

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติของลูกผสมใหม่ที่ได้จากการหลอมรวมโปรโตพลาส

ระหว่าง *Aspergillus niger* กับ *Trichoderma viride*

(Characterization of the new hybrid strains via protoplast fusion

between *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*)

โดย

547.037
ย442ค
ร.3

ผศ.ดร.ยุวดี วัฒนโกศาสิน

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

(2541)

547 037

๕๔๔๒๗

๖.๖

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติของลูกผสมใหม่ที่ได้จากการหลอมรวมโปรโตพลาส

ระหว่าง *Aspergillus niger* กับ *Trichoderma viride*

(Characterization of the new hybrid strains via protoplast fusion

between *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*)

โดย

ผศ.ดร.ยุวดี วัฒนโกศลสิน (หัวหน้าโครงการฯ)

ผศ.ดร.สมศักดิ์ สร้างบิน (ผู้ร่วมโครงการฯ)

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก งบประมาณแผ่นดิน หมวดเงินอุดหนุน

สำหรับโครงการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2541

18 ส.ค. 2542

บทคัดย่อ

ในการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสม (*Aspergillus niger* AT-11-2-3, *Aspergillus niger* AT-11-2-10 และ *Aspergillus niger* AT-11-2-14) ที่ได้จากการหลอมรวมโปรโตพลาสข้ามสายพันธุ์ (Intergeneric protoplast fusion) ระหว่าง *Aspergillus niger* Yang no.2 กับ *Trichoderma viride* WU-36B พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมทั้งสามนั้นสามารถเจริญและผลิตกรดมะนาวโดยใช้กลูโคส เซลโลบิโอส และเซลลูโลส เป็นแหล่งต้นตอของพลังงานได้ ในขณะที่ *A. niger* Yang no.2 ไม่สามารถใช้เซลลูโลสในการเจริญและผลิตกรดมะนาว ส่วน *T. viride* WU-36B นั้น ไม่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ไม่ว่าจะใช้ กลูโคส เซลโลบิโอส หรือ เซลลูโลส นอกจากนั้นยังพบว่า เชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมทั้งสามจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส (β -Glucosidase และ CMCase) ได้สูงกว่าเชื้อรา *A. niger* Yang no.2 แต่จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์ดังกล่าวได้ต่ำกว่า *T. viride* WU-36B ส่วนการศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่ารูปแบบของการตัด Chromosomal DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ การใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมทั้งสามมีรูปแบบของดีเอ็นเอเป็นแบบผสมโดยมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอบางชิ้นเหมือนกับ *A. niger* Yang no.2 และบางชิ้นเหมือนกับ *T. viride* WU-36B

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาที่ดำเนินการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 คุณสมบัติและประโยชน์ของกรดมะนาว	5
2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว	6
2.3 ลักษณะโดยทั่วไปของ <i>Aspergillus niger</i>	9
2.4 การคัดเลือกพันธุ์ (Strain selection)	9
2.5 การคัดเลือกพันธุ์ (Strain selection)	10
2.6 การคัดเลือกพันธุ์ (Strain selection)	10
2.7 การคัดเลือกพันธุ์ (Strain selection)	11
2.8 อิทธิพลของเกลืออนินทรีย์ (Effect of inorganic salt)	11
2.9 ปัจจัยเกี่ยวกับความเป็นกรด-ด่าง (pH Factor)	12
2.10 ปัจจัยเกี่ยวกับอุณหภูมิ (Temperature factor)	13
2.11 เกี่ยวกับการให้อากาศ (Aeration factor)	13
2.12 เรื่องฟองและการควบคุม (Foaming problem and control)	14
2.13 ระยะเวลาในการหมัก และผลผลิต (Fermentation time and yield)	14

เรื่อง	หน้า
2.14 การเก็บเกี่ยวผลผลิต (Product recovery)	14
2.15 สารกระตุ้น (Stimulants)	15
2.16 หลักทั่วไปในการเก็บรักษาและเตรียมเชื้อจุลินทรีย์	15
2.17 ชีวเคมีกรหมักกรดมะนาว	18
2.18 สันฐานวิทยาของเชื้อรา	19
2.19 วัตถุดิบ (Raw material)	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	25
3.1 การเก็บรักษาเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง	25
3.2 การผลิตกรดมะนาวด้วยสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) เมื่อใช้ Cellobiose และ Cellulose powder เป็นแหล่งพลังงาน	25
3.3 การเตรียม Culture filtrate	26
3.4 การวัดปริมาณกรดมะนาวใน Culture filtrate	26
3.5 การวัดแอกติวิตี้ของเอนไซม์	27
3.6 การวัดน้ำตาลรีดิวซิง	27
3.7 การสกัด Chromosomal DNA	28
3.8 ทดสอบหาเอ็นที่จำเพาะต่อการสร้างเอนไซม์ NADP^+ -Specific Isocitrate Dehydrogenase ในสายพันธุ์ตั้งต้นกับสายพันธุ์ลูกผสม	28
3.9 การเปรียบเทียบขนาดของ DNA เมื่อใช้ Primer ชนิดต่าง ๆ	30
3.10 การตัด Chromosomal DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	32
บทที่ 4 ผลการวิจัย	33
4.1 ผลการทดสอบการเจริญของเชื้อราลูกผสม	33
4.2 ผลการผลิตกรดมะนาวของเชื้อราลูกผสม	33
4.3 ผลการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสม	35

เรื่อง

หน้า

4.4	ผลการศึกษาการตัด Chromosomal DNA ของเชื้อราลูกผสม ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	36
4.5	ผลการทดสอบหาเอ็นที่จำเพาะต่อการสร้าง NADP ⁺ -specific isocitrate dehydrogenase เพื่อใช้ในการจำแนกเชื้อราสายพันธุ์ ลูกผสมกับสายพันธุ์ตั้งต้น	39
4.6	ผลการทดสอบการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้ ไพโรเมอร์ชนิดต่าง ๆ	41
บทที่ 5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	43
บทที่ 6	เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก		50

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว	8
2 การผลิตกรดมะนาวของเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น (<i>Aspergillus niger</i> Yang no.2)	33
3 การผลิตกรดมะนาวของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมชนิดต่าง ๆ	34
4 การผลิตกรดมะนาวของเชื้อราลูกผสมเมื่อใช้เซลล์โลส เป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน	35
5 เปรียบเทียบการสังเคราะห์เอนไซม์เซลล์ูเลสระหว่างเชื้อรา สายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์ตั้งต้น	36

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2 TCA cycle	18
3 การย่อยสลายเซลล์ของเอนไซม์เซลล์ูลัส	23
4 แสดงรูปแบบของการตัด Chromosomal DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสม ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoR I ; เลนหมายเลข 1; AT 11-2-3, เลนหมายเลข 2; AT 11-2-10, เลนหมายเลข 3; AT 11-2-14, เลนหมายเลข 4; <i>A. niger</i> Yang no.2, เลนหมายเลข 5; <i>T. viride</i> WU-36B และ เลนหมายเลข 6; Marker (λ /Hind III)	37
5 แสดงรูปแบบของการตัด Chromosomal DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสม ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III ; เลนหมายเลข 1; Marker (λ /Hind III), เลนหมายเลข 2; <i>T. viride</i> WU-36B, เลนหมายเลข 3; <i>A. niger</i> Yang no.2, เลนหมายเลข 4; AT 11-2-3, เลนหมายเลข 5; AT 11-2-10 และ เลนหมายเลข 6; AT 11-2-14	37
6 แสดงรูปแบบของการตัด Chromosomal DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสม ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sma I ; เลนหมายเลข 1; AT 11-2-3, เลนหมายเลข 2; AT 11-2-10, เลนหมายเลข 3; AT 11-2-14, เลนหมายเลข 4; <i>A. niger</i> Yang no.2, เลนหมายเลข 5; <i>T. viride</i> WU-36B และ เลนหมายเลข 6; Marker (λ /Hind III)	38
7 แสดงรูปแบบของการตัด Chromosomal DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสม ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sau3 AI ; เลนหมายเลข 1; Marker (λ /Hind III), เลนหมายเลข 2; <i>T. viride</i> WU-36B, เลนหมายเลข 3; <i>A. niger</i> Yang no.2, เลนหมายเลข 4; AT 11-2-3, เลนหมายเลข 5; AT 11-2-10 และ เลนหมายเลข 6; AT 11-2-14	38

รูปที่

หน้า

- 8 แสดงรูปแบบ PCR amplification products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ;
Marker (pBR322/Msp I) (เลขหมายเลข 1), AT 11-2-3 (เลขหมายเลข 2),
AT 11-2-10 (เลขหมายเลข 3), AT 11-2-14 (เลขหมายเลข 4),
A. niger Yang no.2 (เลขหมายเลข 5) และ
T. viride WU-36B (เลขหมายเลข 6) โดยใช้ไพรเมอร์ 39
- 9 แสดงรูปแบบ Hybridization ของ PCR amplification products
ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (จากรูปที่ 8) โดยใช้ NADP⁺-Specific
Isocitrate Dehydrogenase probe ; Marker (pBR322/Msp I) (เลขหมายเลข 1),
AT 11-2-3 (เลขหมายเลข 2), AT 11-2-10 (เลขหมายเลข 3),
AT 11-2-14 (เลขหมายเลข 4), *A. niger* Yang no.2 (เลขหมายเลข 5)
และ *T. viride* WU-36B (เลขหมายเลข 6) 40
- 10 แสดงรูปแบบ PCR amplification products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ;
T. viride WU-36B (เลขหมายเลข 1), AT 11-2-3 (เลขหมายเลข 2),
AT 11-2-10 (เลขหมายเลข 3), AT 11-2-14 (เลขหมายเลข 4),
A. niger Yang no.2 (เลขหมายเลข 5) และ Marker (λ /Hind III)
(เลขหมายเลข 6) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับของเบสที่มีความจำเพาะต่อ
16S-like rRNA genes 41
- 11 แสดงรูปแบบ PCR amplification products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ
T. viride WU-36B (เลขหมายเลข 1), AT 11-2-3 (เลขหมายเลข 2),
AT 11-2-10 (เลขหมายเลข 3), AT 11-2-14 (เลขหมายเลข 4),
A. niger Yang no.2 (เลขหมายเลข 5) และ Marker (100 bp, DNA ladder)
(เลขหมายเลข 6) โดยใช้ Random primers 42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาที่ดำเนินการวิจัย

กรดมะนาวเป็นกรดอินทรีย์ที่พบได้ตามธรรมชาติทั้งพืชและสัตว์ โดยจากพืชจะเป็นผลไม้ประเภทที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะนาว ส้ม เป็นต้น ส่วนจากสัตว์จะอยู่ในรูปขององค์ประกอบของเนื้อเยื่อและของไหล เนื่องจากกรดมะนาวเป็นสารที่ละลายได้ง่าย มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม มีความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายง่าย ราคาถูกและหาซื้อง่าย จึงพบว่าสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม การผลิตยา เครื่องสำอาง ผสมน้ำยาขัดโลหะ เป็นต้น การผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมระยะแรกๆ นั้น ได้จากการสกัดกรดจากผลไม้จำพวกพวกส้มและมะนาว ต่อมาได้มีการเปลี่ยนแปลงวิธีการผลิตมาเป็นการหมักด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้มีหลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus niger*, *A. clavatus*, *Penicillium luteum* เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีเชื้อยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงและนิยมใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบันคือ *A. niger* เพราะทำให้เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตสูงเมื่อเทียบกับวัตถุดิบที่ใช้ในขบวนการหมัก

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีวัสดุที่เหลือใช้ทางการเกษตรจำนวนมาก ซึ่งมีสารเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักในวัสดุที่เหลือใช้ทางการเกษตรจำนวนมากนั้น เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย จึงน่าจะเป็นการเหมาะแก่การนำมาพัฒนาเพื่อใช้ให้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม แต่ก็ยังไม่มีรายงานการผลิตกรดมะนาวจากเซลลูโลสได้โดยตรง ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากจุลินทรีย์ใช้ในการผลิตไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสโดยตรงได้ ดังนั้นวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิตจึงยังคงเป็นแป้งและน้ำตาล

ด้วยเหตุที่ชานอ้อยมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีกลูโคสเป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงพยายามศึกษาถึงกระบวนการปรับแต่งชานอ้อย ให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนเข้าสู่ขบวนการหมัก เพื่อใช้ในการผลิตกรดมะนาว ศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากวัตถุดิบที่ได้จากการปรับแต่งแล้ว รวมทั้งรูปแบบการนำกลูโคสไปใช้เพื่อผลิตกรดมะนาว และเนื่องจากสารต้านออกซิเดชันที่คาดว่าจะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดมะนาวอยู่ในสภาวะที่เป็นของแข็ง จึงต้องใช้เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2 เพราะเป็นสายพันธุ์ที่เคยมีรายงานว่ามีความสามารถผลิตกรดมะนาวในสภาวะแบบ Semi-solid culture แต่อย่างไรก็ตามเชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ได้ จึงทำให้ไม่สามารถนำวัสดุที่เหลือใช้ทางการเกษตรที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่มาใช้ในการผลิตกรดมะนาวได้โดยตรง จึงมีความจำเป็นที่จะต้องสร้างสายพันธุ์ของเชื้อราที่ให้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เทคนิคการหลอมรวมโปรโตพลาส (Protoplast fusion) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งของการพยายามที่จะนำมาใช้ในการสร้างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้มีศักยภาพในการผลิตกรดอะมิโนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในแง่ของการหลอมรวมโปรโตพลาสในระหว่างสายพันธุ์เดียวกัน (Intraspecific protoplast fusion) เช่นการหลอมรวมโปรโตพลาสระหว่าง *Aspergillus niger* WU-2223L ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะมิโนในกระบวนการผลิตแบบ Submerged culture กับ *Aspergillus niger* Yang no.2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะมิโนในกระบวนการผลิตแบบ Semi-solid culture โดยได้ลูกผสมที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะมิโนได้ทั้งในกระบวนการผลิตแบบ Submerged culture และ Semi-solid culture นอกจากนั้นได้มีการพยายามที่จะใช้เทคนิคการหลอมรวมโปรโตพลาสข้ามสายพันธุ์ (Intergeneric protoplast fusion) โดยการใช้ *A. niger* Yang no.2 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตกรดอะมิโนจากกลูโคสแต่ไม่สามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งต้นตอของพลังงานในการผลิตกรดอะมิโนได้เนื่องจากไม่สามารถผลิตกลุ่มของเอนไซม์เซลลูเลสได้มาหลอมรวมกับโปรโตพลาสของ *Trichoderma viride* WU-36B ซึ่งเป็นราที่มีความสามารถในการผลิตกลุ่มของเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง โดยมีความมุ่งหวังที่จะได้สายพันธุ์ลูกผสมที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะมิโนโดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งต้นตอของพลังงานรวมอยู่ในสายพันธุ์ลูกผสมนั้น ทั้งนี้เพื่อที่จะพัฒนาหรือเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะมิโนโดยใช้แหล่งวัตถุดิบที่มีราคาถูกจำพวกวัสดุเส้นใย (Cellulosic materials)

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองสร้างสายพันธุ์ลูกผสมดังกล่าวแล้วพบว่า ลูกผสม AT 11-2-3, AT 11-2-10 และ AT 11-2-14 ที่ได้จากการหลอมรวมโปรโตพลาสระหว่าง *A. niger* Y-(b) และ *T. viride* M5S51 มีคุณลักษณะที่มีความแตกต่างไปจากลูกผสมที่ได้เคยมีการทำการทดลองมาแล้วคือ จากการศึกษาคุณสมบัติของนิเวศของลูกผสม พบว่า สปอร์ หรือ Conidia ของ ลูกผสมจะมีลักษณะเป็น Multinuclei ในขณะที่ ทั้งสายพันธุ์ *A. niger* Y-(b) และ *T. viride* M5S51 จะมีลักษณะเป็น Uninuclei และเมื่อนำลูกผสมดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำพบว่า ลูกผสมที่ได้จะเจริญได้ดีและไม่แสดงคุณลักษณะเด่นของทั้งสองสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการหลอมรวมโปรโตพลาส เช่นสปอร์จะมีสีเฉพาะตัว รวมทั้งสีที่มีการสะสมในเส้นใยของรา แต่ในขณะเดียวกัน เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรสมบูรณ์ พบว่าสายพันธุ์ของลูกผสม จะเจริญได้ดีเช่นเดียวกัน แต่จะมีการแสดงคุณลักษณะเด่นของสายพันธุ์ดั้งเดิม (*A. niger* และ *T. viride*) โดยแบ่งออกเป็น Sector อย่างชัดเจน นอกจากนี้

ยังพบว่าปริมาณของดีเอ็นเอในลูกผสมจะอยู่ระหว่างกึ่งกลางของ *A. niger* Y-(b) และ *T. viride* M5S51 จึงเป็นที่น่าสนใจว่าลูกผสมดังกล่าวนี้จะมีการพาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของทั้ง *A. niger* Y-(b) และ *T. viride* M5S51 มาอยู่รวมกันภายในเซลล์ของลูกผสม ดังนั้นจึงน่าที่จะทำการศึกษาค้นคว้าต่อไปว่าสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้นั้นจะเป็นลูกผสมที่นำ Genetic material ของทั้ง *A. niger* Y-(b) และ *T. viride* M5S51 มารวมอยู่ด้วยกันหรือไม่ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยในการศึกษาถึงคุณสมบัติต่างของลูกผสมที่ได้นั้นนอกเหนือไปจากการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพดังกล่าว

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- ก. ศึกษาถึงคุณสมบัติของสายพันธุ์ลูกผสม AT 11-2-3, AT 11-2-10 และ AT 11-2-14 (ได้รับความอนุเคราะห์สายพันธุ์ จาก Usami Laboratory, Department of Applied Chemistry, Waseda University, Tokyo, Japan) เช่นการใช้แหล่งต้นตอของคาร์บอน อาทิ Glucose, Cellobiose และ Cellulose Powder ในการเจริญ และการผลิตกรดมะนาว
- ข. ศึกษาถึงปริมาณ และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลล์ูลเลส ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ลูกผสม
- ค. ศึกษาการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ชนิดต่างๆ ในการตัด Chromosomal DNA ของสายพันธุ์ลูกผสม
- ง. จากข้อ ค. หาตัวติดตาม (DNA probe) ที่จำเพาะต่อ Chromosomal DNA ของลูกผสม
- จ. สังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ เช่น ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อการสร้างเอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase และ Random primers เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบของดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของสายพันธุ์ลูกผสมเปรียบเทียบกับ *Aspergillus niger* และ *Trichoderma viride*

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ราสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง *A. niger* และ *T. viride* เป็นสายพันธุ์ของราที่คาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวจากวัตถุดิบราคาถูกเช่น สารเยื่อใยต่างๆ เนื่องจากสายพันธุ์ลูก

ผลดังกล่าวนี้ มีการหลอมรวมโปรโตพลาสข้ามสายพันธุ์ โดยที่ทั้งสองสายพันธุ์นี้มีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป ซึ่งสามารถทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่สอดคล้องกันในการทำงาน โดย โครโมโซม หรือ จิน ของ *T. viride* ในลูกผสมจะสร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลายสารเยื่อใย (Cellulosic Materials) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายซึ่งอาจจะเป็น กลูโคส หรือ Cellobiose ในขณะเดียวกันนั้น เซลล์ของลูกผสมยังมีโครโมโซม หรือ จิน ของ *A. niger* ที่สามารถใช้กลูโคส หรือ Cellobiose เป็น แหล่งต้นตอของคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตกรดมะนาวในประเทศไทยนั้นนิยมใช้มันสำปะหลังเป็น วัตถุดิบในการผลิตและ กระบวนการที่ใช้เป็นแบบ Solid Culture ซึ่งกระบวนการผลิตโดยวิธีดังกล่าว นี้ จำเป็นจะต้องใช้ พื้นที่ ในการผลิตค่อนข้างมาก และมี โอกาสในการเกิดการปนเปื้อน (Contamination) ของจุลชีพอื่นได้ ซึ่งจะมีผลอย่างมากต่อการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น หากสามารถทำการศึกษาถึงคุณสมบัติของราสายพันธุ์ลูกผสมทั้ง ทางด้านกายภาพและชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากสามารถศึกษาลงไปถึงในระดับจีโนมว่าราสายพันธุ์ ลูกผสมนี้ได้นำจินของทั้ง *A. niger* และ *T. viride* มารวมอยู่ในสายพันธุ์เดียวกัน รวมทั้งการ แสดงออกของจินเหล่านั้นยังคงเพียงพอที่จะนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพก็จะเป็น อีกหนทางหนึ่งที่สามารถจะลดต้นทุนในการผลิตกรดมะนาวเพื่อที่จะแข่งขันกับตลาดต่างประเทศได้ อีกทั้งยังเป็นการนำไปสู่การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกรดมะนาวในประเทศไทย และอาจเป็นการ สร้างความร่วมมือระหว่างภาคธุรกิจเอกชนและหน่วยงานของรัฐต่อไป

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณสมบัติและประโยชน์ของกรดมะนาว

กรดมะนาวหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กรดซิตริก ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล 3 หมู่ (Tricarboxylic acid) มีชื่อทางเคมีว่า 2-ไฮดรอกซี-1, 2, 3-โพรเพนไตรคาร์บอกซิลิกแอซิด (2-Hydroxy-1, 2, 3 propanetricarboxylic acid) หรือ เบต้า-ไฮดรอกซีไตรคาร์เบลลิลิกแอซิด (β -Hydroxytricarballic acid) และมีสูตรทางเคมีเป็น $C_6H_8O_7$

กรดมะนาวมีน้ำหนักโมเลกุล 192.12 และประกอบด้วย คาร์บอน 37.51% ไฮโดรเจน 4.20% และออกซิเจน 58.29% (Windholz et al, 1976) กรดมะนาวที่อยู่ในรูปแอนไฮเดรต (Anhydrate) จะมีจุดเดือดที่ 153 องศาเซลเซียส ในรูปผลึกที่เป็นโมโนคลินิกโฮโลฮีดรา (Monoclinic holohedra) จะมีค่าความหนาแน่น (d) 1.665 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่า pK1 เท่ากับ 3.128 ค่า pK2 เท่ากับ 4.767 และ pK3 เท่ากับ 6.396 กรดมะนาวจะละลายในน้ำได้ดีขึ้นหากอุณหภูมิของน้ำสูงขึ้น Bates และ Pinching (อ้างถึงใน Winholz และคณะ, 1976) รายงานว่าค่าการละลายในน้ำของกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จะมีค่า 54.0% (w/w) ที่ 20 องศาเซลเซียส มีค่า 59.2% ที่ 30 องศาเซลเซียส มีค่า 73.5% ที่ 70 องศาเซลเซียส มีค่า 76.2 % ที่ 80 องศาเซลเซียส มีค่า 78.8% ที่ 90 องศาเซลเซียส มีค่า 81.4% ที่ 100 องศาเซลเซียส มีค่า 84.0% กรดมะนาวอยู่ในรูปโมโนไฮเดรต (Monohydrate) หรือออโรโธรมบิกคริสตัล (Orthorombic crystal) เมื่ออยู่ในอุณหภูมิปกติสารละลายกรดมะนาวมีความหนาแน่น 1.542 และสูญเสียน้ำในสภาวะแห้ง หรือมีอุณหภูมิที่ 40-50 องศาเซลเซียส แต่หากอยู่ในสภาวะอากาศชื้นจะละลายที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส จุดเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส pH 2.2 สารละลายกรดมะนาว 10% จะมีความหนาแน่น 1.0392 ที่ 30% จะมีความหนาแน่น 1.2244 ที่ 40% จะมีความหนาแน่น 1.1709 ที่ 50% จะมีความหนาแน่น 1.2204 ที่ 60% จะมีความหนาแน่น 1.2738 (Halbeisen, 1948 อ้างถึงใน Windholz et al, 1976)

ปัจจุบันการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมอาศัยการหมักด้วยเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ ถึงแม้ว่าวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อผลิตกรดมะนาวมีแนวโน้มเป็นไปได้ก็ตาม แต่ให้ผลไม่คุ้มค่าทาง

เศรษฐกิจเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตที่ได้รับจากการหมัก กรดมะนาวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากทั้งในด้านอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม การเภสัชกรรม และใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ โดยกรดมะนาวที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มนั้นได้แก่ เครื่องดื่มที่ทำจากน้ำผลไม้ทั้งชนิดเข้มข้นและเจือจาง ในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนมได้แก่ เนยแข็ง นมข้น ชนิดระเหยน้ำออก นอกจากวัตถุประสงค์เพื่อปรับสภาพกรด (Acidulant) เนื่องจากกรดมะนาวมีความสามารถในการละลายสูง ความเป็นพิษต่ำและให้รสเปรี้ยวที่ยอมรับได้ ทั้งยังป้องกันการเสียในอาหารหรือประเภทน้ำเชื่อมเข้มข้น (Syrup) ป้องกันการขึ้นเนื่องจากตะกอนในไวน์ ป้องกันการตกผลึกในน้ำผึ้ง ป้องกันการเปลี่ยนสี กลิ่น รสในเนื้อมู กุ้ง พืชผัก ผลไม้บรรจุกระป๋อง เนื่องจากกรดมะนาวไปทำลายเอนไซม์จากธรรมชาติ และยังช่วยรักษากรดแอสคอร์บิกที่มีโดยธรรมชาติของพืชผักอีกด้วย กรดมะนาวใช้เติมในผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช ไขมันและน้ำมันจากสัตว์ ช็อกโกแลต โกโก้ เพื่อเพิ่มฤทธิ์สารกันหืน (Antioxidants) และในปัจจุบันกรดมะนาวย่อยสลายได้ง่ายจึงนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอกแทนฟอสเฟต และใช้กำจัดซิลิโพล

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้ผลิตกรดมะนาวได้ เช่น เชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรีย ในปี 1917 Currie ผลิตกรดมะนาวได้เป็นครั้งแรกโดยใช้ *Aspergillus niger* และปัจจุบันยังคงใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดมะนาว

ข้อดีของการใช้ *A. niger* ในการผลิตกรดมะนาว

- ก. การปฏิบัติงานในขบวนการผลิตสามารถทำได้ง่าย
- ข. วัตถุดิบที่เชื้อราสามารถใช้เพื่อผลิตกรดมะนาวมีราคาถูก
- ค. ผลิตผลที่ได้มีความคงตัวและมีปริมาณสูง

ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวจะแปรเปลี่ยนตามสายพันธุ์ของเชื้อราและวิธีการที่ใช้ นั่นคือ สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้ดีในสภาวะที่เรียกว่า Semi-solid culture แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้ในการผลิตกรดมะนาวด้วยวิธี Shaking culture ก็อาจจะให้ผลผลิตของกรดมะนาวได้ไม่ดี (Sarangbin S., et al, 1994) ส่วนสายพันธุ์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดหนึ่งได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่ง

คาร์บอนชนิดอื่นก็อาจทำให้การผลิตมะนาวได้ไม่ดี จึงทำให้มีการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด และมีเชื้อราคาถุก สำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด



ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว

Filamentous Fungi

Aspergillus niger

A. carborarius

A. glaucus

A. niger

A. oryzae

A. phoenici

A. saitoi

A. usamii

A. wentii

Penicillium janthianellum

P. restrictum

Trichoderma viride

Yeast

Candida lipolytica

C. tropicalis

Debaryomyces hansenii

Hansenula anomala

Pichia farinosa

Saccharomyces lipolytica

Torulopsis farinosa

Yarrowia lipolytica

Bacteria

Arthrobacter paraffineus

Brevibacterium ketoglutamicum

Corynebacterium fascians

2.3 ลักษณะโดยทั่วไปของ *Aspergillus niger*

A. niger เป็นเชื้อราที่นิยมใช้ในการผลิตกรดมะนาวด้วยกรรมวิธีการหมัก เชื้อรานี้จัดเป็นเชื้อราชั้นสูงอยู่ใน Sub-division Eumycotina, Class Ascomycetes, Subclass Euascomycetidae โดยทั่วไปเชื้อราตัวนี้มีสีดำ แต่เมื่อเชื้อรานี้ถูกกลายพันธุ์ก็อาจเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเขียวออกเหลือง หรือขาวก็ได้ ลักษณะของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ก็คือ เส้นใยของเชื้อรามีผนังกันเป็นห้องๆ ก้านชูอับสปอร์ (Conidiophore หรือ Stalk) ตั้งอยู่บนเซลล์ชนิดพิเศษเรียกว่า “Foot cell” เซลล์นี้มีขนาดใหญ่และผนังหนา ปลายสุดของก้านชูอับสปอร์จะมีหนึ่งอับสปอร์ (Vesicle) อับสปอร์นี้มีรูปร่างต่างๆ กัน เช่น กลม รีและอื่นๆ บนอับสปอร์จะมีหนาม (Sterigma) อยู่โดยรอบหรือเพียงบางส่วน ในบางครั้งจะสร้างหนามสองชั้น หนามชั้นแรกสุด (Primary sterigma) จะอยู่ติดกับอับสปอร์ ส่วนหนามชุดที่สอง (Secondary sterigma) จะอยู่ถัดจากหนามชั้นแรกออกมา ถัดจากชั้นหนามจะเป็นที่ตั้งของสปอร์ (Conidia) สปอร์นี้อาจเกิดจากการยืตัวของหนามแล้วสร้างผนังกัน บางครั้งสปอร์จะต่อกันเป็นสาย โดยสปอร์ที่อยู่ปลายนอกสุดของสายจะเป็นสปอร์ที่แก่ที่สุด

2.4 การคัดเลือกพันธุ์ (Strain selection)

A. niger ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักในปัจจุบันเป็นเชื้อราที่ถูกทำให้กลายพันธุ์โดยใช้กรรมวิธีและสารเคมีต่างๆ เพื่อให้สามารถสร้างกรดมะนาวออกมาได้มากขึ้น (Das, 1972; Chaudhary และคณะ, 1974; Banik และคณะ, 1975; Hanan และคณะ, 1976) แต่ในการรักษาประสิทธิภาพในการผลิตกรดของเชื้อให้คงที่ตลอดไปนั้นเป็นเรื่องลำบาก มักพบเสมอว่า เชื้อราที่เพาะจากสปอร์ที่เก็บไว้นานเกินไปนั้นจะผลิตกรดมะนาวออกมาได้น้อย ซึ่งเหตุผลของเรื่องนี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัด วิธีแก้อย่างหนึ่งก็คือทำการถ่ายเชื้ออย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ Rohr และคณะ (1976) ได้เสนอแนะวิธีคัดเลือกพันธุ์ *A. niger* ที่ให้ผลผลิตสูงโดยทำการเพาะสปอร์เดี่ยวๆ ของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 115 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจหาปริมาณกรดมะนาวที่เกิดขึ้นโดยพ่นด้วยสารละลายของ *p*-Dimethyl-aminobenzaldehyde ที่มีความเข้มข้น 4% ซึ่งละลายอยู่ใน Acetic acid anhydride ให้ความร้อนที่ 140 องศาเซลเซียส 1 นาที ถ้ามีกรดมะนาวอยู่จะเกิดวงสีม่วงขึ้น (เพียง 1 ไมโครกรัมของกรดมะนาวก็สามารถตรวจพบได้) และปฏิกิริยานี้จำเพาะต่อกรดมะนาวเท่านั้น โดยกรดแร่หรือกรด

