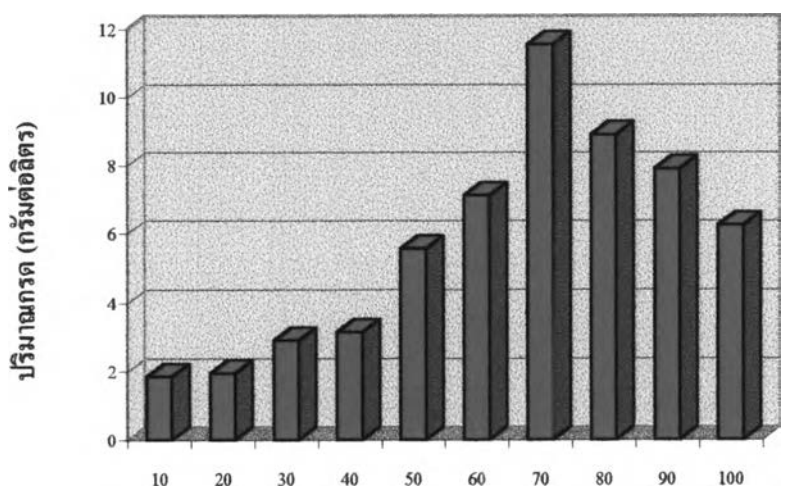
บทที่ 3

ผลการวิจัย

1 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตกรด

เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด จึงทำการทดลองโดยนำสปอร์แขวนลอยของ *A. niger* WU-2223L จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรที่เตรียมได้ตามวิธีการทดลองในข้อ 3 มาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตกรดในอาหารสูตร SL (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) โดยแปรผันความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังแตกต่างกันตั้งแต่ 10 ถึง 90 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองในข้อ 4 นาน 8 วัน นำน้ำหมักที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรด โดยการไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล ตามวิธีการทดลองในข้อ 6 ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 17

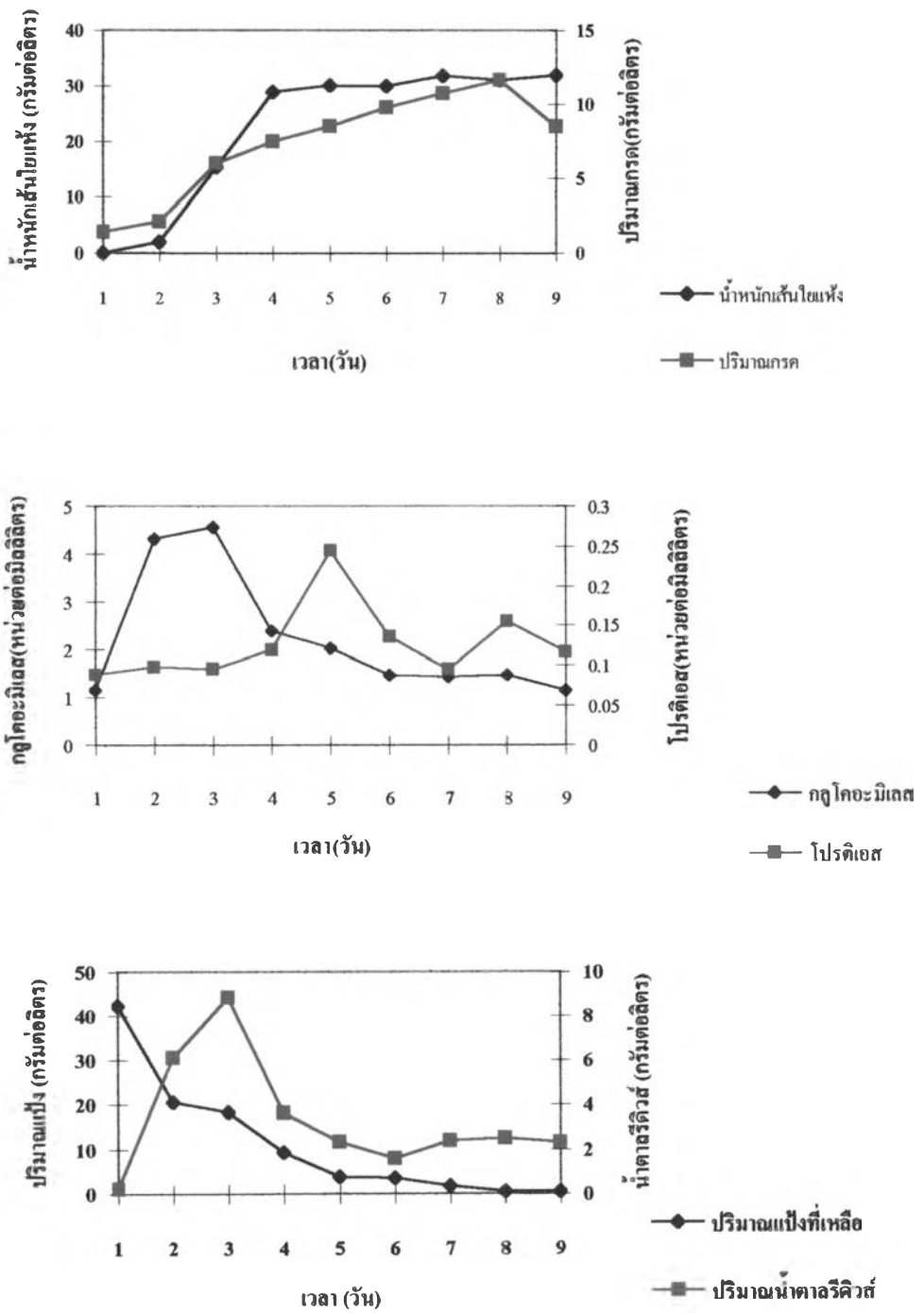


รูปที่ 17 ปริมาณกรดที่ผลิตโดย *A. niger* WU-2223L เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดต่างๆกัน โดยเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

จากรูปที่17 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังสูงขึ้น *A. niger* WU-2223L จะสามารถผลิตกรดได้สูงขึ้นด้วย โดยจะผลิตกรดได้สูงสุดเป็น 11.50 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังสูงกว่า 70 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดจะลดลง อาจเนื่องมาจากอาหารมีลักษณะหนืดมาก ทำให้มีการถ่ายเทอากาศไม่ดี จึงเป็นสาเหตุทำให้เชื้อผลิตกรดลดลง ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อมาจึงเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เชื้อ *A. niger* WU-2223L สามารถนำไปผลิตกรดได้สูงสุดในการทดลองขั้นต่อไป

2 ผลการติดตามคุณสมบัติเบื้องต้นของ *A. niger* WU-2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลองในข้อ 1 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 70 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน *A. niger* WU-2223L จะสามารถผลิตกรดได้สูงสุด ดังนั้นจึงเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นดังกล่าว ติดตามคุณสมบัติเบื้องต้นโดย ตรวจสอบการเจริญโดยวิธีการหาน้ำหนักเส้นใยแห้งตามวิธีการทดลองข้อ 5 ความสามารถในการผลิตกรดตามวิธีการทดลองข้อ 6 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีการทดลองข้อ 8 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ตามวิธีการทดลองข้อ 9.1 ปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีการทดลองข้อ 11 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18 แสดงคุณสมบัติเบื้องต้นของ *A. niger* WU-2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลองใน รูปที่ 18 พบว่า *A. niger* WU-2223L จะค่อยๆผลิตกรดสูงขึ้นจนกระทั่งผลิตได้สูงสุดในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อคือ ผลิตได้ 11.50 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นการผลิตกรดจะลดลงในวันที่ 9 ดังนั้นจึงใช้ระยะเวลาในการหมักนาน 8 วัน ตลอดงานวิจัยจากการติดตามความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสพบว่าเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ เป็น 4.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจะสูงสุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเลี้ยงเชื้อ เป็น 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่าในวันที่ 5 ของการหมักแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสจะลดลงซึ่งอาจเนื่องมาจากผลของเอนไซม์โปรติเอสที่ไปย่อยเอนไซม์ดังกล่าว ทำให้ตรวจพบแอคติวิตีได้ต่ำลง และจากการติดตามปริมาณปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าปริมาณแป้งจะค่อยๆลดลงจนกระทั่งวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อจะตรวจพบปริมาณแป้งน้อยมากทั้งนี้เนื่องจากเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้ และเอนไซม์ดังกล่าวจะย่อยแป้งจึงทำให้ช่วงหลังของการเลี้ยงเชื้อ ตรวจพบปริมาณแป้งในน้ำหมักได้ลดลง และจากการตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะพบว่าช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะต่ำและจะสูงขึ้นโดยจะสอดคล้องกับแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส จากนั้นจะสามารถตรวจพบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ลดลงในช่วงหลังซึ่งเกิดจากการที่เชื้อนำไปใช้ จากผลการทดลอง พบว่า *A. niger* WU-2223L จะผลิตทั้งเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งจากงานวิจัยที่ของ Hayashida และ Flor (1981) และงานวิจัยของ Fukuda และคณะ (1992) พบว่า *A. niger* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้งลดลง

3 ผลของการเติมสารที่มีผลกระทบต่อเอนไซม์โปรติเอส

จากผลการทดลองในข้อ 2 พบว่า *A. niger* WU-2223L สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองเติม เพ็บสแตติน ซึ่งเป็นสารที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสเพื่อดูผลของสารนี้ต่อเอนไซม์ดังกล่าว โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับผลิตกรดที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นเติมเพ็บสแตตินลงในอาหาร ในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเพ็บสแตตินเป็น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sarangbin และคณะ, 1994) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์กลูโคอะมิเลส และกรดของ *A. niger* WU-2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อมีการเติมและไม่มีการเติมเพ็บสแตติน

การทดลอง	*A. niger* WU-2223L			
	โปรติเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)[1]	กลูโคอะมิเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)[2]	อัตราการใช้แป้ง (มิลลิกรัม/วัน)[3]	ปริมาณกรด (กรัมต่อลิตร)
ไม่เติมเพ็บสแตติน	0.23	4.87	2.14	11.94
เติมเพ็บสแตติน	0.11	9.47	2.56	16.50

(1) ค่าแอคติวิตีในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวันที่เชื้อมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด

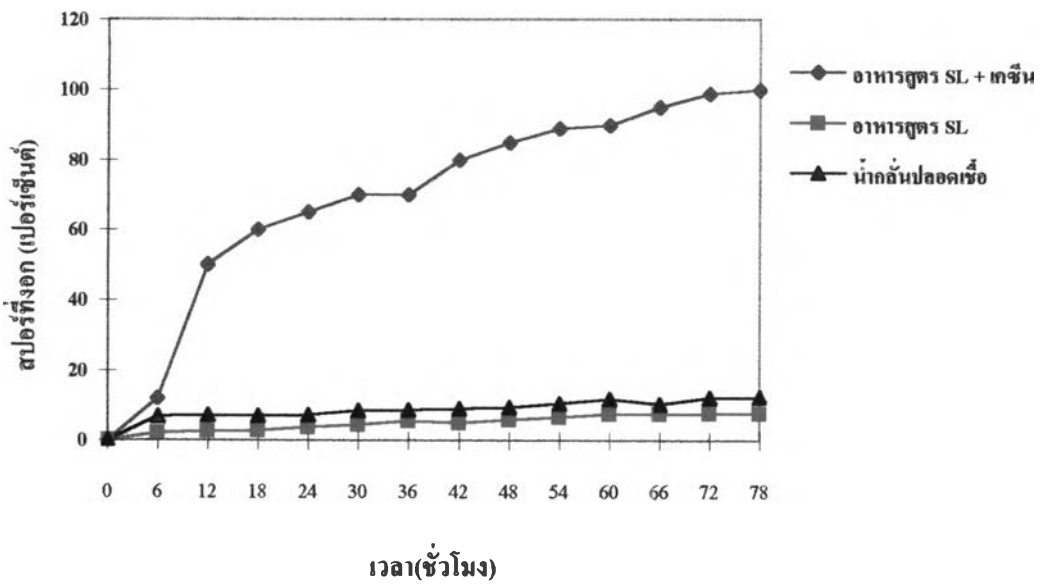
(2) ค่าแอคติวิตีในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวันที่เชื้อมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้สูงที่สุด

(3) อัตราการลดลงของแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากตารางที่ 3 พบว่าเมื่อมีการเติมเพ็บสแตตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *A. niger* WU-2223L แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสลดลง แต่แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและปริมาณกรดที่สร้างจะสูงขึ้นมากกว่าเมื่อไม่มีการเติมสารดังกล่าวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสลดลงจะส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสสูงขึ้น จากตารางจะเห็นว่า อัตราการใช้แป้งในอาหารที่มีการเติมเพ็บสแตตินลงไปจะสูงกว่าที่ไม่มีการเติมสารดังกล่าว นอกจากนี้ ปริมาณกรดที่เชื้อผลิตได้เมื่อมีการเติมเพ็บสแตตินลงไปจะสูงกว่าเมื่อไม่มีการเติมด้วย จากผลการทดลองที่ได้ดังกล่าวเป็นเหตุให้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายในงานวิจัยนี้ทำโดยคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำแต่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดได้สูงในภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

