

การคัดเลือกมิวแทนต์ของ *Pachysolen tanophilus* ที่หมักไซโลส
โดยการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

นายอาทิตย์ ปุษะนาวิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาพฤกษศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

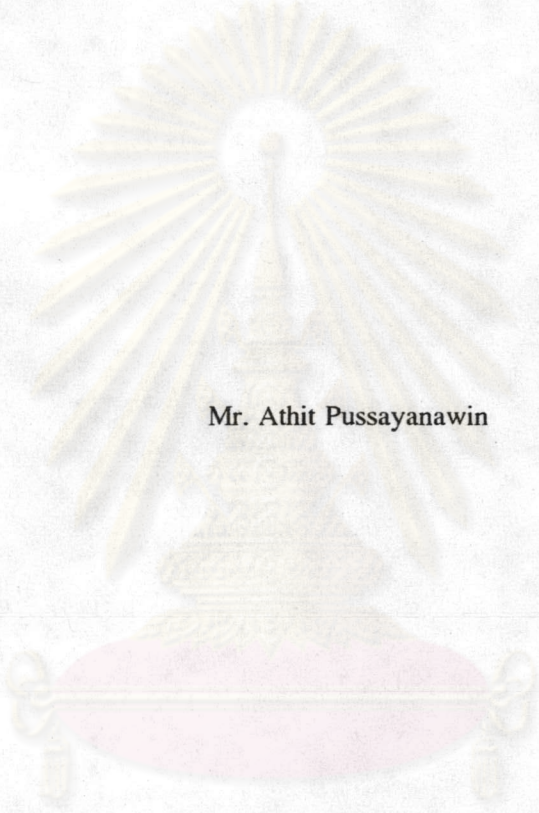
พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-349-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17339601

SELECTION OF XYLOSE-FERMENTING MUTANTS *Pachysolen tannophilus*
BY UV-INDUCTION



Mr. Athit Pussayanawin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Department of Botany

Graduate school

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974-634-349-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกมิวแทนต์ *Pachysolen tannophilus* ที่หมักไซโลส
 โดยการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

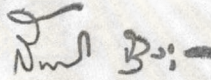
โดย นายอาทิตย์ ปุຍະນาวิน

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ สาขาพันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.हररभा पुण्णपय्कम्

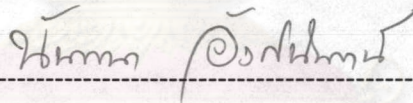
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
 ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

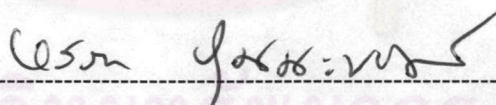


----- คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
 (รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ชุงสุวรรณ)

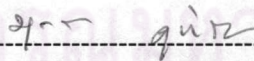
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



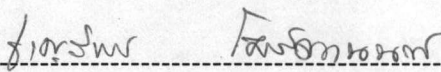
----- ประธานกรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันท์)



----- อาจารย์ที่ปรึกษา
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.हररभा पुण्णपय्कम्)



----- อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
 (รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)



----- กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โหมยิตานนท์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

อาทิศย์ ปุษยะนาวิน : การคัดเลือกมิวแทนต์ Pachysolen tannophilus ที่หมักไซโลสโดย
การชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (SELECTION OF XYLOSE-FERMENTING MUTANTS OF
Pachysolen tannophilus BY UV-INDUCTION) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ھرรษา

