312
WT	0.8276 ± 0.023	1.6031 ± 0.006	0.5163 ± 0.014	0.8931 ± 0.038	1.9577 ± 0.217	0.4607 ± 0.065
EMS45	0.7899 ± 0.041	1.3333 ± 0.003	0.5924 ± 0.031	1.0854 ± 0.026	1.6598 ± 0.045	0.6544 ± 0.031

ตารางแสดง ความสามารถในการทำงานของเบตา-กลูโคซิเดส ของ EMS 45 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ไอโซเลต	ชั่วรุ่นที่ 1			ชั่วรุ่นที่ 5		
	ค่าแอกทिवิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทिवิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ค่าแอกทिवิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทिवิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
E45-UV8	0.2885 ± 0.009	1.2580 ± 0.039	0.2294 ± 0.007	0.0830 ± 0.006	1.8778 ± 0.119	0.0443 ± 0.004
E45-UV12	0.2622 ± 0.002	1.3620 ± 0.018	0.1925 ± 0.002	0.1250 ± 0.007	2.2566 ± 0.089	0.0554 ± 0.002
E45-UV24	0.1783 ± 0.004	0.7803 ± 0.006	0.2285 ± 0.005	0.1075 ± 0.014	0.7070 ± 0.135	0.1568 ± 0.043
E45-UV25	0.2237 ± 0.016	1.1615 ± 0.008	0.1926 ± 0.014	0.1059 ± 0.015	1.8773 ± 0.085	0.0567 ± 0.010
E45-UV26	0.2263 ± 0.005	1.6438 ± 0.005	0.1377 ± 0.003	0.1173 ± 0.036	0.8893 ± 0.065	0.1321 ± 0.039
E45-UV27	0.1728 ± 0.002	1.0440 ± 0.007	0.1655 ± 0.002	0.0883 ± 0.009	1.1877 ± 0.080	0.0742 ± 0.003
E45-UV29	0.2702 ± 0.004	0.9717 ± 0.005	0.2781 ± 0.004	0.1440 ± 0.012	1.5749 ± 0.441	0.0957 ± 0.023
E45-UV30	0.2939 ± 0.004	1.2746 ± 0.003	0.2306 ± 0.003	0.1329 ± 0.022	1.3007 ± 0.051	0.1022 ± 0.016
E45-UV31	0.2465 ± 0.003	1.4765 ± 0.018	0.1670 ± 0.002	0.0948 ± 0.014	2.0582 ± 0.016	0.0461 ± 0.007
E45-UV32	0.2522 ± 0.006	1.1646 ± 0.014	0.2166 ± 0.005	0.0944 ± 0.008	1.8593 ± 0.101	0.0507 ± 0.003
E45-UV35	0.2385 ± 0.004	1.4961 ± 0.021	0.1594 ± 0.002	0.1173 ± 0.026	2.0883 ± 0.124	0.0563 ± 0.013
E45-UV36	0.2958 ± 0.007	1.3816 ± 0.009	0.2141 ± 0.005	0.1276 ± 0.007	2.1521 ± 0.156	0.0595 ± 0.005
E45-UV37	0.3298 ± 0.005	1.4117 ± 0.014	0.2336 ± 0.003	0.1312 ± 0.019	1.8653 ± 0.330	0.0717 ± 0.014
E45-UV39	0.1890 ± 0.002	1.1224 ± 0.006	0.1684 ± 0.002	0.0954 ± 0.051	1.2610 ± 0.208	0.0761 ± 0.037
E45-UV48	0.2631 ± 0.004	0.8933 ± 0.001	0.2945 ± 0.005	0.1162 ± 0.002	1.3886 ± 0.223	0.0851 ± 0.013
WT	0.1931 ± 0.002	1.6031 ± 0.006	0.1204 ± 0.002	0.0986 ± 0.037	1.9577 ± 0.217	0.0522 ± 0.026
EMS45	0.2340 ± 0.002	1.3333 ± 0.003	0.1755 ± 0.002	0.0889 ± 0.009	1.6598 ± 0.045	0.0536 ± 0.006

ตารางแสดง ความสามารถในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส ที่เชื้อที่ใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โคลิซึน

