การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเลนไซม์เดกซ์แทรนเนส ของ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61

นางสาว สุวรรยา นพพรพันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974 - 632 - 533 - 7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16699124

Strain improvement for the dextranase production by *Penicillium* sp. 61

Miss Suwanna Noppornpanth

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974 - 632 - 533 - 7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ของ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61
โดย	นางสาวสุวรรณา นพพรพันธุ์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุวรรณา นพพรพันธุ์ : การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 (STRAIN IMPROVEMENT FOR THE DEXTRANASE PRODUCTION BY Penicillium sp. 61) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน, 123 หน้า. ISBN 974-632-533-7

Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นที่คัดแยกได้จากดิน สามารถผลิตเดกซ์-แทรนเนสได้ 86 หน่วยต่อมล. เมื่อทำการฉายแสงอุลตราไวโอเลตนาน 4 - 10 นาที พบว่าสามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์ SMCU 1-80 ซึ่งผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ 152 หน่วยต่อมล. เมื่อกลายพันธุ์สปอร์ของรานี้ต่อด้วยสาร NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) ที่ความเข้มข้น 0.3 มก.ต่อมล. เป็นเวลา 20-40 นาที 37 องศาเซลเซียส จะได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตเดกซ์แทรนเนสได้สูงจำนวนหนึ่ง และเมื่อทำซ้ำอีกครั้งด้วย NTG จะได้สายพันธุ์ SMCU 3-14 ซึ่งกลายพันธุ์จาก SMCU 2-86 ซึ่งผลิตเดกซ์-แทรนเนสได้ 330 หน่วยต่อมล. โดยมีความเสถียรสำหรับการสร้างเดกซ์แทรนเนส แม้ผ่านการถ่ายเชื้อ 20 ครั้ง พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของรา SMCU 3-14 คือเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) ความเป็นกรดด่าง 4.0 โดยมี 1% เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ ซึ่งให้ผลผลิตเดกซ์แทรนเนส 390 หน่วยต่อมล. โดย SMCU 3-14 นี้ สามารถชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสด้วย 1% เดกซ์แทรน ได้ดีกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสคือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 4.5-5.0 ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ 0.0225-0.0675 โมลาร์ เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสบริสุทธิ์ จะให้แอคติวิตี 600 หน่วยต่อมล. เมื่อทำการวิเคราะห์ภายใต้ภาวะนี้เอนไซม์มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 3.5-8.0 ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ 0.0095-0.475 โมลาร์ จะสูญเสียแอคติวิตีเกือบสมบูรณ์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที การศึกษาทางจลนพลศาสตร์พบว่า ค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสต่อเดกซ์แทรน T-2000 ลดต่ำลงเป็น 0.408×10^{-6} โมลาร์ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต สุวรรณา นพพรพันธุ์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [illegible]

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

C526209 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: DEXTRANASE / UV-LIGHT / NITROSOGUANIDINE / Penicillum sp.
SUWANNA NOPPORNPANTH : STRAIN IMPROVEMENT FOR THE DEXTRANASE PRODUCTION BY Penicillium sp. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., 123 pp. ISBN 974-632-533-7

Penicillium sp. 61, a wild type organism isolated from soil was found capable of producing dextranase at 86 units/ml. Upon exposing to a UV-light for 4-10 minutes, a mutant strain designated SMCU 1-80 was isolated that capable of producing dextranase at 152 units/ml. Further treatment of spores thereof with 0.3 mg/ml of NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) for 20-40 minutes at 37 ^{o}C resulted in a number of mutants with high dextranase activities. Additional round of treatment with NTG yielded another high producer strain, SMCU 3-14, a mutant of the first NTG treated SMCU 2-80 with ability of producing dextranase at 330 units/ml. Such mutant could retain the same level of dextranase production even after 20 rounds of subculture. Optimum conditions for dextranase production were cultivation at room temperature (30-35 ^{o}C), pH 4.0 with 1% dextran as inducer by which the organism could produce dextranase at 390 units/ml. The mutant SMCU 3-14 could produce dextranase in response to the induction by 1% dextran better than that of wild type.

Optimum conditions for dextranase activity were at 55 ^{o}C, pH 4.5-5.0 in 0.0225-0.0675 M buffer such condition gave the above dextranase with activity of 600 units/ml. Enzyme exhibited stability to pH from 3.5 to 8.0 in 0.0095-0.475 M buffer while completely lost the activity at 55 ^{o}C, 30 minutes. Kinetic study of the enzyme revealed a over apparent K_m value of 0.408 x 10^{-6}M toward substrate dextran T-2000 in comparison to that of wild type.

พลสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็น และคำแนะนำ เพื่อแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ ให้คำแนะนำ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา ทุกท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ กรุณาเอื้อเฟื้อสารเคมีที่ใช้ในการกลายพันธุ์ ขอขอบคุณ คุณบุญลักษณ์ เชิญศิริดำรงค์ คุณอโนชา อิ้มศิริวัฒนะ คุณเบญจภรณ์ รุ่งนิทักษ์ไชย ที่กรุณาช่วยเหลือในการบันทึกภาพ รวมทั้งคุณบัณฑิต ฝั่งสินธุ์ ที่กรุณาช่วยเหลือในการเก็บรักษาเชื้อโดยวิธี Lyophilization

ขอขอบพระคุณ สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (STDB) ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่ๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ญ

สัญญลักษณ์และคำย่อ..... ด

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....18

3. ผลการวิจัย.....32

4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย.....99

รายการอ้างอิง.....110

ภาคผนวก.....115

ประวัติผู้เขียน.....123

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนโคโลนีที่เจริญ (สปอร์ที่รอด) และเปอร์เซนต์การรอด ของสปอร์รา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 หลังจากการฉายแสงอุลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ.....	35
2	การคัดเลือกชั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิของราที่ได้จากการกลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลา 4 - 10 นาที.....	38
3	ความกว้างของบริเวณใส ปริมาณการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และวันที่มีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด ของราที่กลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ที่ผ่านการคัดเลือกในชั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ และราสายพันธุ์ดั้งต้น *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61.....	40
4	การทดสอบความเสถียรของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 ในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และวันที่มีการผลิตเอนไซม์สูงสุด ในช่วงอายุเชื้อต่างๆ กัน.....	46
5	จำนวนโคโลนีที่เจริญ (สปอร์ที่รอด) และเปอร์เซนต์การรอด ของสปอร์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 หลังจากการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 0.1-0.3 มก.ต่อมล. ที่เวลาต่างๆ.....	47
6	การคัดเลือกชั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิของราที่ได้จากการกลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 ด้วยสารเคมี NTG.....	50
7	ความกว้างของบริเวณใส ปริมาณการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และวันที่มีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด ของรากลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ที่ผ่านการคัดเลือกในชั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ และราสายพันธุ์ดั้งต้น *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61	51

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ และคัดเลือกราที่ดีที่สุดของแต่ละสายพันธุ์ตั้งต้น ปริมาณการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และวันที่มีการผลิตเอนไซม์สูงสุด ของรา ที่ได้จากการกลายพันธุ์ *Penicillium* sp. ด้วยสารเคมี NTG รอบที่สอง เทียบกับราสายพันธุ์ตั้งต้น.....	54
9	สมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ที่ได้จากรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 และราตั้งต้น *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61	98
10	สภาวะที่เหมาะสม และปริมาณการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ของเชื้อจุลินทรีย์ ต่างๆ.....	105
11	สมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ.....	108

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	การเกิด thymine dimer จากการฉายแสงอุลตราไวโอเลต.....	9
2	กระบวนการ SOS repair ที่มีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์.....	10
3	ปรากฏการณ์ Photoreactivation ซ่อมแซมไดเมอร์ที่เกิดจากการฉายแสงอุลตราไวโอเลต.....	11
4	การซ่อมแซมแบบ Excision ในจุลชีพที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต....	12
5	การสังเคราะห์และโครงสร้างของสาร NTG.....	15
6	การเติมหมู่อัลคิลที่ตำแหน่ง O^6 ของเบสกวานีนและที่ตำแน่ง O^4 ของเบสไทมีนโดยสาร NTG.....	16
7	การเจริญ การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และค่าแอคติวิตีจำเพาะ ของรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุง จาก Fukumoto และคณะ (ภาคผนวก ก) ความเป็นกรดด่าง 6.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30-35°ซ) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที (ภาวะมาตรฐาน).....	33
8	เปอร์เซนต์การรอดของสปอร์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่ผ่านการฉายแสง อุลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ..	36
9	การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ของรากลายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว และราสายพันธุ์ดั้งเดิม *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน.....	41
10	การเจริญของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 และ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน.....	42
11	การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ*Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 1-80 และ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน.....	43

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

12 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 และ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน..... 44

13 เปอร์เซนต์การรอดของสปอร์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 0.1-0.3 มก.ต่อมล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ที่เวลาต่างๆ..... 48

14 การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ของรากลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว กับ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 และ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน..... 52

15 การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ของรากลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ซ้ำ ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว กับราสายพันธุ์ดั้งต้นแต่ละสายพันธุ์ รวมทั้ง *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 และ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน 55

16 การเจริญของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 และ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน..... 57

17 การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 และ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน.... 58

18 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 และ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน..... 59

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
19	การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และค่าแอคติวิตีจำเพาะ ในการทดสอบความเสถียรของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน	60
20	ลักษณะโคโลนีและสีของสปอร์ของราตั้งต้น *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 (ก), รากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 (ข) และ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 3-14 (ค) เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน.....	62
21	การเกิดบริเวณใส ของราตั้งต้น *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 (ก), รากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 (ข) และ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 3-14 (ค)เมื่อเทราดด้วยเอธานอล 95%	63
22	ลักษณะของก้านชูสปอร์ ของราตั้งต้น *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 (ก), รากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 1-80 (ข) และ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 (ค) เมื่อเลี้ยงบนแผ่นสไลด์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน.....	64
23	การเจริญของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน โดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 25 °ซ 30 °ซ อุณหภูมิห้อง (30-35 °ซ) และ 40 °ซ.....	66
24	การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน โดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 25 °ซ 30 °ซ อุณหภูมิห้อง (30-35 °ซ) และ 40 °ซ.....	67