ปดณะพยัคฆ์ , 104 หน้า. ISBN 974-634-349-1

การฉายแสงอัลตราไวโอเลตใช้หลอด UV ขนาด 15 W ความเข้มแสง 8400 mW ที่ช่วงคลื่น
253.7 nm จำนวน 2 หลอดกับเซลล์ P. tannophilus NRRL Y-2460 ที่ใช้เป็น wild type (W)
ด้วยวิธีการให้อาหารคูดซิมเซลล์ติดบนผิวหน้าแล้วจึงนำไปฉายแสง พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด
การกลายพันธุ์เป็น 33 วินาที สร้างสายพันธุ์มิวแทนต์ได้ 55 สายพันธุ์ ผลของแสง UV โคโลนีมิวแทนต์ต่างไป
จาก W 35 สายพันธุ์ (63.6%) จากความสามารถในการเจริญอาหารคัดเลือกที่ใช้เป็นค่าพินิจจำแนกมิว-
แทนต์ได้ 4 ประเภทคือ พวกที่มีความสามารถในการเจริญแบบเดียวกับ W 9 สายพันธุ์ (16.4%) พวกที่ไม่
มีการตอบสนองต่อกรดอะมิโนเมไทโอนีนและไลซีน 16 สายพันธุ์ (29.1%) พวกที่มีการตอบสนองต่อกรดอะ-
มิโนแยกเป็น พวกที่มีการตอบสนองต่อเมไทโอนีน 5 สายพันธุ์ (9.1%) พวกที่มีการตอบสนองต่อไลซีน 13
สายพันธุ์ (23.6%) พวกที่มีการตอบสนองทั้งเมไทโอนีนและไลซีน 12 สายพันธุ์ (21.8%) และพวกสุดท้าย
คือพวกที่ค่อยาปฏิชีวนะในสเตติน 2 สายพันธุ์ (3.6%)

ความสามารถในการหมักไซโลสวัดจากความยาวฟองภายในหลอดเก็บก๊าซของมิวแทนต์ 55
สายพันธุ์เหลือ 2 สายพันธุ์ ในการคัดเลือกครั้งที่ 3 ได้แก่ 5.3D และ 2.6B สูงกว่า W 2.4 และ 2.1 เท่า
ตามลำดับ เมื่อนำไปผลิตเอทานอลจากไซโลสเทียบกับไนเตรตมิวแทนต์ (N) พบว่า N, 5.3D, 2.6B และ W
มีอัตราการผลิตสูงสุดเป็น 0.467, 0.413, 0.353 และ 0.333 ก./ก. เทียบค่าทางทฤษฎี (0.51 ก./ก.)
ได้ 91.57, 80.98, 69.22 และ 65.29% ตามลำดับ ในสภาวะจำกัดอากาศ 32°C รวม 10 วัน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สายพันธุ์ที่มี activity สูง ได้แก่ 2.6B กับ 5.3D ไม่พบ
สิ่งผิดปกติที่ต่างไปจาก W ส่วนมิวแทนต์พบการสร้างเส้นใยและกระจุกเซลล์ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็ก
เท่ากัน 7-29 เซลล์ ซึ่งอาจจะเป็นตัวสร้างเอนไซม์ศักยภาพสูงในการผลิตเอทานอลเหนือกว่ามิวแทนต์
อื่นๆ ในสายพันธุ์ activity ต่ำ 7 สายพันธุ์ พบ 3 สายพันธุ์มีการสร้างเส้นใย, 5 สายพันธุ์สร้างแอสโค-
พอร์แตกสาขาและกระจุกแอสโคพอร์, 2 สายพันธุ์ไม่สร้างแอสค์หรือแอสโคพอร์ ลักษณะที่ผิดปกติเหล่านี้เป็น
ไปในลักษณะเดียวกับสายพันธุ์ที่เป็นแฮพลอยด์และสายพันธุ์ยีสต์ที่ primitive กว่า รวมทั้งความ
สามารถในการผลิตเอทานอลที่ลดลง

ภาควิชา พืชศาสตร์
สาขาวิชา พืชศาสตร์
ปีการศึกษา 2538

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C525517 : MAJOR GENETICS

KEY WORD: Pachysolen tannophilus / XYLOSE-FERMENTING YEAST / UV-INDUCTION

ARTHIT PUSSAYANAWIN : SELECTION OF XYLOSE-FERMENTING MUTANTS OF Pachysolen tannophilus BY UV-INDUCTION. THESIS ADVISOR : ASSIST.

PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D. 104 pp. ISBN 974-634-349-1

The wild type strain of Pachysolen tannophilus NRRL Y-2460 (W) was irradiated by UV from 8400 mW at 253.7 nm 2X15W UV-lights. Cells were adsorbed to agar surface before irradiation. The optimal time to induce mutation by UV was 33S producing 55 mutant strains. Thirty five colonies of mutants (63.6%) were found different from W. Four groups of auxotrophs were screened from ability to grow on selective media. Nine strains (16.4%) were similar to W. Sixteen stains (29.1%) had no responsibility to methionine and lysine. Five strains (9.1%) responded to only methionine, 13 strains (23.6%) responded to only lysine and 12 strains (21.8%) responded to methionine as well as lysine. Only two strains (3.6%) had drug resistant to nystatin.

Their abilities to ferment xylose were evaluated by the length of gases produced in durham tubes, which screened 55 mutant strains to 2 strains 5.3D and 2.6B, with mores gases 2.4 and 2.1 times than W, respectively. The ethanol production from xylose of W, 2.6B and 5.3D compared with nitrate mutant (N) got highest rates at 0.333, 0.353, 0.413 and 0.467 g/g corresponding to 65.29, 69.22, 80.98 and 91.57% respectively as compared to the theoretical yeilds (0.51 g/g) in limited aeration 32 °C for 10 days.

The morphology of mutants with high activity strains 2.6B and 5.3D were not different from W. Instead N, produced pseudomycelium and cell clusters. The cluster consisted of 7-29 cells similarin shapes perhaps responsible for synthesizing higher ethanol productivity enzymes than the others. As for seven low activity strains, three produced pseudomycelium, five produced cluster and branched ascophores, and two strains had no asci or ascophores formations were similar to haploid or more primitive strains with reduction of ethanol productivity.

ภาควิชา..... พุทธศาสตร์
สาขาวิชา..... พันธุศาสตร์
ปีการศึกษา..... 2538

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะไม่มีวันสำเร็จสมบูรณ์ลงได้ถ้าไม่ได้รับความเอื้อเฟื้อช่วยเหลือจาก ท่านทั้งหลายผู้มีพระคุณต่อข้าพเจ้าเป็นอย่างยิ่ง ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.हरररर รุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้ความดูแลเอาใจใส่ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำแก้ไขข้อบกพร่องทั้งปวงอันพึงมี ต่อขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ต้นจนจบ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ให้ความอุปการะ สนับสนุน แนะนำวิธีการใหม่อันเหมาะสมต่อการทดลอง พร้อมทั้งห่วงใยดูแล และอุทิศเวลาให้คำปรึกษาแนะนำศิษย์มาโดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันท์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โหมยิตานนท์ ที่ช่วย ตรวจท่านแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้มีความถูกต้องและมีคุณค่ามากยิ่งขึ้น กราบขอบพระคุณ คุณประธานันท์ นันท์ธนะวานิช เจ้าหน้าที่บรรณารักษ์ห้องสมุดภาควิชาพฤกษศาสตร์ ผู้เมตตา อนุเคราะห์ แนะนำหนังสือและเอกสารอันเหมาะสมต่อการค้นคว้าข้อมูลต่างๆ กราบขอบพระคุณ คุณสมพงษ์ สิงห์นิล เจ้าหน้าที่ธุรการ ผู้ให้ความเอื้อเฟื้อเป็นธุระด้านอุปกรณ์การทดลองและการ เขียนวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ขอขอบคุณ พี่วิทยา รัชญาโภชน ผู้คอยดูแลแก้ไขซ่อมแซม อุปกรณ์ที่ชำรุดเสียหาย ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย และ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ช่วยสนับสนุนด้านทุนการศึกษาประจำปีการศึกษา 2536 และ 2537 ขอขอบคุณ อาจารย์พรเทพ ถนอมแก้ว ผู้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และ น้อง ๆ แพนก ทุก ๆ คน ที่ช่วยในงานบางสิ่งบางอย่าง พร้อมทั้งคอยให้กำลังใจมาโดยตลอด กราบแทบเท้า คุณแม่สุชาดา ปุษะนาวิ น มารดาผู้ให้กำเนิด ความสุข ใ้ชีวิตและทุกสิ่งทุกอย่าง อันเต็มเปี่ยมด้วยความเมตตาที่แม่พึงมีต่อลูก กราบบูชา คุณพ่อณรงค์ ปุษะนาวิ น ผู้ล่วงลับที่แม่ จะไม่ได้อยู่คู่ความสำเร็จของลูกแต่ก็เป็นผู้ให้ชีวิตและการศึกษาเพื่ออนาคตลูกมาจนถึงวันนี้ กราบ บูชาพระคุณหลวงปู่ พระราชพรหมยานผู้ข้าพเจ้าเคารพบูชาอย่างสูงสุด ผู้ให้แสงธรรมและ ความสว่างแห่งทางดำเนินในชีวิต และ จะไม่มีวันนี้เกิดขึ้นได้เลย ถ้าไม่ได้พระคุณจากสถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอันเกริกไกร จากพระนามาภิไธยแห่งองค์ พระมหาปิยราชาเจ้า พระบาท สมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 5 ผู้ทรงพระมหากรุณาธิคุณดลบันดาลเกล้าล้นกระหม่อมแก่ ข้าพระพุทธเจ้าและพสกนิกรชาวไทยอันจะจารีกรอยู่ในใจของ ข้าพระพุทธเจ้าตลอดเท่ากาลนาน

อาทิตย์ ปุษะนาวิ น

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญกราฟ	ฅ
สารบัญรูป	ญ

บทที่

1. บทนำ	1
2. การตรวจเอกสาร	5
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	20
4. ผลการทดลอง	27
5. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	77
รายการอ้างอิง	93
ภาคผนวก	98
ประวัติผู้เขียน	104

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	2
4.1.1	28
4.1.2	29
4.2	34
4.3.1	50
4.3.2	51
4.3.3	52
4.4.1	56
4.4.2	58
4.5	65

สารบัญกราฟ

กราฟที่

หน้า

4.1 ผลการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ <i>P. tannophilus</i> NRRL Y-2460	30
4.4.1 อัตราการผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลไซโลสของ wild type	59
4.4.2 อัตราการผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลไซโลสของ NO ₃ -NO ₃ mutant	60
4.4.3 อัตราการผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลไซโลสของ สายพันธุ์ 2.6 B	61
4.4.4 อัตราการผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลไซโลสของ สายพันธุ์ 5.3 D	62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	วิธีเมตาบอลิซึมของไซโลสของ <i>P. tannophilus</i> ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ซึ่งเสนอโดย Dieter Debus และคณะ16
2.2	วิธีเมตาบอลิซึมของไซโลสของ <i>P. tannophilus</i> ซึ่งเสนอโดย Gong และ Tsao17
4.1.1	การเจริญของเชื้อหลังถูกฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ระยะห่าง 45 ซม. ช่วงเวลาแตกต่างกัน
ก.	Plate ที่ใช้เป็น control ไม่ถูกฉายแสง [0 วินาที]31
ข.	Plate ที่ถูกใช้ฉายแสงนาน 25 วินาที31
ค.	Plate ที่ถูกใช้ฉายแสงนาน 30 วินาที32
ง.	Plate ที่ถูกใช้ฉายแสงนาน 35 วินาที32
จ.	Plate ที่ถูกใช้ฉายแสงนาน 40 วินาที32
4.2.1	การเจริญของ wild type หลังทำ replica plating ลงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ40
4.2.2	โคโลนีของ <i>P. tannophilus</i> หลังถูกฉายแสงใน Plates ที่คัดเลือกไว้
ก.	Plate ที่ 1 สายพันธุ์ 1A-1F40
4.2.3	โคโลนีของ <i>P. tannophilus</i> หลังถูกฉายแสงใน Plates ที่คัดเลือกไว้
ก.	Plate ที่ 2.1 สายพันธุ์ 2.1A-2.1C41
ข.	Plate ที่ 2.2 สายพันธุ์ 2.2A-2.2D41
ค.	Plate ที่ 2.3 สายพันธุ์ 2.3A-2.3B41
ง.	Plate ที่ 2.4 สายพันธุ์ 2.4A-2.4B41
จ.	Plate ที่ 2.5 สายพันธุ์ 2.5A-2.5C41
4.2.4	โคโลนีของ <i>P. tannophilus</i> หลังถูกฉายแสงใน Plates ที่คัดเลือกไว้
ก.	Plate ที่ 2.6 สายพันธุ์ 2.6A-2.6C42
ข.	Plate ที่ 3.1-3.4 สายพันธุ์ 3.1A-3.1E , 3.2A-3.2D , 3.3A-3.3C และ 3.4A-3.4C42
ค.	Plate ที่ 4.1-4.2 สายพันธุ์ 4.1A-4.1E และ 4.2A-4.2B42
ง.	Plate ที่ 5.1-5.3 สายพันธุ์ 5.1A-5.1C , 5.2A-5.2C , และ 5.3A-5.3D42

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.2.5 Replica Plate ลงบนอาหารคัดเลือกสูตรต่างๆ	
ก.-ค. Replica Plate ที่ 1, 2.1 และ 2.2 ลงบนอาหารคัดเลือก	43
4.2.6 Replica Plate ลงบนอาหารคัดเลือกสูตรต่างๆ	
ก.-ค. Replica Plate ที่ 2.3, 2.4 และ 2.5 ลงบนอาหารคัดเลือก	44
4.2.7 Replica Plate ลงบนอาหารคัดเลือกสูตรต่างๆ	
ก.-ค. Replica Plate ที่ 2.6, 3.1 และ 3.2 ลงบนอาหารคัดเลือก	45
4.2.8 Replica Plate ลงบนอาหารคัดเลือกสูตรต่างๆ	
ก.-ค. Replica Plate ที่ 3.3, 3.4 และ 4.1 ลงบนอาหารคัดเลือก	46
4.2.9 Replica Plate ลงบนอาหารคัดเลือกสูตรต่างๆ	
ก.-ข. Replica Plate ที่ 4.2 และ 5.1 ลงบนอาหารคัดเลือก	47
4.2.10 Replica Plate ลงบนอาหารคัดเลือกสูตรต่างๆ	
ก.-ข. Replica Plate ที่ 5.2 และ 5.3 ลงบนอาหารคัดเลือก	48
4.3.1 ฟองกาซไฮแต่ละหลอดเก็บกาซ ที่เชื้อแต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้นจากการใช้น้ำตาล ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการหมัก ไซโลสครั้งที่ 3	
ก.-ค. สายพันธุ์ wild type, NO ₃ -NO ₃ mutant และ 2.6 B	53
4.3.2 ฟองกาซไฮแต่ละหลอดเก็บกาซ ที่เชื้อแต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้นจากการใช้น้ำตาล ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการหมัก ไซโลสครั้งที่ 3	
ก.-ค. สายพันธุ์ 3.1 D, 4.2 B และ 5.3 D	54
4.5	
ก. เซลล์กลมและรีของ wild type	67
ข. แอสโคสปอร์รูปร่างข้าง บริเวณส่วนหัวซึ่งเป็นเซลล์ที่สร้างแอสคัสบริเวณ ก้านชูแอสคัสทรงกระบอกผนังหนาที่บวม และส่วนปลายที่สร้างแอสคัส ผนังบางก่อนแตกและหลังแตกจะเป็นรูปตัว U หรือ V	67

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.6	
ก. แอสคัสที่พบใน $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant	68
ข. ลักษณะคล้ายเส้นใย เป็นสายยาวเป็นข้อ ๆ ผนังบางของ $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant	68
ค.-จ. กระจกเซลล์ ที่พบเฉพาะ $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant	69
4.7	
ก. สายพันธุ์ 2.6 B สังเกตเซลล์ที่กำลังสร้างแอสคัส.....	70
ข. แอสโคฟอร์ที่แอสคัสแตกแล้วของสายพันธุ์ 2.6 B จะเห็นว่าไม่แตกต่าง จาก wild type	70
4.8	
ก.-ข. สายพันธุ์ 5.3 D ไม่แตกต่างจาก wild type แต่พบแอสโคฟอร์โค้งงอมากกว่า	71
4.9	
ก. สายพันธุ์ที่ 1A สังเกตแอสโคฟอร์แตกสาขา	72
ข. กระจกแอสโคฟอร์ของสายพันธุ์ 1A	72
4.10	
ก. สายพันธุ์ที่ 2.3C เซลล์เป็นเหลี่ยมสั้นไม่พบแอสคัส	73
ข. สายพันธุ์ที่ 2.4B budding cells เป็นเหลี่ยมสั้นไม่พบแอสคัส.....	73
4.11	
ก. แอสโคฟอร์แตกสาขาและกระจกแอสโคฟอร์ สายพันธุ์ 2.6C	74
ข. ลักษณะเส้นใย ที่สร้างขึ้นในสายพันธุ์ 2.6C	74
4.12	
ก. แอสโคฟอร์แตกสาขาของสายพันธุ์ 3.1A	75
ข. กระจกแอสโคฟอร์ของสายพันธุ์ 3.3B	75
4.13	
ก. ลักษณะคล้ายแอสโคฟอร์แตกสาขาหรือเส้นใยของสายพันธุ์ 4.1C.....	76
ข. ลักษณะคล้ายเส้นใยของสายพันธุ์ 4.1C	76