อินทรีย์อื่นๆ ที่ผลิตได้จากเชื้อราจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารตรวจสอบแต่ประการใด ประสิทธิภาพในการสร้างกรดของโคโลนีนีมีหน่วยวัดเรียกว่า แอซิดยูนิตเรต (Acidunitage) (AU-value) ซึ่งมีค่าเท่ากับอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางของวงแหวนสีม่วงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีนี ถ้าโคโลนีสสร้างกรดออกมามากค่า AU-value ก็จะสูงตามไปด้วย

2.5 การผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลว (Citric acid production in shake culture)

การผลิตกรดมะนาวโดยการหมักนอกจากจะใช้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงแล้ว ยังต้องควบคุมองค์ประกอบของอาหาร อุณหภูมิในระหว่างการหมัก การให้อากาศ ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการหมักจะต้องไม่เร็วหรือช้าเกินไป ในระหว่างที่มีการหมักเอกรดมะนาวนั้นอาจแบ่งออกเป็น 2 ระยะ (Hockenhull, 1960) คือ

2.5.1 ช่วงแรกของการหมักเชื้อราจะมีอัตราการเจริญสูงสุด น้ำตาลส่วนหนึ่งจะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญและสร้างเซลล์ ระยะแรกนี้เชื้อราจะให้กรดออกมาน้อย

2.5.2 ระยะถัดมาอัตราการเจริญของเชื้อราจะลดลง แต่เชื้อราจะเริ่มสร้างกรด ในระยะนี้ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสิ่งสำคัญมาก ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรด-ด่างเป็น 7 เชื้อราจะสร้างกรดกลูโคนิก (Gluconic acid) แต่ถ้าความเป็นกรดอยู่ในช่วง 3-6 เชื้อราจะสร้างกรดออกซาลิก (Oxalic acid) เป็นส่วนใหญ่

2.6 แหล่งคาร์บอน (Carbon sources)

ในทางทฤษฎีแล้วน้ำตาลที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2-7 และชนิด 12 คาร์บอน สามารถเปลี่ยนเป็นกรดมะนาวได้ (Prescott และ Dunn, 1959) แต่น้ำตาลที่ดีที่สุดในการผลิตกรดมะนาวโดย *A. niger* ก็คือ ซูโครส ถัดไปคือ กลูโคสและฟรักโทส ตามลำดับ (Hossain และคณะ, 1984) ส่วนน้ำตาลนมถูกเปลี่ยนเป็นกรดมะนาวได้น้อย (Hossain และคณะ, 1983) ในขณะที่กาแลคโตสไม่ให้เกิดกรดมะนาวออกมาเลย แต่เชื้อเจริญได้ดีพอๆ กับเลี้ยงในซูโครส (Hossain และคณะ, 1984) ส่วน Miall (1978) ประสบผลสำเร็จจากการใช้กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้ง นอกจากนี้ยังอาจใช้น้ำตาลจากอ้อยหรือหัวผักกาดหวานก็ได้ โดยปริมาณของน้ำตาลที่ใช้ทั่วไปจะอยู่ในช่วง 140-200 กรัมต่อลิตร (Prescott และ Dunn, 1959) ส่วน Currie (1917) ใช้ซูโครสที่มีความเข้มข้น 125-150 กรัมต่อ

ลิตร ในการผลิตกรดมะนาว ทางด้าน Doelger กับ Prescott (1934) พบว่าเมื่อใช้ซูโครสเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อดำเนินการหมักไปได้ 9-12 วัน และยังพบอีกว่าถ้าใช้น้ำตาลเกิน 150 กรัมต่อลิตร จะเหลือน้ำตาลภายหลังการหมักสูงกว่าปกติ (ต่ำกว่า 30 กรัมต่อลิตร) เมื่อทดแทนซูโครสด้วยฟรักโทสหรือกลูโคส 10-50 กรัมต่อลิตร (จากจำนวนทั้งหมด 140 กรัมต่อลิตร) ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จะลดลงเมื่อเทียบกับการหมักที่ใช้ซูโครสเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ซูโครสที่ถูกย่อยไปบางส่วนในระหว่างการนี้ฆ่าเชื้อจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลิตลดลงได้

2.7 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sources)

A. niger สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของเกลือต่างๆ ได้ Porgers (1932) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โซเดียมไนเตรด 0.4 เปอร์เซ็นต์ จะให้ผลที่ดีกว่าใช้เกลือแอมโมเนียมไนเตรด หรือแอมโมเนียมซัลเฟต กรณีที่ใช้เกลือแอมโมเนียมไนเตรด เกินกว่า 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณมวลของเชื้อจะสูง (Prescott และ Dunn, 1959) ส่วน Snell กับ Schweiger (1949) พบว่า แอมโมเนียมคาร์บอเนตเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ดีที่สุดเพราะ

- ก. การสร้างกรดออกซาลิกจนวิเคราะห์ไม่พบในน้ำหมัก
- ข. ไม่มีการสร้างสารสี
- ค. ไม่เกิดเมือกเมื่อเพิ่มการให้อากาศ และแยกเอาเชื้อออกจากน้ำหมักได้ง่ายเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก
- ง. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวต่อน้ำหนักมวลของเชื้อ

นอกจากนี้ Shepard (1963) ยังกล่าวว่าสามารถเพิ่มผลผลิตของกรดมะนาวได้เมื่อเติมเกลือไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากที่เชื้อราหยุดสร้างเซลล์ โดยจะเติมหลังจากที่การหมักดำเนินไปได้ 1/3 ของเวลาทั้งหมด ถ้าหากทำได้เช่นนี้ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลจะสูงขึ้น และได้กรดมะนาวเพิ่มขึ้นด้วย แต่ถ้าเติมไนโตรเจนก่อนเวลาสมควรผลผลิตก็จะลดลง

2.8 อิทธิพลของเกลืออนินทรีย์ (Effect of inorganic salt)

นอกเหนือไปจากน้ำตาลและเกลือแอมโมเนียมไนเตรดแล้ว *A. niger* ยังต้องการธาตุอาหารอื่นๆ เช่น โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส กำมะถัน และแมกนีเซียม ในการเจริญอีกด้วย จากรายงานของ

Currie (1917) และ Doelger กับ Prescott (1934) พบว่าการผลิตกรดมะนาวให้ได้ผลดีนั้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตอยู่ 0.75-1.00 กรัมต่อลิตร และดีเกลืออยู่ 0.20-0.25 กรัมต่อลิตร ในระยะเริ่มต้นของการหมักขณะยังมีเกลือฟอสเฟตในอาหาร เชื้อราจะอยู่ในช่วงการเจริญโดยที่เกลือฟอสเฟตจะชะลอการสร้างกรดไว้ก่อน เมื่อเกลือฟอสเฟตหมดไปเชื้อจึงเริ่มการสร้างกรดขึ้น (Szucs, 1944) ส่วน Steel และคณะ (1955) เติมเกลือฟอสเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากกากน้ำตาลของหัวผักกาดหวาน ในปริมาณ 0.01-0.50 กรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีการสร้างกรดออกซาลิก แต่เมื่อดำเนินการจะมีขนาดใหญ่ผิดปกติทำให้มีความหนืดเพิ่มขึ้น ในที่สุดจะขัดขวางการทำงานของเครื่องให้อากาศ นอกจากนี้ Martin กับ Steel (1955) พบว่าถ้าเติมเกลือฟอสเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากกากน้ำตาลหัวผักกาดหวานมากเกินไป นอกจากจะได้กรดมะนาวออกมาน้อยแล้ว เชื้อรายังสร้างกรดกลูโคนิก กรดมาลิกเพิ่มขึ้นอีกด้วย

นอกเหนือจากเกลือฟอสเฟตแล้ว แมกนีเซียมและสังกะสี ยังมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวอีกด้วย Sue กับ Johnson (1947) พบว่าถ้าเติมแมกนีเซียมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 9.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อราสร้างสปอร์มากมายภายใน 48 ชั่วโมง แทนที่จะเป็น 68 ชั่วโมงอย่างทั่วไป แต่แมกนีเซียมที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อของขั้นเตรียมเชื้อนี้ จะถูกถ่ายทอดไปจนถึงขั้นการหมักและพบว่าแมกนีเซียมนี้เองจะไปลดปริมาณของกรดมะนาวที่ผลิตได้ ไม่ว่าจะใช้แมกนีเซียมเพียงตัวเดียวหรือจะใช้ร่วมกับสังกะสี ทองแดง และ/หรือเหล็กก็ตาม แต่ถ้าเลี้ยงเชื้อแบบผิวหน้า (Surface culture) แมกนีเซียมจะไม่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวแต่อย่างใด

2.9 ปัจจัยเกี่ยวกับความเป็นกรด-ด่าง (pH Factor)

ความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่จะทำให้การหมักบรรลุผลสำเร็จ เมื่อใช้ความเป็นกรด-ด่างต่ำๆ นอกจากจะได้กรดมะนาวออกมามาก ยังช่วยลดการเกิดกรดออกซาลิกและลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นได้อีกด้วย โดยไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อในอาหารเหลวที่อุณหภูมิและเป็นเวลานาน จากการทดลองของ Currie (1917) โดยปรับความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 3.4-3.5 ด้วยกรดเกลือและควบคุมพวกเกลืออนินทรีย์ จะได้กรดมะนาวออกมามากในขณะที่มีการสร้างกรดออกซาลิกน้อย กรดที่ใช้พบว่าการเกลือให้ประสิทธิภาพสูงกว่ากรดกำมะถัน กรดดินประสิว และกรดน้ำส้ม เมื่อพิจารณาถึงผลิตผลของกรดมะนาวที่ได้ออกมาหลังจากปรับความเป็น

กรด-ต่างด้วยกรดต่าง ๆ ดังที่กล่าวมา สำหรับกรดมด (formic acid) ต้องใช้ในปริมาณมากกว่าจึงจะปรับกรด-ต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหลือ 3.0 เพื่อป้องกันการรอกของสปอร์ (Prescott กับ Dunn, 1959)

2.10 ปัจจัยเกี่ยวกับอุณหภูมิ (Temperature factor)

ถึงแม้ *A. niger* จะเป็นเชื้อราในเขตโซนร้อน (Mehrotra, 1976) แต่อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวจากเชื้อราตัวนี้ก็แตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อและสภาวะการหมักปกติอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักจะอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส (Prescott กับ Dunn, 1959) ส่วน Doelger และ Prescott (1934) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อราชนิดนี้อยู่ระหว่าง 26-28 องศาเซลเซียส เขาพบว่าปริมาณการผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่ออุณหภูมิของการหมักเพิ่มขึ้นจาก 8-28 องศาเซลเซียส แต่ที่ 30 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่านี้การผลิตกรดมะนาวจะลดลง และกรดออกซาลิกจะถูกสร้างมากขึ้น

2.11 เกี่ยวกับการให้อากาศ (Aeration factor)

เชื้อราจัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ จึงจำเป็นอย่างยิ่งในการให้อากาศแก่เชื้อรา ในขณะที่ทำการหมักเอากรดมะนาว Kubicek กับคณะ (1980) ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักต่อการผลิตกรดมะนาว เขาพบว่าในช่วงการเจริญคงที่ของเชื้อราจะมีการผลิตกรดมะนาวออกมามาก และจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนมากกว่าในช่วงที่เชื้อรามีอัตราการเจริญสูง ซึ่งในระยะนั้นเชื้อราจะสร้างกรดออกมาน้อย ค่าวิกฤตการละลายได้ของออกซิเจนจะเป็น 18-21 มิลลิบาร์ (mbar) เมื่อเชื้อราอยู่ในระยะอัตราการเจริญสูง แต่ค่านี้จะเพิ่มเป็น 23-26 มิลลิบาร์ เมื่อเชื้อราอยู่ในระยะการเจริญคงที่ และมีการสะสมกรดมะนาวมาก ในระยะการเจริญคงที่ดังกล่าวนี้ ถ้าค่าวิกฤตการละลายได้ของออกซิเจนต่ำกว่าที่กำหนดแม้แต่เพียง 20 นาที ก็จะทำให้การผลิตกรดยุติลงได้โดยสิ้นเชิง แต่จะไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ ในขณะที่ทำการหมักเชื้อราย่อมปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาด้วย ก๊าซนี้มีผลโดยตรงต่อการผลิตกรดมะนาว จากการทดลองของ Foster และคณะ (1941) พบว่าเมื่อเติมคาร์บอนไดออกไซด์ลงไป 5-15 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่หมักนอกจากจะได้กรดออกมาน้อยแล้วยังทำให้การใช้น้ำตาลและการสร้างเส้นใยของเชื้อราลดลงด้วย

2.12 เรื่องฟองและการควบคุม (Foaming problem and control)

ในขณะที่หมักเอากรดมะนาวนั้นนอกจากจะมีการให้อากาศและการคนแล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ ยังมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่สูง ตลอดจนเชื้อปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาอีกด้วย จึงทำให้มีฟองเกิดขึ้นในขณะหมัก ฟองที่เกิดขึ้นอาจควบคุมได้โดยการเติมสารพวกไขมันหรือน้ำมันลงไป ในน้ำหมัก น้ำมันที่เติมลงไปนอกจากจะลดปัญหาเรื่องฟองแล้ว ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักอีกด้วย น้ำมันที่ใช้เติมอาจเป็นเนย น้ำมันหมู น้ำมันมะกอก น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม อื่น ๆ Gold กับ Kiber (1968) แนะนำในช่วงแรกของการหมักควรปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.0 เมื่อหมักไประยะหนึ่งแล้ว มันจะลดลงเหลือ 2.0-2.5 ถ้าความเป็นกรด-ด่างลดลงเหลือ 3.0 จะเริ่มมีปัญหาเรื่องฟอง จึงควรเติมสารกันฟองจำพวกไขมัน หรือน้ำมันลงไป 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ปริมาณที่ใช้ขนาดนี้สามารถป้องกันฟองได้ตลอดช่วงของการหมัก

2.13 ระยะเวลาในการหมัก และผลผลิต (Fermentation time and yield)

ระยะเวลาการหมักเอากรดมะนาวอยู่ในช่วง 7-10 วัน (Prescott กับ Dunn, 1959) ส่วนประสิทธิภาพสูงสุดในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดคือ 90.7 เปอร์เซ็นต์ (Wells กับคณะ, 1934) แต่โดยทั่วไปการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมจะทำการแยกเอากรดออกเสียก่อนที่จะสิ้นสุดการหมัก ดังนั้นประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดจะเหลือประมาณ 60% เท่านั้น (Prescott กับ Dunn, 1959) ถ้าปล่อยให้การหมักดำเนินไปจนสิ้นสุดถึงแม้ประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดจะสูงแต่ไม่คุ้มทุน

2.14 การเก็บเกี่ยวผลผลิต (Product recovery)

เมื่อหมักกรดมะนาวได้ที่แล้ว จะกรองแยกของเหลวออกจากเชื้อซึ่งจะมีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ ส่วนของเหลวที่แยกได้นำไปต้มให้ร้อน ทำการคนตลอดเวลาแล้วเติมปูนขาว (Lime) ลงไป เพื่อตกตะกอนกรดมะนาวออกมาในรูปเกลือแคลเซียม ล้างตะกอนเกลือแคลเซียมชนิดเรตในสารละลายกรดกำมะถัน ที่มีค่าสมมูลย์เท่ากับเกลือซิเตรต จากนั้นกรองแยกเอาสารละลายกรดมะนาวออกจากตะกอนเกลือแคลเซียมซัลเฟต ดังสมการในรูปที่ 1

พันธุ์ในห้วงปฏิบัติการที่ใดที่หนึ่ง หรืออาจได้มาจากการทดสอบสายพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อแล้วคัดเลือกพันธุ์ที่ดีเอาไว้ ความคงที่ของเชื้อเป็นลักษณะที่มีความสำคัญมากอันหนึ่ง เพราะอัตราการทำงานและผลผลิตที่ได้ไม่ควรมีการเปลี่ยนแปลง

2.16.2 การรักษากิจกรรมของเชื้อ

เชื้อที่เก็บรักษาไว้จะต้องเป็นเชื้อบริสุทธิ์และต้องอยู่ในสภาพที่ว่องไวอยู่เสมอ จุดประสงค์นี้สามารถบรรลุได้โดยให้ทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารที่เหมาะสมเป็นระยะ ๆ ไปและจะต้องบ่มเชื้อจนเชื้อเจริญถึงระยะ Maximal stationary phase แล้วจึงนำไปเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิที่ต่ำพอที่จะป้องกันการเจริญของเชื้อได้ การถ่ายเชื้อไม่สม่ำเสมอ และบ่อยเกินไปอาจทำให้ลักษณะบางอย่างของเชื้อเปลี่ยนแปลงไปได้

2.16.3 เชื้อที่ต้องการเก็บไว้เป็นสต็อก (Stock cultures)

ควรเตรียมให้อยู่ในรูปที่เก็บรักษาเชื้อไว้ได้นาน ๆ โดยไม่ต้องทำการถ่ายเชื้อเพื่อที่เชื้อจะได้ไม่กลายพันธุ์และจะได้ใช้เป็นแหล่งของเชื้อต่อไปได้ ถ้าเกิดการสูญหายหรือการตายของเชื้อที่นำไปใช้ในขบวนการ ปัจจุบันเรามักจะเก็บสต็อกเชื้อไว้โดยวิธีการไลโอฟิลไลซ์ (Lyophilization) และการเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แม้ว่าในบางแห่งยังคงใช้พาราฟินเหลว เทปิดทับเชื้อที่เลี้ยงไว้ในอาหารวัฒนธรรมดา เราอาจเก็บเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิห้องไว้ได้หลายเดือนเมื่อเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรีนหรือโพรตีนไฮดรอลิซเตดประกอบอยู่ร้อยละ 1 ดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วอาจใช้เป็นที่ยกสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่แห้งได้นานพอสมควร

2.16.4 การรักษาสภาพความบริสุทธิ์ของเชื้อ

เพื่อให้เกิดความแน่ใจในความบริสุทธิ์ของเชื้อจึงควรจะนำเชื้อมาจากห้องปฏิบัติการที่มีการถ่ายเชื้ออย่างสม่ำเสมอ หรือทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้ออยู่เสมอ การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทำได้หลายวิธี แล้วแต่ชนิดของเชื้อที่ต้องการทดสอบ การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์นั้น จะตรวจได้ต่อเมื่อสิ่งปนเปื้อนนั้นแตกต่างจากเชื้อที่เรามีอยู่ และต้องมีจำนวนมากพอ อีกวิธีหนึ่งก็คือ การเพาะเชื้อในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเหมาะสมต่อการเจริญของสิ่งปนเปื้อน แต่ไม่เหมาะสมกับเชื้อของเรา อีกวิธีหนึ่งคือการตรวจหาสารบางชนิดที่เชื้อของเราไม่สามารถผลิตได้ เช่น การตรวจหาเอนไซม์อะไมเลส ในกรณีที่เชื้อของเราเป็นแบคทีเรียชนิดไม่สร้างอะไมเลส แต่เชื้อที่ปนเปื้อนมาเป็นเชื้อที่สร้างขึ้นได้ เป็นต้น

2.16.5 การเตรียมเชื้อ

เราควรเตรียมแม่เชื้อ (Mother culture) ขึ้นใหม่เสมอจากแม่เชื้อเดิมหรือสต็อกเชื้อเดิม นำแม่เชื้อเหล่านี้ไปใส่ในอาหาร เลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณมาก เพื่อให้เชื้อเจริญเพิ่มจำนวนให้มากพอที่จะนำไปใช้ในขบวนการหมักได้ การเพิ่มจำนวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เชื้อนั้น (1) ประกอบด้วยเชื้อที่ต้องการเท่านั้น (2) มีจำนวนสัดส่วน (ถ้าเป็นเชื้อผสม) และการทำงานเท่ากันตลอด (3) มีความว่องไวในการให้ผลผลิตที่ต้องการ และ (4) สามารถต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้พอสมควรในกรณีที่เป็น เช่น ทนความร้อนได้ถ้าจะต้องได้รับความร้อนในขณะตกตะกอนเนยเหลว การเตรียมเชื้อแต่ละครั้งนั้น จะต้องพยายามให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกันหมดไม่ว่าจะในด้านการเตรียมอาหารเลี้ยง การเพาะเชื้อ การบ่มเชื้อเป็นต้น การที่จะเก็บเชื้อในระยะใดของการเจริญนั้นขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ที่ต้องการ เช่นถ้าต้องการให้เชื้อเจริญทันทีและรวดเร็วก็เก็บเกี่ยวเชื้อที่อยู่ในระยะที่เรียกว่า Logarithmic phase of growth แต่ถ้าต้องการให้เชื้อสามารถทนทานต่อความร้อนหรือสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้มากขึ้น ก็ควรเก็บเกี่ยวเชื้อที่อยู่ในระยะต้นของ Maximal stationary phase คุณสมบัติที่ใช้ในการบ่มเชื้อมักจะใช้คุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับคุณสมบัติเหมาะสมของเชื้อ เมื่อเชื้ออยู่ในระยะที่ต้องการแล้วจะต้องลดอุณหภูมิลงเพื่อมิให้มีการเจริญต่อไปอีก

2.16.6 การทำงานของเชื้อจุลินทรีย์

เราสามารถวัดการเจริญของเชื้อได้โดยใช้ระยะเวลาบ่มเชื้อดี คุณสมบัติเหมาะสมก็ควรจะได้ผลงานที่ดี การทำงานของเชื้อ อัตราการเจริญของเชื้อกับปริมาณของผลผลิต ถ้าเป็นเชื้อพันธุ์ดี อาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสมอาจจะทำให้เกิดเหตุการณ์ต่างๆ เลวลงได้ถ้าการเก็บรักษาและการเพาะเชื้อไม่เหมาะสม มีการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เหมาะสมบ่อยๆ เป็นเวลานานๆ มีการกลายพันธุ์ หรือมีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส

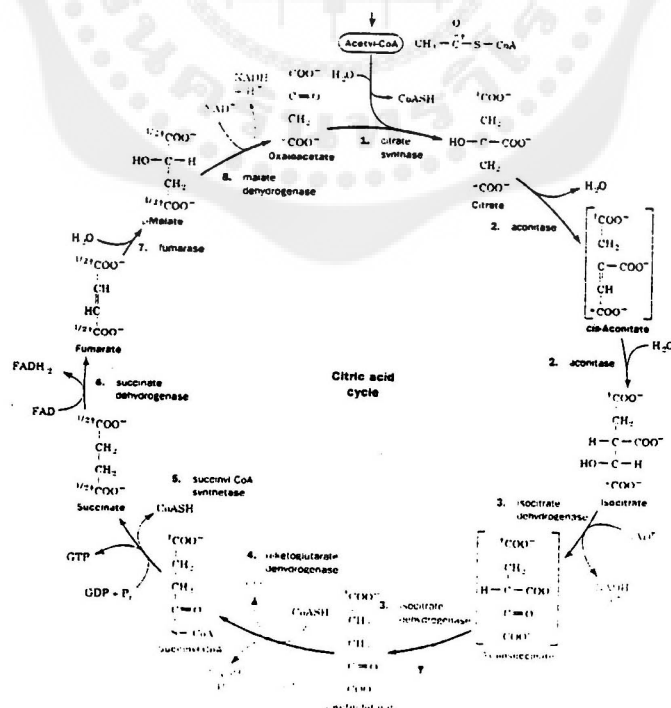
2.16.7 เชื้อผสม (Mixed culture)

เชื้อผสมชนิดที่ได้มีการจัดจำแนกไว้แล้ว อาจได้มาจากการนำเชื้อบริสุทธิ์หลายๆ ชนิดมาเพาะเลี้ยงรวมกันให้มีการเจริญไปพร้อมๆ กัน หรืออาจเพาะเลี้ยงแยกกันแล้วนำมาผสมกันก่อนนำไปใช้ในขบวนการก็ได้ เช่น เชื้อแลกติก (Lactic culture) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมนม เป็นเชื้อผสมที่ได้จากการนำแบคทีเรียหลายๆ ชนิดมาเพาะเลี้ยงรวมกันซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะต้องสามารถเข้า

เก็บรักษาเชื้อผสมให้มีสัดส่วนของเชื้อแต่ละชนิดเท่าเดิมตลอดทำได้ยาก เชื้อผสมที่ยังไม่ได้มีการจัดจำแนกอาจใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดได้ เช่น เชื้อผสมระหว่างยีสต์กับแบคทีเรียที่ย้ายมาจากผิวของเนยแข็งลิมเบอร์เกอร์ก้อนหนึ่งมาใส่อีกก้อนหนึ่ง เป็นต้น

2.17 ชีวเคมีการหมักกรดมะนาว

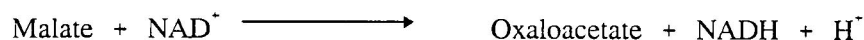
Citric acid cycle (Tricarboxylic acid cycle : TCA cycle) เป็นแนวทางในการผลิตกรดมะนาวโดยอาศัยการหมักด้วยเชื้อรา โดยเฉพาะในกลุ่ม *A. niger* (ดังแสดงในรูปที่ 2) ทั้งนี้กรดมะนาวที่ได้จะเกิดการสะสมในปริมาณสูง เนื่องจากความผิดปกติในการทำงานใน TCA cycle เป็นสำคัญ สำหรับเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดมะนาว ได้แก่ Aconitase, Isocitrate dehydrogenase และ Citric synthase โดยในช่วงของการสะสมกรดมะนาว เอนไซม์สองชนิดแรกจะมีกิจกรรมในระดับต่ำ ในขณะที่เอนไซม์ Citric synthase มีกิจกรรมในระดับสูง จึงทำให้เกิดการรวมตัวของ Acetyl CoA กับ Oxaloacetate เกิดเป็นกรดมะนาวขึ้น



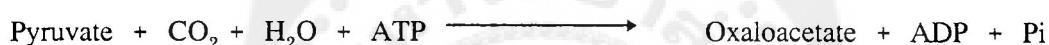
รูปที่ 2 TCA cycle

สาร Oxaloacetate ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดมะนาว ถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยแนวทางในการสร้างหลายรูปแบบดังนี้

ก. อาศัยปฏิกิริยา Dehydrogenation ของ Malate โดยอาศัยเอนไซม์ Malate dehydrogenase ดังสมการ



ข. อาศัยปฏิกิริยา Carboxylation ของ Pyruvate โดยอาศัยการรวมตัวของ Pyruvate กับคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งถูกเร่งด้วยเอนไซม์ Pyruvate carboxylase ดังสมการ



ค. อาศัยปฏิกิริยา Carboxylation ของ Phosphoenolpyruvate โดยอาศัย Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase system (พบในยีสต์) ทั้งนี้จะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวของ Phosphoenolpyruvate กับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยไม่ต้องอาศัยพลังงานหรือ ATP

ง. อาศัย Glyoxylate cycle โดยที่เกิดการรวมตัวของ Glyoxylate กับ Acetyl CoA ซึ่งถูกเร่งด้วยเอนไซม์ Malate synthetase ดังสมการ ทั้งนี้ Malate ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนต่อไปเป็น Oxaloacetate อีกทอดหนึ่ง



สำหรับ Glyoxylate ที่ใช้นี้สามารถสังเคราะห์ได้โดยอาศัยเอนไซม์ Isocitritase ดังนี้



2.18 สันฐานวิทยาของเชื้อรา

เชื้อรามีทั้งชนิดที่เป็นเซลล์เดี่ยว เช่น ยีสต์ และที่เป็นหลายเซลล์เรียงเป็นเส้นใย (Hypha) กลุ่มของเส้นใยเรียกไมซีเลียม (Mycelium) เส้นใยทั่วไปมีความกว้าง 5-10 ไมโครเมตร และมีความยาวมาก เส้นใยประกอบด้วยผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และช่องว่างภายในที่บรรจุโปรโทพลาสซึม เยื่อหุ้มเป็นเยื่อ 2 ชั้นล้อมรอบโปรโทพลาสซึม ส่วนผนังเซลล์ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

หรือโคทิน ในเชื้อราชั้นต่ำ ผนังเซลล์ประกอบด้วยเซลลูโลส การเจริญของเส้นใยเกิดทางด้านใกล้ปลาย โดยมีการยืดตัวบริเวณนั้น เส้นใยจะมีการแบ่งตัวเว้าเข้ามาในเซลล์ (Centripetal invagination) และเกิดผนังกันโดยเยื่อหุ้มเซลล์คอดเข้ามาเกิดเป็นผนังที่ไม่สมบูรณ์ เพราะมีรูตรงกลางผนังเพื่อให้โปรโทพลาสซึมไหลเวียนถึงกันได้แม้แต่นิวเคลียสก็เคลื่อนที่จากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์ได้

เส้นใยแบ่งเป็น 3 แบบ คือ

1. เส้นใยไม่มีผนังกัน (Nonseptate หรือ coenocytic) เส้นใยจะเป็นท่อทะลุถึงกัน มีไซโทพลาสซึมและนิวเคลียสต่อเนื่องกัน
2. เส้นใยที่มีผนังกัน และมีนิวเคลียสอันเดียวในแต่ละเซลล์
3. เส้นใยที่มีผนังกัน และมีนิวเคลียสหลายอันในแต่ละเซลล์

เชื้อรานอกจากจะมีรูปร่างเป็นเส้นใยและเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แล้ว บางชนิดยังมีรูปร่าง 2 แบบ (Dimorphism) คือ ถ้าเจริญในดินหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง จะมีรูปร่างเป็นเส้นใย แต่ถ้าเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือในร่างกายโฮสต์ เช่น คน จะมีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยวแบบยีสต์ เช่น *Histoplasma capsulatum* ได้แก่ เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่นกลาก เกลื้อน และที่ทำให้เกิดโรคกับธัญพืช เป็นต้น

2.18.1 การเจริญของเชื้อรา

เชื้อราเป็นเส้นใยจะมีการเจริญออกไปได้สองทิศทางคือ ทางขวางจะเจริญไปเต็มที่แล้วจึงหยุด ส่วนการเจริญทางด้านยาวนั้น เส้นใยของเชื้อราจะงอกยาวออกไปและแตกแขนงอย่างไม่จำกัด トラบเท่าที่สภาพแวดล้อมยังเหมาะสม สายใยเหล่านี้เรียกว่า Mycelium ทำให้เชื้อรามีขนาดใหญ่จนมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า Mycelium มีสองชนิดคือ Vegetative mycelium เป็นส่วนที่ยึดเกาะกับอาหาร เพื่อทำหน้าที่นำอาหารไปสู่ส่วนต่างๆ ของทลัสสอีกชนิดหนึ่ง ได้แก่ Aerial mycelium เป็นส่วนที่ยืนไปในอากาศ ทำหน้าที่สร้างสปอร์ จึงเรียกไมซีเลียมแบบนี้ว่า Reproductive mycelium ในบางระยะของการเจริญอาจพบ Mycelium มาเรียงอัดตัวประสานกันเป็นลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อ มีสองชนิดคือ

1. Prosenchyma ประกอบด้วย Mycelium อัดตัวกันอย่างหลวมๆ และขนานกันตามความยาว

2. Pseudoparenchyma ประกอบด้วย Mycelium เรียงอัดตัวกันอย่างหนาแน่น มีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อ Parenchyma ในพืชชั้นสูง

2.18.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา

การเติบโตของเชื้อราจะเติบโตบริเวณปลายไฮฟา (Hypha tip) และมักมีการแตกแขนงอันแรก ทำให้เกิดแขนงอันที่ สอง และ สาม ต่อไป แขนงเหล่านี้เติบโตไปด้านหน้าทางขอบของโคโลนีและแยกห่างจากอันอื่นๆ การเจริญเติบโตจะหยุดลงเมื่อโมซีเลียมใช้อาหารรอบๆ บริเวณนั้นหมดไปและแตกแขนงไปอย่างรวดเร็วในอาหารที่ยังไม่ได้ใช้ การเติบโตลักษณะนี้ทำให้โคโลนีมีลักษณะเป็นวงกลมในอาหารแข็งเส้นใยของเชื้อรา บนอาหารแข็งบางส่วนหยั่งลึกลงไปในการอาหารเพื่อดูดอาหารส่งไปให้ส่วนที่ไม่ได้สัมผัสกับอาหาร โคโลนีของราแตกต่างกัน บางชนิดเส้นใยจะอัดกันแน่น บางชนิดเส้นใยจะอยู่กันอย่างหลวมๆ มีลักษณะฟู ผิวหน้าโคโลนีบางชนิดแห้ง บางชนิดเปียกหรือเหนียว สีเส้นใยอาจมีสีดำ เทา น้ำตาล แดง เหลือง ส่วนสปอร์ที่เห็นอาจมีสีเขียว น้ำตาลแกมเขียว ส้ม ชมพู น้ำตาล ดำ เทา เป็นต้น ส่วนการเจริญเติบโตของราบนอาหารเหลวมักเติบโตเป็นแผ่นอยู่บนผิวหน้าอาหาร แต่ถ้าให้อากาศโดยการเขย่า เส้นใยจะรวมตัวกันเป็นกระจุก ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ เรียกว่า Pellet ซึ่งเป็นรูปแบบการเจริญที่มีผลต่อการเจริญและการเกิดผลิตภัณฑ์ภายใน Pellet เนื่องจากภายใน Pellet จะได้รับสารอาหารน้อยมากโดยเฉพาะบริเวณตรงกลางของ Pellet จนกระทั่งอาจจะไม่ได้รับสารอาหารเลย นอกจากนั้นแล้วผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นก็ไม่สามารถนำออกจาก Pellet ได้ ซึ่งบางครั้งจะทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์ได้ (Product inhibition)

2.19 วัตถุดิบ (Raw material)

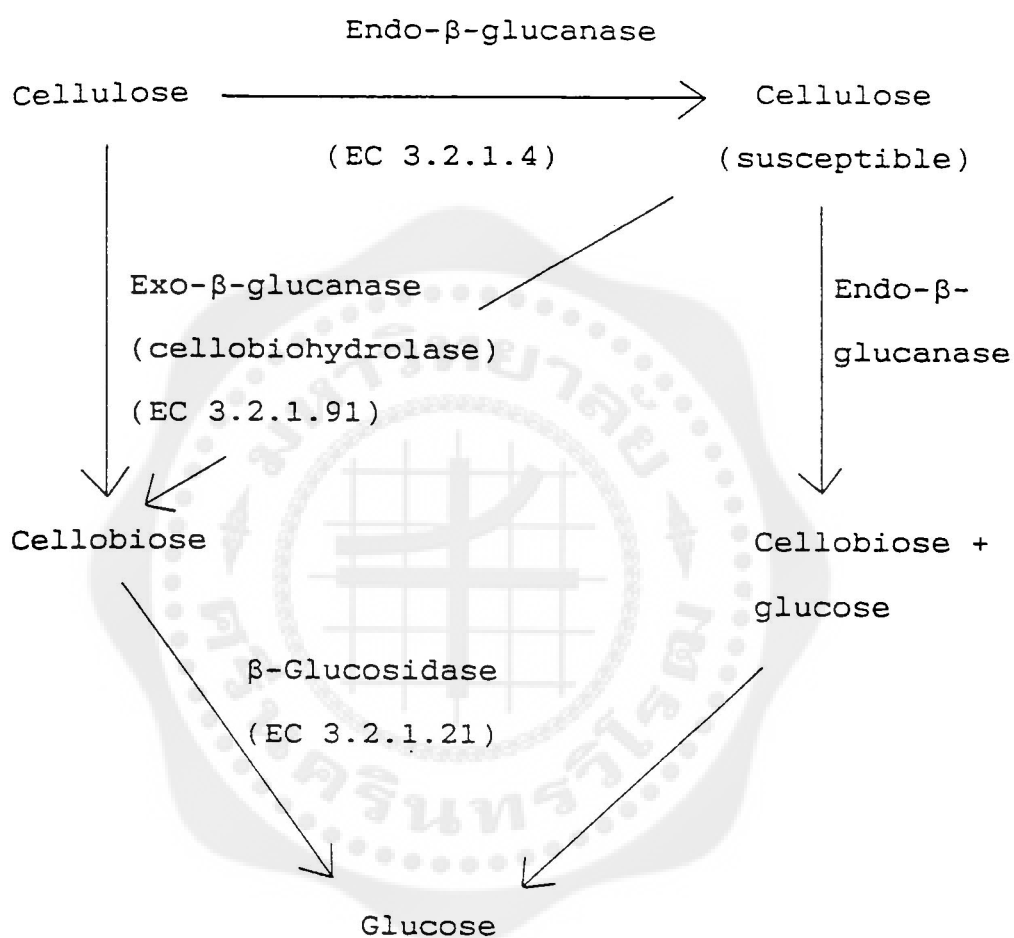
ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในขบวนการหมัก ต้องพิจารณาถึงประโยชน์และราคาที่เกี่ยวข้องกับการลงทุน ตลอดจนวิธีการเตรียมให้ได้มาซึ่งคาร์โบไฮเดรต การประหยัดในแง่ของอุตสาหกรรมจะจำกัดแหล่งคาร์โบไฮเดรต ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดมะนาวส่วนใหญ่ได้แก่ กากน้ำตาลจากอ้อย กากน้ำตาลจากหัวบีท เมล็ดธัญพืช และแห้ง ทั้งนี้เพราะถ้าการปรับแต่งมากขึ้นตอนทำไรก็ยิ่งจะเพิ่มต้นทุนการผลิต

เซลลูโลส เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่พบมากในธรรมชาติ คิดเป็นประมาณโดยเฉลี่ย 40% ของมวลชีวภาพ ซึ่งมากที่สุดของอินทรีย์สารที่ถูกเก็บในพีชชั้นสูง และผลิตขึ้นหมุนเวียนในแต่ละปีประมาณ 4×10^{10} ตัน เทียบกับประมาณได้ว่า เซลลูโลสถูกสังเคราะห์ขึ้นมา 70 กิโลกรัม/คน/วัน (Lutzen และคณะ, 1983) ในเชิงพลังงานเทียบได้เท่ากับน้ำมัน 5×10^4 บาเรล/วินาที

การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของมวลชีวภาพอาจเป็นผลมาจากการย่อยสลายของเชื้อจุลินทรีย์ หรือโดยการไฮโดรไลซ์ หรือขบวนการหมัก และเป็นที่ยอมรับกันว่า Cellulosic material ประกอบด้วยองค์ประกอบสำคัญคือ เซลลูโลส (40-60%) เฮมิเซลลูโลส (15-30%) และลิกนิน (10-30%) (Dekker และ Lindner, 1979) ซึ่งก็มีปริมาณแตกต่างกันแล้วแต่ชนิด เฮมิเซลลูโลสจะสร้างพันธะอะซีตาล กับลิกนิน และเซลลูโลส เพื่อเพิ่มความแข็งแรงและยืดหยุ่นของผนังเซลล์พืช เซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของกลูแคน ที่ต่อกันเป็นโซ่ตรง ด้วยพันธะ β -1, 4-D-Glycosidic linkage ในธรรมชาติ จะอยู่ร่วมกับเฮมิเซลลูโลสและลิกนินดังกล่าว

จำนวนน้ำตาลในแต่ละเส้นจะบอกเป็นดีกรีของโพลิเมอไรเซชัน (Degree of polymerization, DP) DP 10,000 หมายถึงความยาวของโซ่ตรงประมาณ 5 ไมโครเมตร (μm) ของไม้เนื้อแข็ง โครงสร้างที่แตกต่างกันของเซลลูโลสขึ้นกับแหล่งธรรมชาติและพัฒนาการ

การย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ละลายทำได้โดยอาศัยกรดและเอนไซม์กระบวนการย่อยด้วยกรด ยังคงมีการศึกษาและพัฒนากันอยู่ แต่การพัฒนาระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นที่นิยมมากกว่า เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเซลลูโลส (Cellulolytic enzymes) สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์ หลายชนิด รวมทั้งเชื้อรา แอคติโนไมซีต และแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตาม เฉพาะเชื้อราเท่านั้นที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเป็นจำนวนมากซึ่งอยู่ในรูปที่แอกทีฟออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ เอนไซม์เหล่านี้ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ Endo- β -glucanase เอนไซม์ Exo- β -glucanase และเอนไซม์ β -glucosidase การที่เซลลูโลสจะย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ดังกล่าว ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 การย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์เซลลูเลส

Endo-cellulase [1,4- β -D-Glucan 4-glucanohydrolase (EC 3.2.1.4)] มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์พันธะ β -1,4-D-Glycosidic linkages ภายในส่วนที่เป็นอสัณฐาน (Amorphous) โดยจะเกิดปฏิกิริยาแบบสุ่ม

Exo-cellulase [$1,4\text{-}\beta\text{-D-Glucan cellobiohydrolase}$ (EC 3.2.1.91)] มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยา ไฮโดรไลซ์ของพันธะ $\beta\text{-1,4-D-Glycosidic linkages}$ โดยจะย่อยทางด้าน Nonreducing ของ crystalline cellulose chain และได้ Cellobiose เป็นผลิตภัณฑ์

$\beta\text{-Glucosidase}$ [$\beta\text{-D-Glucoside glucohydrolases}$ (EC 3.2.1.21)] พบได้ในพืชและจุลินทรีย์หลายชนิด มีหน้าที่ย่อยพันธะ $\beta\text{-Glucosidic linkage}$ ของ Cellobiose ได้ D-glucose ซึ่งกลูโคสที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ $\beta\text{-Glucosidase}$ จะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งต้นตอของพลังงานในการผลิตกรดมะนาวโดยรา



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บรักษาเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2 ถูกใช้เป็นสายพันธุ์หลักในการผลิตกรดมะนาว ในสภาวะเลี้ยงแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) ซึ่งจะเก็บ *A. niger* Yang no.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเอียงสูตรสมบูรณ์ในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มีฝาปิด (Potato Dextrose Agar slant) โดยเชื้อที่เก็บไว้ในหลอดนี้สามารถนำมาใช้เป็นหัวเชื้อได้เลย นอกจากนี้ยังใช้เชื้อรา *Trichoderma viride* WU-36B เป็นแหล่งที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และในการศึกษาการหลอมรวมโปรโตพลาสข้ามสายพันธุ์นี้จำเป็นที่จะต้องกลายพันธุ์ของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ก่อนเพื่อใช้เป็น Marker

ลูกผสม *A. niger* AT 11-2-3, *A. niger* AT 11-2-10 และ *A. niger* AT 11-2-14 ที่ได้จากการหลอมรวมโปรโตพลาสระหว่าง *A. niger* Y-(b) และ *T. viride* M5S51 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ได้จาก *A. niger* Yang no.2 และ *T. viride* WU-36B ตามลำดับ โดยเชื้อราลูกผสมเหล่านี้จะถูกนำไปเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ (Minimal medium) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป ซึ่งขั้นตอนการเตรียมเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ นั้น จะต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ (Biohazard clean air) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราตัวอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ ทำได้โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) ที่ผ่านการลนไฟและทิ้งให้เย็นสักครู่ เขี่ยสปอร์ของเชื้อราลงบนอาหารเอียงสูตรสมบูรณ์ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 30°C จนกระทั่งเชื้อราเจริญ สามารถใช้สปอร์ในการทดลองต่อไปได้

3.2 การผลิตกรดมะนาวด้วยสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) เมื่อใช้ Cellobiose และ Cellulose powder เป็นแหล่งพลังงาน

3.2.1 ขั้นตอนการเตรียม

ซึ่งชานอ้อยในอัตราส่วน 2:1 โดยใช้ขนาดยาว (Long size) 2.6 กรัม และขนาดสั้น (Short size) 1.3 กรัม ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็น Carrier จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรควบคุม (Synthetic medium) โดยใช้ Cellobiose และ Cellulose powder เป็นแหล่งต้นตอของ

พลังงานในการผลิตกรดมะนาว ปรับ pH เป็น 4.25 แล้วเติมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้จานละ 15 มล.และนำไปผ่านการฆ่าเชื้อ

3.2.2 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อให้มีการผลิตกรดมะนาว

ขั้นตอนนี้ทำในตู้ปลอดเชื้อโดยใช้หัวถ่ายเชื้อเขี่ยสปอร์ของเชื้อราลูกผสม *A. niger* AT 11-2-3, *A. niger* AT 11-2-10 และ *A. niger* AT 11-2-14 รวมทั้งเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ *A. niger* Yang no.2 และ *T. viride* WU-36B ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vertex mixer หลังจากนั้นใช้ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) ขนาด 1 มล. ตูดสารละลายสปอร์ ปริมาตร 1 มล. ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ตามข้อ 3.2.1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4-5 วัน โดยทำการวัดปริมาณกรดมะนาว เอนไซม์ β -Glucosidase และ CMCase รวมทั้งน้ำตาลรีดิวซิง (Reducing sugar) ทุกวัน

3.3 การเตรียม Culture filtrate

นำจานเลี้ยงเชื้อหลังการบ่มมาทำการสกัดกรดมะนาวออกจากชานอ้อยมาแช่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 500 มล. ทำให้ชานอ้อยแตกหักเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย เติมน้ำกลั่นอุณหภูมิ 60°C ปริมาตร 200 มล. ทำการปั่นอย่างแรงด้วยเครื่อง Magnetic stirrer เป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศจะได้ Culture filtrate ที่สามารถนำไปหาปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลรีดิวซิงได้

3.4 การวัดปริมาณกรดมะนาวใน Culture filtrate

นำ Culture filtrate ที่ได้จาก ข้อ 3.3 ปริมาตร 5 มล. เติมฟีนอล์ฟทาลีนลงไปประมาณ 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ นำมาไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (0.1 N) จนกระทั่งถึงจุดยุติ (Culture filtrate เปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนๆ) ทำการบันทึกปริมาตรสารละลาย NaOH ที่ใช้ นำมาคำนวณหาปริมาณกรดมะนาวได้จากสูตร

$$\% \text{ yield} = \frac{F \times (V-B) \times 21.6 \times 210 \times 100}{(16 \times 15 \times \%C\text{-source})}$$

$$\text{Citric acid (g/l)} = \text{g/l (C-source)} \times \% \text{ yield} / 100$$

F = ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH

V = ปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต

%C-source = ปริมาณของแหล่งต้นตอของคาร์บอนที่ใช้ หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

B = Blank มีค่าเท่ากับ 0.2

g/l (C-source) = ปริมาณของแหล่งต้นตอของคาร์บอนที่ใช้ หน่วยเป็นกรัม/ลิตร

3.5 การวัดแอกติวิตี้ของเอนไซม์

3.5.1 β -Glucosidase

การวัดแอกติวิตี้ของเอนไซม์ β -Glucosidase จะใช้ *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside เป็น Substrate โดยให้ 1 Unit (U) ของเอนไซม์ มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ 1 μ mole ของ *p*-Nitrophenol ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

3.5.2 Carboxymethyl cellulase (CMCase)

ใช้ Carboxymethyl cellulose powder เป็น Substrate แล้วทำการวัดน้ำตาลกลูโคส ด้วยวิธีการวัดเช่นเดียวกับการวัดน้ำตาลรีดิวซิง

3.6 การวัดน้ำตาลรีดิวซิง

น้ำตาลรีดิวซิงทั้งหมดใน Culture filtrate วัดปริมาณโดย Colorimetric method นั่นคือ นำ Culture filtrate ปริมาตร 1 มล. ทำปฏิกิริยากับกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก รีเอเจนท์ ปริมาตร 1 มล. เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็งทันทีแล้วเติมน้ำกลั่นที่เย็นปริมาตร 10 มล. ลงไป เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณค่าน้ำตาลรีดิวซิง จากกราฟมาตรฐานของ กลูโคส

3.7 การสกัด Chromosomal DNA

นำ *A. niger* AT 11-2-3, *A. niger* AT 11-2-10 และ *A. niger* AT 11-2-14 รวมทั้งเชื้อราสายพันธุ์พ่อ-แม่ *A. niger* Yang no.2 และ *T. viride* WU-36B มาเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่มี 8% กลูโคส เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นกรองเอา Mycelium ที่ได้มาทำการสกัดและแยก Chromosomal DNA โดยวิธี Phenol-Chloroform extraction โดย DNA ที่ได้จะละลายเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ด้วยสารละลาย TE buffer

3.8 ทดสอบหาขึ้นที่จำเพาะต่อการสร้างเอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ในสายพันธุ์ตั้งต้นกับสายพันธุ์ลูกผสม

3.8.1 การเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ Primer ที่มีความจำเพาะต่อการสร้างเอนไซม์ Isocitrate dehydrogenase

ทำการคัดเลือกและสังเคราะห์ Oligonucleotide primers ที่มีลำดับของเบส Consensus sequence ที่อยู่ระหว่างปลายด้าน 5' และ 3' ของ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase (ข้อมูลจาก Genbank ของ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase) ซึ่งมีลำดับของเบสดังต่อไปนี้

Sense

S1 5'.....AAG TGC GCC ACC ATC ACT CCC GAT GAG GC.....3'

Antisense

A1 5'.....ACC GCG GGT CCA GGC GAA GAT GGA GGC.....3'

ได้ทำการทดลอง Amplify ขึ้นของ เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ด้วย S1 และ A1 โดยใช้สภาวะในการทดลองดังนี้

PCR mixture ประกอบด้วย

- 1 x PCR buffer
- 1.5 mM MgCl₂
- 200 μM dNTPs
- 2.5 U Taq DNA polymerase
- 1 μg of genomic DNA

- 100 pmole of S1 and A1

สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR amplification ดังนี้

ขั้นที่1	94°C 2 นาที	1 รอบ
ขั้นที่2	94°C 1 นาที	
	63°C 1.5 นาที	25 รอบ
	72°C 2.5 นาที	
ขั้นที่3	72°C 10 นาที	1 รอบ

3.8.2 การเตรียม Probe ที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ Isocitrate dehydrogenase

3.8.2.1 PCR amplification of NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase

ทำการคัดเลือกและสังเคราะห์ Oligonucleotide primers ที่มีลำดับของเบส Consensus sequence ที่อยู่ระหว่างปลายด้าน 5' และ 3' ของ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ในการ Amplify DNA ของ *Aspergillus niger* WU-2223L (ข้อมูลจาก Genbank ของ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase) ซึ่งมีลำดับของเบสดังต่อไปนี้

Sense

S1 5'.....AAG TGC GCC ACC ATC ACT CCC GAT GAG GC.....3'

Antisense

A1 5'.....ACC GCG GGT CCA GGC GAA GAT GGA GGC.....3'

ได้ทำการทดลอง Amplify ยีนของ เอนไซม์ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase ด้วย S1 และ A1 โดยใช้สภาวะในการทดลองดังนี้

PCR mixture ประกอบด้วย

- 1 x PCR buffer
- 1.5 mM MgCl₂
- 200 μM dNTPs
- 2.5 U Taq DNA polymerase
- 1 μg of genomic DNA
- 100 pmole of S1 and A1

สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR amplification ดังนี้

ขั้นที่1	94°C 2 นาที	1 รอบ
----------	-------------	-------

ขั้นที่2 94°C 1 นาที
 63°C 1.5 นาที 25 รอบ
 72°C 2.5 นาที

ขั้นที่3 72°C 10 นาที 1 รอบ

3.8.2.2 Purification and labeling of NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase probe

นำ PCR products ที่ได้จากข้อ 3.8.2.1 มาแยกโดยใช้ Agarose electrophoresis จากนั้นทำการตัด Band เดียวที่ได้ จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Prep-A-Gene (Bio Rad)

ทำการติดฉลาก DNA probe ที่ได้ด้วย DIG DNA labeling kit (Boehringer Mannheim)

3.8.3 Southern blot hybridization of the NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase products

นำ PCR products ที่ได้จากข้อ 3.8.1 ที่ถูก Transfer มาอยู่บน Hybond N⁺ มา Hybridize กับ Probe ที่เตรียมได้ในข้อ 3.8.2.2 และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย Alkaline phosphatase

3.9 การเปรียบเทียบขนาดของ DNA เมื่อใช้ Primer ชนิดต่าง ๆ

3.9.1 การเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ Primer ที่มีความจำเพาะต่อ 16S-like rRNA genes

ทำการคัดเลือกและสังเคราะห์ Oligonucleotide primers ที่มีลำดับของเบสที่มีความจำเพาะต่อ 16S-like rRNA genes ซึ่งมีลำดับของเบสดังต่อไปนี้

Sense

S2 5'.....CCG AAT TCG TCG ACA ACC TGG TTG ATC CTG CCA
GT.....3'

Antisense

A2 5'.....CCC GGG ATC CAA GCT TGA TCC TTC TGC AGG TTC
ACC TAC.....3'

โดยใช้สภาวะในการทดลองดังนี้

PCR mixture ประกอบด้วย

- 1 x PCR buffer
- 2 mM $MgCl_2$
- 200 μM dNTPs
- 2.5 U *Taq* DNA polymerase
- 100 ng of genomic DNA
- 20 pmole of S2 and A2

สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR amplification ดังนี้

ขั้นที่1	95°C 2 นาที	1 รอบ
ขั้นที่2	95°C 1 นาที	
	52°C 1.5 นาที	20 รอบ
	70°C 2 นาที	
ขั้นที่3	70°C 10 นาที	1 รอบ

3.9.2 การเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ Random primers

โดยมีลำดับของเบสดังนี้

5'.....GTG CGG TTT GGC3'

โดยใช้สภาวะในการทดลองดังนี้

PCR mixture ประกอบด้วย

- 1 x PCR buffer
- 1.5 mM $MgCl_2$
- 200 μM dNTPs
- 2.5 U *Taq* DNA polymerase
- 100 ng of genomic DNA
- 20 pmole of primer

สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR amplification ดังนี้

ขั้นที่1	95°C 5 นาที	1 รอบ
----------	-------------	-------

ขั้นที่2	95°C 1 นาที	
	37°C 1 นาที	30 รอบ
	72°C 1 นาที	
ขั้นที่3	72°C 7 นาที	1 รอบ

3.10 การตัด Chromosomal DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Chromosomal DNA ของสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ลูกผสมต่าง ๆ ถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ เช่น SmaI, EcoRI, Bam HI, Sau3 AI เป็นต้น บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 12 ชั่วโมง



บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการทดสอบการเจริญของเชื้อราลูกผสม

จากการทดสอบการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสม (AT 11-2-3, AT 11-2-10 และ AT 11-2-14) ที่ได้จากการหลอมรวมโปรโตพลาส ระหว่าง *Aspergillus niger* และ *Trichoderma viride* ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี 3% กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน (Czapek-Dox minimal medium) พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมทั้งหมดสามารถเจริญได้ดีแต่อัตราเร็วในการเจริญช้ามาก โดยใช้เวลาในการเจริญนานถึง 25 วัน และให้สปอร์น้อย จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นเป็นการยืนยันได้อย่างหนึ่งว่า เชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมทั้งหมดนี้ยังคงสภาพความเป็น Stable heterokaryon

4.2 ผลการผลิตกรดมะนาวของเชื้อราลูกผสม

ผลจากการศึกษาการผลิตกรดมะนาวของสายพันธุ์ตั้งต้นของทั้ง *Aspergillus niger* และ *Trichoderma viride* โดยใช้กลูโคส เซลโลบิโอส และเซลลูโลส เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนในสูตรอาหารแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) จากผลการทดลองพบว่า *Trichoderma viride* WU-36B ไม่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ไม่ว่าจะใช้กลูโคส หรือ เซลโลบิโอส และ เซลลูโลส เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน อย่างไรก็ตามเมื่อใช้กลูโคส เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนพบว่า *Aspergillus niger* Yang no.2 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าเมื่อใช้ เซลโลบิโอส เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การผลิตกรดมะนาวของเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น (*Aspergillus niger* Yang no.2)

Strains	Citric acid produced ^a (g/l)	
	Glucose ^b	Cellobiose ^c
<i>Aspergillus niger</i> Yang no.2	83.5	33.8

^aAmounts of citric acid is shown as the values per milliliter of the medium supplied

^bSemi-solid culture containing 140 g/l of glucose as the sole carbon source

^cSemi-solid culture containing 100 g/l of cellobiose as the sole carbon source

นอกจากนั้น จากการศึกษาการใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวด้วยรา *Aspergillus niger* Yang no.2 นั้น พบว่า *Aspergillus niger* Yang no.2 ไม่สามารถใช้เซลลูโลส ในการเจริญ และการผลิตกรดมะนาวได้

ทดสอบการผลิตกรดมะนาวของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสม (AT 11-2-3, AT 11-2-10 และ AT 11-2-14) ในอาหารสูตรที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว โดยใช้กลูโคส เซลโลบิโอส และเซลลูโลส แหล่งต้นตอของคาร์บอนตามลำดับ พบว่าราสายพันธุ์ลูกผสมทั้งหมดสามารถใช้กลูโคส และเซลโลบิโอส เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาว ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การผลิตกรดมะนาวของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมชนิดต่างๆ

Strains	Citric acid produced ^a (g/l)	
	Glucose ^b	Cellobiose ^c
1. AT 11-2-3	76.8	27.4
2. AT 11-2-10	54.4	16.7
3. AT 11-2-14	70.3	28.9

หมายเหตุ เช่นเดียวกับตารางที่ 2

อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวโดยวิธี Semi-solid culture แล้วพบว่า การผลิตกรดมะนาวของราสายพันธุ์ลูกผสมจะแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจนเมื่อใช้เซลลูโลสในปริมาณ 100 g/l ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การผลิตกรดมะนาวของเชื้อราลูกผสมเมื่อใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน

Strains	Citric acid produced (g/l)
1. AT 11-2-3	19.2
2. AT 11-2-10	6.1
3. AT 11-2-14	10.5

4.3 ผลการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสม

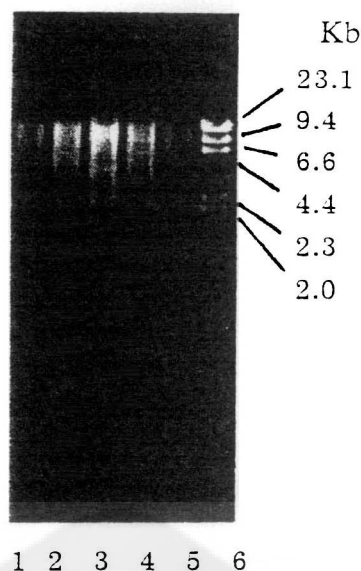
จากการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสม (AT 11-2-3, AT 11-2-10 และ AT 11-2-14) ในอาหารสูตรที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ (Mandel's medium) โดยใช้เซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose powder, CMC) เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนตามลำดับ พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมทั้งหมดมีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ ทั้ง β -Glucosidase และ CMCase สูงกว่า สายพันธุ์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 แต่อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้ง 2 นี้ ของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมนี้จะต่ำกว่า *Trichoderma viride* WU-36B ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสระหว่างเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์ตั้งต้น

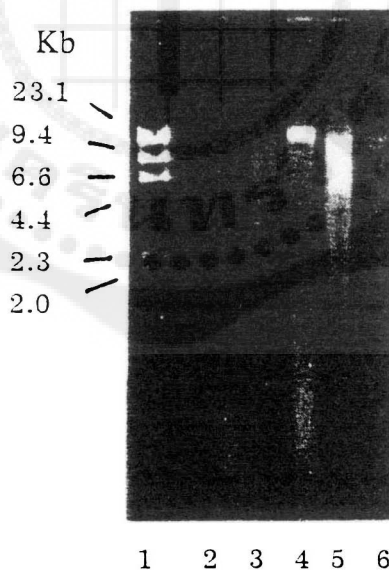
Strains	β -Glucosidase (U/ml)	CMCase (U/ml)
สายพันธุ์ตั้งต้น		
1. <i>A. niger</i> Yang no.2	0.002	-
2. <i>T. viride</i> WU-36B	1.280	4.15
สายพันธุ์ลูกผสม		
3. AT 11-2-3	1.119	3.88
4. AT 11-2-10	1.058	3.79
5. AT 11-2-14	1.201	3.91

4.4 ผลการศึกษาการตัด Chromosomal DNA ของเชื้อราลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

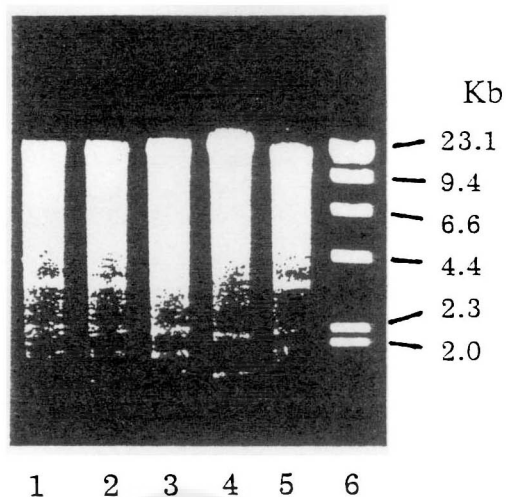
พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ อาทิเช่น EcoRI, Hind III, Sma I และ Sau3 AI ในการตัด Chromosomal DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นนั้นจะให้รูปแบบของการตัดที่แตกต่างกันออกไป แต่อย่างไรก็ตามเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมจะมีส่วนร่วมของรูปแบบของการตัดผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ ดังแสดงในรูปที่ 4 ถึง 7



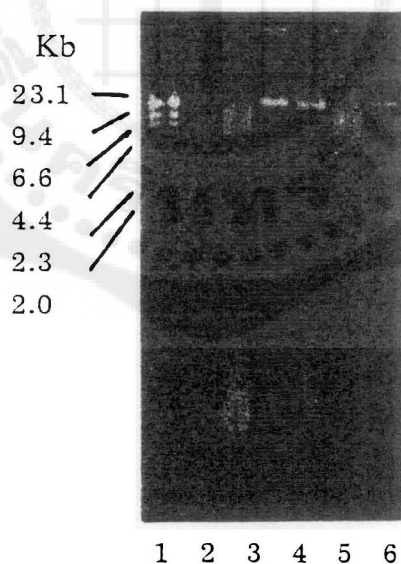
รูปที่ 4 แสดงรูปแบบของการตัด Chromosomal DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoR I เลนหมายเลข 1; AT 11-2-3, เลนหมายเลข 2; AT 11-2-10, เลนหมายเลข 3; AT 11-2-14, เลนหมายเลข 4; *A. niger* Yang no.2, เลนหมายเลข 5; *T. viride* WU-36B และ เลนหมายเลข 6; Marker (λ /Hind III)



รูปที่ 5 แสดงรูปแบบของการตัด Chromosomal DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III เลนหมายเลข 1; Marker (λ /Hind III), เลนหมายเลข 2; *T. viride* WU-36B, เลนหมายเลข 3; *A. niger* Yang no.2, เลนหมายเลข 4; AT 11-2-3, เลนหมายเลข 5; AT 11-2-10 และ เลนหมายเลข 6; AT 11-2-14

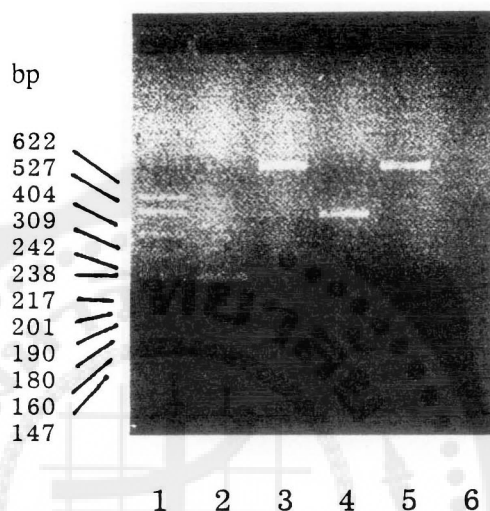


รูปที่ 6 แสดงรูปแบบของการตัด Chromosomal DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ Sma I เลนหมายเลข 1; AT 11-2-3, เลนหมายเลข 2; AT 11-2-10, เลนหมายเลข 3; AT 11-2-14, เลนหมายเลข 4; *A. niger* Yang no.2, เลนหมายเลข 5; *T. viride* WU-36B และ เลนหมายเลข 6; Marker (λ /Hind III)



รูปที่ 7 แสดงรูปแบบของการตัด Chromosomal DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ Sau3 AI เลนหมายเลข 1; Marker (λ /Hind III), เลนหมายเลข 2; *T. viride* WU-36B, เลนหมายเลข 3; *A. niger* Yang no.2, เลนหมายเลข 4; AT 11-2-3, เลนหมายเลข 5; AT 11-2-10 และ เลนหมายเลข 6; AT 11-2-14

4.5 ผลการทดสอบยีนที่จำเพาะต่อการสร้าง NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase เพื่อใช้ในการจำแนกเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์ตั้งต้น



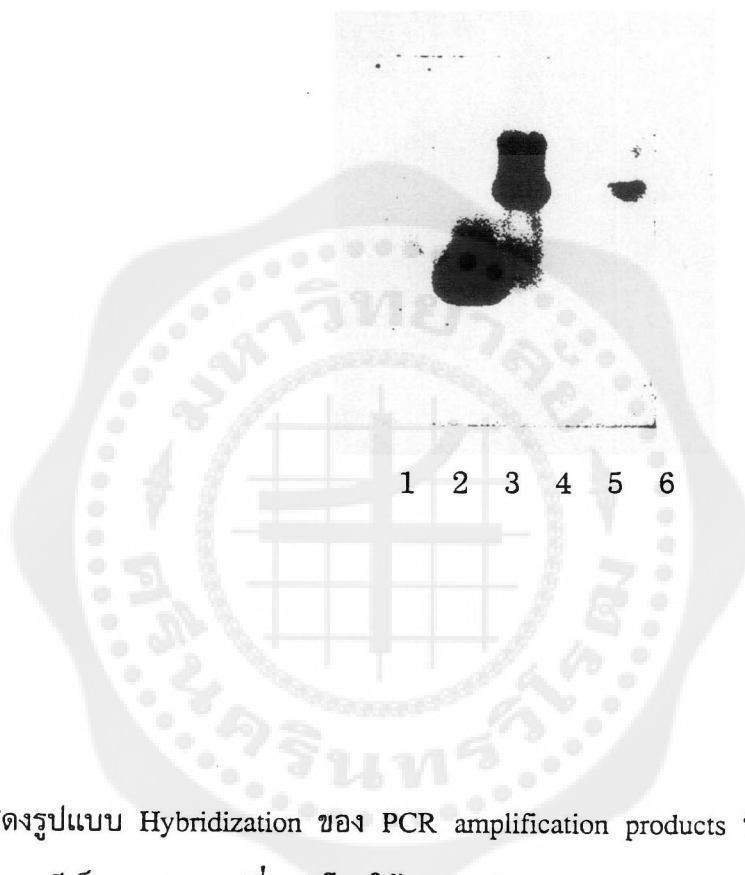
รูปที่ 8 แสดงรูปแบบ PCR amplification products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ; Marker (pBR322/Msp I) (เลขหมายเลข 1), AT 11-2-3 (เลขหมายเลข 2), AT 11-2-10 (เลขหมายเลข 3), AT 11-2-14 (เลขหมายเลข 4), *A. niger* Yang no.2 (เลขหมายเลข 5) และ *T. viride* WU-36B (เลขหมายเลข 6) โดยใช้ไพรเมอร์

Sense

S1 5'.....AAG TGC GCC ACC ATC ACT CCC GAT GAG GC.....3'

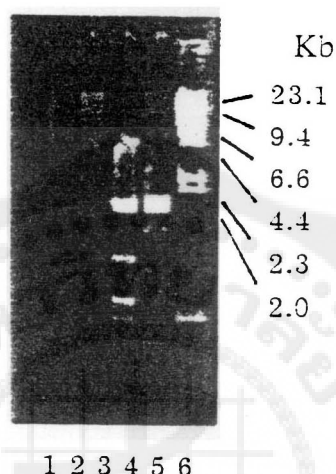
Antisense

A1 5'.....ACC GCG GGT CCA GGC GAA GAT GGA GGC.....3'



รูปที่ 9 แสดงรูปแบบ Hybridization ของ PCR amplification products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (จากรูปที่ 8) โดยใช้ NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase probe ; Marker (pBR322/Msp I) (เลขหมายเลข 1), AT 11-2-3 (เลขหมายเลข 2), AT 11-2-10 (เลขหมายเลข 3), AT 11-2-14 (เลขหมายเลข 4), *A. niger* Yang no.2 (เลขหมายเลข 5) และ *T. viride* WU-36B (เลขหมายเลข 6)

4.6 ผลการทดสอบการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆ



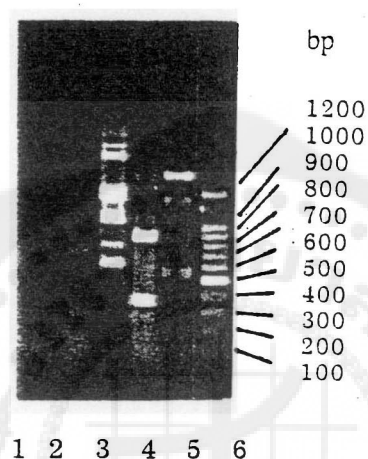
รูปที่ 10 แสดงรูปแบบ PCR amplification products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ; *T. viride* WU-36B (เลขหมายเลข 1), AT 11-2-3 (เลขหมายเลข 2), AT 11-2-10 (เลขหมายเลข 3), AT 11-2-14 (เลขหมายเลข 4), *A. niger* Yang no.2 (เลขหมายเลข 5) และ Marker (λ /Hind III) (เลขหมายเลข 6) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับของเบสที่มีความจำเพาะต่อ 16S-like rRNA genes ซึ่งมีลำดับของเบสดังต่อไปนี้

Sense

S2 5'.....CCG AAT TCG TCG ACA ACC TGG TTG ATC CTG CCA
GT.....3'

Antisense

A2 5'.....CCC GGG ATC CAA GCT TGA TCC TTC TGC AGG TTC
ACC TAC.....3'



รูปที่ 11 แสดงรูปแบบ PCR amplification products ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ *T. viride* WU-36B (เลขหมายเลข 1), AT 11-2-3 (เลขหมายเลข 2), AT 11-2-10 (เลขหมายเลข 3), AT 11-2-14 (เลขหมายเลข 4), *A. niger* Yang no.2 (เลขหมายเลข 5) และ Marker (100 bp, DNA ladder) (เลขหมายเลข 6) โดยใช้ Random primers โดยมีลำดับของเบสดังนี้
5'.....GTG CCG TTT GGC3'

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดสอบการเจริญของเชื้อราลูกผสม (*Aspergillus niger* AT-11-2-3, AT 11-2-10 และ AT-11-2-14) ที่ได้จากการหลอมรวมโปรโตพลาสข้ามสายพันธุ์ (Intergeneric protoplast fusion) ระหว่าง *Aspergillus niger* ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้สูงในการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) และ *Trichoderma viride* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสได้สูง นั้นสามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตรปรับต่ำ (Minimal medium) แต่อย่างไรก็ตามในการเจริญนี้พบว่าเชื้อราลูกผสมเหล่านี้ต้องใช้เวลาในการเจริญนานมากถึง 25 วัน ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้นทั้งสอง จะใช้เวลาในการเจริญเพียง 5-7 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการแสดงออกถึงคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมที่มีลักษณะเป็น Heterokaryon และเป็น Heterokaryon ที่มีความเสถียร ถึงแม้ว่าจะมีนิวเคลียสที่เป็น Multi-nuclei ก็ตาม

การผลิตกรดมะนาวของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 นั้นพบว่า สามารถผลิตได้โดยใช้แหล่งต้นตอของคาร์บอนที่เป็นกลูโคส (83.5 g/l) และผลิตได้สูงกว่าเมื่อใช้เซลโลบิโอสเป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน (33.8 g/l) แต่อย่างไรก็ตาม *A. niger* Yang no.2 ไม่สามารถที่จะใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวได้ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากการที่ *A. niger* Yang no.2 ไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ CMCase จึงไม่สามารถย่อยสลายเส้นใยเซลลูโลสได้ถึงแม้ว่าจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์ β -Glucosidase ก็ตาม ในขณะที่ *T. viride* WU-36B นั้นถึงแม้ว่าจะมีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้ง CMCase และ β -Glucosidase ก็ไม่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ไม่ว่าจะใช้ กลูโคส เซลโลบิโอส หรือแม้กระทั่งเซลลูโลสเป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน ส่วนในเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมนั้นพบว่าสามารถใช้กลูโคส และ เซลโลบิโอสเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวได้ โดย *Aspergillus niger* AT-11-2-3 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดถึง 76.8 g/l เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน ในขณะที่เมื่อใช้เซลโลบิโอสเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนนั้นพบว่า *Aspergillus niger* AT-11-2-14 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดถึง 28.9 g/l และพบว่า *Aspergillus niger* AT-11-2-10 มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้ในระดับปานกลางคือ 54.4 g/l และ 16.7 g/l เมื่อใช้กลูโคส และ เซลโลบิโอสเป็นแหล่ง

ต้นตอของคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาว ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้ นั้น มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้แตกต่างไปจากเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเกิดการแลกเปลี่ยนหรือรวมกันของเนื้อยีน (Genetic material) บางส่วนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดมะนาวรวมทั้งความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (CMCase และ β -Glucosidase) และที่น่าสนใจก็คือ เชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมทั้งสามสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ สามารถผลิตกรดมะนาวได้เมื่อใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน โดย *Aspergillus niger* AT-11-2-3 ผลิตกรดมะนาวได้เท่ากับ 19.2 g/l, *Aspergillus niger* AT-11-2-10 ผลิตกรดมะนาวได้เท่ากับ 6.1 g/l และ *Aspergillus niger* AT-11-2-14 ผลิตกรดมะนาวได้เท่ากับ 10.5 g/l ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวนี้สามารถอธิบายได้ว่า อาจเกิดการรวมกัน (Crossing over) ของยีนระหว่างเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้นทั้งสอง (*A. niger* Yang no.2 และ *T. viride* WU-36B) ทำให้เชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมดังกล่าวสามารถแสดงออกถึงคุณสมบัติต่างๆ ของสายพันธุ์ตั้งต้น นอกจากนั้นอาจจะเกิดจากการกระตุ้นยีนบางยีนซึ่งปกติจะเป็น Silent gene ที่ไม่แสดงออก แต่เมื่อเกิดการรวมกันหรือการแลกเปลี่ยนกันของยีนจากสายพันธุ์ตั้งต้นจึงทำให้ยีนนี้ถูกกระตุ้นและแสดงออกได้ จึงพบว่า เชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้เหล่านี้สามารถผลิตกรดมะนาวได้เมื่อใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งต้นตอของพลังงานได้

ในการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส (CMCase และ β -Glucosidase) ของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสม โดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน พบว่า มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ CMCase และ β -Glucosidase ต่างกันออกไป (ดังแสดงในตารางที่ 4) จะเห็นได้ว่า เชื้อราลูกผสมทั้งสามสายพันธุ์ (*Aspergillus niger* AT-11-2-3, AT 11-2-10 และ AT-11-2-14) มีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ CMCase และ β -Glucosidase สูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ *A. niger* Yang no.2 แต่ต่ำกว่า *T. viride* WU-36B ดังนั้นจึงอาจจะเป็นเหตุผลหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่าเหตุใดเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมจึงสามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งต้นตอของพลังงานในการผลิตกรดมะนาวได้

จากการศึกษารูปแบบในการตัด Chromosomal DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมทั้งสามด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I, *Hind* III, *Sma* I และ *Sau*3 AI จะได้รูปแบบที่แตกต่างกันออกไป โดยมีขนาดของดีเอ็นเอที่คล้ายกันกับขนาดของดีเอ็นเอที่มาจากสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมที่เกิดจากการหลอมรวมกันของ

ดีเอ็นเอที่มาจากสายพันธุ์ตั้งต้นนั่นเอง แต่อย่างไรก็ตามหากใช้ตัวติดตาม (Probe) ที่เหมาะสมในการทำ Hybridization ก็สามารถใช้บอกความแตกต่างได้ชัดเจนและถูกต้องมากยิ่งขึ้น

นอกจากนั้น ในการศึกษาหาชนิดที่จำเพาะต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ NADP^+ -Specific Isocitrate Dehydrogenase (ICDH gene) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการของ TCA cycle นอกจากนั้นยังเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทอย่างในกระบวนการผลิตกรดมะนาว ซึ่งจากการศึกษาพบว่า PCR products ที่ได้จะมีขนาดแตกต่างกันออกไป (รูปที่ 8) และเพื่อที่จะเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ ICDH จึงได้ทำการสังเคราะห์ตัวติดตาม (Probe) ที่มีความจำเพาะต่อยีน NADP^+ -Specific Isocitrate Dehydrogenase และทำการ Hybridization พบว่า ในสายพันธุ์ลูกผสม *Aspergillus niger* AT-11-2-3 และ *Aspergillus niger* AT 11-2-10 จะพบยีนที่จำเพาะต่อเอนไซม์ ICDH ชัดเจน ในขณะที่ *Aspergillus niger* AT-11-2-14 นั้นไม่พบ ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากมีปริมาณเอนไซม์ ICDH ต่ำกว่าเชื้อราลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีเอนไซม์ ICDH ในส่วนของเชื้อรา *A. niger* Yang no.2 แต่ไม่พบใน *T. viride* WU-36B ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่ามีปริมาณที่ต่ำมาก

การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อราสายพันธุ์ลูกผสมทั้งสามกับเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้นทั้ง *A. niger* Yang no.2 และ *T. viride* WU-36B ว่ามีความสัมพันธ์ของ Genetic material อย่างไร โดยใช้เทคนิคทาง PCR ในการศึกษา กล่าวคือ จากการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ 16S-like rRNA genes เนื่องจาก Small subunit ribosomal RNAs สามารถใช้บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ด้าน Phylogenetic relationship ทั้งนี้เนื่องจากมีลำดับเบสที่เป็น Conserved sequence elements กระจายในยีนของ rRNA ดังนั้นจากการทดลองพบว่า ใน *T. viride* WU-36B, *Aspergillus niger* AT-11-2-3 และ *Aspergillus niger* AT-11-2-10 ไม่พบยีนที่จำเพาะต่อ 16S-like rRNA genes ในขณะที่ *A. niger* Yang no.2 และ *Aspergillus niger* AT-11-2-14 มียีนที่จำเพาะต่อ 16S-like rRNA genes และยังพบว่าขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จะมีขนาดที่เท่ากัน และบางชิ้นจะมีขนาดแตกต่างกัน (รูปที่ 10) อธิบายได้ว่า ลูกผสมที่ได้มีการแสดงออกของยีนบางส่วนเหมือนสายพันธุ์ตั้งต้น นอกจากนั้นจากการศึกษาการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม พบว่า รูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากลูกผสมทั้งสามสายพันธุ์จะมีบางส่วนที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ตั้งต้น และมีบางส่วนที่เหมือนกับสายพันธุ์ตั้งต้น ดังนั้นอาจสรุปได้

เปรียบเทียบกับเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้นได้ อันจะเป็นประโยชน์ ต่อการศึกษาคุณสมบัติด้านอื่นๆ ต่อไป
ได้



บทที่ 6

เอกสารอ้างอิง

1. กรดซิตริก สารใช้ปรับสภาพความเป็นกรดในอาหาร 2529 วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ ฉบับ 118 (ก.ย. 31) :86.
2. คมศร ลมไธสง 2539. “การผลิตกรดมะนาวจากแป้งโดย *Aspergillus niger* WU-2223L”
 ขอนแก่น : รายงานโครงการวิจัยปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัย
 ขอนแก่น
3. จิตติมา เกศกนกวงศ์ 2539 “การผลิตกรดมะนาวโดยราพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2”
 ขอนแก่น : รายงานโครงการวิจัยปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัย
 ขอนแก่น
4. สุขใจ โสมะฐิติ 2529 “อุตสาหกรรมกรดซิตริกกับแนวโน้มการผลิตในประเทศไทย” วารสาร
 เกษตรพระจอมเกล้า 4(3) : 14-77
5. อารณ วงษ์วิจารณ์ 2529 “กรดซิตริก” วารสารคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและ วิทยาศาสตร์
 3(5) : 405-422.
6. อารณ วงษ์วิจารณ์ 2529 “การคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อหมักกรดซิตริกจากน้ำ
 ที่สับปะรดเข้มข้น วารสารคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์ 2(5) : 115-129
7. Ajibad, A. et al. 1980 Enzyme Microb. Technol. 2, 61.
8. Chaudhary, K. K., Lakshmiminarayana, S., Ethiraj and Tauro, P. 1978 “Citric Acid
 Production by *Aspergillus niger* from Indian cane molasse by solid state fermentation J.
 Ferment. Technol. Jpn. 56 : 554.
9. Dekker, R. F. H. and Lindner, W. A. 1979 S. Afr. J. Sci. 75 : 65.
10. Gupta, J. K., Heding, L.G. and Jangensen, O. B. 1976 “Effect of sugar, pH and
 Ammonium Nitrate on Formation of Citric Acid by *Aspergillus niger*” Acta. Microbiol.
 Acad. Sci. Hung. 23 : 63.
11. Hannan, M. A., Rabbi, F., Rahman, A. T. M. F. and N-Chandhury 1973 J. Ferment.
 Technol. 51 : 606.

12. Kapoor, K. K., Chaudhary K. and Tauro, P., 1982 "Citric Acid in Prescott and Dunn's Industrial Microbiology" 4th ed. edited by G. Reed. AVI Publishing Com., Inc. Westport, Connecticut.
13. Kirk, O. 1964. Encyclopedia of Chemical, Citric Acid 2nd ed., John Wiley and Sons, New York : pp.524.
14. Koullas et al. 1993 "Effect of Alkali Delignification on Wheat Straw Saccharification by *Fusarium oxysporum* Cellulases" Biomass and Bioenergy, 4(1) : 9.
15. Kubicek, C. P. and Rohr M., 1986 Citric Acid Fermentation, CRC Crit. Rev. Biotechnol., 3 : 331.
16. Lutzen, N. W. Nielsen, M. H., Oxenboel, K. M., Schulein, M. and Stentebjerg- Olesen, B., 1983 Philos. Trans, R. Soc. London Ser., B 300 : 283.
17. Manonmani, H. K. and Sreekantiah, K. R., 1987 "Study on the Conversion of Cellulose Hydrolysate into Citric Acid by *A. niger*", Process. Biochem., 19 : 92.
18. Mollering, H. and Gruber, W., 1966 Anal. Biochem., 17 : 369.
19. Prescott, S. C. and Dunn, C. G., 1949 "The Citric Acid Fermentation" Industrial Microbiology, Mc-Graw Hill Book Company, Inc. New York.
20. Puri, V. P. and Pearce, G. R., 1986 "Alkali-Explosion Pretreatment of Straw and Bagasse for Enzymatic Hydrolysis", Biotech. Bioeng. XXVIII, 480.
21. Purnendu Ghosh and Ajay Singh in "Advances in Applied Microbiology" vol.39. pp. 295, Academic Press, U.S.A (1993)
22. Ryu, D. D. Y. and Mandels, M., 1980 Enzyme Microb. Technol., 2 : 91.
23. Somsak Sarangbin, 1994 "Breeding of Filamentous Fungi for Citric Acid Production from Cellulosic and Starchy Materials", A Thesis presented to Department of Applied Chemistry, School of Science and Engineering, Waseda University.
24. Sarangbin, S., Kirimura, K. and Usami S., 1993 "Citric Acid Production from Cellobiose by 2-Deoxyglucose-Resistant Mutant Strains of *Aspergillus niger* in Semi-Solid Culture", Appl. Microbiol. Biotechnol., 40 : 206.

25. Chang, L. T. and Terry, C. A., 1973 "Intergenic complementation of glucoylase and citric acid production in two species of *Aspergillus niger*", Appl. Microbiol., 25 : 890.
26. Gokhale, D. V. , Patil, S. G. and Bastawde, K. B., 1991 "Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207", Appl. Biochem. Biotech., 30 : 99.
27. Kirimura, K. , Sarangbin, S. , Rugsaseel, S. and Usami, S., 1992 "Citric acid production by 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Aspergillus niger*", Appl. Microbiol. Biotechnol., 36 : 573.
28. Lovrien, R. E., Gusek, T. and Hart, B., 1985 "Cellulase and protease specific activities of commercially available cellulase preparations", J. Appl. Biochem., 7 : 258.
29. Reczey, K., Laszlo, E. and Hollo, J., 1986 "Comparison of enzymic saccharification of starch and cellulose from technological and economic aspects", Starch/Starke, 38 : 306.
30. Sarangbin, S., Kirimura, K. and Usami, S., 1993 "Citric acid production from cellobiose by 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Aspergillus niger* in semi-solid culture", Appl. Microbiol. Biotechnol., 40 : 206.
31. Sinitsyn, A. P., Gusakov, A. V. and Yu Vlasenko, E., 1991 "Effect of structural and physio-chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis", Appl. Biochem. Biotech., 30 : 43.
32. Szezodrak, J., 1989 "The use of cellulase from a β -glucosidase-hyperproducing mutant of *Trichoderma reesei* in simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw", Biotech. Bioeng., 33 : 1112.

ภาคผนวก

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีเตรียมสารละลาย

อุปกรณ์ และสารเคมี

ก. อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาดต่าง ๆ
2. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาดต่าง ๆ
3. กระบอกตวง (Cylinder) ขนาดต่าง ๆ
4. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
5. ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) พร้อมทิป (Tips) ขนาดต่าง ๆ
6. ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
7. หลอดทดลองฝาเกลียว และแบบไม่มีฝา
8. พาราฟิล์ม และอะลูมิเนียมฟอยด์
9. ตะแกรงวางหลอด (Tes-tube rack)
10. หลอดหยด (Pasteur pipette) พร้อมลูกยาง
11. ขวดปริมาตร (Schot bottle) ขนาดต่าง ๆ
12. กระดาษกรอง Whatman No. 1 และ No. 4
13. บิวเรต (Buret) พร้อมขาตั้ง
14. กรวยกรอง (Buchner funnel)
15. Suction flask
16. Magnetic bar
17. Magnetic stirrer
18. Vertex mixer
19. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
20. เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum pump) บริษัท ABM, Germany

21. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท Beckman Instrument, Inc., U.S.A.
22. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) Model KT-30LD บริษัท LAP CO., Ltd., Japan
23. ตู้ปลอดเชื้อ (Biohazard clean air) รุ่น CA/REV6, Natherland
24. ตู้บ่มปรับอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Conthem Scientific Ltd., Newzealand
25. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Shimadzu UV-1201 บริษัท Shimadzu, Japan
26. เครื่องเซนตริฟิวจ์
27. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส (Mini Gel, Tokyo, Japan)
28. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR, Thermal cycle) (MJ, USA)
29. กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม
30. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
31. อุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็นในห้องปฏิบัติการ

ข. สารเคมี

1. กรด 3,5 ไดไนโตรซาลิซิลิก Fluka A.G., Switzerland
(3,5-dinitrosalicylic acid)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ E.Merck A.G., Germany
(Sodium hydroxide)
3. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต Famitalia carlo eaba A.G.
(Potassium sodium tartrate)
4. ฟีนอล์ฟทาลีน
(Phenophthalein)
5. กลูโคส (Glucose) Famitalia carlo eaba A.G.
6. เอทิลแอลกอฮอล์ Famitalia carlo eaba A.G.
(Absolute ethyl alcohol)

7. แอมโมเนียมไนเตรต
(Ammonium nitrate) Fluka A.G., Switzerland
8. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
(Potassium dihydrogen phosphate) E. Merck A.G., Germany
9. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต
(Magnesium sulfate heptahydrate) E. Merck A.G., Germany
10. แมงกานีสซัลเฟต
(Manganese sulfate) E. Merck A.G., Germany
11. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต
(Ferric chloride hexahydrate) Fluka A.G., Switzerland
12. อะซีโตน (Acetone) Fluka A.G., Switzerland
13. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟทาเลต
(Potassium hydrogen phthalate) Fluka A.G., Switzerland
14. โปเทโท เดกซ์โทรส อาการ์
(Potato dextrose agar) Difco laboratories, U.S.A.
15. กรดซิตริก (Citric acid) Fluka A.G., Switzerland
16. ไตรโซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต
(tri- Sodium citrate Dihydrate) Fluka A.G., Switzerland
17. อะกาโรส Difco laboratories, U.S.A.
18. เอนไซม์ตัดจำเพาะ อาทิเช่น *EcoR* I, *Hind* III เป็นต้น
19. PCR reaction kits Perkin Elmer, U.S.A.

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2, *Trichoderma viride* WU-36B, *Aspergillus niger* AT-11-2-3, *Aspergillus niger* AT-11-2-10 และ *Aspergillus niger* AT-11-2-14

ที่มา : Department of Applied Chemistry, School of Science and Engineering, Waseda University

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารชนิดแข็งสูตรสมบูรณ์ (Complete agar medium)

เติม Potato dextrose agar (PDA) จำนวน 3.9 กรัม ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. ต้มให้เดือดพร้อมกวนจนอาหารละลายหมด จากนั้นเทใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละประมาณ 5 มล. ปิดฝาไม่ต้องแน่นแล้วหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้พออุ่นๆ แล้วปิดฝาให้แน่น วางหลอดเอียงลงให้อาหารห่างจากปากหลอด ประมาณ 1-1 1/2 นิ้ว ทิ้งไว้ให้เย็น อาหารแข็งสูตรสมบูรณ์นี้ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อ (Strain maintenance)

2. อาหารสังเคราะห์สูตรสำหรับการผลิตกรดมะนาว (Synthetic medium)

สูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว จะเป็นอาหารสูตรควบคุม กล่าวคือ มีแร่ธาตุบางชนิดในปริมาณจำกัด เพื่อทำให้เกิดการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด โดยสูตรอาหารสำหรับการหมักแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) ประกอบด้วย

องค์ประกอบ	จำนวน (กรัม/ลิตร)
NH_4NO_3	2
KH_2PO_4	10
MgSO_4	0.25
MnSO_4	0.014
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.02

ในการเตรียมจะเติมแหล่งต้นตอของคาร์บอน ในขั้นตอนสุดท้ายแล้วปรับ pH 4.25 ก่อนนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

ซิงโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอน ด้วยการไตเตรตกับสารละลาย KHP (Potassium hydrogen phthalate)

2. สารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก รีเอเจนท์

ประกอบด้วยสารเคมี ดังต่อไปนี้

ก. กรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid)	10	กรัม
ข. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	16	กรัม
ค. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรท (Potassium sodium tartate)	300	กรัม
ง. น้ำกลั่น (Distilled water)	1000	กรัม

เทส่วนผสมต่างๆ ลงในขวดต้มกลั่น (Refluxion flask) จากนั้นทำการต้มกลั่น (Reflux) ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

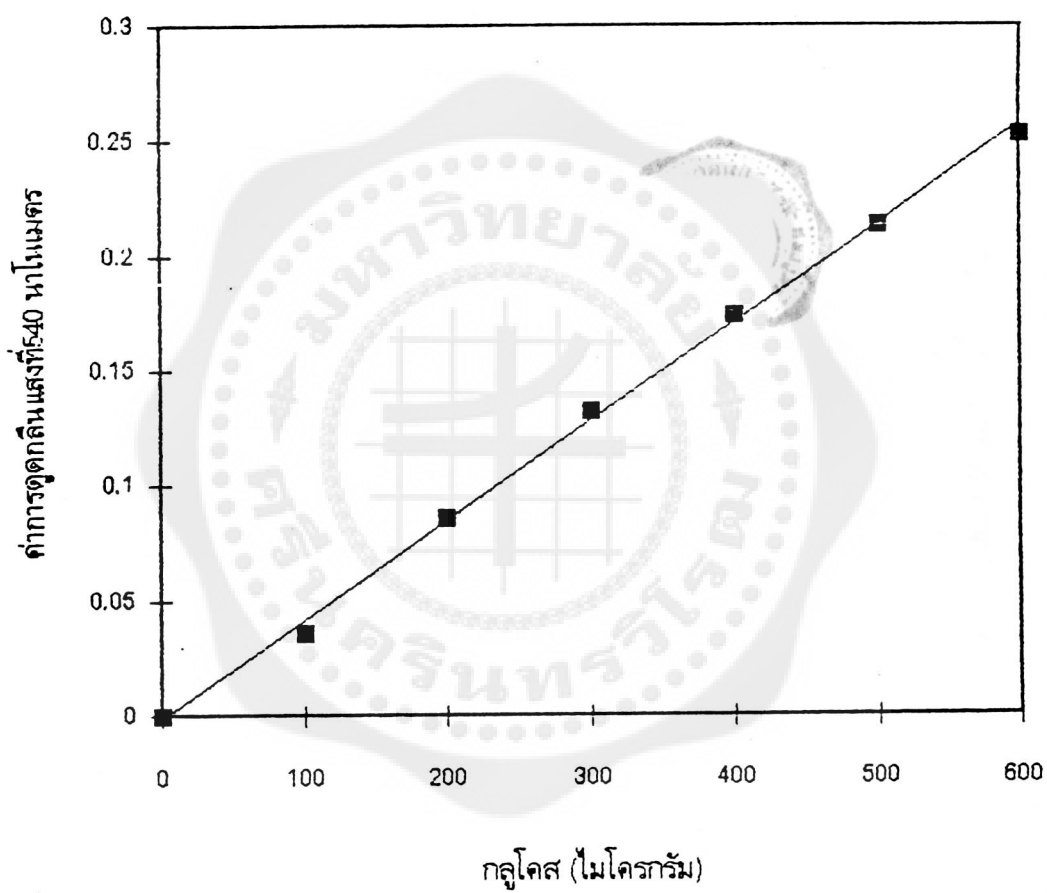
3. สารละลาย 70 % เอทิลแอลกอฮอล์

ตวงเอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 70 มล. แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ซิงกลูโคส 20 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 20 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคสอยู่ในช่วง 100-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

วิธีสร้างกราฟมาตรฐานของกลูโคสทำได้โดยใช้สารละลายกลูโคสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรด 3,5 - Dinitrosalicylic acid reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยเครื่อง Vertex จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำลงแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่นที่เย็นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส



รูป แสดงกราฟกลูโคสมาตรฐาน