4 ผลเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ *A. niger* WU-2223L

จากงานวิจัยของ Fukuda และคณะ (1992) พบว่าสปอร์ที่สามารถงอกได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่มีเคซีนเป็นพลังงาน จะสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูง ดังนั้นจึงทำการทดลองเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ของ *A. niger* WU-2223L โดยการนำสปอร์แขวนลอย จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีเคซีนเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งพลังงาน อาหารสูตร SL ที่ไม่มีการเติมแหล่งพลังงาน และในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ติดตามเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ โดยการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง มาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้อุปกรณ์นับเม็ดเลือด นับจำนวนสปอร์ที่งอกเปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ที่ไม่งอก แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 19 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกสปอร์ของ *A. niger* WU-2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีเคซีนเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งพลังงาน อาหารสูตร SL และในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ที่เวลาต่างๆกัน

จากรูปที่ 19 พบว่าสปอร์ของ *A. niger* WU-2223L สามารถงอกได้อย่างวดเร็วเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีเคซีนเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งพลังงาน โดยงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่ไม่มีเคซีนและในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ การงอกของสปอร์จะต่ำมาก โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง สปอร์จะงอกได้ 12.1 และ 7.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงคาดว่า การงอกอย่างรวดเร็วของสปอร์ในอาหารที่มีเคซีนเป็นแหล่งพลังงาน เกิดจากการที่เชื้อสามารถใช้เคซีนเป็นแหล่งพลังงานได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสปอร์ที่งอกนั้นสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ เนื่องจากในงานวิจัยนี้ต้องการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำกว่าสายพันธุ์ WU-2223L และจากผลการทดลองข้างต้น ก่อให้เกิดสมมุติฐานว่าสปอร์ของสายพันธุ์กลายที่งอกไม่ได้ในอาหารที่มีเคซีนเป็นแหล่งพลังงาน เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง จะเป็นสปอร์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำกว่า WU-2223L จึงใช้ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ไปใช้ในการคัดเลือกเบื้องต้น ในการกำจัดสปอร์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้โดยหลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้วนำสปอร์ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มี เคซีนเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งพลังงาน นาน 72 ชั่วโมง แล้วกรองสปอร์ที่งอกทิ้ง ตามวิธีการทดลองในข้อ 14.1.5 เก็บเฉพาะสปอร์ที่ไม่งอกมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

5 ผลการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของ *A. niger* WU-2223L บนจานอาหารแข็ง

จากงานวิจัยของ Hayashida และ Flor (1981) พบว่าสายพันธุ์กลายของ *A. awamori* สายพันธุ์ *kawachi* ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำจะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบได้สูง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงคัดเลือกเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติในการย่อยแป้งดิบ โดยในขั้นต้นจะทำการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของ *A. niger* WU-2223L ด้วยการแปรผันความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังดิบ ซึ่งเตรียมตามวิธีของ Lefuji (1987) เพื่อหาความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังดิบและเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของ *A. niger* WU-2223L โดยการสังเกตจากบริเวณใสหลังจากราดจานอาหารด้วยสารละลายไอโอดีน ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง และเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของ *A. niger* WU-2223L บนจานอาหารแข็ง

เวลา (วัน) / แป้งมันสำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)	1	2	3	4	5	6
10	-	-	+	+	ND	ND
20	-	-	-	-	ND	ND
30	-	-	-	-	ND	ND
40	-	-	-	-	ND	ND
50	-	-	-	-	ND	ND
60	-	-	-	-	ND	ND
70	-	-	-	-	ND	ND

– ไม่เห็นบริเวณใสหลังจากราดด้วยสารละลายไอโอดีน

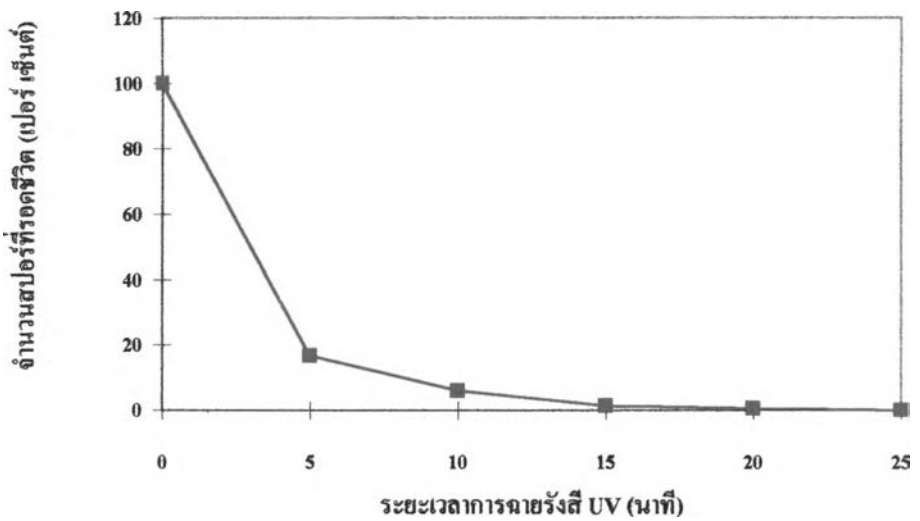
\+ เห็นบริเวณใสหลังจากที่ราดด้วยสารละลายไอโอดีน

ND ไม่สามารถตรวจผลการทดลองได้เนื่องจากเชื้อเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และใช้เวลาในการบ่มนาน 3 และ 4 วัน จะสังเกตเห็นบริเวณใสหลังจากการราดด้วยสารละลายไอโอดีน เนื่องจากมีปริมาณแป้งอยู่เหมาะสม และเชื้อสามารถย่อยได้หมด แต่เมื่อบ่มต่อไปนาน 5 และ 6 วัน พบว่า *A. niger* WU-2223L จะเจริญจนเต็มจานอาหารจึงไม่สามารถเห็นบริเวณใสเมื่อราดด้วยสารละลายไอโอดีน และเมื่อความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเพิ่มขึ้น หลังจากราดด้วยสารละลายไอโอดีนแล้ว จะไม่สามารถสังเกตเห็นบริเวณใสไม่ว่าจะใช้เวลาในการบ่มนานกี่วันก็ตาม อาจเนื่องมาจากแป้งมันสำปะหลังมีความเข้มข้นมากเกินไป ซึ่งเชื้อสามารถย่อยได้เพียงบางส่วนเท่านั้น ดังนั้นจากผลการทดลองนี้จึงเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และใช้เวลาในการบ่มนาน 3 วัน เป็นภาวะในการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งในขั้นตอนต่อไป

6 ผลการหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสปอร์ของ *A. niger* WU-2223L หลังจากผ่านการฉายรังสี UV

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของ *A. niger* WU-2223L จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ไปผ่านการฉายรังสี UV นาน 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที ตามวิธีการทดลองข้อ 14.1.1 หลังจากนั้นนำสปอร์ที่ผ่านการฉายรังสีแล้ว มาเลี้ยงบนจานอาหารสูตร SL ที่มีกลูโคสเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 2 วัน จากนั้น นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 20



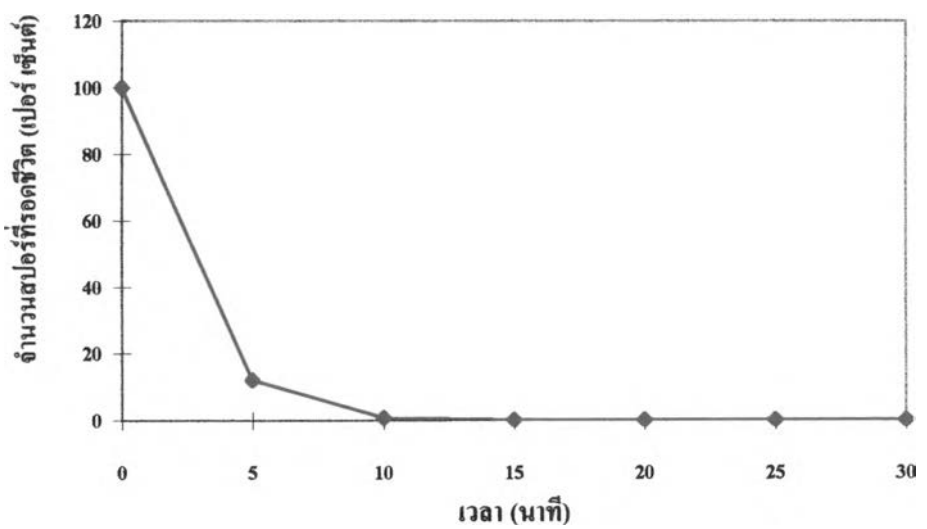
รูปที่ 20 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *A. niger* WU-2223L เมื่อถูกฉายรังสี UV ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน โดยใช้ความหนาแน่นของสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

จากรูปที่ 20 พบว่า เมื่อระยะเวลาในการฉายรังสี UV นานขึ้น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *A. niger* WU-2223L จะลดลงและพบว่าเมื่อฉายรังสี UV นานตั้งแต่ 15 นาที จำนวนการรอดชีวิตจะเหลือ 1.45 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ในการทดลองเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV ในขั้นตอนต่อไปจะเลือกใช้เวลานาน 15 นาที เพราะมีรายงานว่า ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรา

ด้วยการฉายรังสี UV โดยใช้ระยะเวลาการฉายแสงที่ทำให้มีการรอดชีวิตต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ จะได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสูงในปริมาณมาก (Tohdo และคณะ, 1991)

7 ผลการหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *A. niger* WU-2223L เมื่อถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้วยสารเคมี NTG

นำสปอร์แขวนลอยของ *A. niger* WU-2223L จำนวน 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารละลาย NTG ตามวิธีการทดลองในข้อ 14.2 จากนั้นนำสปอร์ที่ได้มาทำการทดลองตามวิธีทำการทดลองในข้อ 14.1.2 ถึงข้อ 14.1.4 นำผลที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสปอร์ ได้ผลการทดลองดังแสดงรูปที่ 21



รูปที่ 21 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *A. niger* WU-2223L เมื่อถูกชักนำด้วย NTG ที่ระยะเวลาต่างๆกัน โดยใช้ความหนาแน่นของสปอร์ตั้งต้นเท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

จากรูปที่ 21 เมื่อใช้ NTG เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่าเมื่อระยะเวลามากขึ้น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสปอร์จะลดลง โดยเมื่อเวลาผ่านไป 5 นาที การรอดชีวิตจะเหลือ 12 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที การรอดชีวิตของสปอร์จะลดลงเหลือเพียง 0.76 เปอร์เซ็นต์ และสปอร์จะตายหมดเมื่อบ่มนาน 30 นาทีขึ้นไปมีรายงานว่าในการชักนำให้เกิดการ

กลายพันธุ์ด้วยสาร NTG นิยมใช้ช่วงที่มีการรอดชีวิตอยู่ระหว่าง 0-50 เปอร์เซ็นต์ (Miller, 1972 และ Fantini, 1975) ดังนั้นในการทดลองเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG นี้จึงเลือกใช้เวลาในการชักนำนาน 5 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป

8 ผลการกลายพันธุ์ *A. niger* WU-2223L เพื่อลดความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส แต่ เพิ่มผลผลิตกรดและเอนไซม์ย่อยแป้ง

8.1 การกลายพันธุ์ *A. niger* WU-2223L ด้วยรังสี UV

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของ *A. niger* WU-2223L จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ไปผ่านการฉายรังสี UV นาน 15 นาที นำสปอร์ที่ผ่านการฉายรังสีแล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารสูตร SL ที่มีเคซีนเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับวิธีทำการทดลองในข้อ 14.1.5 จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ14.1.6 ถึง 14.1.7 แล้วนำราสายพันธุ์กลายที่สุ่มเลือกเก็บมาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

8.1.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV

โดยการสุ่มเก็บโคโลนีเดี่ยวๆ ของรากลายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV และคาดว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำ ซึ่งผ่านขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงทิ้ง จากการเลี้ยงในอาหารที่มีเคซีนเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งพลังงาน โดยการกรองสปอร์ที่สามารถงอกในอาหารดังกล่าวได้ใน 72 ชั่วโมง ทั้งหมด 241 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหาร PDA นาน 9 วัน แล้วนำราสายพันธุ์กลายมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งบนอาหาร SLST (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ตามวิธีการทดลองในข้อ 12 พบสายพันธุ์กลาย 23 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L จากนั้นนำสายพันธุ์กลายทั้ง 23 สายพันธุ์มาตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดบนอาหาร SLBG (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ตามวิธีการทดลองในข้อ 13 พบว่ามีราสายพันธุ์กลายจำนวน 20 สายพันธุ์ ที่ผลิตกรดบนจานอาหารแข็งได้สูงกว่า

สายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 5 นำสายพันธุ์กลาย 20 สายพันธุ์ ไปคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิต่อไป

ตารางที่ 5 อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสของการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี บนอาหารวุ้น SLST และ SLBG ของสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L และสายพันธุ์กลายที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

