หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปและวิจารย์ผลการวิจัย

Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 เป็นราที่แยกโดย เอก แสงวิเชียร (2531) และรายงานว่า มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้สูงสุด 42 หน่วยต่อมล. ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อได้ทำการศึกษาสมบัติของเดกซ์แทรนเนส ในภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าให้แอคติวิตีสูงสุดประมาณ 80 หน่วยต่อมล. เมื่อนำเชื้อรานี้มาเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ในงานวิจัยนี้ การศึกษาเริ่มโดยการหาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส เมื่อเลี้ยงราสายพันธุ์ตั้งต้น *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 ในภาวะมาตรฐาน เพื่อใช้เปรียบเทียบกับรากลายพันธุ์ โดยทำการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มี 1% เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ (ภาคผนวก ก) ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 บ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้อง อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าให้แอคติวิตีสูงสุดประมาณ 86.46 หน่วยต่อมล.

การศึกษาการเจริญ การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และค่าแอคติวิตีจำเพาะ ของรา *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 พบว่า มีการเจริญสูงสุด วัดจากน้ำหนักแห้งของเซลล์ในช่วง 1-2 วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในน้ำเลี้ยงเชื้อต่ำ ตรงกับรายงานของเอก แสงวิเชียร (2531) และสุภาพร ชาติวรพงศา (2536) ว่า ในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจะมีการสร้างออกมามาก แต่ต้องนำไปใช้ในการย่อยเดกซ์แทรน ให้อยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเล็ก เพื่อจะสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของเซลล์ จนเมื่อปริมาณเดกซ์แทรนในอาหารเริ่มลดลง แต่การสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสยังคงมีอยู่ จึงตรวจพบเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อมากขึ้น ในช่วงกลางของการเลี้ยงเชื้อ และยังคงอยู่ในระดับค่อนข้างคงที่ จนถึงช่วงสุดท้ายของการเลี้ยง ขณะที่การเจริญเริ่มลดระดับลง เนื่องจากปริมาณเดกซ์แทรนลดลง นอกจากนี้ การพบว่าช่วงที่มีเอนไซม์สูงสุดในน้ำเลี้ยงเชื้อ เป็นช่วงหลังของการเจริญเติบโต อาจมีสาเหตุมาจากการสลายตัวของเซลล์ ในช่วง death phase ทำให้เอนไซม์ที่สร้างอยู่

ภายในเซลล์ ถูกปลดปล่อยออกมาสู่น้ำเลี้ยงเชื้อภายนอก จึงตรวจพบเอนไซม์ในปริมาณที่สูง ส่วนค่าแอคติวิตีจำเพาะ จะให้ผลสอดคล้องกับปริมาณเอนไซม์ที่เชื้อผลิตได้ เนื่องจากโปรตีนที่วัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ มีปริมาณไม่แตกต่างกันมากนัก

เมื่อนำรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 มากลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้สปอร์เริ่มต้น 1.8×10^3 สปอร์ต่อมล. ซึ่งปริมาณสปอร์ที่ใช้ในการฉายแสงนี้ ได้มาจากการทดลองแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้น เพื่อให้ได้ค่าที่เมื่อนำมาฉายแสงและบ่มเลี้ยงบนอาหารแข็งแล้ว จะให้จำนวนโคโลนีต่อจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 250 โคโลนี โดยไม่ต้องทำการเจือจางสปอร์ ซึ่งแตกต่างจากวิธีการของผู้วิจัยอื่นๆ (Carlton and Brown, 1981 ; Hoffman and Wood, 1985) ทั้งนี้มีผลเนื่องจาก การทดลองขั้นต้นพบว่า การเจือจางสปอร์ให้มีความหนาแน่นเหมาะสมต่อการเจริญบนจานเลี้ยงเชื้อ มักทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วยจุลชีพอื่นๆ

การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต มักนิยมใช้ในการกลายพันธุ์ครั้งแรกของเชื้อจุลินทรีย์ และจะให้เชื้อกลายพันธุ์ที่ดี ในช่วงที่มีการรอดของสปอร์ 0.01 - 5.0 % (Miller, 1972 ; Fantini, 1975) หลังจากบ่มเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน เพื่อป้องกันการเกิดปรากฏการณ์ Photoreactivation พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 คือการฉายแสงอุลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่างจากแหล่งแสง 30 เซนติเมตร เป็นเวลา 4-10 นาที โดยเป็นช่วงที่มีการรอดของสปอร์ 0.15-5.24 % เมื่อพิจารณาเวลาในการฉายแสงที่เหมาะสม จะพบว่าใช้เวลานานกว่าที่มีการรายงานถึงการกลายพันธุ์เชื้อในกลุ่มเดียวกัน เช่น โชตนา ประมวลวัลลิกุล (2534) ได้รายงานสภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ รา *Penicillium chrysogenum* ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต เป็นเวลา 120 วินาที แต่อย่างไรก็ตาม ภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลชีพด้วย สำหรับในกรณีนี้ อาจเป็นไปได้ว่า *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เป็นราที่แยกได้จากธรรมชาติ จึงมีความทนทานต่อแสงอุลตราไวโอเลตค่อนข้างสูง ส่วนเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์มาก่อน จะมีอัตราการรอดต่ำกว่า

จากราที่กลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตทั้งสิ้น 310 สายพันธุ์ นำมาทดสอบการเกิดบริเวณใส พบว่า การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยวิธีกล่องโลหะ มีประสิทธิภาพค่อนข้างดี คือสามารถคัดเลือกเชื้อได้เหลือเพียง 67 สายพันธุ์ ข้อดีของการใช้วิธีนี้คือ สะดวก สามารถคัดเลือกเชื้อได้ครั้งละจำนวนมาก ใช้เวลาน้อยในการบ่มเลี้ยงและวัดความกว้างของบริเวณใส ประหยัดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและเอธานอล 95% ที่ใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้ยังเป็นอุปกรณ์ที่สามารถทำได้ง่าย ราคาถูก เหมาะสำหรับการคัดเลือกเชื้อในขั้นปฐมภูมิ จะมีประโยชน์ในการคัดเลือกเชื้อจำนวนมากต่อไป แต่ข้อบกพร่องของวิธีนี้คือ เมื่อบ่มเลี้ยงในกล่องโลหะปิดฝาจะเป็นภาวะที่ไม่มีแสง และต้องพันเทปกาวรอบฝากล่อง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนด้วยเชื้ออื่น ทำให้อากาศหมุนเวียนภายในกล่องน้อยกว่าปกติ นอกจากนี้ บริเวณของการเจริญของเชื้อค่อนข้างน้อย (ภายในกระดุมเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร) อาจเป็นการจำกัดการเจริญของเชื้อ ดังนั้น จึงต้องนำเชื้อที่คัดเลือกได้ มาทดสอบการเกิดบริเวณใสในจานเพาะเลี้ยงเชื้ออีกครั้งหนึ่ง เพื่อคัดปัญหาดังที่กล่าวไปแล้ว และพบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อเพื่อทดสอบในขั้นทุติยภูมิได้เพียง 27 สายพันธุ์

การคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิ พบว่า มีรากลายพันธุ์ 12 สายพันธุ์ที่มีการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้สูง และสายพันธุ์ SMCU 1-80 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 152.07 หน่วยต่อมล. ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ คิดเป็น 1.7 เท่าของ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม เมื่อศึกษาการเจริญพบว่า รากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 มีการเจริญน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ ตรงตามรายงานของ อรพิน ภูมิภมร (2527) ว่าเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ จะมีลักษณะและการเจริญเปลี่ยนไป เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงภายในหน่วยพันธุกรรม ความสัมพันธ์ของการเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จะมีรูปแบบคล้ายคลึงกับ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 โดยจะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุด หลังจากมีการเจริญสูงสุดแล้ว ส่วนค่าแอคติวิตีจำเพาะ ก็จะให้ผลสอดคล้องกับการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

การทดสอบความเสถียรของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 1-80 โดยนำมาถ่ายเชื้อและทดสอบการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ในช่วงอายุเชื้อต่างๆ พบว่าเมื่อมีการถ่ายเชื้อถึงสัปดาห์ที่ 41 การผลิตเอนไซม์ลดต่ำลงและไม่เพิ่มขึ้น แม้จะทดสอบต่อไปจน