ไอโซเลต	หัวรุ่นที่ 1			หัวรุ่นที่ 5		
	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
EV24-C31	39.0468 ± 0.518	1.8940 ± 0.111	20.6684 ± 1.349	26.1541 ± 3.047	2.1442 ± 0.365	12.3677 ± 1.890
EV24-C33	31.6327 ± 4.598	1.5148 ± 0.091	20.8471 ± 2.347	26.8559 ± 1.146	1.9721 ± 0.133	13.6350 ± 0.435
EV24-C37	37.8684 ± 1.518	1.9252 ± 0.076	19.6714 ± 0.341	28.1597 ± 0.584	1.7420 ± 0.310	16.4688 ± 2.574
EV24-C46	35.1317 ± 0.468	1.3821 ± 0.318	26.2369 ± 5.375	29.0897 ± 1.463	1.6896 ± 0.090	17.2412 ± 1.066
EV24-C50	33.5390 ± 2.621	1.5191 ± 0.201	22.4714 ± 4.473	24.0335 ± 4.609	1.6942 ± 0.043	14.2379 ± 3.117
EV24-C51	29.7147 ± 6.618	1.7143 ± 0.114	17.2176 ± 2.623	26.9491 ± 3.152	1.6106 ± 0.169	16.7196 ± 0.226
EV26-C9	46.3024 ± 1.952	1.7638 ± 0.146	26.4182 ± 3.094	27.1083 ± 2.962	1.5956 ± 0.286	17.2759 ± 2.898
EV26-C21	18.2194 ± 3.971	0.9744 ± 0.153	18.5739 ± 1.179	26.7195 ± 2.456	1.5715 ± 0.130	17.0570 ± 1.733
EV26-C37	25.0785 ± 5.309	1.1827 ± 0.298	21.5755 ± 3.281	30.5797 ± 1.628	1.7225 ± 0.190	17.8845 ± 1.983
EV26-C41	25.0288 ± 4.681	1.0869 ± 0.132	22.9617 ± 2.693	26.5178 ± 3.102	1.7276 ± 0.196	15.3524 ± 0.559
EV26-C52	29.8636 ± 0.768	1.2906 ± 0.159	23.3506 ± 2.635	23.3947 ± 3.621	1.4631 ± 0.227	15.9994 ± 0.486
EV39-C11	31.0649 ± 2.439	1.9222 ± 0.235	16.2482 ± 1.335	28.1549 ± 1.230	1.6094 ± 0.147	17.5779 ± 1.590
EV39-C43	28.0477 ± 0.946	1.8189 ± 0.211	15.5860 ± 2.216	28.3879 ± 3.260	1.6446 ± 0.206	17.2777 ± 0.296
EV39-C53	27.4484 ± 1.874	1.9540 ± 0.070	14.0386 ± 0.540	30.0502 ± 1.848	1.7005 ± 0.314	17.9521 ± 2.388
EV39-C63	29.8154 ± 2.416	1.9463 ± 0.188	15.3574 ± 0.989	29.6285 ± 2.306	1.8816 ± 0.278	15.8651 ± 1.315
EV39-C69	29.5592 ± 2.508	1.7950 ± 0.275	16.5928 ± 1.242	33.9778 ± 2.658	1.4215 ± 0.071	23.9380 ± 2.138
WT	16.2013 ± 3.851	1.5862 ± 0.271	13.4874 ± 1.106	13.9339 ± 2.598	1.2583 ± 0.160	11.0739 ± 1.615
E45-UV24	12.0342 ± 0.747	1.2670 ± 0.094	9.5363 ± 0.991	12.6207 ± 2.295	1.1352 ± 0.274	11.2333 ± 0.911
E45-UV26	11.8147 ± 2.439	0.9880 ± 0.145	11.8879 ± 0.768	13.8105 ± 1.063	1.1705 ± 0.222	12.0796 ± 2.363
E45-UV39	19.7661 ± 0.608	1.1367 ± 0.109	17.4981 ± 1.808	14.7619 ± 2.144	0.9769 ± 0.315	15.7515 ± 3.495

ตารางแสดง ความสามารถในการทำงานของเอกซิกลูกูคานเนส ที่เชื้อที่ใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โคคซิซิน