เชื้อทอสอบ	เอนไซม์ย่อยแป้ง		กรด	
	Mutant	WU-2223L	Mutant	WU-2223L
MU-22	1.19	1.05	3.87	3.99
MU-24	3.20	1.35	6.59	3.99
MU-30	1.62	1.35	2.78	3.80
MU-47	3.50	1.25	5.21	5.00
MU-74	2.86	1.25	5.65	5.00
MU-76	1.15	1.25	5.70	5.00
MU-80	3.75	1.19	4.90	3.31
MU-86	3.88	1.19	4.30	3.31
MU-91	3.91	1.19	2.43	3.31
MU-94	1.95	1.19	4.60	3.31
MU-97	1.24	1.19	4.77	3.31
MU-100	3.75	1.19	5.30	5.00
MU-182	1.26	1.19	4.50	4.12
MU-184	1.58	1.15	3.47	3.61
MU-192	1.20	1.13	4.48	3.61
MU-193	1.41	1.13	4.30	4.12
MU-195	1.19	1.13	3.79	3.61
MU-209	1.23	1.15	4.17	3.61
MU-217	1.95	1.15	5.12	3.61
MU-237	1.28	1.15	5.19	3.61

8.1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นทุติยภูมิ ของสายพันธุ์ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV

นำสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ในขั้นปฐมภูมิทั้ง 20 สายพันธุ์ (ตารางที่ 5) มาทดสอบหาความสามารถในการผลิตกรดจากแป้งมันสำปะหลัง โดยวิธีการหมักในอาหารเหลวโดยนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์กลายจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 จากนั้นตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น โดยวัดการเจริญด้วยการหาน้ำหนักเส้นใยแห้งตามวิธีการทดลองในข้อ 5 ตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดตามวิธีการทดลองในข้อ 6 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีการทดลองในข้อ 8 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ตามวิธีการทดลองในข้อ 9.1 และความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมิเลส ตามวิธีการทดลองในข้อ 9.2 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส กลูโคอะมิเลส อัลฟาอะมิเลส และกรด จากแป้งมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลว ของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV กับสายพันธุ์ตั้งต้น *A. niger* WU-2223L

เชื้อทดสอบ	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (กรัม/ลิตร)	โปรติเอส (หน่วย/มิลลิลิตร)	กลูโคอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)	อัลฟาอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)	ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)
WU-2223L	**33.11**	**0.21**	**1.16**	**9.07**	**11.23**
MU-22	25.72	1.02	0.94	9.08	31.40
MU-24	32.28	2.54	1.48	9.10	9.45
MU-47	24.97	0.87	2.31	9.08	8.67
MU-74	32.19	0.36	1.11	9.07	11.18
MU-76	33.20	0.10	1.89	9.16	18.78
MU-80	31.50	0.31	1.17	9.12	11.77
MU-86	25.57	0.58	1.22	8.99	58.31
MU-94	33.58	0.12	1.14	9.11	15.90
MU-97	27.46	0.41	1.46	8.97	33.31
MU-100	28.28	1.36	1.26	9.05	23.01
MU-182	38.25	0.26	1.70	9.04	29.92
MU-192	29.76	0.48	2.22	9.06	18.92
MU-193	32.68	0.19	1.35	9.22	18.24
MU-195	32.46	0.24	2.22	9.07	13.40
MU-209	31.54	0.26	1.16	9.06	15.51
MU-217	29.36	0.09	1.27	9.05	14.72
MU-237	26.15	0.75	1.25	9.11	41.01

จากตารางที่ 6 พบว่ามีสายพันธุ์กลายจำนวน 14 สายพันธุ์ที่ผลิตกรดจากแป้งมันสำปะหลังได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น *A. niger* WU-2223L โดยในสายพันธุ์กลายทั้ง 14 สายพันธุ์ ที่ผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น มีเพียง 4 สายพันธุ์เท่านั้น ที่มีผลิตเอนไซม์โปรติเอส ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ได้แก่สายพันธุ์ MU-76, MU-94, MU-193 และ MU-217 และยังพบว่าสายพันธุ์กลายทั้ง 14

สายพันธุ์ที่ผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นนั้น ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นด้วย ยกเว้นสายพันธุ์ MU-22 , MU-94 และ MU-209

8.1.3 ผลการทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรม ของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV

นำสปอร์ของรากลายพันธุ์ที่คัดเลือกทั้ง 14 สายพันธุ์ มาถ่ายเชื้อ 5 รุ่น แล้วใช้สปอร์ที่ได้จากการถ่ายเชื้อรุ่นสุดท้ายเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4 จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดรวมทั้งความสามารถอื่นๆ ได้แก่ การผลิตเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์กลูโคอะมิเลส เปรียบเทียบกับเชื้อรุ่นที่ 1 พบว่าสายพันธุ์กลายที่มีความเสถียรทางพันธุกรรมได้แก่ MU-22, MU-76, MU-97, MU-100 และ MU-182 ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการฉายรังสี UV

เชื้อทดสอบ	โปรติเอส (หน่วย/มิลลิลิตร)		กลูโคอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)		ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)	
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 5	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 5	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 5
WU-2223L	**0.21**	**0.21**	**1.16**	**1.17**	11.23	11.56
MU-22	1.02	1.05	0.94	0.95	31.40	30.92
MU-76	0.10	0.09	1.89	1.91	18.78	17.00
MU-97	0.41	0.44	1.46	1.45	33.31	32.56
MU-100	1.36	1.39	1.26	1.27	23.01	19.50
MU-182	0.26	0.31	1.70	1.72	29.92	22.73

จากตารางที่ 7 พบว่าสายพันธุ์กลายที่มีความเสถียรทางพันธุกรรมได้แก่ MU-22 MU-76, MU-97, MU-100 และ MU-182 โดยสามารถผลิตกรดจากแป้งมันสำปะหลังได้ เป็น

2.67, 1.47, 2.82, 1.69 และ 1.97 เท่า ตามลำดับเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L และเมื่อดูความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและเอนไซม์โปรติเอส พบว่าในสายพันธุ์กลายดังกล่าวข้างต้น มีทั้งสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงและต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์กลายรหัส MU-97 และ MU-76 เป็นตัวแทนมาทำการทดลองชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสาร NTG เนื่องจาก MU-97 มีความสามารถในการผลิตกรดจากแป้งมันสำปะหลังได้สูงมากที่สุด ถึงแม้ว่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จะสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L ส่วนสายพันธุ์ MU-76 นั้นถึงแม้ว่าผลิตกรดได้ต่ำกว่าสายพันธุ์กลายในกลุ่ม แต่การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของมันต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นมาก ดังนั้นเพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติตามต้องการคือผลิตกรดและเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงแต่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำ จึงเลือกสายพันธุ์กลายทั้งสองมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG

8.2 การกลายพันธุ์ *A. niger* สายพันธุ์ MU-76 และ MU- 97 ด้วย NTG

โดยการนำสปอร์แขวนลอยของ *A. niger* สายพันธุ์ MU-76 และ MU-97 ที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 8.1.3 จำนวน 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ตามวิธีการทดลองในข้อ 14.2 นำเชื้อสายพันธุ์กลายที่สุ่มเก็บ มาทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิ

8.2.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 1

จากการสุ่มคัดเลือกสายพันธุ์กลาย 165 สายพันธุ์ที่เจริญได้อย่างรวดเร็วบนจานอาหารสูตร SL ที่มีกลูโคสเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีการทดลองข้อ 14.1.6 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA จนเชื้ออายุครบ 9 วันจึงนำมาทดสอบขั้นปฐมภูมิตามวิธีทดลองในข้อ 15.1 โดยกำหนดรหัสสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ MU-97 เป็นกลุ่ม MUN1 และกำหนดรหัสสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ MU-76 เป็นกลุ่ม MUN2 พบว่า สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลาย 46 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสของการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดบน อาหารวุ้น SLST และ SLBG ต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของสายพันธุ์ WU-2223L กับสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG ที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

เชื้อทดสอบ	เอนไซม์ย่อยแป้ง		กรด	
	Mutant	WU-2223L	Mutant	WU-2223L
MU-97 (ตั้งต้น)				
MUN1-3	3.92	1.08	5.78	3.83
MUN1-5	7.00	1.08	7.00	3.83
MUN1-10	4.00	1.08	6.10	3.83
MUN1-11	3.87	1.08	6.33	3.83
MUN1-12	4.19	1.08	7.00	3.83
MUN1-14	3.72	1.08	7.11	3.83
MUN1-16	4.25	1.08	2.10	2.90
MUN1-19	4.08	1.08	7.44	2.90
MUN1-20	4.68	1.10	8.50	2.90
MUN1-24	4.48	1.10	7.13	2.90
MUN1-25	4.80	1.10	7.78	2.90
MUN1-27	3.29	1.10	5.64	3.83
MUN1-28	3.43	1.10	8.50	3.83
MUN1-29	3.57	1.10	7.22	3.83
MUN1-40	3.93	1.09	6.33	3.83
MUN1-41	3.57	1.09	6.56	3.83
MUN1-43	4.90	1.09	6.89	3.83
MUN1-45	4.80	1.09	6.20	3.83
MUN1-47	3.87	1.09	7.44	3.83

ตารางที่ 8 (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	เอนไซม์ย่อยแป้ง		กรด	
	Mutant	WU-2223L	Mutant	WU-2223L
MUN1-48	4.20	1.09	6.22	3.83
MUN1-49	5.00	1.09	7.33	3.83
MUN1-50	4.80	1.09	8.13	3.83
MUN1-55	5.21	1.09	6.56	3.83
MUN1-56	5.10	1.09	6.67	3.83
MUN1-61	5.10	1.09	8.50	3.83
MUN1-63	4.70	1.09	8.63	3.83
MU-76(ตั้งต้น)				
MUN2-16	3.24	1.23	5.55	3.61
MUN2-18	3.59	1.23	5.05	3.61
MUN2-20	3.80	1.26	6.75	3.61
MUN2-21	2.68	1.26	4.66	3.61
MUN2-26	3.29	1.26	5.38	3.61
MUN2-28	3.36	1.26	5.00	3.61
MUN2-29	2.95	1.26	4.88	3.61
MUN2-30	3.00	1.26	7.33	3.61
MUN2-31	4.25	1.26	7.33	3.61
MUN2-34	2.88	1.26	5.25	3.61
MUN2-35	2.89	1.26	5.35	3.61
MUN2-37	3.15	1.26	5.52	3.61
MUN2-40	1.48	1.35	6.00	3.61
MUN2-42	4.78	1.35	3.64	3.82
MUN2-43	2.71	1.35	5.35	3.82
MUN2-60	2.52	1.35	5.27	3.82
MUN2-61	3.29	1.35	6.32	3.82
MUN2-64	3.83	1.35	4.45	3.82
MUN2-65	3.12	1.35	5.06	3.82
MUN2-66	3.25	1.35	6.00	3.82

จากตารางที่ 8 พบว่า สายพันธุ์กลายจำนวน 46 สายพันธุ์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ MU-97 และ MU-67 พบว่าสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L บนอาหาร SLST จากนั้นนำสายพันธ์กลายทั้ง 46 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดบนอาหาร SLBG พบว่ามีสายพันธุ์กลาย 44 สายพันธุ์ผลิตกรดบนอาหารดังกล่าวได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์กลายทั้ง 44 สายพันธุ์มาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไป

8.2.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์กลาย ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG รอบที่ 1

โดยการนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์กลายทั้ง 44 สายพันธุ์ ที่ได้จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ มาทดลองหาความสามารถในการผลิตกรดจากแป้งมันสำปะหลัง โดยวิธีการหมักในอาหารเหลวด้วยการนำสปอร์ของเชื้อกลายพันธุ์จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 จากนั้น ตรวจสอบความสามารถต่างๆ ของสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น โดยวัดการเจริญด้วยการหาน้ำหนักเส้นใยแห้ง ตามวิธีการทดลองในข้อ 5 ตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรด ตามวิธีการทดลองในข้อ 6 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีการทดลองในข้อ 8 เอนไซม์กลูโคอะมิเลส ตามวิธีการทดลองในข้อ 9.1 และความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมิเลส ตามวิธีการทดลองในข้อ 9.2 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส กลูโคอะมิเลส อัลฟาอะมิเลส และ กรด จากแป้งมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลวของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำสายพันธุ์ MU-97 และสายพันธุ์ MU-76 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG กับ *A. niger* WU-2223L

เชื้อทดสอบ	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (กรัม/ลิตร)	โปรติเอส (หน่วย/มิลลิลิตร)	กลูโคอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)	อัลฟาอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)	ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)
WU-2223L	**33.20**	**0.21**	**1.16**	**9.07**	**11.67**
MUN1-3	29.10	0.84	1.54	9.05	7.06
MUN1-5	21.10	1.12	1.38	9.06	49.27
MUN1-10	30.69	0.59	1.37	9.02	22.23
MUN1-11	24.19	1.05	1.25	9.07	34.77
MUN1-12	27.91	1.07	1.41	9.06	30.61
MUN1-16	26.66	0.54	1.64	9.03	29.64
MUN1-19	28.90	0.58	1.21	9.04	19.85
MUN1-20	26.25	0.62	1.43	9.09	6.23
MUN1-24	29.98	0.32	1.36	9.02	17.29
MUN1-25	29.63	0.59	1.64	9.05	21.41
MUN1-27	29.22	0.39	1.61	9.04	5.76
MUN1-28	29.63	0.29	1.37	9.01	4.67
MUN1-29	24.28	1.56	0.94	9.12	6.25
MUN1-40	25.66	1.25	0.80	9.09	7.31
MUN1-41	27.52	1.15	0.93	9.07	6.98
MUN1-43	29.49	0.36	1.45	9.17	0.64
MUN1-45	29.05	1.03	0.97	9.07	4.87
MUN1-47	30.84	1.01	0.78	9.04	20.31
MUN1-48	25.96	1.23	0.97	9.07	6.98
MUN1-49	32.16	0.35	1.58	9.05	6.53

