

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต ต่อการเหลือรอดชีวิต [Survival] ของเซลล์ที่ใช้เป็น wild type เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

ผลการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต ลงบนเซลล์ยีสต์ที่ใช้เป็น wild type [*P. tannophilus* NRRL Y-2460] ที่ถูกเจือจางในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เกลี่ยกระจายทั่วผิวน้ำอาหารแข็งบนจานแก้ว ร่องนสารละลายถูกอาหารแข็งดูดซึมไว้เป็นผลให้เซลล์เกาะติดอยู่บนผิวน้ำอาหาร ในครั้งแรกใช้เวลาในการฉายแสงเป็น O [control] 5 , 10 , 20 , 30 , 40 , 50 , 60 และ 75 วินาที ตามลำดับ ในแนวตั้งฉากห่างจากหลอด 45 ซม. ตรวจนับจำนวนโคโลนี ที่เกิดขึ้นหลังจากนำไปบ่ม 3 วัน แสดงผลไว้ในตารางที่ 4.1.1 และ กราฟที่ 4.1 พบว่าช่วงเวลาที่ทำให้เชื้อรอดชีวิตไม่เกิน 1% จึงทำการฉายแสงครั้งที่สองใช้วิธีการเดียวกันกับครั้งแรก แต่ใช้ระยะเวลาการฉายแสงเป็น 0 , 20 , 25 , 30 , 35 และ 40 วินาที ตามลำดับ แสดงผลของโคโลนีที่เหลือรอดไว้ในรูปที่ 4.1.1 ก. ถึง 4.1.2 ค. [รูปโคโลนีที่เหลือรอดในการฉายแสงเวลา 20 วินาที ไม่ได้แสดงไว้] และตารางที่ 4.1.2 พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมของการฉายแสงอยู่ในช่วง 30-35 วินาที จึงเลือกเวลาการฉายแสงที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็น 33 วินาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1.1 จำนวนโคโลนีที่เหลือรอดหลังการถูกฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้เวลาแตกต่างกัน ที่ระยะ 45 เซนติเมตร ในครั้งที่ 1

เวลาที่ใช้ในการฉายแสง (วินาที)	จำนวนโคโลนีที่เหลือรอด เฉลี่ย *	ร้อยละการรอดชีวิต (% survival) **
0	94.67	100.00
5	78.00	82.39
10	68.17	72.01
20	35.17	37.15
30	6.00	6.38
40	0.67	0.71
50	0.17	0.18
60	0.00	0.00
75	0.00	0.00

* เฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

** $\frac{\text{จำนวนโคโลนีที่เหลือรอด}}{\text{จำนวนโคโลนีที่ไม่ถูกฉายแสง}} \times 100$

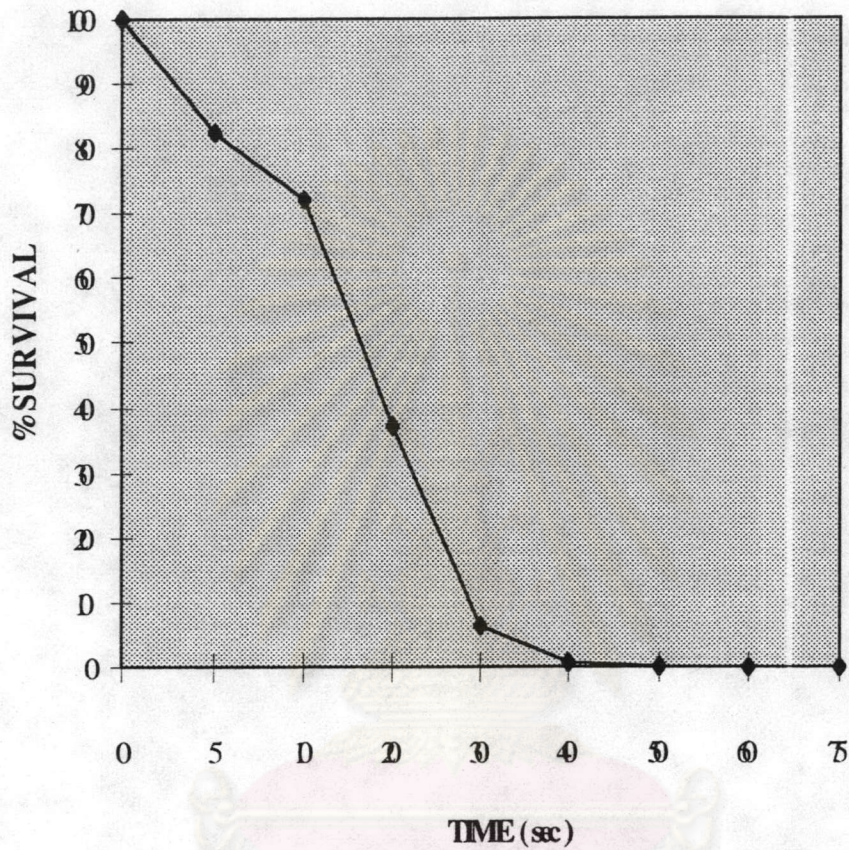
ตารางที่ 4.1.2 จำนวนโคโลนีที่เหลือรอดหลังการถูกฉายแสงอัลตราไวโอเลต โดยใช้เวลาแตกต่างกัน ที่ระยะ 45 เซนติเมตร ในครั้งที่ 2

เวลาที่ใช้ในการฉายแสง (วินาที)	จำนวนโคโลนีที่เหลือรอด เฉลี่ย *	ร้อยละการรอดชีวิต (% survival) **
0	87.33	100.00
20	32.17	36.84
25	6.83	7.82
30	3.50	4.01
35	0.50	0.57
40	0.33	0.38

* เฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

** หาจาก $\frac{\text{จำนวนโคโลนีที่เหลือรอด}}{\text{จำนวนโคโลนีที่ไม่ถูกฉายแสง}} \times 100$

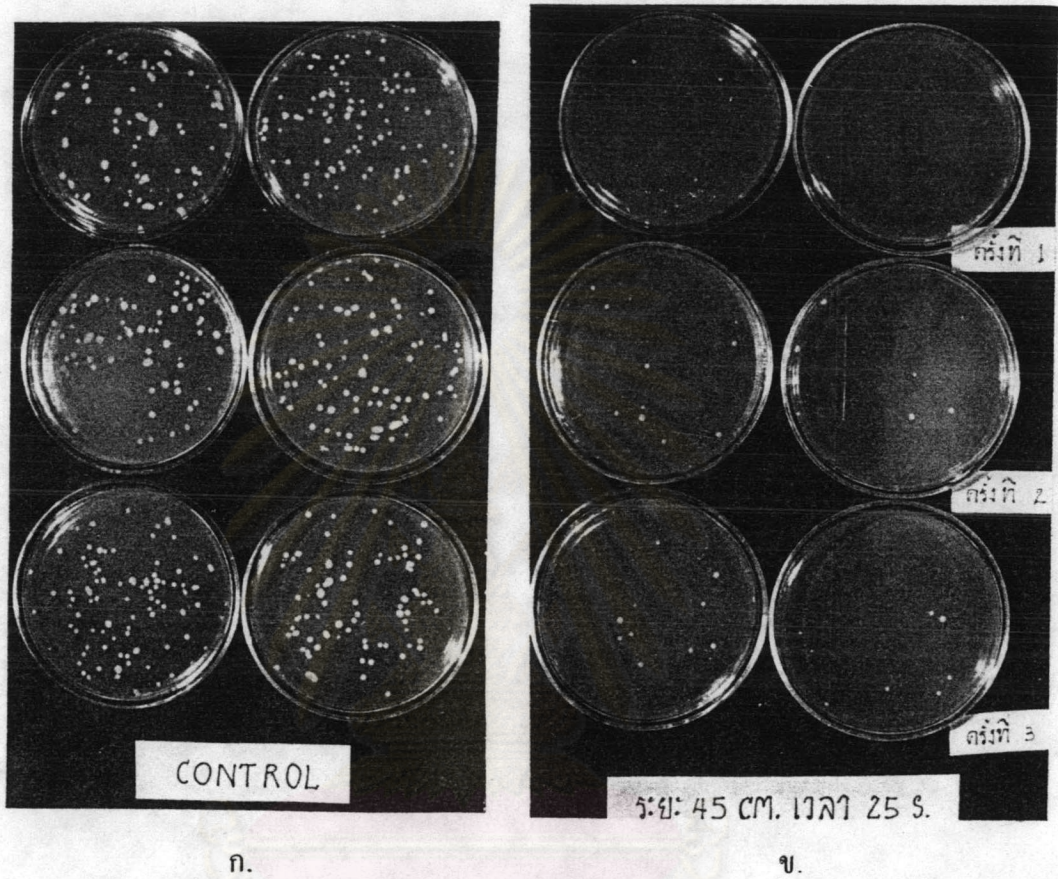
ศูนย์วิจัยการพยาบาล
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 4.1 ผลการฉายแสงอัลตราไวโอเลตต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ *P. tannophilus*

NRRL Y-2460 ใช้หลอด UV ขนาด 15 วัตต์ 2 หลอด ให้ความเข้มแสง 8400

mW ที่ 253.7 นาโนเมตร ฉายห่างจากเซลล์ 45 เซนติเมตร

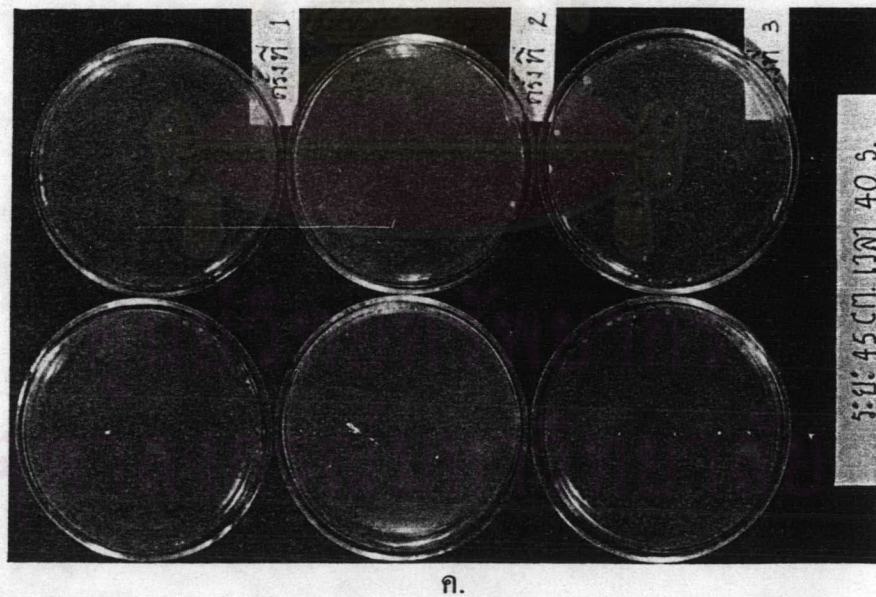
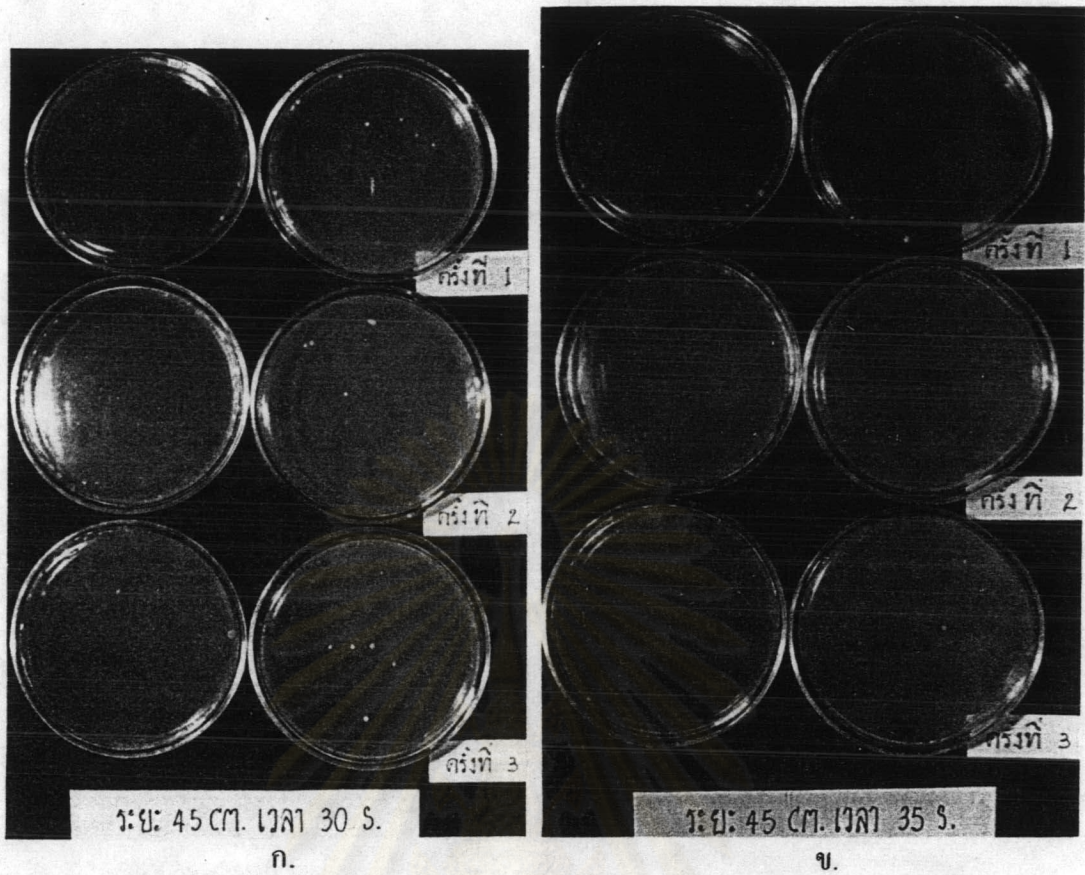


ก.

ข.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- รูปที่ 4.1.1 การเจริญของโคโลนี *P. tannophilus* หลังฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต
ที่ระยะห่าง 45 เซนติเมตร ช่วงเวลาแตกต่างกัน
- ก. Plate ที่ใช้เป็น control ไม่ถูกฉายแสง [0 วินาที]
- ข. Plate ที่ถูกฉายแสงนาน 25 วินาที



รูปที่ 4.1.2 การเจริญของโคโลนี *P. tannophilus* หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต
ที่ระยะห่าง 45 เซนติเมตร ช่วงเวลาแตกต่างกัน
ก. Plate ที่ถูกฉายแสงนาน 30 วินาที
ข. Plate ที่ถูกฉายแสงนาน 35 วินาที
ค. Plate ที่ถูกฉายแสงนาน 40 วินาที

2. ผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของสายพันธุ์ wild type และโคโลนีที่เกิดขึ้นหลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตรต่าง ๆ ซึ่งใช้เป็นคำหับ [Marker]

จากการทำ replica plating ของเชื้อสายพันธุ์ wild type ลงบนอาหารแข็งสูตร YMA ซึ่งใช้เป็น enrich media และอาหารแข็งสูตรไนโตรจีนัสเบสปราศจากกรดอะมิโน ซึ่งใช้เป็น minimal media พบว่าเชื้อเจริญได้ดีเท่า ๆ กัน ส่วนเชื้อที่ทำ replica plates ลงบนอาหารแข็งสูตร YMA เดิมขาดปฏิชีวนะในสเตรน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญขึ้นได้เลย ดังแสดงไว้ในรูป 4.2.1 โคโลนีของเชื้อหลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่คัดเลือกแสดงไว้ในรูปที่ 4.2.2 ถึง 4.2.4 นำมาทำ replica plates ลงบน enrich media และ minimal media รวมทั้ง minimal media ที่เติมกรดอะมิโน methionine และ lysine กับ enrich media เติม nystatin ความเข้มข้นเดียวกันกับข้างต้น ได้ผลดังปรากฏในตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2.5 ถึง 4.2.10 รวมทั้งหมด 55 สายพันธุ์ ในตารางได้ระบุถึงลักษณะและขนาดของโคโลนีหลังการฉายแสง แล้วนำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 32°C นาน 5 วัน ให้หมายเลขสายพันธุ์ในแต่ละโคโลนีเช่น 2.1B ตัวเลข 2 หมายถึง Plate ที่ทำพร้อมกันในครั้งที่ 2, .1 หมายถึง Plate ที่ถูกคัดไว้เป็น Plate แรก, B หมายถึงโคโลนี Plate 2.1 ที่ให้เป็นโคโลนี B [เช่นใน Plate ที่มี 3 โคโลนี จะกำหนดชื่อให้เป็น A,B และ C ตามลำดับ] ความสามารถในการเจริญบนอาหาร minimal media [min] อาหาร minimal media ที่เติมกรดอะมิโน methionine [met] และ กรดอะมิโน lysine [lys] อาหาร enrich media ผสมยาปฏิชีวนะ nystatin [nys] แทนด้วยเครื่องหมาย + , ++ , +++ และ ++++ หมายถึง ความหนาแน่นของเซลล์ที่เจริญบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็น 25% , 50% , 75% และ 100% ตามลำดับเมื่อเทียบกับความหนาแน่นของเซลล์ที่เจริญบน enrich media ซึ่งให้เป็น 100%

เครื่องหมาย - หมายถึง เซลล์ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารสูตรนั้นๆ หลังการทำ replica plating ลงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น แล้วนำไปบ่มที่ 32°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงผลไว้ในตารางที่ 4.2 เช่นเดียวกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อสายพันธุ์ wild type [W] และโคโลนีหลังการฉายแสง อัลตราไวโอเล็ต ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ ซึ่งใช้เป็นค้ำหนี

หมายเลขสายพันธุ์	ขนาดโคโลนี [มม.]	ลักษณะของโคโลนี [สัณฐาน , ขอบรอบ] [ผิวหน้า , สี *]	ความสามารถในการเจริญบนอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับบน enrich media			
			min	met	lys	nys
W	2.5-4.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++++	++++	++++	-
1A	4.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++++	++++	++++	-
1B	2.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวด้าน , ครีม	++	++	++++	-
1C	3.0X4.5	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	+++	+++	++++	-
1D	3.0X4.0	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++	++++	-
1E	2.0X3.0	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++	++++	-
1F	1.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	+	+	+++	-
2.1A	3.5	กลม , ขอบไม่เรียบ ผิวด้าน , ครีม	-	++++	++++	-
2.1B	5.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวด้าน , ขาว	+	+++	+	-
2.1C	3.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวด้าน , ครีม	++	++++	++++	-

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

หมายเลข สายพันธุ์	ขนาด โคโลนี [มม.]	ลักษณะของโคโลนี [สัณฐาน , ขอบรอบ] [ผิวหน้า , สี *]	ความสามารถในการเจริญบนอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับบน enrich media			
			min	met	lys	nys
2.2A	2.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	-	-	+	-
2.2B	2.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++++	++++	++++	-
2.2C	2.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	+	+++	+++	-
2.2D	4.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวด้าน , ครีม	+++	+++	+++	-
2.3A	3.5X4.0	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++	++++	-
2.3B	3.5X4.0	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++++	++++	++++	-
2.4A	2.5	กลม , ขอบไม่เรียบ ผิวด้าน , ขาว	+++	+++	+++	+
2.4B	3.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวด้าน , ครีม	++	++	++++	-
2.5A	3.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	+++	+++	+++	+
2.5B	3.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	+++	+++	+++	-
2.5C	2.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	+	++	+	-

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

หมายเลข สายพันธุ์	ขนาด โคโลนี [มม.]	ลักษณะของโคโลนี [สัณฐาน , ขอบรอบ] [ผิวหน้า , สี *]	ความสามารถในการเจริญบนอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับบน enrich media			
			min	met	lys	nys
2.6A	4.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	-	++++	++++	-
2.6B	3.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++++	++++	++++	-
2.6C	3.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++++	++++	++++	-
3.1A	2.0X2.5	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++++	++++	-
3.1B	2.5X3.0	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++++	++++	++++	-
3.1C	3.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++++	++++	++++	-
3.1D	2.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++++	++++	++++	-
3.1E	2.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++++	++++	++++	-
3.2A	3.0X4.0	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	+	+++	+++	-
3.2B	2.0X2.5	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++	++	-
3.2C	2.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวด้าน , ครีม	++	++	+++	-

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

หมายเลข สายพันธุ์	ขนาด โคโลนี [มม.]	ลักษณะของโคโลนี [สัณฐาน , ขอบรอบ] [ผิวหน้า , สี *]	ความสามารถในการเจริญบนอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับบน enrich media			
			min	met	lys	nys
3.2D	2.5X3.0	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาว	+	+++	+++	-
3.3A	2.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++	++	-
3.3B	2.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	+	+	+	-
3.3C	3.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++++	++	-
3.4A	2.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	-	++	++	-
3.4B	1.5X2.0	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++++	++	-
3.4C	2.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++++	++	-
4.1A	3.5X4.0	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++	+++	-
4.1B	4.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	+++	+++	-
4.1C	2.0X3.0	รี , ขอบไม่เรียบ ผิวมัน , ขาว	+	++	++	-
4.1D	3.5X4.0	รี , ขอบไม่เรียบ ผิวด้าน , ครีม	+	+	+	-

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

หมายเลข สายพันธุ์	ขนาด โคโลนี [มม.]	ลักษณะของโคโลนี [ลักษณะ , ขอบรอบ] [ผิวหน้า , สี*]	ความสามารถในการเจริญบนอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับบน enrich media			
			min	met	lys	nys
4.1E	3.5	ค่อนข้างกลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++	++	-
4.2A	4.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++	++	-
4.2B	3.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++	++	-
5.1A	4.5	ค่อนข้างกลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	+	+	++	-
5.1B	4.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	+++	+++	+++	-
5.1C	4.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++	++	-
5.2A	4.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาว	+++	+++	+++	-
5.2B	3.0	ค่อนข้างกลม , ขอบเรียบ ผิวด้าน , ครีม	+	++	++	-
5.2C	4.0X5.0	รี , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	+++	+++	-
5.3A	4.0	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	+++	++++	-
5.3B	3.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	++	++	++	-

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

หมายเลข สายพันธุ์	ขนาด โคโลนี [มม.]	ลักษณะของโคโลนี [สีฐาน , ขอบรอบ] [ผิวหน้า , สี *]	ความสามารถในการเจริญบนอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับบน enrich media			
			min	met	lys	nys
5.3C	4.5	กลม , ขอบเรียบ ผิวมัน , ขาวครีม	+++	+++	+++	-
5.3D	3.5	ค่อนข้างกลม , ขอบไม่เรียบ ผิวด้าน , ครีม	++	++	++++	-

* สีขาวครีม = สีขาวอมเหลืองอ่อน

สีครีม = สีเหลืองอ่อนคล้ายเนยเหลว

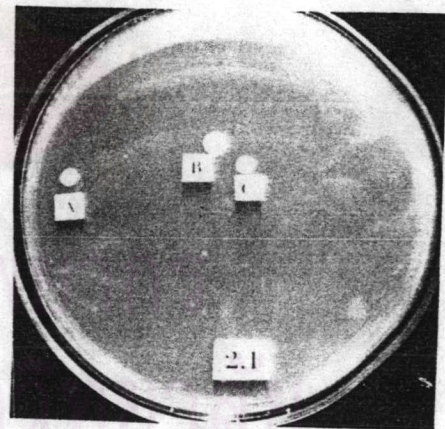
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2.1 การเจริญของ wild type หลังทำ replica plating ลงบนอาหารแข็ง [จากซ้ายไปขวา] สูตร YMA [enrich media], สูตรไนโตรจีนัสเบสปราศจากกรดอะมิโน [minimal media] และ สูตร YMA เติมนยาปฏิชีวนะ nystatin [เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร]



ก.

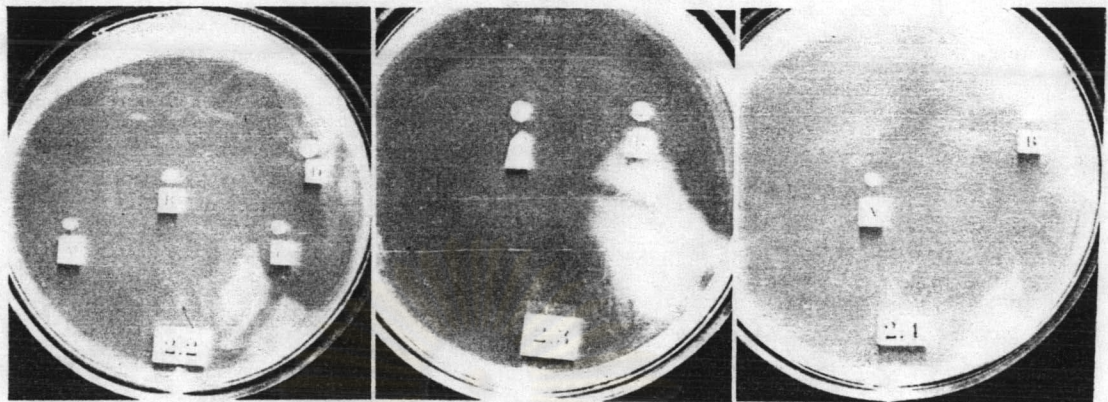


ข.

รูปที่ 4.2.2 โคลนินของ *P. tannophilus* หลังการฉายแสงใน Plates ที่คัดเลือกไว้

ก. Plate ที่ 1 สายพันธุ์ 1A-1F

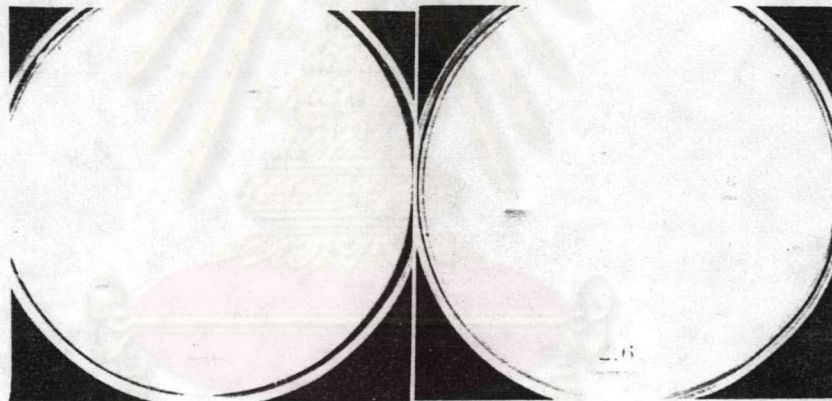
ข. Plate ที่ 2.1 สายพันธุ์ 2.1A-2.1E



ก.

ข.

ค.



ง.

จ.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.2.3 โคโลนีของ *P. tannophilus* หลังการฉายแสงใน Plates ที่คัดเลือกไว้

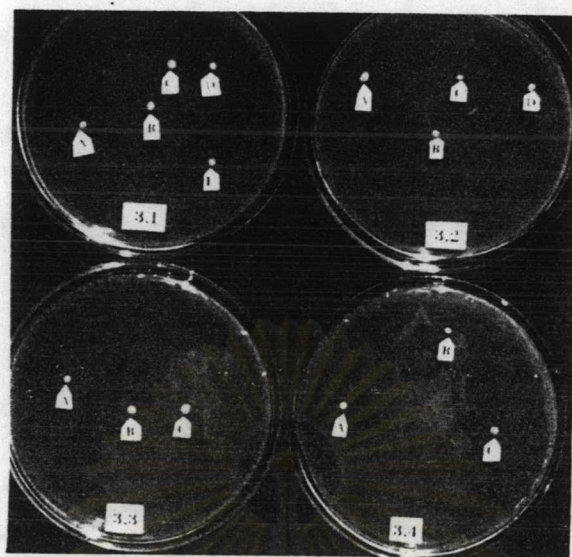
ก. Plate ที่ 2.2 สายพันธุ์ 2.2A-2.2D

ข. Plate ที่ 2.3 สายพันธุ์ 2.3A-2.3B

ค. Plate ที่ 2.4 สายพันธุ์ 2.4A-2.4B

ง. Plate ที่ 2.5 สายพันธุ์ 2.5A-2.5C

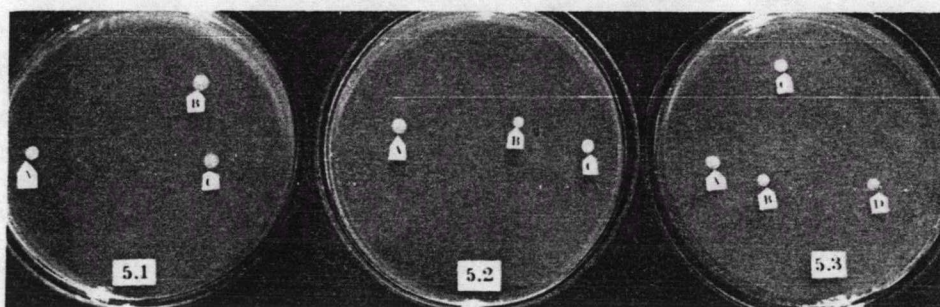
จ. Plate ที่ 2.6 สายพันธุ์ 2.6A-2.6C



ก.



ข.



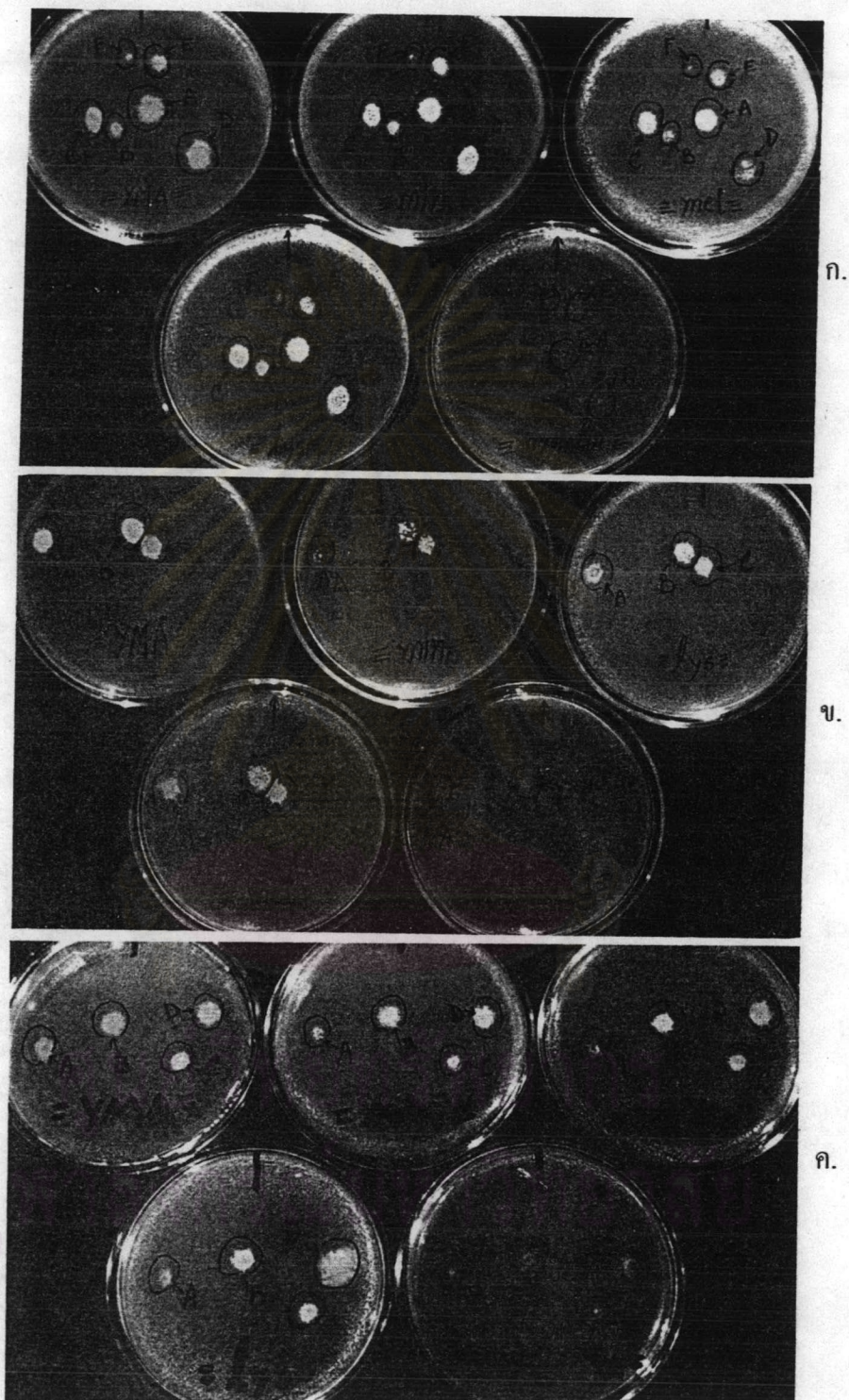
ค.

รูปที่ 4.2.4 โคโลนีของ *P. tannophilus* หลังการฉายแสงใน Plates ที่คัดเลือกไว้

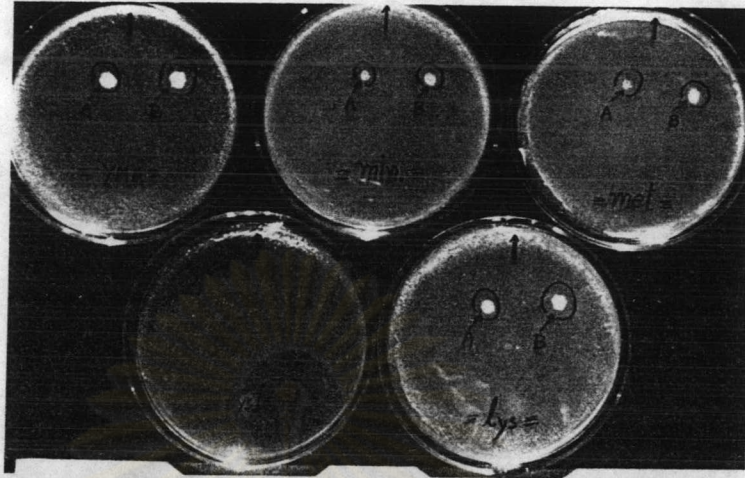
ก. Plate ที่ 3.1-3.4 สายพันธุ์ 3.1A-3.1E, 3.2A-3.2D, 3.3A-3.3C และ 3.4A-3.4C

ข. Plate ที่ 4.1-4.2 สายพันธุ์ 4.1A-4.1E และ 4.2A-4.2B

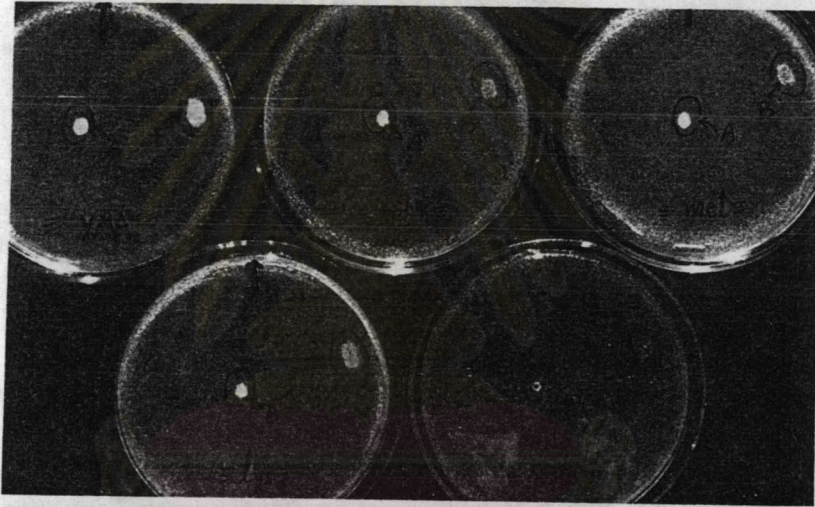
ค. Plate ที่ 5.1-5.3 สายพันธุ์ 5.1A-5.1E, 5.2A-5.2C และ 5.3A-5.3D



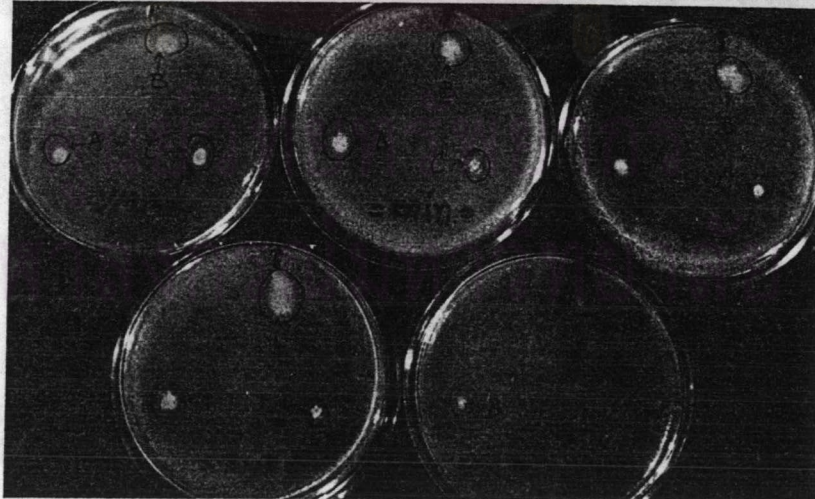
รูปที่ 4.2.5 Replica Plate บนอาหารคัดเลือกได้แก่อาหารแข็งสูตร YMA, สูตร YMA เติมเมทไธโอนีน [met] และไลซีน [lys], สูตร YMA เติมยาปฏิชีวนะไนสแตติน [nys] เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก. Plate ที่ 1, ข. Plate ที่ 2.1, ค. Plate ที่ 2.2



ก.

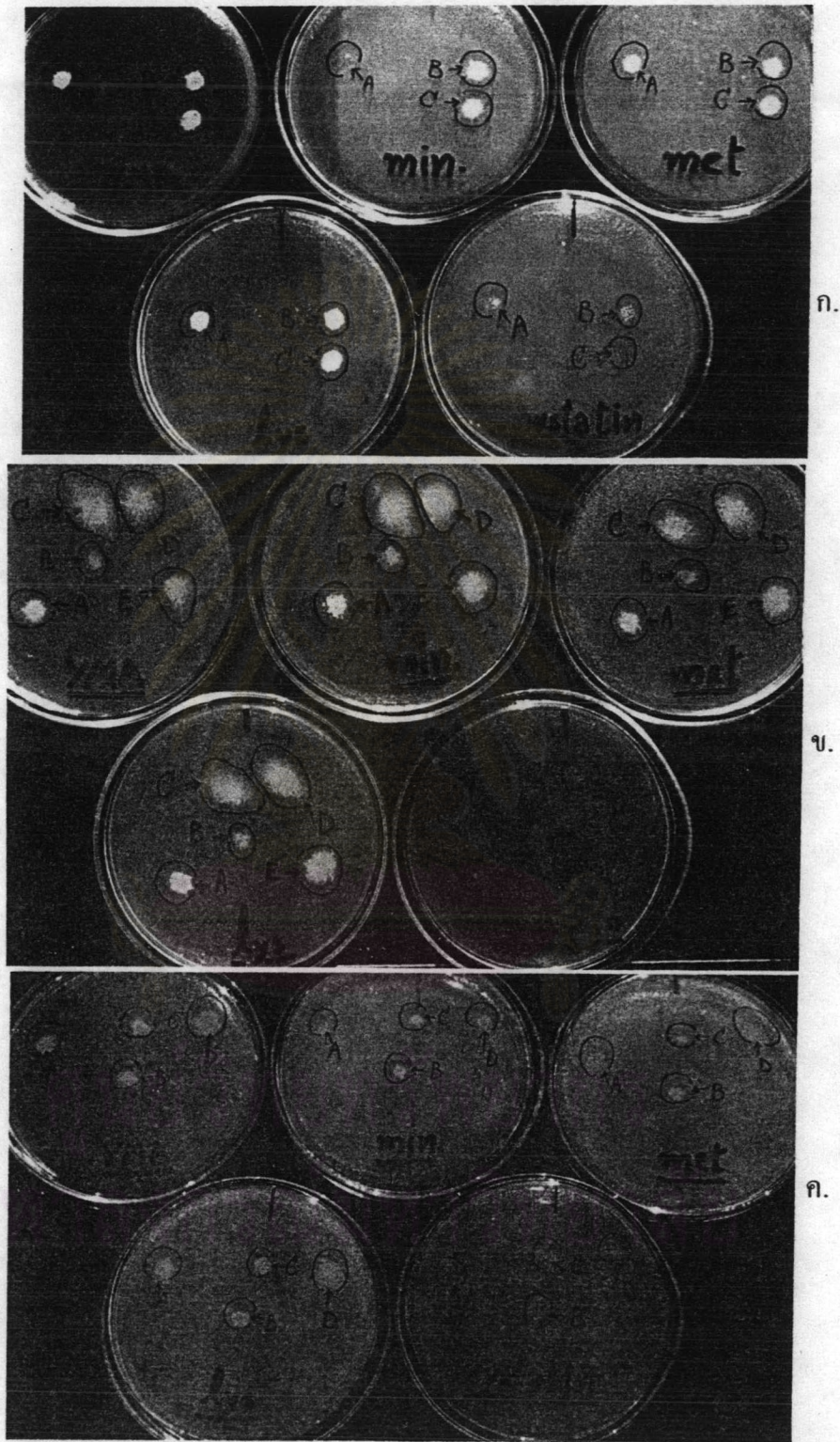


ข.

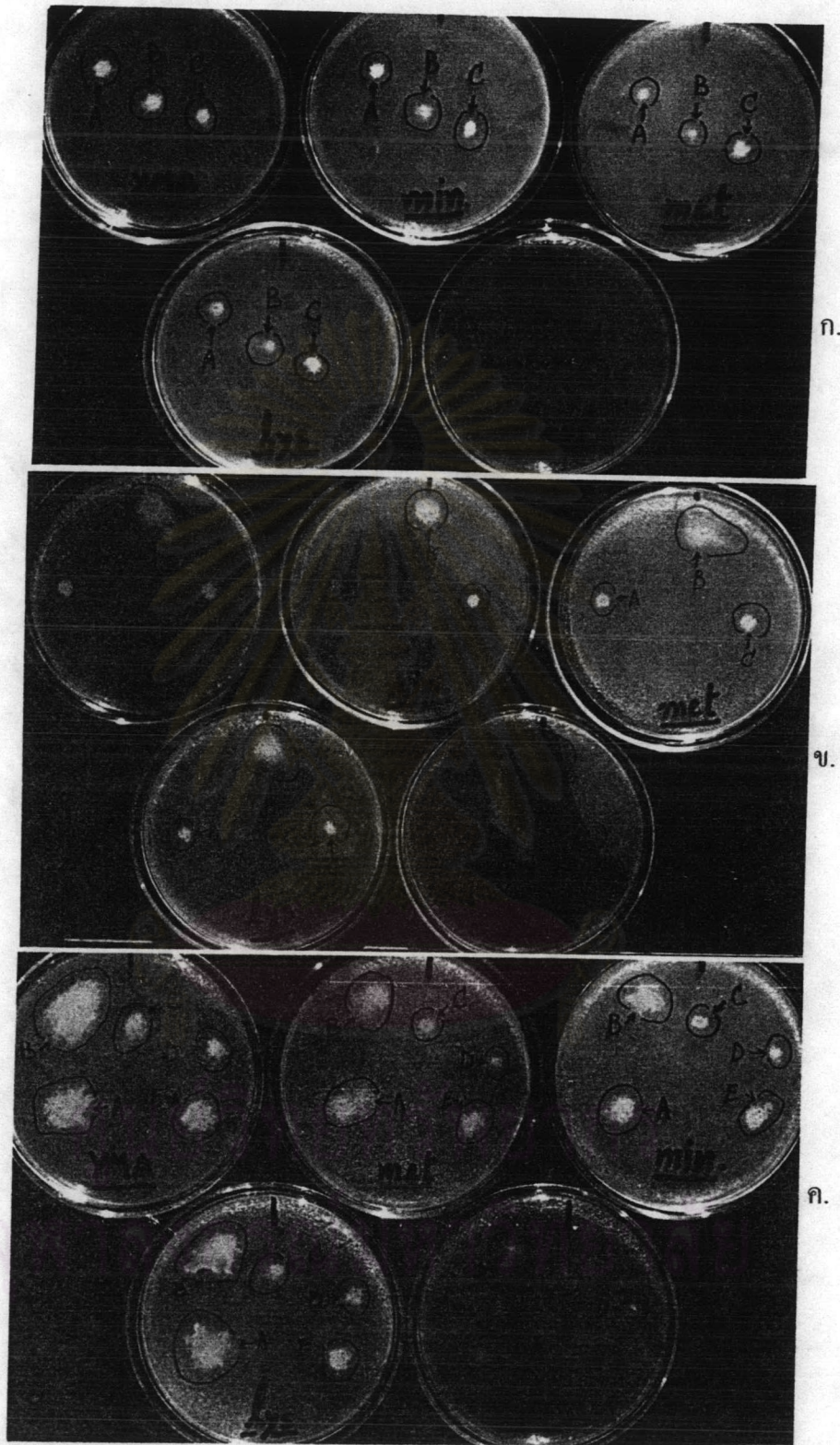


ค.

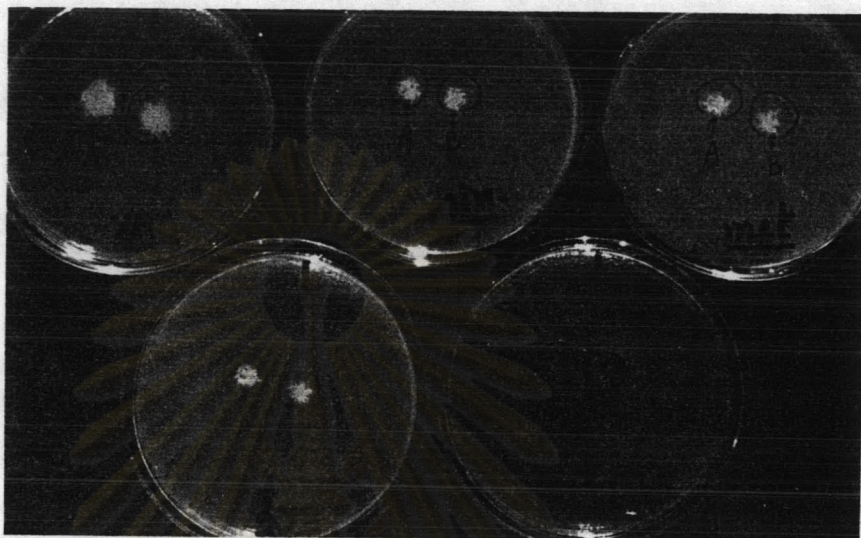
รูปที่ 4.2.6 Replica Plate บนอาหารคัดเลือกได้แก่อาหารแข็งสูตร YMA, สูตร YMA เติมเมทไธโอนีน [met] และไลซีน [lys], สูตร YMA เติมฮาปทิวีชีวานะโนสเตดิน [nys] เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก. Plate ที่ 2.3, ข. Plate ที่ 2.4, ค. Plate ที่ 2.5



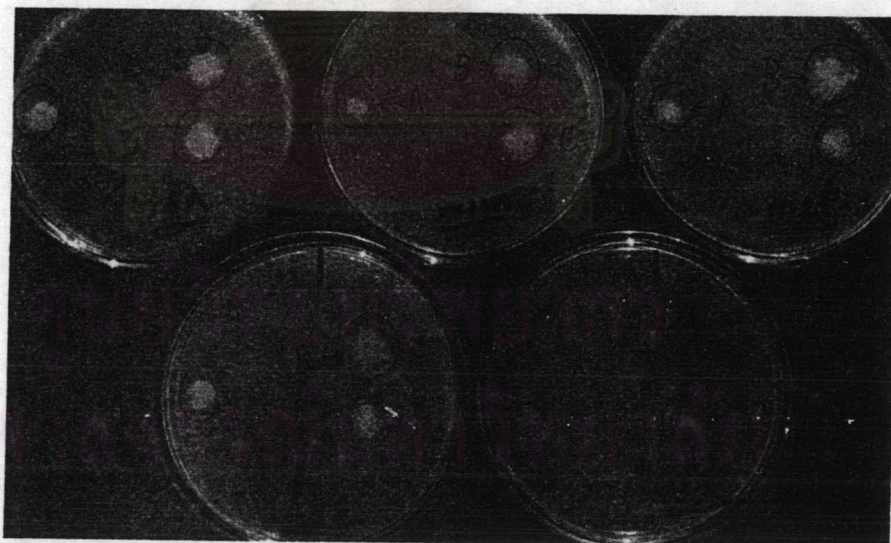
รูปที่ 4.2.7 Replica Plate บนอาหารคัดเลือกได้แก่อาหารแข็งสูตร YMA, สูตร YMA เต็มเมทไธโอนีน [met] และไลซีน [lys], สูตร YMA เต็มซาปทีชีวันะไนสเตดิน [nys] เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก. Plate ที่ 2.6, ข. Plate ที่ 3.1, ค. Plate ที่ 3.2



รูปที่ 4.2.8 Replica Plate บนอาหารคัดเลือกได้แก่อาหารแข็งสูตร YMA, สูตร YMA เติมเมทไธโอนีน [met] และไลซีน [lys], สูตร YMA เติมฮาปทิซิวะโนสเตดิน [nys] เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก. Plate ที่ 3.3, ข. Plate ที่ 3.4, ค. Plate ที่ 4.1