ไอโซเลต	ชั่วรุ่นที่ 1			ชั่วรุ่นที่ 5		
	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
EV24-C31	2.4480 ± 0.267	1.8940 ± 0.111	1.2908 ± 0.091	1.9173 ± 0.349	2.1442 ± 0.365	0.8929 ± 0.012
EV24-C33	1.8670 ± 0.178	1.5148 ± 0.091	1.2320 ± 0.083	1.6395 ± 0.056	1.9721 ± 0.133	0.8335 ± 0.055
EV24-C37	2.4273 ± 0.283	1.9252 ± 0.076	1.2585 ± 0.105	1.9707 ± 0.291	1.7420 ± 0.310	1.1543 ± 0.273
EV24-C46	1.9843 ± 0.483	1.3821 ± 0.318	1.4348 ± 0.094	2.0028 ± 0.234	1.6896 ± 0.090	1.1876 ± 0.148
EV24-C50	2.0292 ± 0.350	1.5191 ± 0.201	1.3621 ± 0.344	1.5744 ± 0.084	1.6942 ± 0.043	0.9288 ± 0.026
EV24-C51	2.5107 ± 0.392	1.7143 ± 0.114	1.4605 ± 0.158	1.7278 ± 0.127	1.6106 ± 0.169	1.0782 ± 0.106
EV26-C9	1.8645 ± 0.536	1.7638 ± 0.146	1.0758 ± 0.393	1.6937 ± 0.324	1.5956 ± 0.286	1.0696 ± 0.158
EV26-C21	1.3752 ± 0.042	0.9744 ± 0.153	1.4308 ± 0.186	1.7527 ± 0.204	1.5715 ± 0.130	1.1174 ± 0.117
EV26-C37	1.6059 ± 0.186	1.1827 ± 0.298	1.4109 ± 0.344	2.0369 ± 0.197	1.7225 ± 0.190	1.1851 ± 0.078
EV26-C41	1.6356 ± 0.412	1.0869 ± 0.132	1.4896 ± 0.236	1.9646 ± 0.194	1.7276 ± 0.196	1.1387 ± 0.029
EV26-C52	1.9043 ± 0.220	1.2906 ± 0.159	1.5029 ± 0.334	1.5447 ± 0.327	1.4631 ± 0.227	1.0498 ± 0.071
EV39-C11	1.8464 ± 0.369	1.9222 ± 0.235	0.9568 ± 0.101	2.0065 ± 0.129	1.6094 ± 0.147	1.2538 ± 0.145
EV39-C43	2.2835 ± 0.080	1.8189 ± 0.211	1.2708 ± 0.199	1.8825 ± 0.270	1.6446 ± 0.206	1.1474 ± 0.115
EV39-C53	2.2167 ± 0.227	1.9540 ± 0.070	1.1382 ± 0.159	2.0185 ± 0.143	1.7005 ± 0.314	1.2092 ± 0.192
EV39-C63	2.4224 ± 0.251	1.9463 ± 0.188	1.2507 ± 0.150	1.8670 ± 0.272	1.8816 ± 0.278	0.9924 ± 0.016
EV39-C69	2.3401 ± 0.272	1.7950 ± 0.275	1.3204 ± 0.219	1.4153 ± 0.272	1.4215 ± 0.071	0.9911 ± 0.141
WT	1.0846 ± 0.172	1.5862 ± 0.271	0.6846 ± 0.011	0.9087 ± 0.067	1.2583 ± 0.160	0.7325 ± 0.126
E45-UV24	0.7864 ± 0.199	1.2670 ± 0.094	0.6298 ± 0.202	0.9807 ± 0.039	1.1352 ± 0.274	0.8998 ± 0.223
E45-UV26	1.3260 ± 0.186	0.9880 ± 0.145	1.3622 ± 0.269	1.3443 ± 0.346	1.1705 ± 0.222	1.1372 ± 0.092
E45-UV39	1.1545 ± 0.050	1.1367 ± 0.109	1.0239 ± 0.135	1.0070 ± 0.193	0.9769 ± 0.315	1.0630 ± 0.202

ตารางแสดง ความสามารถในการทำงานของเบตา-กลูโคซิเดส ที่เชื้อที่ใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โคลิชีซีน