ตารางที่ 9 (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (กรัม/ลิตร)	โปรติเอส (หน่วย/มิลลิลิตร)	กลูโคอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)	อัลฟาอะไมเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)	ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)
MUN1-50	29.49	0.14	3.88	9.09	10.27
MUN1-55	26.20	0.23	1.13	9.05	9.80
MUN1-56	24.46	0.82	2.89	9.07	33.95
MUN1-61	25.65	0.51	1.59	9.06	18.20
MUN1-63	22.08	0.11	1.97	9.14	5.60
MUN2-16	28.39	0.18	1.11	8.94	14.46
MUN2-18	23.33	0.24	0.88	9.02	14.23
MUN2-20	24.06	0.21	0.94	9.01	18.84
MUN2-21	26.06	0.18	0.74	9.02	14.34
MUN2-26	23.98	0.21	0.80	9.03	15.54
MUN2-28	21.42	0.32	1.22	9.03	15.86
MUN2-29	23.85	0.17	0.84	9.04	14.92
MUN2-30	31.34	0.33	1.37	8.92	13.09
MUN2-31	26.86	0.34	1.11	8.96	13.58
MUN2-34	29.21	0.11	6.08	8.97	12.46
MUN2-35	25.85	0.23	0.57	8.99	15.71
MUN2-37	25.12	0.21	1.37	8.92	17.95
MUN2-42	15.65	0.09	9.49	8.99	10.87
MUN2-43	24.98	0.23	0.88	8.95	17.95
MUN2-60	30.08	0.02	0.86	9.06	26.60
MUN2-61	27.62	0.11	1.42	9.05	45.80
MUN2-64	29.62	0.16	1.38	9.06	43.75
MUN2-65	30.08	0.14	1.06	9.04	32.20
MUN2-66	28.27	0.03	0.71	9.05	39.43

จากตารางที่ 9 พบว่า เมื่อนำสายพันธุ์ MU-97 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG และกำหนดรหัสเป็นกลุ่ม MUN1 มีสายพันธุ์กลาย 12 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตกรดและเอนไซม์กลูโคอะมิเลสสูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L ยกเว้นสายพันธุ์ MUN1-14 และ MUN1-47 ที่ถึงแม้จะผลิตกรดได้สูงกว่าแต่พบว่าการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสต่ำกว่าสายพันธุ์ WU-2223L นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าสายพันธุ์กลายทั้ง 12 สายพันธุ์ที่ผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L ยังคงผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L

เมื่อนำสายพันธุ์กลาย MU-76 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำแล้วคัดเลือกเช่นเดียวกับสายพันธุ์ MU-97 โดยกำหนดรหัสเป็นชุด MUN2 พบว่าสายพันธุ์กลายจำนวน 18 สายพันธุ์ สามารถผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L ในจำนวนนี้มี 6 สายพันธุ์ที่ผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น MU-76 นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ กลูโคอะมิเลส พบว่าส่วนใหญ่จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ต่ำกว่าสายพันธุ์ WU-2223L ยกเว้นสายพันธุ์ MUN2-28, MUN2-30 MUN2-34, MUN2-37 และ MUN2-42 เมื่อพิจารณาความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มราสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L พบว่ามี 12 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับหรือน้อยกว่าสายพันธุ์ WU-2223L ส่วนอีก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ MUN2-18, MUN2-30, MUN2-31 และ MUN2-35 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L เพียงเล็กน้อย

ดังนั้น จึงนำสายพันธุ์กลาย จำนวน 30 สายพันธุ์ ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำดังกล่าวที่สามารถผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L ไปทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมต่อไป

8.2.3 การทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กลาย ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 1

โดยนำสปอร์ของรากลายพันธุ์ที่คัดเลือกทั้ง 30 สายพันธุ์ มาถ่ายเชื้อ 5 รุ่น แล้วใช้สปอร์ที่ได้จากการถ่ายเชื้อรุ่นสุดท้าย มาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4 จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์กลูโคอะมิเลส รวมทั้งความสามารถในการผลิตกรด เปรียบเทียบกับเชื้อรุ่นที่ 1 พบว่า สายพันธุ์กลายที่มีความเสถียรทางพันธุกรรม ที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จากสายพันธุ์ MU-97 ได้แก่ MUN1-5 MUN1-11 และ MUN1-47 และสายพันธุ์ที่มีความเสถียรทางพันธุกรรม ที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จากสายพันธุ์ MU-76 ได้แก่ MUN2-28, MUN2-61 และ MUN2-64 ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG รอบที่ 1

เชื้อทดสอบ	โปรติเอส (หน่วย/มิลลิลิตร)		กลูโคอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)		ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)	
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 5	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 5	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 5
WU-22223L	**0.21**	**0.19**	**1.17**	**1.16**	**11.67**	**11.53**
MUN1-5	1.12	1.11	1.38	1.37	49.27	41.72
MUN1-11	1.05	1.36	1.25	1.24	34.77	29.41
MUN1-47	1.01	0.94	0.78	0.76	20.31	18.71
MUN2-28	0.32	0.29	1.22	1.23	15.86	18.02
MUN2-61	0.11	0.10	1.42	1.45	45.80	42.72
MUN2-64	0.16	0.19	1.38	1.31	43.75	41.73

จากตารางที่ 10 สายพันธุ์กลาย MUN1-5 มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดได้สูงที่สุดในจำนวนสายพันธุ์กลายทั้งหมดที่มีความเสถียรทางพันธุกรรม แต่เมื่อพิจารณาความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของสายพันธุ์ดังกล่าวพบว่าสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ไม่ต้องการ ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์กลายดังกล่าวข้างต้น เป็นตัวแทนมาทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำอีกครั้งด้วย NTG

เมื่อพิจารณา สายพันธุ์กลายในกลุ่ม MUN2 พบว่า MUN2-61 มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดได้สูงสุดโดยสูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ดังกล่าวจะผลิตกรดได้ต่ำกว่า MUN1-5 แต่สายพันธุ์กลาย MUN2-61 มีคุณสมบัติที่น่าสนใจคือสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำกว่าสายพันธุ์ WU-2223L นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ MUN2-61 ผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส สูงกว่าสายพันธุ์กลายตัวอื่นๆในกลุ่ม ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ MUN2-61 เป็นตัวแทนสายพันธุ์กลายในกลุ่มนี้ มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติตามต้องการคือ สามารถผลิตกรดและเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงแต่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำเมื่อเลี้ยงโดยวิธีการหมักในอาหารเหลวเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ในภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

8.3 การกลายพันธุ์ *A. niger* สายพันธุ์ MUN1-5 และ MUN2-61 ด้วย NTG รอบที่ 2

โดยการนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ตั้งต้น MUN1-5 และ MUN2-61 ที่ได้จากการทดลองในข้อ 8.2.3 จำนวน 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ตามวิธีการทดลองในข้อ 14.2 นำสปอร์ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้ว มาเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีเคซีนเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน นาน 72 ชั่วโมง ตามวิธีการทดลองในข้อ 14.1.5 แล้วทำการทดลองตามวิธีการทดลองในข้อ 14.1.6 และ 14.1.7 จากนั้นนำไปคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิ

8.3.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ ของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 2

โดยการสุ่มคัดเลือกสายพันธุ์กลาย 50 สายพันธุ์ ที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ MUN1-5 และสุ่มเก็บ 60 สายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ MUN2-61 ที่เจริญได้อย่างรวดเร็วบนจานอาหารสูตร SL ที่มีกลูโคสเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน นำสายพันธุ์กลายมาเลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 9 วัน แล้วนำมาทดสอบขั้นปฐมภูมิตามวิธีการทดลองในข้อ 15.1 โดยกำหนดรหัสสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ MUN1-5 เป็นชุด MUNN1 และกำหนดรหัสสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ MUN2-61 เป็นชุด MUNN2 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง และกรด บนอาหารวุ้น SLST และ SLBG ของบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำสายพันธุ์ MUN1-5 และ MUN2-61 ให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้วย NTG รอบที่ 2 ที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *A. niger* WU-2223L

เชื้อทดสอบ	เอนไซม์ย่อยแป้ง		กรด	
	Mutant	WU-2223L	Mutant	WU-2223L
MUN1-5 (ตั้งต้น)				
MUNN1-30	4.00	1.00	7.98	3.83
MUN2-61(ตั้งต้น)				
MUNN2-2	3.06	1.06	4.75	4.36
MUNN2-8	3.35	1.06	5.00	4.36
MUNN2-11	3.07	1.06	4.50	4.36
MUNN2-12	3.25	1.06	4.73	4.36
MUNN2-13	2.91	1.06	5.64	4.36
MUNN2-14	3.23	1.06	4.63	4.36
MUNN2-15	3.25	1.06	4.39	4.36
MUNN2-17	3.43	1.07	5.67	4.13
MUNN2-22	3.29	1.07	6.09	4.13
MUNN2-39	3.12	1.07	5.17	4.13
MUNN2-40	2.64	1.07	5.62	4.13
MUNN2-41	3.50	1.07	5.07	4.13
MUNN2-43	3.25	1.07	2.11	4.13

จากตารางที่ 11 พบว่าสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ MUN1-5 และ MUN2-61 ที่สุ่มเก็บทั้ง 14 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งบนจานอาหาร SLST ได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L และเมื่อนำมาตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดบนจานอาหาร SLBG พบว่ามีเพียง 13 สายพันธุ์ที่ผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L นำสายพันธุ์กลายทั้ง 13 สายพันธุ์ มาทดสอบขั้นทุติยภูมิต่อไป

8.3.2 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 2

จากนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์กลายจำนวน 13 สายพันธุ์ ที่ได้จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิมาทดสอบ หาความสามารถในการผลิตกรดจากแป้งมันสำปะหลัง ด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลวโดยการนำสปอร์ของเชื้อกลายพันธุ์จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 จากนั้น ตรวจสอบความสามารถต่างๆ ของสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น โดยวัดการเจริญด้วยการหาน้ำหนักเส้นใยแห้ง ตามวิธีการทดสองในข้อ 5 ตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดตามวิธีการทดลองในข้อ 6 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ โปรติเอส ตามวิธีการทดลองในข้อ 8 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ตามวิธีการทดลองในข้อ 9.1 และความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมิเลส ตามวิธีการทดลองในข้อ 9.2 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส กลูโคอะมิเลส อัลฟาอะมิเลส และกรดจากแป้งมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลว ของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำสายพันธุ์ MUN1-5 และ MUN2-61 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบ 2 กับ *A. niger* WU-2223L

เชื้อทดสอบ	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (กรัม/ลิตร)	โปรติเอส (หน่วย/มิลลิลิตร)	กลูโคอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)	อัลฟาอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)	ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)
WU-2223L	**33.11**	**0.21**	**1.18**	**9.07**	**11.43**
MUNN1-30	30.24	1.26	1.05	9.09	35.33
MUNN2-2	32.77	1.12	1.07	9.07	39.91
MUNN2-8	30.52	0.08	1.21	9.06	38.72
MUNN2-11	33.88	0.13	1.19	9.12	34.22
MUNN2-12	30.61	0.11	1.41	9.08	39.75
MUNN2-13	32.88	0.07	1.28	9.08	30.64
MUNN2-14	31.68	0.09	1.90	9.15	38.30
MUNN2-15	22.87	0.11	1.13	9.05	43.37
MUNN2-17	22.34	0.08	1.36	8.99	46.76
MUNN2-22	31.45	0.03	1.76	9.01	37.08
MUNN2-39	31.88	0.08	1.55	8.99	37.40
MUNN2-40	32.19	0.04	1.51	8.97	36.45
MUNN2-41	31.98	0.09	2.19	8.98	35.85

จากตารางที่ 12 พบว่าเมื่อกลายพันธ์ MUN1-5 มีเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นคือ MUNN1-30 ที่สามารถผลิตกรดและเอนไซม์กลูโคอะมิเลส สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L อย่างไรก็ตามสายพันธุ์กลายดังกล่าวยังคงผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L

จากการกลายพันธุ์สายพันธุ์ MUN2-61 ด้วยสาร NTG ซ้ำเป็นรอบที่ 2 พบว่าสายพันธุ์กลายที่คัดเลือก สามารถผลิตกรดและเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L ยกเว้นสายพันธุ์ MUNN2-2 และ MUNN2-15 ผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้ต่ำกว่าสายพันธุ์ WU-2223L นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกมาทั้งหมดในกลุ่มนี้ผลิตเอนไซม์

โปรติเอสต่ำกว่าสายพันธุ์ WU-2223L นำสายพันธุ์กลายทั้ง 13 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในตารางที่ 12 มาทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมต่อไป