ถึงสัปดาห์ที่ 48 แสดงให้เห็นว่า เชื้อเกิดการย้อนกลับ เนื่องจาก เชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต อาจเกิดการซ่อมแซมดีเอนเอที่เปลี่ยนไป ด้วยกระบวนการ Photoreactivation หรือ การซ่อมแซมแบบ Excision ทำให้กลับเป็นสายพันธุ์เดิม หรือคุณสมบัติเปลี่ยนไปได้ (Goodenough, 1984)

จากการศึกษาการกลายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยสารเคมี NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) พบว่า มักคัดเลือกโคโลนีในช่วงที่มีเปอร์เซนต์รอดของสปอร์ 0-50 % ซึ่งเป็นช่วงที่มีการกลายพันธุ์ได้ดีที่สุด (Miller,1972 ; Fantini, 1975 ; Carlton and Brown, 1981) เมื่อนำสปอร์ของ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 1-80 มากลายพันธุ์ซ้ำด้วยสาร NTG จึงคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ โดยใช้สาร NTG ความเข้มข้น 0.3 มก.ต่อมล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 20 - 40 นาที ซึ่งเป็นช่วงที่ให้เปอร์เซนต์การรอดของสปอร์ อยู่ในช่วงกึ่งกลาง คือ ประมาณ 10 - 30 %

การคัดเลือกเชื้อราที่กลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ทั้งหมด 520 สายพันธุ์ ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิแล้ว พบว่ามีเชื้อรา 30 สายพันธุ์ ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้มากกว่า *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 แต่เนื่องจาก ราตั้งต้นในการกลายพันธุ์ครั้งนี้ คือ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 1-80 เกิดการย้อนกลับของสายพันธุ์ เมื่อนำมากลายพันธุ์ต่อ ราที่คัดเลือกได้จึงมีการผลิตเอนไซม์ได้น้อยกว่าที่สายพันธุ์ SMCU 1-80 เคยผลิตได้ ดังนั้น จึงนำราที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG และได้คัดเลือกไว้แล้วนี้ มากลายพันธุ์ซ้ำด้วยสาร NTG อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้สภาวะในการกลายพันธุ์เหมือนครั้งแรก

จากการศึกษาพบว่า การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ มีผลทำให้รามีคุณสมบัติและลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Brown et al., 1987) ในการทดลองนี้ ต้องการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในรูปแบบต่างๆ มากที่สุด ดังนั้น จึงนำราที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG และผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้มากที่สุด 4 สายพันธุ์ มากลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ครั้งที่สอง และทำการคัดเลือก พบว่า รากลายพันธุ์ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 3-14 ซึ่งกลายพันธุ์มาจาก *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 2-86 สามารถผลิต

เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้สูงที่สุด 330.17 หน่วยต่อมล.ในวันที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ คิดเป็น 3.81 เท่าของ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61

ลักษณะการเจริญ การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และค่าแอคติวิตีจำเพาะ ของรากลายพันธุ์ SMCU 3-14 จะให้รูปแบบคล้ายคลึงกับ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 และรากลายพันธุ์ SMCU 1-80 ซึ่งได้ศึกษาไว้แล้ว คือจะมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะรากลายพันธุ์นี้ มีการเจริญสูงสุดมากกว่า *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 ส่วนการผลิตเอนไซม์จะเริ่มสูงขึ้นหลังการเจริญสูงสุด และผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในช่วงท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นช่วงที่มีการ lysis ของเซลล์ ส่วนค่าแอคติวิตีจำเพาะ จะให้ผลสอดคล้องกับการผลิตเอนไซม์

การทดสอบความเสถียรในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยการทดสอบในอาหารเหลว ทำการถ่ายเลี้ยงเชื้อเป็นจำนวน 20 ครั้ง พบว่า การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสค่อนข้างคงที่ และลดลงเล็กน้อยในบางครั้ง ค่าที่แปรปรวนนี้ อาจมีผลจากการที่การบ่มเลี้ยงรา กระทำที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีความผันแปรของอุณหภูมิ ทำให้ผลการผลิตเอนไซม์ไม่คงที่ เมื่อตรวจลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใย การสร้างสปอร์ จะเห็นได้ว่า เมื่อนำ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 มาฉายแสงอุลตราไวโอเลต สีของเส้นใยและลักษณะโคโลนี ของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 จะเปลี่ยนไปอย่างชัดเจน แต่เมื่อนำมากลายพันธุ์ด้วยสาร NTG รากลายพันธุ์ SMCU 3-14 จะให้ลักษณะโคโลนีเหมือนเดิม ตามที่มีรายงานว่า การกลายพันธุ์อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายนอกหรือไม่ก็ได้ (อรพิน ภูมิภมร, 2527) แต่ลักษณะการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่สามารถบ่งถึง ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบลักษณะของสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์ ในราทั้ง 3 สายพันธุ์ ก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ ยังคงมีลักษณะของเชื้อในกลุ่ม Penicillium อยู่

เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโต และการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ดังนั้น จึงได้นำรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 มาศึกษา

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิห้อง หรืออุณหภูมิ 30-35 °ซ เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ของรากลายพันธุ์นี้ ใกล้เคียงกับราชนิดอื่นๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วนที่อุณหภูมิ 25 °ซ และ 40 °ซ มีการเจริญและการผลิตเอนไซม์ ตลอดจนค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่า สำหรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ช่วงที่เหมาะสมแก่การเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของรากลายพันธุ์ SMCU 3-14 ค่อนข้างมีภาวะเป็นกรด คือที่ความเป็นกรดด่าง 4.0 ซึ่งภาวะนี้ ค่อนข้างจะแตกต่างจากเชื้อราอื่นๆ แต่เนื่องจากเชื้อรานี้เป็นเชื้อรากลายพันธุ์ จึงอาจมีภาวะการเจริญที่แตกต่างไปจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากธรรมชาติ และจากค่าแอคติวิตีจำเพาะ พบว่า ในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0 - 7.0 จะให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าที่ 4.0 อาจเนื่องมาจาก ในภาวะที่เป็นกรด เชื้อมีการเจริญและสร้างโปรตีนอื่นๆ ออกมาในปริมาณมาก จึงทำให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่าสภาพที่เป็นกลาง โดยเอนไซม์ที่นำมาตรวจสอบแอคติวิตี มาจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยตรงโดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ก่อน จึงไม่สามารถทำนายโดยค่าแอคติวิตีจำเพาะได้ ดังนั้น จึงเลือกเอาความเป็นกรดด่าง 4.0 เป็นภาวะเหมาะสมในการเลี้ยงรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ซึ่งให้ปริมาณเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้นเป็น 390 หน่วยต่อมล. ในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ

จากการทดลองหาปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยลดปริมาณเดกซ์แทรนลง และทดแทนด้วยน้ำตาลกลูโคส แม้จะมีรายงานว่า เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัยเดกซ์แทรน เป็นตัวชักนำการสร้างเอนไซม์ (Fukumoto et al., 1971 ; Joshi, 1975 ; Galvez-Mariscal and Lopez-Munguia, 1991) การใช้สารชักนำที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก หรือมีจำนวนหน่วยกลูโคสสั้น ในรูปไดเมอร์หรือโอลิโกเมอร์ จะชักนำการสร้างเอนไซม์ได้ไม่ดีเท่ากับการใช้โพลีเมอร์ โดยเฉพาะกลูโคส ไม่มีผลต่อการชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (Tsuru et al., 1971 ; Fukumoto et al., 1971 ; Koenig and Day, 1989) แต่จากรายงานของ Koenig และ Day (1989) ว่ามีการนำเชื้อยีสต์ *Lipomyces starkeyi* ATCC 20825 ซึ่งผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต มาทดสอบคุณสมบัติการเป็น Constitutive ของเชื้อ โดยใช้สารชนิดอื่นที่มีราคาถูก ชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส แทนการใช้เดกซ์แทรนเป็นสาร

ตารางที่ 10 ภาวะที่เหมาะสม และปริมาณการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°ซ)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	เดกซ์แทรนเนส (หน่วยต่อมล.)
Aspergillus carneus	Tsuru et al., 1971	28	8.5	140
Penicillium luteum ATCC9644	Fukumoto et al., 1971	30	6.0	13
P. aculeatum NSI4	Shukla et al., 1989	30-35	5.5-6.0	230
Paecilomyces lilacinus	Galvez-Mariscal 1991	28	5.8	42
Lipomyces starkeyi	Koenig, 1988	30	3.0	14.5
Penicillium sp. SMCU 3-14	งานวิจัยนี้	30-35	4.0	390