ไอโซเลต	หัวรุ่นที่ 1			หัวรุ่นที่ 5		
	ค่าแอกทีวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทีวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ค่าแอกทีวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทีวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
EV24-C31	0.2156 ± 0.012	1.8940 ± 0.111	0.1140 ± 0.008	0.1367 ± 0.025	2.1442 ± 0.365	0.0657 ± 0.019
EV24-C33	0.2533 ± 0.013	1.5148 ± 0.091	0.1673 ± 0.004	0.1592 ± 0.042	1.9721 ± 0.133	0.0800 ± 0.017
EV24-C37	0.1937 ± 0.032	1.9252 ± 0.076	0.1003 ± 0.012	0.1809 ± 0.030	1.7420 ± 0.310	0.1076 ± 0.032
EV24-C46	0.1249 ± 0.017	1.3821 ± 0.318	0.0937 ± 0.026	0.2004 ± 0.015	1.6896 ± 0.090	0.1191 ± 0.014
EV24-C50	0.1134 ± 0.004	1.5191 ± 0.201	0.0757 ± 0.012	0.1322 ± 0.028	1.6942 ± 0.043	0.0779 ± 0.015
EV24-C51	0.1166 ± 0.009	1.7143 ± 0.114	0.0680 ± 0.001	0.1664 ± 0.010	1.6106 ± 0.169	0.1042 ± 0.015
EV26-C9	0.1476 ± 0.038	1.7638 ± 0.146	0.0851 ± 0.029	0.1250 ± 0.004	1.5956 ± 0.286	0.0801 ± 0.015
EV26-C21	0.1686 ± 0.012	0.9744 ± 0.153	0.1767 ± 0.037	0.2079 ± 0.031	1.5715 ± 0.130	0.1321 ± 0.014
EV26-C37	0.1569 ± 0.019	1.1827 ± 0.298	0.1379 ± 0.033	0.1172 ± 0.006	1.7225 ± 0.190	0.0685 ± 0.008
EV26-C41	0.2648 ± 0.041	1.0869 ± 0.132	0.2436 ± 0.023	0.1775 ± 0.032	1.7276 ± 0.196	0.1052 ± 0.032
EV26-C52	0.1508 ± 0.006	1.2906 ± 0.159	0.1177 ± 0.011	0.2072 ± 0.029	1.4631 ± 0.227	0.1436 ± 0.027
EV39-C11	0.1476 ± 0.010	1.9222 ± 0.235	0.0774 ± 0.009	0.1701 ± 0.003	1.6094 ± 0.147	0.1063 ± 0.011
EV39-C43	0.1150 ± 0.012	1.8189 ± 0.211	0.0639 ± 0.011	0.1981 ± 0.020	1.6446 ± 0.206	0.1225 ± 0.026
EV39-C53	0.1611 ± 0.003	1.9540 ± 0.070	0.0825 ± 0.002	0.1434 ± 0.024	1.7005 ± 0.314	0.0866 ± 0.022
EV39-C63	0.1117 ± 0.014	1.9463 ± 0.188	0.0573 ± 0.002	0.1923 ± 0.040	1.8816 ± 0.278	0.1029 ± 0.022
EV39-C69	0.1172 ± 0.013	1.7950 ± 0.275	0.0656 ± 0.003	0.1916 ± 0.007	1.4215 ± 0.071	0.1349 ± 0.007
WT	0.1890 ± 0.016	1.5862 ± 0.271	0.1609 ± 0.026	0.1659 ± 0.014	1.2583 ± 0.160	0.1342 ± 0.027
E45-UV24	0.1216 ± 0.010	1.2670 ± 0.094	0.0959 ± 0.003	0.0947 ± 0.003	1.1352 ± 0.274	0.0861 ± 0.017
E45-UV26	0.1329 ± 0.014	0.9880 ± 0.145	0.1377 ± 0.034	0.1164 ± 0.005	1.1705 ± 0.222	0.1026 ± 0.025
E45-UV39	0.1303 ± 0.005	1.1367 ± 0.109	0.1151 ± 0.008	0.1200 ± 0.004	0.9769 ± 0.315	0.1301 ± 0.034



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวมหัทธนี ภิญโญ เกิดเมื่อวันที่ 1 พฤศจิกายน พ.ศ.2526 ที่อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง จากคณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อปี พ.ศ. 2548 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549 ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและเทคโนโลยี บริษัท ปตท. จำกัด โดยมีการทำรายงานความก้าวหน้าเสนอ ปตท. ไปแล้วจำนวน 3 ครั้ง โดยงานวิจัยชิ้นนี้ได้มีการนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยายในหัวข้อเรื่อง การเพิ่มเซลลูเลสแอกทิวิตีของ *Trichoderma reesei* TISTR 3081 โดยการกลายพันธุ์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต และรังสีอัลตราไวโอเล็ต ในงานนเรศวรวิจัยครั้งที่ 4 : การบริหารนวัตกรรม ประจำปี 2551 ระหว่างวันที่ 28-29 กรกฎาคม 2551 โดยได้ตีพิมพ์ในรายงานการประชุมฉบับสมบูรณ์ และการนำเสนอแบบโปสเตอร์ในหัวข้อเรื่อง Double mutagenesis by EMS and UV irradiation of *Trichoderma reesei* TISTR 3081 to enhance cellulose activity ในงาน 13<sup>th</sup> Biological Sciences Graduate Congress ระหว่างวันที่ 15-17 ธันวาคม 2551 ณ National University of Singapore ประเทศสิงคโปร์ และงานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการยื่นจดสิทธิบัตรกระบวนการเหนี่ยวนำด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตและรังสีอัลตราไวโอเล็ตให้เกิดเชื้อราไตรโคอร์เดอร์มาเรซีไอพันธุ้กลาย (เลขที่ยื่นคำขอ 0901000962 วันที่ 5 มีนาคม 2552)