8.3.3 ผลการทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 2

เมื่อนำสปอร์ของรากลายพันธุ์ที่คัดเลือกทั้ง 13 สายพันธุ์ มาถ่ายเชื้อ 5 รุ่น แล้วใช้สปอร์ที่ได้จากการถ่ายเชื้อรุ่นสุดท้าย มาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4 จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส รวมทั้งความสามารถในการผลิตกรด เปรียบเทียบกับเชื้อรุ่นที่ 1 พบว่าสายพันธุ์กลายที่มีความเสถียรทางพันธุกรรม ได้แก่ สายพันธุ์ MUNN2-8, MUNN2-13, MUNN2-14, MUNN2-15 MUNN2-17 และ MUNN2-22 ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 การทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 2

เชื้อทดสอบ	โปรติเอส (หน่วย/มิลลิลิตร)		กลูโคอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)		ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)	
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 5	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 5	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 5
WU-2223L	**0.21**	**0.22**	**1.18**	**1.16**	**11.43**	**11.93**
MUNN2-8	0.08	0.08	1.21	1.14	38.72	35.51
MUNN2-13	0.07	0.07	1.28	1.35	30.64	36.77
MUNN2-14	0.09	0.10	1.90	1.32	38.30	36.25
MUNN2-15	0.11	0.11	1.13	1.15	43.37	41.28
MUNN2-17	0.08	0.09	1.36	1.39	46.76	42.05
MUNN2-22	0.03	0.04	1.76	1.51	37.08	35.04

จากตารางที่ 13 พบว่าสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำกว่าสายพันธุ์ WU-2223L และพบว่าสายพันธุ์กลายดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคยะมิเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L เมื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดพบว่าสายพันธุ์กลายผลิตกรดได้สูงกว่า ประมาณ 3-3.5 เท่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์ มาศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ WU-2223L ต่อไป

8.4 การกลายพันธุ์ *A. niger* MUN2-61 ซ้ำด้วยรังสี UV

จากการทดลองชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์พบว่าถ้าใช้ NTG จะได้สายพันธุ์กลายที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันเป็นส่วนใหญ่ แต่ถ้าใช้รังสี UV เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่าจะได้สายพันธุ์กลายที่มีลักษณะหลากหลาย ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ MUN2-61 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำกว่ารวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำอีกครั้งหนึ่งโดยการนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ MUN2-61 จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตรไปฉายรังสี UV ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 14.1 แล้วสุ่มเก็บสายพันธุ์กลายที่เกิดขึ้น มาทำการคัดเลือกเชื้อต่อไป

8.4.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์กลายที่ได้จากนำสายพันธุ์ MUN2-61 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำอีกครั้งด้วยรังสี UV

โดยการสุ่มเก็บโคโลนีเดี่ยวๆของราสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายรังสี UV ทั้งหมด 60 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหาร PDA จนกระทั่งอายุครบ 9 วันแล้วจึงนำสายพันธุ์กลาย มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง บนอาหาร SLST ตามวิธีการทดลองในข้อ 12 พบว่ามีสายพันธุ์กลาย 10 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งบนจานอาหารแข็งได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L จากนั้นนำสายพันธุ์กลายทั้ง 10 สายพันธุ์มาตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดบนอาหาร SLBG ตามวิธีการทดลองในข้อ 13 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L พบว่าสายพันธุ์กลายทั้ง 10 สายพันธุ์ผลิตกรดบนจานอาหารแข็งได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสของการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง และกรด ต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ของโคโลนี บนอาหารวุ้น SLST และ SLBG ของสายพันธุ์ *A. niger* WU-2223L กับสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสายพันธุ์ MUN2-61 ด้วยรังสี UV รอบที่ 2 ที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

เชื้อทดสอบ	เอนไซม์ย่อยแป้ง		กรด	
	Mutant	WU-2223L	Mutant	WU-2223L
MUN2-61	**3.29**	**1.27**	**6.32**	**3.81**
MUNU-3	3.33	1.27	4.00	3.49
MUNU-5	3.42	1.27	4.07	3.49
MUNU-6	3.00	1.27	4.14	3.49
MUNU-7	4.12	1.27	4.86	3.49
MUNU-8	3.50	1.27	5.25	3.49
MUNU-9	2.15	1.27	4.58	3.49
MUNU-21	3.63	1.22	5.25	4.49
MUNU-22	3.64	1.22	6.16	4.49
MUNU-44	5.00	1.22	5.23	4.49
MUNU-49	3.33	1.15	5.33	4.49

จากตารางที่ 14 พบว่ามีราสายพันธุ์กลาย 10 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L สายพันธุ์กลายทั้ง 10 สายพันธุ์ไปทดสอบในขั้นทุติยภูมิ

8.4.2 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการนำสายพันธุ์ MUN2-61 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำอีกครั้งด้วยรังสี UV

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์กลายทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่ได้จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิมาทดสอบหาความสามารถในการผลิตกรด โดยการนำสปอร์ของราสายพันธุ์กลายจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 จากนั้น ตรวจสอบความสามารถต่างๆของ

ราสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ WU-2223L โดยวัดการเจริญด้วยการหาน้ำหนักเส้นใยแห้ง ตามวิธีการทดลองในข้อ 5 ตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรด ตามวิธีการทดลองในข้อ 6 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีการทดลองในข้อ 8 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ตามวิธีการทดลองในข้อ 9.1 และความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมิเลส ตามวิธีการทดลองในข้อ 9.2 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์กลูโคอะมิเลส อัลฟาอะมิเลส และกรดจากแป้งมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลวของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำสายพันธุ์ MUN2-61ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV รอบที่ 2 กับสายพันธุ์ *A. niger* WU-2223L

เชื้อทดสอบ	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (กรัม/ลิตร)	โปรติเอส (หน่วย/มิลลิลิตร)	กลูโคอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)	อัลฟาอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)	ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)
WU-2223L	**33.27**	**0.21**	**1.16**	**9.02**	**11.08**
MUNU-3	31.86	0.18	0.96	8.96	20.14
MUNU-5	29.75	0.19	0.99	8.98	26.14
MUNU-6	30.25	0.22	0.66	8.96	27.42
MUNU-7	32.20	0.18	1.52	9.15	26.83
MUNU-8	31.83	0.15	1.41	9.09	30.48
MUNU-9	31.27	0.09	1.26	9.11	26.01
MUNU-21	29.55	0.08	1.62	9.07	34.17
MUNU-22	20.43	0.05	1.53	9.09	53.07
MUNU-44	28.59	0.04	1.32	9018	33.98
MUNU-49	27.45	0.10	1.00	9017	42.93

จากตารางที่ 15 พบว่าสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ทั้งหมดสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำกว่าสายพันธ์ WU-2223L ส่วนความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสพบว่า สายพันธุ์กลายส่วนใหญ่สามารถผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L ยกเว้นสายพันธุ์ MUNU-3, MUNU-5, MUNU-6 และ MUNU-49 ส่วนความสามารถในการผลิตกรดพบว่าสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์

ผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L นำสายพันธุ์กลายทั้ง 10 สายพันธุ์ในตารางที่ 15 ไปทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมต่อไป

8.4.3 ผลการทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรม ของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้ เกิดการกลายพันธุ์ MUN2-61 ด้วยรังสี UV

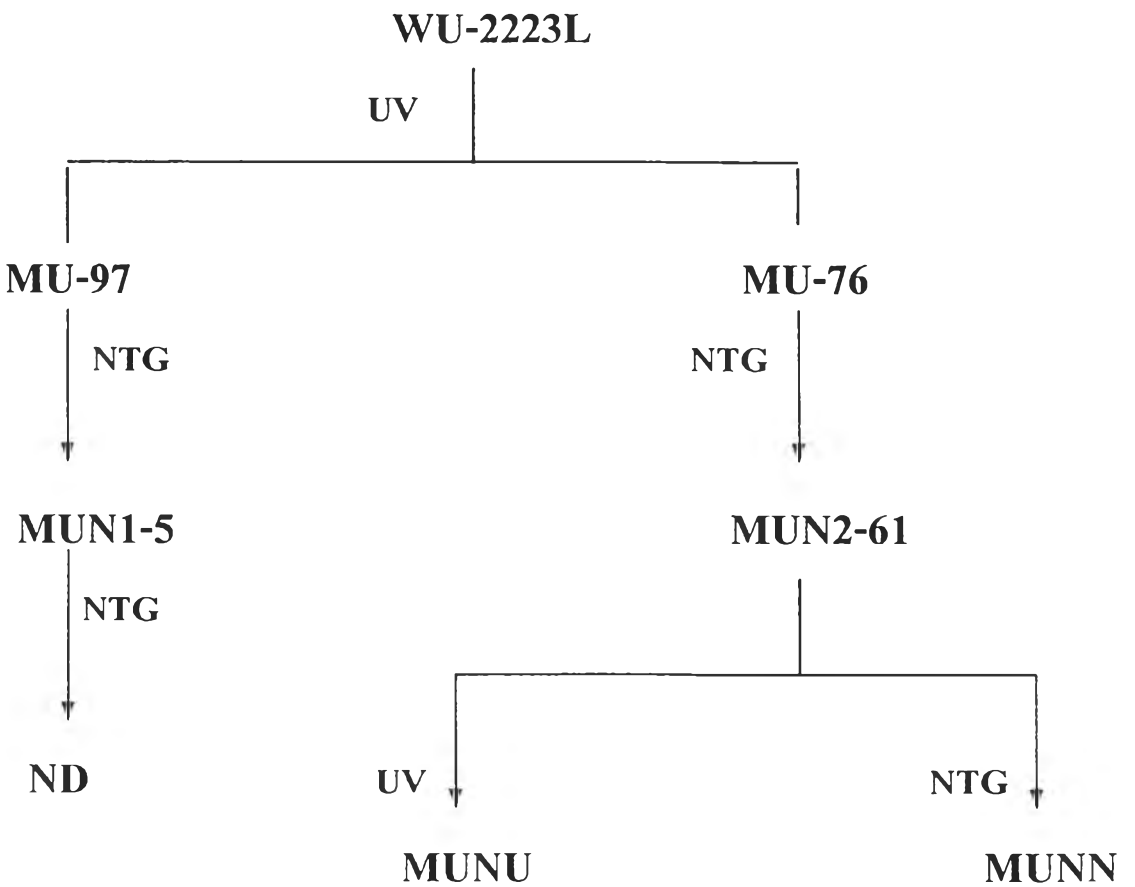
เมื่อนำสปอร์ของราสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ทั้ง 10 สายพันธุ์ มาถ่ายเชื้อ 5 รุ่น แล้วใช้สปอร์ที่ได้จากการถ่ายเชื้อรุ่นสุดท้าย มาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4 จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ความสามารถการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส รวมทั้งความสามารถในการผลิตกรด เปรียบเทียบกับเชื้อรุ่นที่ 1 พบว่าสายพันธุ์กลายที่มีความเสถียรทาง พันธุกรรม ได้แก่ สายพันธุ์ MUNU-22, MUNU-44 และ MUNU-49 ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 การทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กลาย ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการพันธุ์ MUN2-61 ด้วยรังสี UV

เชื้อทดสอบ	โปรติเอส (หน่วย/มิลลิลิตร)		กลูโคอะมิเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)		ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)	
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 5	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 5	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 5
WU-22223L	0.21	**0.21**	**0.16**	**0.17**	**11.08**	11.20
MUNU-22	0.05	0.04	1.53	1.50	53.07	50.15
MUNU-44	0.04	0.06	1.32	1.33	33.98	31.75
MUNU-49	0.10	0.09	1.00	0.99	42.93	40.20

จากตารางที่ 16 สายพันธุ์กลายที่มีความเสถียรทางพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดจากแป้งมันสำปะหลังได้สูงกว่า เป็น 5, 3, และ 4 เท่า ตามลำดับเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ WU-2223L และจะพบว่าสายพันธุ์กลายทั้งหมดสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์ WU-2223L นอกจากนี้สายพันธุ์กลายทั้งหมด สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำกว่าสายพันธุ์ WU-2223L

จากการทดลองชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L จนกระทั่งได้สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติบรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้ง คือสามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดและเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูง แต่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำ โดยวิธีการหมักในอาหารเหลวเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ในภาวะที่เหมาะสมต่อผลิตกรด สามารถสรุปเป็นแผนภูมิได้ดังแสดงในรูปที่ 22



รูปที่ 22 แผนภาพแสดงขั้นตอนในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อสายพันธุ์ตั้งต้น *A. niger* WU-2223L ด้วยรังสี UV และ NTG เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตกรดและเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูง แต่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำ โดยวิธีการหมักในอาหารเหลวเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

จากการทดลองชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลาย ที่สามารถผลิตกรดจากแป้งมันสำปะหลังได้สูงขณะที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด ได้คัดเลือกสายพันธุ์กลาย ดังแสดงในตารางที่ 17 สำหรับศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น *A. niger* WU-2223L ต่อไป

ตารางที่ 17 ตารางแสดงสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกและขั้นตอนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