ชักนำ แต่ก็พบว่า การใช้กลูโคสในการเลี้ยงเชื้อยีสต์นี้ ไม่สามารถชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ ในการทดลองนี้ จึงนำรากลายพันธุ์ SMCU 3-14 มาเลี้ยงในอาหารที่มีการลดปริมาณเดกซ์แทรนลง เพิ่มเติมด้วยกลูโคสในเปอร์เซนต์ที่เท่ากัน เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 พบว่าน้ำตาลกลูโคสมีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อ เนื่องจากอยู่ในรูปที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ทันที และมีผลต่อการเจริญของสายพันธุ์ดั้งเดิม มากกว่ารากลายพันธุ์ แต่การใช้ 1% เดกซ์แทรน ก็ยังเหมาะสมที่สุดในการชักนำการสร้างเอนไซม์ ในราทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า ในอาหารที่มี 1% กลูโคสอย่างเดียว พบว่า สายพันธุ์ดั้งเดิมไม่มีการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเลย ในขณะที่รากลายพันธุ์มีการผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณต่ำ ประมาณ 12 หน่วยต่อมล. อาจเป็นไปได้ว่า รากลายพันธุ์มีคุณสมบัติของเชื้อเป็น constitutive จึงทำการเลี้ยงรากลายพันธุ์ SMCU 3-14 ในอาหารที่ไม่มีเดกซ์แทรน ถ่ายเลี้ยงเชื้อเป็นจำนวน 5 ครั้ง พบว่าการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จะมีปรากฏในการถ่ายเลี้ยงเชื้อครั้งที่ 1 เท่านั้น ส่วนการถ่ายเลี้ยงเชื้อในครั้งต่อๆมา มีการสร้างเอนไซม์ต่ำมาก จนถือว่าไม่มีการสร้าง ดังนั้น จึงอาจพอตั้งสมมุติฐานได้ว่า รากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ไม่ได้มีคุณสมบัติของเชื้อเป็น constitutive ยังคงต้องการเดกซ์แทรนในการชักนำการสร้างเอนไซม์ แต่เดกซ์แทรนอาจมีผลไปชักนำการสร้างเอนไซม์ได้ในระยะยาวนานกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

จากการทดสอบผลของเดกซ์แทรนต่อการชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ในรากลายพันธุ์ และสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยนำเชื้อที่ถ่ายเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีเดกซ์แทรนเป็นจำนวน 5 ครั้ง จนไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ถ่ายเชื้อไปเลี้ยงในอาหารที่มีเดกซ์แทรนต่างๆกัน จะพบว่า สายพันธุ์ดั้งเดิม จะมีการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ต่ำกว่าที่เคยผลิตได้ คือ ผลิตได้ประมาณ 60 หน่วยต่อมล. จากที่เดิมเคยผลิตได้ 80-90 หน่วยต่อมล. ในขณะที่เชื้อรากลายพันธุ์จะผลิตได้เต็มที่เท่าที่เคย คือประมาณ 390 หน่วยต่อมล. อาจเป็นไปได้ว่ารากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 มีความไวต่อเดกซ์แทรนในการชักนำให้สร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากน้ำเลี้ยงเชื้อของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์ดั้งเดิม

Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 จากการศึกษาของเอก แสงวิเชียร (2531) พบว่าเอนไซม์จากรากลายพันธุ์ มีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน ที่อุณหภูมิ 55 °ซ สำหรับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ที่บัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ กัน คือ ไกลซีน-ไฮโดรคลอไรด์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ การใช้อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.045 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 เป็นภาวะที่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ และสามารถวัดแอคติวิตีสูงสุดได้ถึง 600 หน่วยต่อมล. สำหรับความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ จะอยู่ในช่วง 40-50 °ซ และจะสูญเสียแอคติวิตีเกือบสมบูรณ์ เมื่อบ่มที่ 55 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ส่วนความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง อยู่ในช่วงกว้าง คือ 3.5-8.0 ซึ่งจะมีแอคติวิตีอยู่ 90-100% และความเสถียรต่อความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ โดยทดสอบด้วยอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 พบว่า เอนไซม์สามารถมีแอคติวิตี 80-100% ในช่วงที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของบัฟเฟอร์ 0.0095-0.475 โมลาร์ การหาค่าคงที่ทางจลศาสตร์ (K_m) ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากรากลายพันธุ์ SMCU 3-14 เท่ากับ 0.408 ไมโครโมลาร์ เมื่อใช้ 0.625 % เดกซ์แทรน T-2000 เป็นสับสเตรท ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับราดั้งต้น *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 หรือเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ได้จากจุลินทรีย์อื่นๆ ตามตารางที่ 11 อาจกล่าวได้ว่ามีค่าต่ำมาก แสดงถึงความจำเพาะต่อสับสเตรทมากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น