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
25	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน โดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 25 °ซ 30 °ซ อุณหภูมิห้อง (30-35 °ซ) และ 40 °ซ.....	68
26	การเจริญของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน โดยแปรผันความเป็นกรดด่าง 3.0 - 8.0.....	69
27	การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 3-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน โดยแปรผันความเป็นกรดด่าง 3.0 - 8.0.....	71
28	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ภายใต้ภาวะมาตรฐาน โดยแปรผันความเป็นกรดด่าง 3.0-8.0.....	72
29	การเจริญของราตั้งต้น *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มีอัตราส่วนของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสเป็น 0:1.0, 0.25:0.75, 0.50:0.50, 0.75:0.25 และ 1.0:0 ตามลำดับ ความเป็นกรดด่าง 6.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30-35°ซ) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที.....	73
30	การเจริญของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มีอัตราส่วนของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสเป็น 0:1.0, 0.25:0.75, 0.50:0.50, 0.75:0.25 และ 1.0:0 ตามลำดับ ความเป็นกรดด่าง 4.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 °ซ) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที.....	74

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
31	การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของราตั้งต้น *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มีอัตราส่วนของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสและภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับรูปที่ 29.....	75
32	การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 3-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มีอัตราส่วนของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสและภาวะการเลี้ยง เช่นเดียวกับรูปที่ 30.....	76
33	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของราตั้งต้น *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มีอัตราส่วนของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสและภาวะการเลี้ยง เช่นเดียวกับรูปที่ 29.....	78
34	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มีอัตราส่วนของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสและภาวะการเลี้ยง เช่นเดียวกับรูปที่ 30.	79
35	การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และค่าแอคติวิตีจำเพาะ ของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 3-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มีน้ำตาลกลูโคส 1 % ความเป็นกรดด่าง 4.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 °ซ) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ถ่ายเลี้ยงเชื้อเป็นจำนวน 5 ครั้ง.....	80
36	การเจริญของราตั้งต้น *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่ผ่านการถ่ายเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีเดกซ์แทรนเป็นจำนวน 5 ครั้ง เลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ เพื่อทดสอบผลของเดกซ์แทรนต่อการผลิตเอนไซม์ โดยมีอัตราส่วนของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสเป็น 0.25:0.75, 0.50:0.50, 0.75:0.25 และ 1.0:0 ตามลำดับ ความเป็นกรดด่าง 6.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 °ซ) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที.....	82

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

37 การเจริญของรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ที่ผ่านการถ่ายเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีเดกซ์แทรนเป็นจำนวน 5 ครั้ง เลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ เพื่อทดสอบผลของเดกซ์แทรนต่อการผลิตเอนไซม์ โดยมีอัตราส่วนของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสเป็น 0.25:0.75, 0.50:0.50, 0.75:0.25 และ 1.0:0 ตามลำดับ ความเป็นกรดด่าง 4.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 °ซ) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที..... 83

38 การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์ดั้งเดิน *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่ผ่านการถ่ายเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีเดกซ์แทรนเป็นจำนวน 5 ครั้ง เลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ เพื่อทดสอบผลของเดกซ์แทรนต่อการผลิตเอนไซม์ โดยมีอัตราส่วนของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสและภาวะการเลี้ยง เช่นเดียวกับรูปที่ 36..... 84

39 การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของเชื้อราลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ที่ผ่านการถ่ายเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีเดกซ์แทรนเป็นจำนวน 5 ครั้ง เลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ เพื่อทดสอบผลของเดกซ์แทรนต่อการผลิตเอนไซม์ โดยมีอัตราส่วนของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสและภาวะการเลี้ยง เช่นเดียวกับรูปที่ 37..... 85

40 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของสายพันธุ์ดั้งต้น *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่ผ่านการถ่ายเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีเดกซ์แทรนเป็นจำนวน 5 ครั้ง เลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ เพื่อทดสอบผลของเดกซ์แทรนต่อการผลิตเอนไซม์ โดยมีอัตราส่วนของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคส และภาวะการเลี้ยง เช่นเดียวกับรูปที่ 36..... 86

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
41	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเชื้อรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 3-14 ที่ผ่านการถ่ายเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีเดกซ์แทรนเป็นจำนวน 5 ครั้ง เลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ เพื่อทดสอบผลของเดกซ์แทรนต่อการผลิตเอนไซม์ โดยมีอัตราส่วนของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสและภาวะการเลี้ยง เช่นเดียวกับรูปที่ 37.....	87
42	ผลของอุณหภูมิ ต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	89
43	ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14	90
44	ผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	91
45	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	93
46	ผลของความเป็นกรดด่างต่อความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	94
47	ผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ต่อความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	95
48	ค่า K_m จากกราฟไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver - Burk plot) ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากรากลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....	97
49	การเลี้ยงราในกล่องโลหะ เพื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในขั้นปฐมภูมิ.....	120
50	ลักษณะการเกิดบริเวณใสของราที่ทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิในกล่องโลหะ.....	120

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

% = เปอร์เซนต์

°ซ = องศาเซลเซียส