สายพันธุ์กลาย	ขั้นตอนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์
MUN2-61 MUN2-64	ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L ด้วยรังสี UV จากนั้นชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG (WU-2223L → UV → NTG → MUTANTS)
MUNN2-8 MUNN2-13 MUNN2-14 MUNN2-15 MUNN2-17 MUNN2-22	ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L ด้วยรังสี UV จากนั้นชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG จากนั้นนำมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG อีก 1 รอบ (WU-2223L → UV → NTG → NTG → MUTANTS)
MUNU-22 MUNU-44 MUNU-49	ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L ด้วยรังสี UV จากนั้นชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG จากนั้นนำมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสี UV อีก 1 รอบ (WU-2223L → UV → NTG → UV → MUTANTS)

จากขั้นตอนการคัดเลือกจนกระทั่งได้สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติตามต้องการ เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ของขั้นตอนการคัดเลือกดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ของขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์กลายจนกระทั่งได้สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติตามต้องการ

ขั้นตอนการคัดเลือก	คุณสมบัติของสายพันธุ์กลาย	จำนวนสายพันธุ์กลาย (สายพันธุ์)	เปอร์เซ็นต์สัมพัทธ์ (1)
ขั้นที่ 1 ผ่านการกรองภายหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร SL + เคซีน	เป็นสปอร์ที่คาดว่าจะมีเอนไซม์โปรติเอสต่ำ	580	-
ขั้นที่ 2 การคัดเลือกบนอาหารแข็ง	เอนไซม์ย่อยแป้งและกรดบนจานอาหารแข็ง SLST และ SLBG สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้นมากๆ	97	16.7
ขั้นที่ 3 การคัดเลือกในอาหารเหลว	ผลิตกรดได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน	76	78.4
	ผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้สูง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน	61	62.9
	ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน	49	50.5

(1) เปอร์เซ็นต์สัมพัทธ์ = $\frac{\text{จำนวนสายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติตามที่ระบุในขั้นตอนการคัดเลือกนั้นๆ}}{\text{จำนวนสายพันธุ์กลายในขั้นตอนการคัดเลือกขั้นก่อนหน้า (1-2)}} \times 100$

จากตารางที่ 18 พบว่าเมื่อนำสายพันธุ์กลาย 580 สายพันธุ์ที่ผ่านขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่คาดว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงออกไปแล้ว (ขั้นที่ 1) มาคัดเลือกในขั้นที่ 2 พบว่ามีสายพันธุ์กลายจำนวน 97 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดบนจานอาหารแข็ง SLST และ SLBG สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L โดยคิดเป็น 16.7 เปอร์เซ็นต์สัมพัทธ์ เมื่อเทียบกับจำนวนสายพันธุ์กลายที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นที่ 1 และเมื่อนำ

สายพันธุ์กลายทั้ง 97 สายพันธุ์ดังกล่าวมาทำการคัดเลือกในอาหารเหลวสูตร SL ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (ขั้นที 3) พบว่ามีสายพันธุ์กลาย 76 สายพันธุ์ (78.4 เปอร์เซ็นต์สัมพัทธ์ เมื่อเทียบกับจำนวนสายพันธุ์กลายที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นที่ 2 (97 สายพันธุ์)) ผลิตกรดได้สูงและ 61 สายพันธุ์ (62.9 เปอร์เซ็นต์สัมพัทเมื่อเทียบกับจำนวนสายพันธุ์กลายที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 2) ผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้สูงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ในขณะที่มีเพียง 49 สายพันธุ์ (50.5 เปอร์เซ็นต์สัมพัทธ์ เมื่อเทียบกับจำนวนสายพันธุ์กลายที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นที่ 2) ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

นำสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกมาตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร SL ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบคุณสมบัติเบื้องต้นของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อทดสอบ	โปรติเอส[1] (หน่วย/มิลลิลิตร)	กลูโคอะมิเลส[2] (หน่วย/มิลลิลิตร)	ปริมาณกรด[3] (กรัม/ลิตร)
WU-2223L	0.24	5.18	10.98
MUN2-61	0.17	12.04	42.25
MUN2-64	0.07	10.35	45.32
MUNN2-8	0.10	10.64	39.85
MUNN2-13	0.09	14.13	31.14
MUNN2-14	0.16	10.73	30.24
MUNN2-15	0.17	12.92	45.07
MUNN2-17	0.16	11.82	41.27
MUNN2-22	0.003	10.99	29.48
MUNU-22	0.12	11.89	52.36
MUNU-44	0.11	9.85	30.59
MUNU-49	0.18	10.25	40.95

(1) วัดแอคติวิตีของเอนไซม์วันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อเพราะเป็นวันที่เอนไซม์โปรติเอสมีแอคติวิตีสูงที่สุด

(2) วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ วันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อเพราะเป็นวันที่แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสสูงที่สุด

(3) วัดปริมาณกรดวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ เพราะเป็นวันที่เชื้อสามารถผลิตกรดได้สูงที่สุด

จากตารางที่ 19 จะเห็นว่าเมื่อนำสายพันธุ์กลายมาเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสของสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น เมื่อวัดในวันที่เชื้อมีแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวสูงที่สุด ส่วนแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและปริมาณกรด พบว่าสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์มี

แอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณกรดสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น โดยแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ทำการวัดในวันที่เชื้อมีแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวสูงที่สุด จากการทดลองนี้ (ตารางที่ 19) จะเห็นว่าสอดคล้องกับสมมุติฐานที่ตั้งไว้คือ เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำแต่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถผลิตกรดได้สูงด้วย (Moyer และคณะ, 1953; Usami และ Taketomi, 1960)

จากผลการทดลองที่ได้ (ตารางที่ 19) เนื่องจากยังไม่ทราบว่า การที่สายพันธุ์กลายสามารถผลิตกรดได้สูงขึ้นนั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนใด (จากรูปที่ 15) ระหว่างจากการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลกลูโคส หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมตาบอลิสมของกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดมะนาว ดังนั้นเพื่อเป็นการตรวจสอบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงที่จุดใด จึงออกแบบการทดลองโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน คือ ในอาหารสูตร SL ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารสูตร SL ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และในอาหารสูตร SL ที่ใช้ น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (อาหารสูตร SL ที่มีน้ำตาลกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของสายพันธุ์ WU-2223Lมากที่สุด (Usami,1978) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L

เชื้อทดสอบ	แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร		น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร		น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร	
	ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (กรัม/ลิตร)
WU-2223L	11.76	33.07	15.05	25.93	17.80	37.42
MUN2-61	45.00	31.07	20.06	23.36	33.25	33.51
MUN2-6	47.30	29.79	26.60	23.29	72.10	26.27
MUNN2-8	35.00	31.36	15.17	17.62	29.40	35.04
MUNN2-13	35.35	29.36	15.13	21.42	38.15	32.78
MUNN2-14	33.25	29.99	29.40	20.76	36.75	28.02
MUNN2-15	48.25	24.01	15.75	22.25	53.75	34.12
MUNN2-17	45.20	28.15	12.60	18.70	47.80	33.19
MUNN2-22	31.25	30.69	13.30	20.45	30.10	29.03
MUNU-22	52.20	27.35	10.97	21.49	29.60	33.85
MUNU-44	30.17	33.17	8.87	20.93	21.00	33.05
MUNU-49	40.05	25.32	9.57	17.99	30.80	30.85

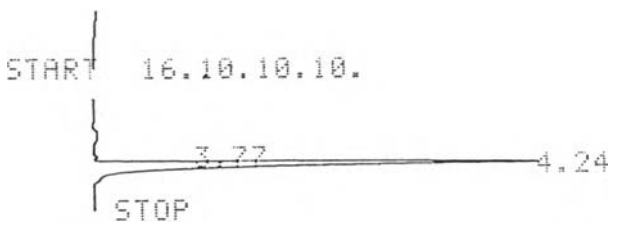
เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรด โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร กับเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ของสายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L พบว่าสายพันธุ์กลายส่วนมากจะผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นทั้งที่เมื่อใช้กลูโคส 120กรัมต่อลิตรและเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ยกเว้นสายพันธุ์ MUNU-44 เท่านั้นที่ผลิตกรดได้ปริมาณใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้นในอาหารที่ใช้กลูโคส 120 กรัมต่อลิตร อาจเนื่องมาจากเมื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ สายพันธุ์ MUNU-44 เกิดการเปลี่ยนแปลงช่วงที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ส่วนประสิทธิภาพของวิถีเมตาบอลิสมของการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดนั้นไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นเมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจึงผลิตกรดได้ใกล้เคียงกับสายพันธ์ตั้งต้น

ส่วนสายพันธุ์กลายที่เหลือทั้งหมด พบว่าสามารถผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L มากทั้งที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้กลูโคส 120 กรัมต่อลิตรและเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งอาจเนื่องมาจากในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เชื้อกลุ่มนี้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลและประสิทธิภาพของวิถีเมตตาบอลิสมของการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดสูงขึ้น จึงส่งผลให้เชื้อในกลุ่มนี้ผลิตกรดได้สูงทั้งที่เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังและใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

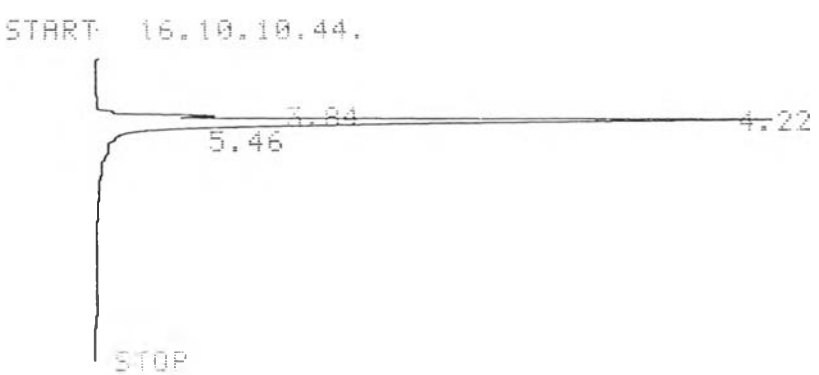
จากการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 120 กรัมต่อลิตรกับเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สายพันธุ์ MUN2-61, MUNN2-8, MUNN2-22, MUNU-22, MUNU-44 และ MUNU-49 ผลิตกรดได้ต่ำเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความไวต่อแรงกระแทก ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ความหนืดของอาหารจะต่ำกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นเมื่อนำเชื้อดังกล่าวข้างต้นมาเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้รับแรงกระแทกสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน จึงทำให้ผลิตกรดต่ำลง ปรากฏการณ์ดังกล่าวถูกพบโดย Usami และ Taketomi, 1960; Smith และ Lilly, 1990; Toma และคณะ, 1991; Morimura และคณะ, 1992 และRugsaseel และคณะ, 1993

9 ผลการหาปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC)

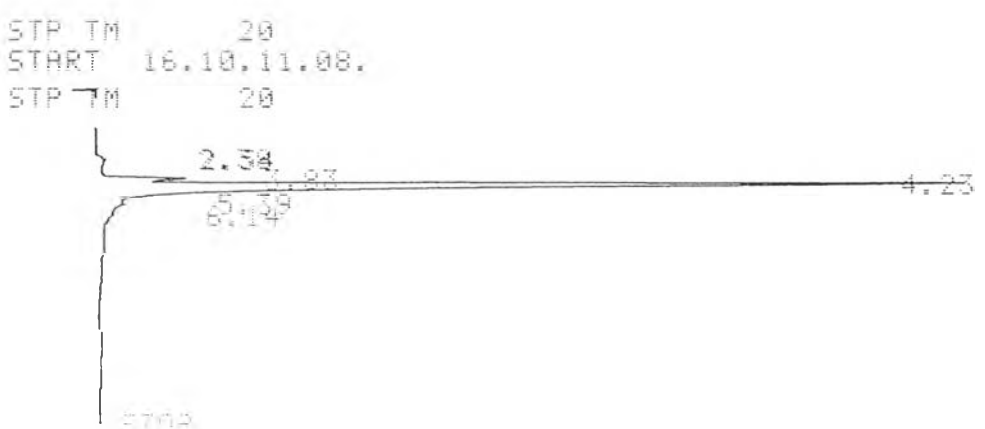
เมื่อวิเคราะห์กรดกรดมะนาวโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) โดยใช้ภาวะในการตรวจพิสูจน์เช่นเดียวกับการทดลองของ อรพิณ อุดมพงศ์อนันต์ (2533) ตามวิธีทำการทดลองข้อ 7 เมื่อเปรียบเทียบชนิดของสารที่ถูกแยกออกมาได้ (ปรากฏเป็นแท่งกราฟ, peak) ในการวิเคราะห์กรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 23) จะปรากฏแท่งกราฟของกรดมะนาวอย่างชัดเจนที่เวลา (retention time) 4.2 นาที ในทำนองเดียวกันการวิเคราะห์หากรดมะนาวในน้ำหมัก ที่ได้จากการหมักในสายพันธุ์ตั้งต้น *A. niger* WU-2223L พบว่าปรากฏแท่งกราฟที่เด่นชัด ณ เวลา 4.22 นาที และในกรณีของสายพันธุ์กลายสายพันธุ์ MUNU-22 พบว่าจะปรากฏแท่งกราฟเด่นชัด ณ เวลาประมาณ 4.23 นาที ดังแสดงในรูปที่ 24 และรูปที่ 25 ส่วนสายพันธุ์กลายอื่นๆจะปรากฏแท่งกราฟของกรดมะนาวอย่างชัดเจนที่เวลาประมาณ 4.2 นาที เช่นเดียวกัน (ไม่ได้แสดงรูป)



รูปที่ 23 ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 24 ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ที่ได้จากสายพันธุ์ดั้งต้น WU-2223L



รูปที่ 25 ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลายรหัส MUNU-22

จากผลการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบชนิดของสารที่ถูกแยกออกมาได้ (ปรากฏเป็นแท่งกราฟ, peak) และปริมาณสารที่ถูกแยก (พื้นที่ใต้กราฟ) ภายหลังจากที่ทำการวิเคราะห์นานประมาณ 20 นาที พบว่าปรากฏพีคอื่นน้อยมาก แสดงให้เห็นว่ากรดอินทรีย์ ที่สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย MUNU-22 ผลิตนั้นส่วนมากเป็นกรดมะนาว

ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตโดยสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L และสายพันธุ์กลายทั้ง 11 สายพันธุ์ โดยการเปรียบเทียบจากการหาปริมาณกรดมะนาวโดยการไทเทรดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล และจากการใช้วิธี HPLC โดยการเทียบจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ง หมายเลข 4) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 21

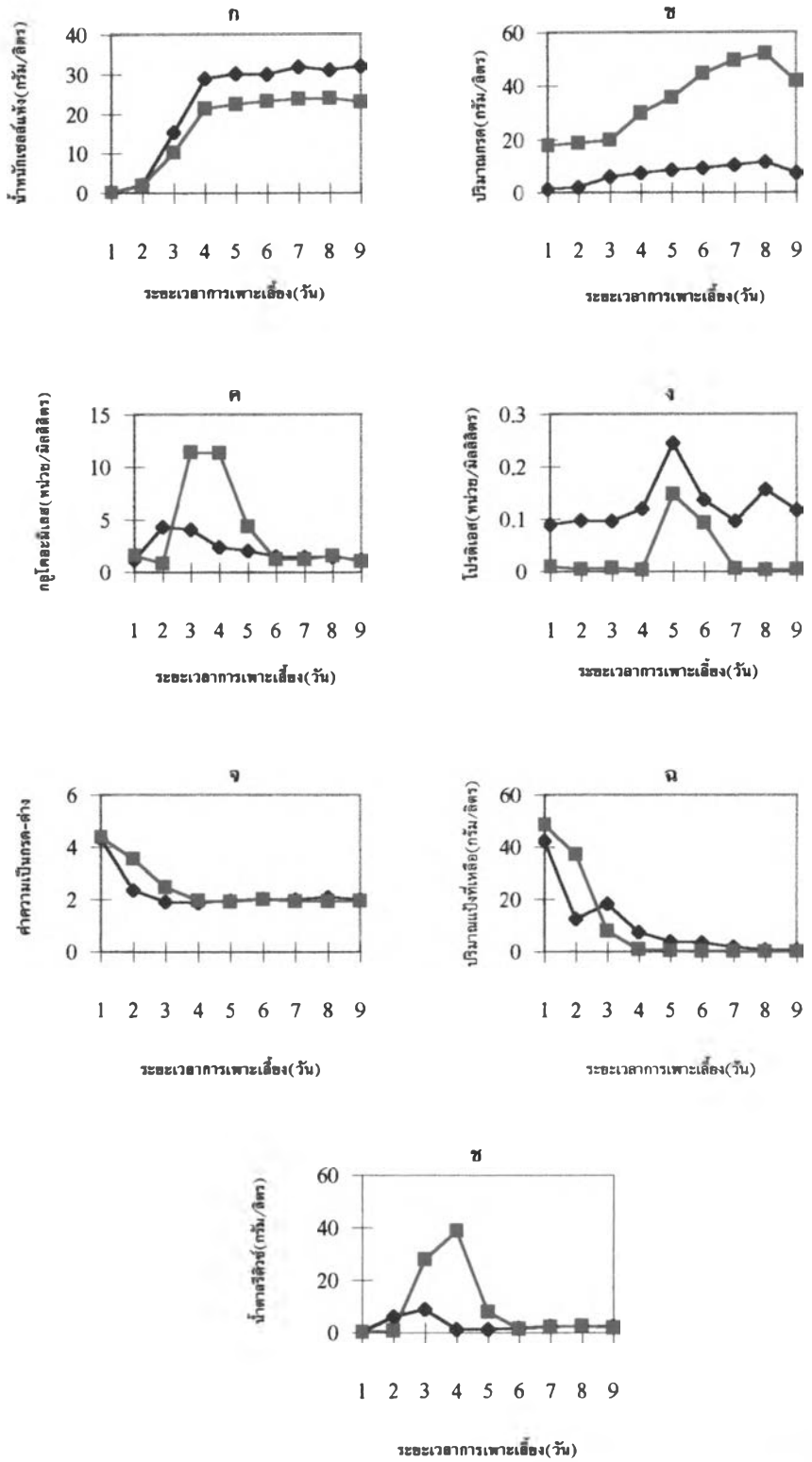
ตารางที่ 21 ผลการเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ที่วิเคราะห์โดยวิธีไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล กับวิธี HPLC

เชื้อทดสอบ	ปริมาณกรดที่หาได้จากการไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 นอร์มัล (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรดมะนาวที่หาได้จากการเทียบกราฟมาตรฐานด้วยวิธี HPLC (กรัม/ลิตร)	เปอร์เซ็นต์กรดมะนาว
WU-2223L	11.95	12.76	100
MUN2-61	47.29	35.71	75.52
MUN2-64	48.75	45.62	93.58
MUNN2-8	39.90	40.65	100
MUNN2-13	30.94	25.91	83.75
MUNN2-14	32.61	28.40	87.09
MUNN2-15	48.02	44.65	92.98
MUNN2-17	46.57	36.57	78.53
MUNN2-22	33.00	23.23	70.39
MUNU-22	54.57	51.16	93.76
MUNU-44	29.05	23.25	80.04
MUNU-49	42.93	41.23	96.04

จากตารางที่ 21 พบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่วิเคราะห์โดยการการไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล เปรียบเทียบกับปริมาณกรดมะนาวที่หาได้จากการคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC จะมีค่าแตกต่างกันระหว่างวิธีทั้งสองอยู่ในช่วง 0 ถึง 29.61 โดยพบว่าสายพันธุ์ MUNU-22 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตกรดได้สูงสุดสามารถผลิตกรดอินทรีย์ที่เป็นกรดมะนาวได้ 51.16 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 4 เท่า (สายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L สามารถผลิตกรดอินทรีย์ที่เป็นกรดมะนาวได้ 12.76 กรัมต่อลิตร)

10 ผลการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสายพันธุ์กลาย MUNU-22 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L

จากสายพันธุ์กลายทั้ง 11 สายพันธุ์เลือกสายพันธุ์รหัส MUNU-22 มาศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L โดยการติดตามการเจริญ การผลิตกรดมะนาว ค่าความเป็นกรดด่าง ความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและโปรติเอส รวมทั้งปริมาณแป้งที่เหลือ โดยทำการเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองในข้อ 4 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 26



รูปที่ 26 แผนภูมิเปรียบเทียบคุณสมบัติของสายพันธุ์กลายMUNU-22กับสายพันธุ์ดั้งต้นWU-2223Lเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรSL

รูป ก การเจริญ

รูป ข ปริมาณกรด

รูป ค กลูโคอะมิเลสแอคติวิตี

รูป ง โปรติเอสแอคติวิตี

รูป จ ค่าความเป็นกรด-ด่าง

รูป ฉ ปริมาณแป้งที่เหลือ

รูป ช น้ำตาลรีดิวซ์

สัญญลักษณ์ —◆— WU-2223L

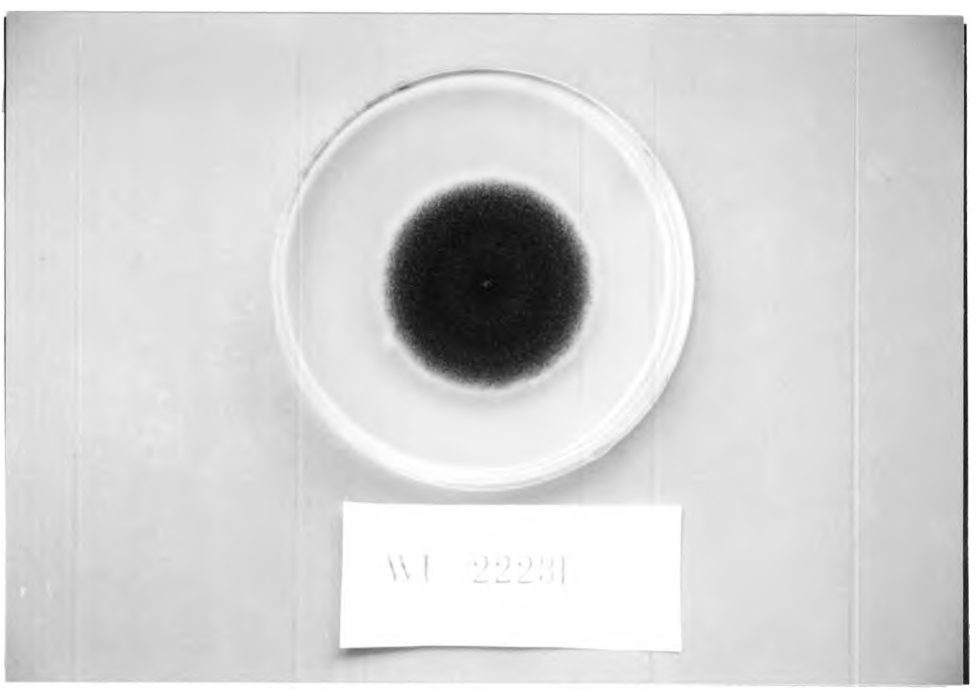
—■— MUNU-22

จากรูปที่ 26 (ก) เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลาย MUNU-22 และสายพันธุ์ดั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรด เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าทั้งสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งต้น จะค่อยๆผลิตกรดจนกระทั่งสูงสุดในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยสายพันธุ์กลายจะผลิตได้สูงสุดที่ 52 กรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ดั้งต้นผลิตได้ 11.50 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปเป็นวันที่ 9 พบว่าปริมาณกรดจะลดลงทั้งสองสายพันธุ์ ส่วนการเจริญของเชื้อพบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญใกล้เคียงกัน (รูปที่ 26 ข) จากการติดตามโปรติเอสแอคติวิตี ของสายพันธุ์กลาย MUNU-22 และสายพันธุ์ดั้งต้น พบว่าสายพันธุ์กลายในระยะ 2-3 วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ จะมีโปรติเอสแอคติวิตีต่ำมาก จากนั้นจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งสูงที่สุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อเป็น 0.15 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นแอคติวิตีจะค่อยๆลดลง ส่วนสายพันธุ์ ดั้งต้นก็เป็นไปในทำนองเดียวกัน โดยโปรติเอสแอคติวิตีจะสูงที่สุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อเป็น 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร จะเห็นว่าตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อโปรติเอสแอคติวิตีในสายพันธุ์กลาย MUNU-22 จะต่ำกว่าในสายพันธุ์ดั้งต้น กรณีการติดตามกลูโคอะมิเลสแอคติวิตี พบว่า (รูปที่ 26 ค) ในสายพันธุ์กลาย MUNU-22 กลูโคอะมิเลสแอคติวิตีจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อเป็น 11.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นจะค่อยๆลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ สำหรับสายพันธุ์ดั้งต้น จะมีกลูโคอะมิเลสแอคติวิตีสูงที่สุดในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อเช่นกัน แต่จะมีค่าสูงสุดเพียง 4.31 หน่วยต่อมิลลิลิตร เท่านั้นซึ่งต่ำกว่าในสายพันธุ์กลาย นอกจากนี้ยังพบว่าตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ กลูโคอะมิเลสแอคติวิตีในสายพันธุ์ดั้งต้น จะต่ำกว่าในสายพันธุ์กลาย MUNU-22 กรณีการติดตามค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าทั้งในสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งต้น ระยะแรกของการเลี้ยงเชื้อค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะสูงจากนั้นจะค่อยๆลดลง และค่อนข้างคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 26 ง) จากการติดตามปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ในสายพันธุ์กลาย MUNU-22 มีอัตราการใช้แป้งสูงกว่า WU-2223L โดยพบว่าในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อจะเหลือปริมาณแป้งน้อยมาก ในขณะที่ในสายพันธุ์ดั้งต้น ปริมาณแป้งจะค่อยๆลดลงจนกระทั่งหมดในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 26 จ) จากการติดตามปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในน้ำหมักพบว่าวันแรกๆของการหมักจะตรวจพบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในปริมาณต่ำ แต่เมื่อหมักต่อไปถึงวันที่ 2 และ 3 ทั้งสายพันธุ์ดั้งต้นและสายพันธุ์จะตรวจพบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงขึ้น ทั้งนี้เพราะเป็นระยะเวลาเดียวกันกับที่เชื้อมีแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสสูง ดังนั้นเอนไซม์ดังกล่าวจะย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นเป็นน้ำตาล จึงทำให้สามารถตรวจพบปริมาณน้ำตาลสูง เมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะค่อยๆลดลง

จนกระทั่งเกือบหมดในวันที่ 6 ของการหมัก ทั้งนี้เนื่องมาจากเมื่อแป้งถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลแล้วเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองสามารถนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปใช้ต่อไปได้ ส่งผลให้เราตรวจพบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป

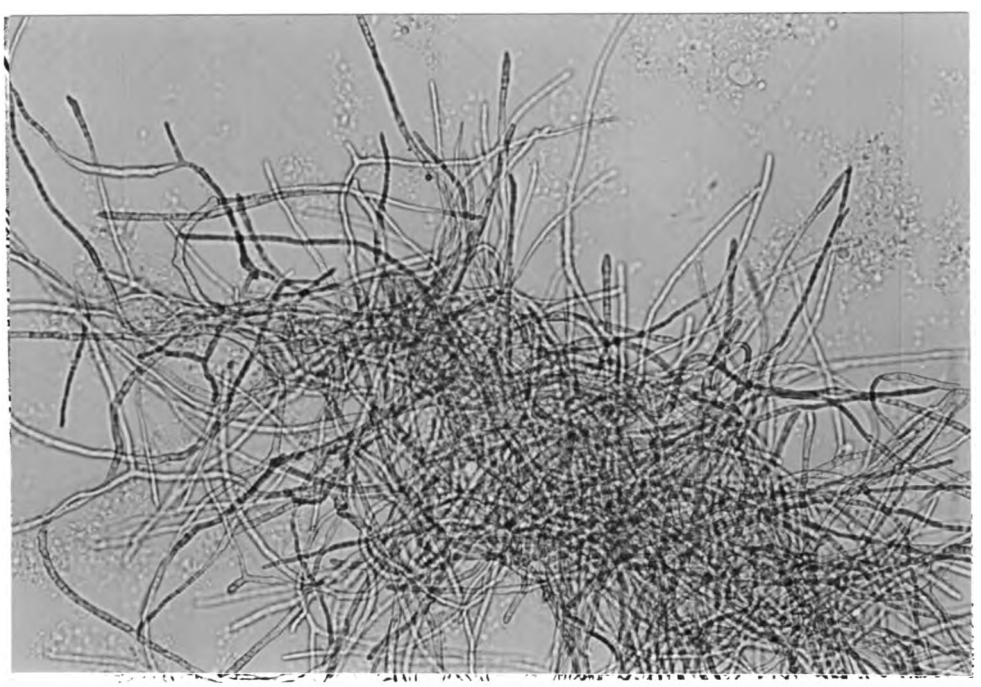
11 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์กลาย MUNU-22 และสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L

นำสายพันธุ์กลาย MUNU-22 และสายพันธุ์พันธุ์ตั้งต้น WU-2223L มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ เป็นเวลา 5-10 วัน และเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวตามวิธีการทดลองในข้อ 4 นาน 72 ชั่วโมง นำสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ตั้งต้นมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยดูด้วยตาเปล่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดไลต์ไมโครสโคป (light microscope) ซึ่งลักษณะของเชื้อทั้งสองแสดงดังรูปที่ 27 ถึงรูปที่ 32

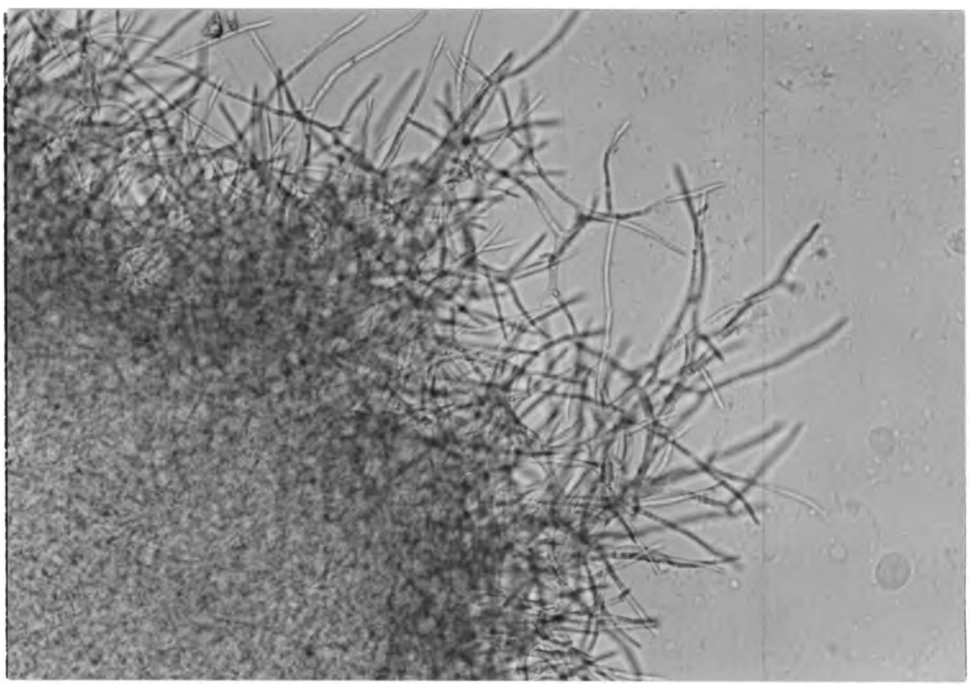


รูปที่ 27 ลักษณะการเจริญของ *A. niger* WU-2223L อายุ 6 วันบนอาหารวุ้น PDA

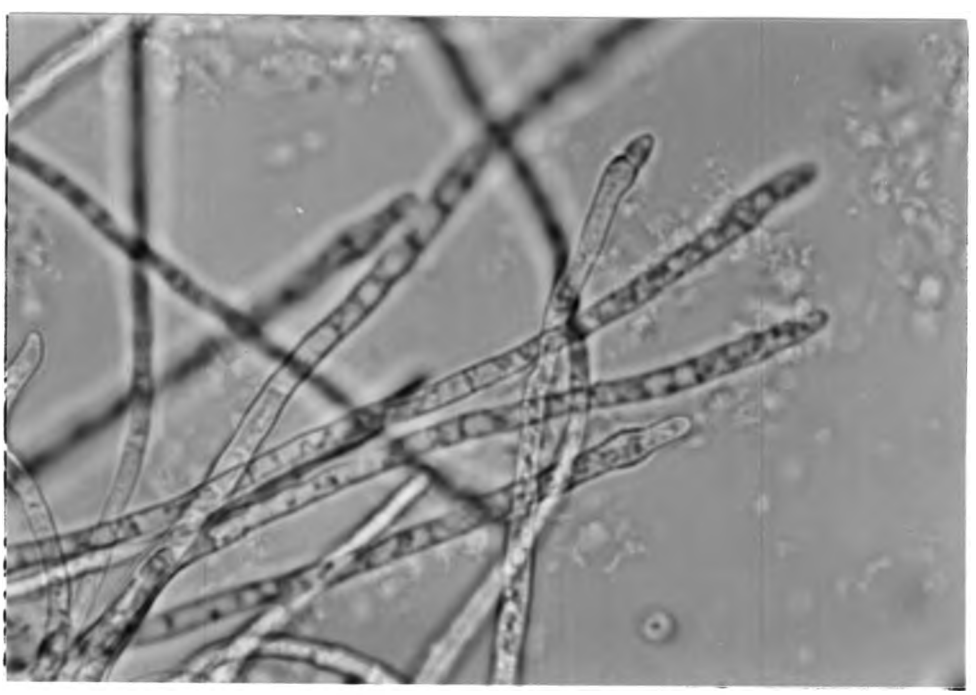
รูปที่ 28 ลักษณะการเจริญของ *A. niger* MUNU-22 อายุ 6 วันบนอาหารวุ้น PDA



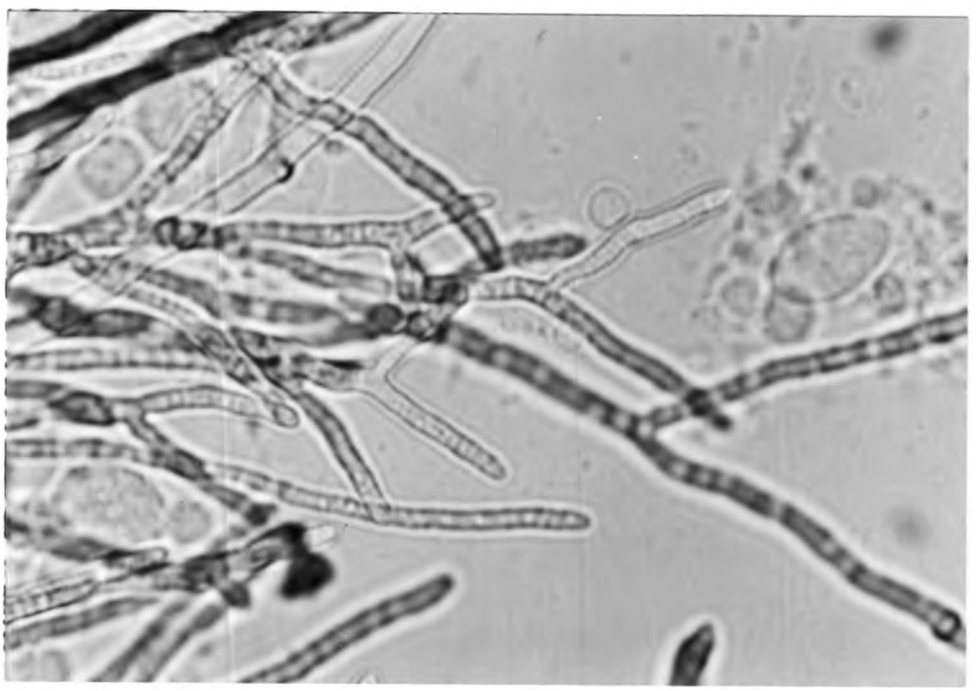
รูปที่ 29 ลักษณะเส้นใยของสายพันธุ์ตั้งต้น *A. niger* WU-22223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวนาน 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไลต์ไมโครสโคป กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 30 ลักษณะเส้นใยของสายพันธุ์กลาย *A. niger* MUNU-22 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวนาน 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไลต์ไมโครสโคป กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 31 ลักษณะเส้นใยของสายพันธุ์ตั้งต้น *A. niger* WU-2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวนาน 72 ชั่วโมงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไลต์ไมโครสโคป กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 32 ลักษณะเส้นใยของสายพันธุ์กลาย *A. niger* MUNU-22 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวนาน 72 ชั่วโมงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไลต์ไมโครสโคป กำลังขยาย 400 เท่า

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L พบว่า เมื่อเลี้ยงบนจานอาหาร PDA นาน 6 วัน จะมีโคโลนีขนาดใหญ่ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของการเจริญเท่ากับ 5.2 เซนติเมตร ขอบโคโลนีเรียบ สร้างสปอร์เป็นสีดำ และเมื่อตรวจดูลักษณะของเชื้อเมื่อเลี้ยงโดยอาศัยเทคนิคการเลี้ยงบนแผ่นสไลด์พบว่าการเจริญของเส้นใยไม่ค่อยหนาแน่น ลักษณะเส้นใยจะเจริญออกไปทางยาวมากกว่ามีการแตกแขนง สร้างสปอร์บริเวณปลายเส้นใย มีผนังกั้นระหว่างเซลล์ (septum) เมื่อตรวจดูลักษณะเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดพบว่าเส้นใยจะเจริญเกาะกันเป็นเม็ดกลมๆ (pellet) เป็นจำนวนมาก เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า เส้นใยมีลักษณะบางกระจาย ยาวและมีการแตกแขนงน้อย ไม่ค่อยพบลักษณะที่เป็นปุ่ม (bobus cell) มากนัก

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราสายพันธุ์กลาย MUNU-22 ที่มีอายุเท่ากับ WU-2223L พบว่า การเจริญบนจานอาหาร PDA นาน 6 วัน จะน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งต้นคือมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของการเจริญเท่ากับ 1.9 เซนติเมตร ขอบโคโลนีไม่เรียบ สร้างสปอร์สีดำ และเมื่อตรวจดูลักษณะของเชื้อเมื่อเลี้ยงโดยอาศัยเทคนิคการเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์ พบว่ามีการเจริญของเส้นใยน้อยมาก เส้นใยมีการแตกแขนงมากกว่าในสายพันธุ์ดั้งต้น การสร้างสปอร์จะเกิดบริเวณส่วนปลายของเส้นใย เส้นใยมีผนังกั้น เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดพบว่าเส้นใยมีการเจริญเกาะกันเป็นกลุ่มขนาดเล็ก และเมื่อนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศ์พบว่าเส้นใยเกาะกลุ่มกันแน่นมาก เส้นใยจะมีลักษณะเป็นเส้นสั้นๆ มีการแตกแขนงเป็นจำนวนมากและมีขนาดเล็กกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น นอกจากนี้ยังพบลักษณะที่เป็นปุ่มเป็นจำนวนมาก