งานวิจัยนี้ ศึกษาการกลายพันธุ์รา *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และสารเคมี NTG คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้สูงขึ้น คือรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 330.17 หน่วยต่อมล. ได้เพิ่มเป็น 3.81 เท่าของสายพันธุ์ดั้งต้น และมีความเสถียรในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ในการทดสอบจำนวน 20 รุ่น เมื่อนำมาหาภาวะเหมาะสมในการเจริญ พบว่า ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 °ซ) ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4.0 โดยมีเดกซ์แทรน 1% เป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ สามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ได้เป็น 390 หน่วยต่อมล. และยังพบว่ารากลายพันธุ์สามารถถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรน ให้มีการสร้างเอนไซม์ขึ้น ได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น รวมทั้งการชักนำให้สร้างเอนไซม์นี้ จะยังคงอยู่ในรากลายพันธุ์ได้นานกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น

ตารางที่ 11 สมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°ซ)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ค่า K_m (โมลาร์)
Penicillium luteum ATCC9644	Fukumoto et al., 1971	50	4-6	-
P.funiculosum	Sugiura et al., 1973	-	6.0	0.952×10^{-6}
Lipomyces starkeyi	Webb et al., 1983	50	5.0	0.003×10^{-3}
L. starkeyi	Koenig and Day, 1989	55	5.0	0.004×10^{-3}
Paccilomyces lilacinus	Lee and Fox, 1985	55	4.5	-
P. lilacinus	Galvez-Mariscal 1991	60	5.4	0.26 g/l
Penicillium sp. SMCU 3-14	งานวิจัยนี้	55	4.5	0.408×10^{-6}

สมบัติของเอนไซม์ที่สร้างจากรากลายพันธุ์ SMCU 3-14 จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 °ซ ทำปฏิกิริยาใน 0.045 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 4.5 จะวัดแอคติวิตีได้สูง 600 หน่วยต่อมล. ความเสถียรของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 40-50 °ซ ความเป็นกรดด่าง 3.5-8.0 ความเข้มข้นสุดท้ายของบัฟเฟอร์ 0.0095 - 0.475 โมลาร์ จากสมบัติเหล่านี้พบว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาเดกซ์แทรนในโรงงานน้ำตาลซึ่งมีอุณหภูมิสูง การทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ในช่วงที่เป็นกรด ก็เหมาะสมกับการนำไปใช้ในน้ำอ้อยที่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะมีการเจริญและปลดปล่อยกรดอินทรีย์จากกระบวนการเมตาบอลิซึมออกมา ตามรายงานของ Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia (1991) พบว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ใช้ในโรงงานน้ำตาล ซึ่งต้องเติมลงในน้ำอ้อยก่อนการตกผลึกต้องทำงานในถังเก็บที่มีอุณหภูมิ 55 °ซ ความเป็นกรดด่าง 5.5 เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที จึงนับได้ว่าเอนไซม์ที่สร้างได้จากรากลายพันธุ์ SMCU 3-14 มีสมบัติที่เหมาะสม ควรแก่การพัฒนาเพื่อประยุกต์เข้าสู่ระดับอุตสาหกรรม ซึ่งอาจทำได้โดย การปรับปรุงสูตรอาหาร การคัดเลือกสารชักนำการสร้างเอนไซม์ที่มีราคาถูก และมีประสิทธิภาพดีขึ้น การนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้เลี้ยงเชื้อรา เพื่อลดต้นทุนการผลิต การทดลองเลี้ยงรากลายพันธุ์ในระดับขยายส่วน และการพัฒนาการตรึงเอนไซม์สำหรับใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งปรับปรุงสายพันธุ์ให้สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้เพิ่มมากขึ้น โดยใช้การกลายพันธุ์ซ้ำหรือใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อให้เหมาะสมกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป