รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

โชตนา ประมวลวัลลิกุล. 2534. การกลายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum* เพื่อเพิ่มผลผลิตเพนิซิลลิน จี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณฐินี สุวรรณสิงห์. 2533. เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียในทะเล. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บุญส่ง แสงอ่อน. 2525. บทบาทของบัคเตรีในน้ำอ้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฝ่ายนโยบายและเศรษฐกิจน้ำตาล. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. กระทรวงอุตสาหกรรม. 2538. รายงานการผลิตน้ำตาลทรายของโรงงานน้ำตาลทั่วประเทศและการส่งออกน้ำตาลทรายไปจำหน่ายต่างประเทศ ประจำปี 2532-2538.

สุภาพร ชาติวรพงศา. 2536. การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สันติ์ ฉายตระกูล. 2525. เดกซ์แทรน ศัตรูสำคัญของกระบวนการผลิตและคุณภาพน้ำตาลทราย. วารสารน้ำตาล. พ.ค.-มิ.ย. : 5-9.

อรพิน ภูมิภมร. 2527. การควบคุมระบบจุลินทรีย์อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิต.ระบบชีวภาพที่สำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพ เล่มที่ 3.ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอก แสงวิเชียร. 2531. เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Arora, D., Mukerji, K.G., and Marth, E.H. 1991. Handbook of Applied Mycology. Vol 3 : Food and Feeds. Mercel Dekker. New York. pp. 466-467.

Baltz, R.H. 1986. Strain improvement. Demain, A.L., and Solomon, N.A. (eds.). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp. 154-169

Barnes, A.C. 1974. The Sugar Cane. Billing and Sons. London. pp. 424-469.

Barret,J.F., Barret, T.A., and Roy Curtiss III. 1987. Purification and partial characterization of the multicomponent dextranase complex of *Streptococcus sorbrinus* and cloning of the dextranase gene. Infect. Immun. 55(3) : 792-802.

Brown, J.A., Falconer, D.J. and Wood, T.M. 1987. Isolation and properties of mutants of the fungus *Penicillium pinophilum* with enhanced cellulase and β-glucosidase production. Enzyme Microb. Technol. 9(3) : 169-175.

Burnett, G.W. and Scherp, H.W. 1962. Oral Microbiology and Infection Disease. The William and Wilkins Company. USA. pp. 359-363.

Calam, C.T. 1970. Improvement of Microorganisms by Mutation, Hybridization and Selection. Norris, I.R. and Ribbon,N.W. (eds.). Method in Microbiology. Vol. 3 A. Academic Press, New York. pp. 435-439.

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

Cutting, S.M. and Horn, P.B.V. 1990. Genetic analysis. Harwood, C.R., and Cutting, S.M. (eds.). Molecular Biology Methods for *Bacillus*. John Wiley and Sons. pp. 27-29.

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

Fishbein, L., Flamm, W.G., and Falk, H.L. 1970. Chemical mutagen. Environmental Effects on Biological Systems. Academic Press. New York. pp. 169-170.

Fukumoto, J., Tsuji, H., and Tsuru, D. 1971. Studies on Mold Dextranase. J. Biochem. 69 : 1113-1121.

Galvez-Mariscal, A., and Lopez-Mungia, A. 1991. Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 327-331.

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

Gunde-Cimerman, N., Cimerman, A., and Perdih, A. 1986. *Aspergillus niger* mutants for bioconversion of apple distillery wastes. Enzyme Microb. Technol. 8(8) : 166-170.

Hattori, A., Ishibashi,K., and Minato, S. 1981. The purification and characterization of the dextranase of *Chaetomium gracile*. Agric. Biol. Chem. 45(11) : 2409-2416.

Hoffman, R.M. and Wood, T.M. 1985. Isolation and partial characterization of a mutants of *Penicillium funiculosum* for the saccharification of straw. Biotech. Bioeng. 27 : 81-85.

Hopwood, D.A. 1970. The isolation of mutants. Norris, J.R. and Ribbon, D.W. (eds.). Method in Microbiology. Academic Press. pp. 363-430.

Imrie, F.K.E., and Tilbury, R.H. 1972. Polysaccharides in sugar cane and its products. William, J.C. and Kelsall, D.F. C.S.I.R.O. (eds.). Sugar Technol. Reviews. Elsevier Publishing Company. Netherlands. 5(1) : 291-361.

Irvine, J.E. 1981. Fields organics of dextran and other substance affecting sucrose crystallization. Sug. Y. Azucar. 76 (7) : 43-47.

Joshi, V.K., and Tamhane, D.V. 1975. Fermentative production of dextranase by *Aspergillus luchuensis* Inui. Indian J. Exp. Biol. 13 : 55-57.

Koenig, D.W. and Day, D.F. 1988. Production of dextranase by *Lipomyces starkeyi*. Biotech. Letters. 10(2) : 117-122.

_____, 1989. Induction of *Lipomyces starkeyi* dextranase. Appl. Environ. Microbiol. 55(8) : 2079-2081.

_____, 1989. The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*. Eur. J. Biochem. 183 : 161-167.

Lachke, A.H., Bastawde, K.B., Powar, V.K. and Srinivasan, M.C. 1986. Isolation of a hypercellulolytic mutant (Cu-1) of *Penicillium funiculosum*. Enzyme Microbiol. Technol. 8(2) : 105-108.

Lee, J.M. and Fox, P.F. 1985. Purification and characterization of *Paecilomyces lilacinus* dextranase. Enzyme Microbiol. Technol. 7 : 573-577.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193 : 265-275.

Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbour Lab. USA. pp. 113-143.

Mori, H. 1972. Induction of Auxotrophic mutants in *Saccharomyces rouxii* by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. J.Ferment. Technol. 50(3) : 218-221.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. J. Biol. Chem. 153 : 375-380.

Shukla, G.L., Madhu, and Prabhu, K.A. 1989. Study of some parameters for the production of dextranase by *Penicillium aculeatum*. Enzyme Microbiol. Technol. 11 : 533-536.

Sikyta, B. 1983. Genetics of Industrial Microorganisms. Method in Industrial Microbiology. Chap 7. pp. 214-239.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195 : 19-23.

Sugiura, M., Ito, A., Ogiso, T., Kato, K., and Asano, H. 1973. Studies on dextranase purification of dextranase from *Penicillium funiculosum* and its enzymatic properties. Biochem. Biophys. Acta. 309 : 357-362.

Tilbury, R.H. and French, S.M. 1974. Further studies on enzymatic hydrolysis of dextran in mills juices by dextranase and fungal α-amylaase. Proc. 15th ISSCT. 1277-1286.

Tsuru, D., Hiraoka, N., Hirose, T., and Fukumoto, J. 1971. Studies on Mold Dextranase. Agr. Biol. Chem. 35(11) : 1727-1732.

Webb, E., and Spencer-Martins, I. 1983. Extracellular endodextranase from the yeast *Lipomyces starkeyi*. Can. J. Microbiol. 29: 1092-1095.

Windholz, M. 1983. The Merck Index . 10th edition . 5974 p.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสตามวิธีของ Fukumotc และคณะ ซึ่งปรับปรุงโดย เอก แสงวิเชียร (2532)

เดกซ์แทรน (น้ำหนักโมเลกุล 3-50 x 10^6)	1.0 %
โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	0.2 %
โปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.2 %
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.05 %
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.05 %
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$)	0.0005 %
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	0.2 %

ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Somogyi (1952)-Nelson (1944)

1.1 อัลคาไลน์ คอปเปอร์ รีเอเจนต์ (Alkaline copper reagent)

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) 71 กรัมและโรเชลซอลท์ (Ammonium Sodium tartrate$\cdot 4H_2O$) 40 กรัมในน้ำ 700 มล. เติม 1 N ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 100 มล. แล้วเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 80 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนต้องกรองก่อนนำมาใช้

1.2 เนลสัน รีเอเจนต์ (Nelson reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท [$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$] 53.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 900 มล. แล้วเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 21 มล. ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโซเดียมอาซีเนท ($NaHAsO_4 \cdot 7H_2O$) ความเข้มข้น 12 % ปริมาตร 50 มล. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนต้องกรองก่อนนำไปใช้

2. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (1951)

2.1 สารละลาย Lowry A ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0 กรัม
โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรท	0.6 กรัม
น้ำปลอดประจุ (DW)	3.0 ลิตร

2.2 สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	5.0 กรัม
น้ำปลอดประจุ (DW)	1.0 ลิตร

2.3 สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย

สารละลาย Lowry A	50 ส่วน
สารละลาย Lowry B	1 ส่วน

2.4 สารละลาย Lowry D (Phenol reagent) ประกอบด้วย

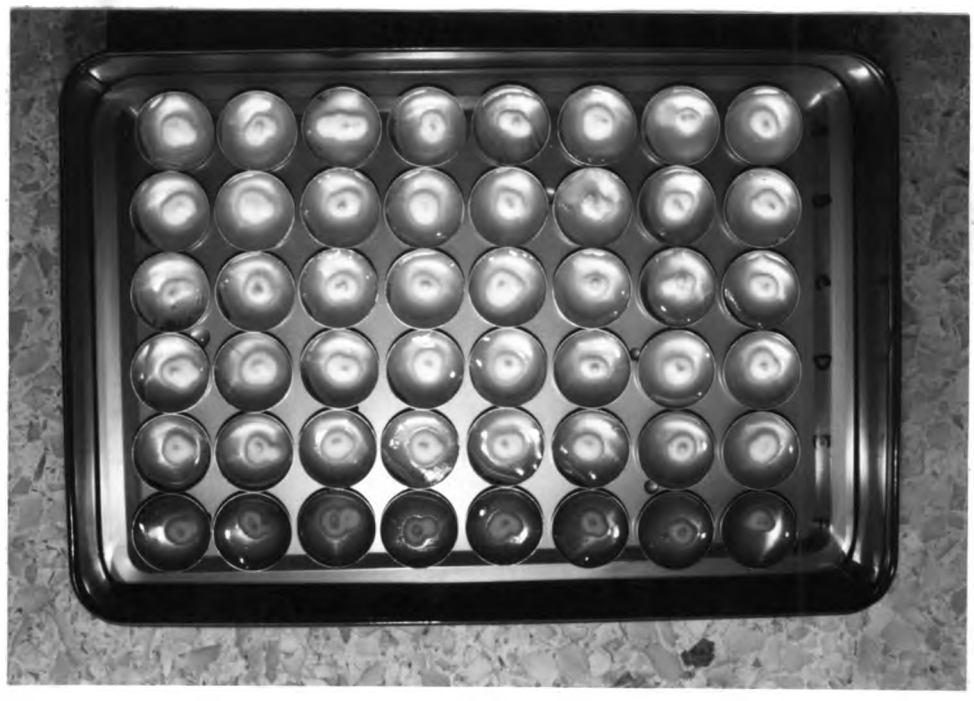
สารละลายโฟลีน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin phenol reagent)	1 ส่วน
น้ำปลอดประจุ	1 ส่วน

ภาคผนวก ค

การเตรียมกล่องโลหะที่ใช้ในการคัดแยกชั้นปฐมภูมิ

1. นำกล่องโลหะที่มีขนาด 20 x 30 เซนติเมตร มาทำความสะอาดและเช็ดให้แห้ง ใช้กระดุมปั๊มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร นำมาทำความสะอาดและเช็ดให้แห้งเช่นเดียวกัน จากนั้นทากาวติดโลหะด้านล่างของกระดุม หงายฝากระดุมขึ้น นำไปติดกับกล่องโลหะเว้นระยะห่างในการติดเท่าๆ กัน ทิ้งไว้ให้กาวแห้งประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 180 ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2. หลอมอาหารแข็งตามสูตรอาหารซึ่งปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มี 1 % เดกซ์แทรน หยอดลงในฝากระดุมในกล่อง โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ปล่อยให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 15 นาที นำไปเลี้ยงเชื้อราที่ต้องการทดสอบ โดยกล่องโลหะ 1 กล่อง จะสามารถเลี้ยงเชื้อได้ประมาณ 48 สายพันธุ์ (รูปที่ 49) และคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสซึ่งสามารถทำให้เกิดบริเวณใส (clear zone) มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (รูปที่ 50)



รูปที่ 49 การเลี้ยงราในกล่องโลหะ เพื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในขั้นปฐมภูมิ

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 50 ลักษณะการเกิดบริเวณใสของราที่ทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิในกล่องโลหะ

ภาคผนวก ง

การเตรียมและป้องกันอันตรายจากสารกลายพันธุ์

แสงอุลตราไวโอเลต

เป็นสารรังสีที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ อาจทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้ การปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับแสงอุลตราไวโอเลต ควรมีการสวมแว่นป้องกัน ห้ามมองหลอด UV โดยตรง เพราะเป็นแสงที่เป็นอันตรายต่อตา ควรมีการสวมแว่นป้องกัน หรือใช้แสงอุลตราไวโอเลตที่อยู่ภายในตู้เขี่ยเชื้อที่มีกระจกกั้น ควรสวมถุงมือเมื่อต้องทำงานภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต เนื่องจากแสงอุลตราไวโอเลตนี้ ผ่านกระจกได้ไม่ดี เชื้อที่ต้องการฉายแสงเพื่อกลายพันธุ์ จึงต้องเปิดฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อไว้

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

สาร NTG เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต และอาจเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ด้วย ดังนั้นในการทดลอง จึงต้องทำด้วยความระมัดระวัง สาร NTG เป็นสารที่อันตรายต่อการสัมผัส การสูดดม การทดลองเกี่ยวกับสาร NTG ทั้งในลักษณะผลึกของแข็ง หรือสารละลาย ควรสวมถุงมือยางป้องกันตลอดเวลา ควรสวมผ้าปิดปากเพื่อป้องกันละอองหรือไอระเหย ห้ามใช้ปากในการดูดปิเปตสารชนิดนี้เด็ดขาด การชั่งสาร NTG ควรทำในที่ไม่มีลมพัด ไม่ควรชั่งบนกระดาษ เพราะอาจปลิวไปทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ทดลองและผู้ที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียง อย่าเปิดขวดที่ใส่ NTG ทิ้งไว้ ควรใช้หลอดปลอดเชื้อ (sterilized) ที่แห้งและมีฝาปิด ชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าก่อน แล้วจึงใช้ช้อนตักสารเติม NTG ลงในหลอด ปิดฝาแล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง คำนวณน้ำหนักของสารและนำไปเตรียมเป็น stock ซึ่งควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้

อุปกรณ์ทุกชนิดที่สัมผัสกับสาร NTG นำไปแช่ใน 1N NaOH ในตู้ควัน เปิดเครื่องให้ดูดควันออก ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงนำมาล้าง และควรสวมถุงมือยางในการล้างด้วย

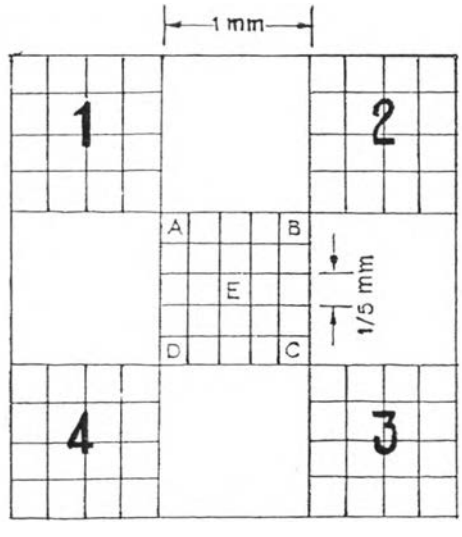
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

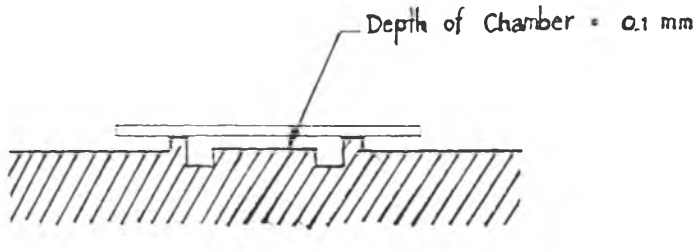
ภาคผนวก จ

การนับสปอร์โดยใช้ Haemacytometer

หาปริมาณโดยนับจำนวนสปอร์ในช่องใหญ่ 5 ช่อง โดยในแต่ละช่องใหญ่นั้นนับ 8 ช่อง ดังแสดงในรูปข้างล่าง

คำนวณจำนวนสปอร์ต่อมล. = จำนวนสปอร์เฉลี่ยในช่องเล็ก x 10^6





ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุวรรณา นพพรพันธุ์ เกิดวันที่ 5 มกราคม พ.ศ. 2513 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2534 และเข้ารับการศึกษาต่อในชั้นปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2535 ที่อยู่ปัจจุบัน 1022/80 ซอยประชาอุทิศ 28 ถนนประชาอุทิศ แขวงบางมด เขตราษฎร์บูรณะ กรุงเทพมหานคร