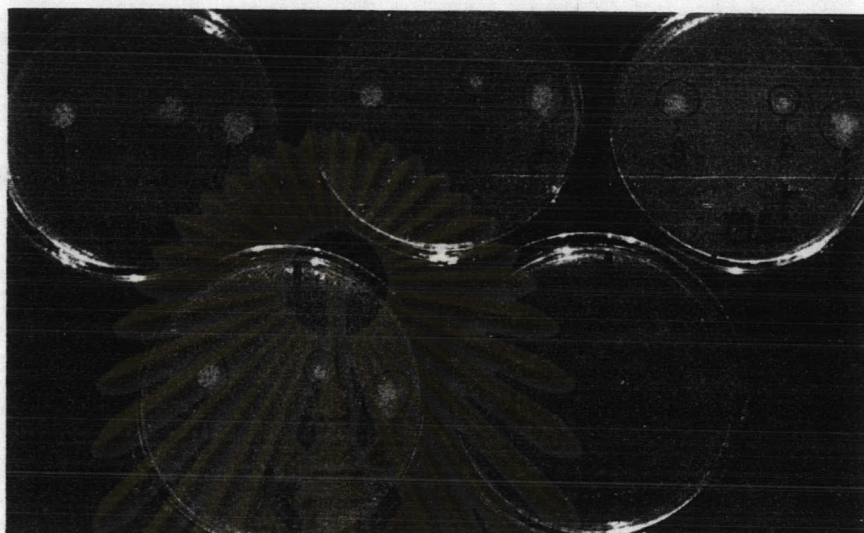


ก.



ข.

รูปที่ 4.2.9. Replica Plate บนอาหารคัดเลือกได้แก่อาหารแข็งสูตร YMA, สูตร YMA เดิม เมทไธโอนีน [met] และไลซีน [lys], สูตร YMA เดิมขาดปฏิชีวนะไนสเตรดิน [nys] เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก. Plate ที่ 4.2, ข. Plate ที่ 5.1



ก.



ข.

รูปที่ 4.2.10. Replica Plate บนอาหารคัดเลือกได้แก่อาหารแข็งสูตร YMA, สูตร YMA เติม เมทไรโอนีน [met] และไลซีน [lys], สูตร YMA เติมยาปฏิชีวนะไนสเตรดิน [nys] เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก. Plate ที่ 5.2, ข. Plate ที่ 5.3

3. การคัดเลือกมิวแทนต์ที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลส

ความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสหาจากปริมาณฟองก๊าซที่เชื้อสร้างขึ้นในหลอดเก็บก๊าซ [Durham tube] โดยถือว่าเมื่อเชื้อใช้น้ำตาลจะเปลี่ยนโมเลกุลน้ำตาลเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ [พวงพร , 2530] ทำการวัดความยาวฟองก๊าซแต่ละสายพันธุ์บันทึกผลไว้ในตารางที่ 4.3.1 ซึ่งสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความยาวฟองก๊าซเฉลี่ยสูงกว่า wild type ไม่น้อยกว่า 90% ในการคัดเลือกครั้งแรกนี้ได้ 11 สายพันธุ์ ได้แก่ 2.3B , 2.5B , 2.6B , 3.1B , 3.1D , 4.2A , 4.2B , 5.1A , 5.2B , 5.3A และ 5.3D นำสายพันธุ์เหล่านี้ ไปทำการคัดเลือกในครั้งที่ 2 เหมือนในครั้งแรก โดยในครั้งนี้เพิ่มสายพันธุ์มิวแทนต์ activity สูงจากต่างประเทศ คือ $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant เข้าไปเป็นตัวเปรียบเทียบกับ wild type แสดงผลไว้ในตารางที่ 4.3.2 ในครั้งนี้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความยาวฟองก๊าซเฉลี่ยสูงกว่า wild type รวมทั้งใกล้เคียงและสูงกว่า $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant ได้เหลือ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ 2.6B , 3.1D , 4.2B และ 5.3D นำไปทำการคัดเลือกครั้งสุดท้ายอีกครั้งหนึ่งในแบบเดียวกัน โดยในสองครั้งแรกเชื้อถูกเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YMB ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 วัน ส่วนในครั้งที่ 3 นี้ ใช้สภาวะเดิมเหมือนสองครั้งแรกแต่เพิ่มเวลาเลี้ยงเป็น 7 วัน ความสูงฟองก๊าซแสดงในตารางที่ 4.3.3 และรูปที่ 4.3.1-4.3.2 คัดเลือกไว้ได้เหลือ 2 สายพันธุ์ คือ 2.6B และ 5.3D ที่มีความยาวฟองก๊าซใกล้เคียงและมากกว่า $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant ไปทำการหมักจริง เพื่อหาอัตราการผลิตเอทานอลเปรียบเทียบกับ wild type ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3.1 ความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสของ wild type [W] และ มิวแทนดัดของมัน

โดยการวัดความยาวฟองก๊าซที่เชื้อสร้างขึ้นในหลอดเก็บก๊าซ จากการคัดเลือกครั้งที่ 1

หมายเลข สายพันธุ์	ความยาวฟองก๊าซ		หมายเลข สายพันธุ์	ความยาวฟองก๊าซ		หมายเลข สายพันธุ์	ความยาวฟองก๊าซ	
	* เฉลี่ย	S.D.		* เฉลี่ย	S.D.		* เฉลี่ย	S.D.
W	0.600	0.071	2.5B**	1.250	0.112	3.4C	0.500	0.122
1A	0.175	0.083	2.5C	0.625	0.466	4.1A	0.525	0.148
1B	0.600	0.071	2.6A	0.650	0.150	4.1B	0.400	0.071
1C	0.625	0.109	2.6B**	1.525	0.216	4.1C	0.050	0.050
1D	0.600	0.122	2.6C	0.200	0.122	4.1D	0.500	0.071
1E	0.425	0.192	3.1A	0.250	0.050	4.1E	0.450	0.166
1F	0.650	0.112	3.1B**	1.175	0.216	4.2A**	1.275	0.130
2.1A	1.025	0.178	3.1C	0.425	0.327	4.2B**	1.500	0.071
2.1B	0.700	0.141	3.1D**	1.500	0.212	5.1A**	1.150	0.250
2.1C	0.638	0.132	3.1E	0.650	0.112	5.1B	0.475	0.178
2.2A	0.725	0.148	3.2A	0.875	0.286	5.1C	0.325	0.043
2.2B	0.975	0.148	3.2B	0.575	0.192	5.2A	0.675	0.109
2.2C	0.575	0.083	3.2C	0.075	0.130	5.2B**	1.275	0.286
2.2D	0.575	0.192	3.2D	0.375	0.192	5.2C	0.400	0.122
2.3A	0.600	0.122	3.3A	0.475	0.178	5.3A**	1.175	0.178
2.3B**	1.500	0.255	3.3B	0.100	0.071	5.3B**	0.600	0.234
2.4A	0.575	0.148	3.3C	0.575	0.109	5.3C	0.525	0.178
2.4B	0.200	0.212	3.4A	0.525	0.083	5.3D**	1.825	0.043
2.5A	0.750	0.229	3.4B	0.500	0.122			

* เฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

** คือสายพันธุ์ ที่มีความยาวฟองก๊าซมากกว่า 90% เมื่อเปรียบเทียบกับ W นำไปคัดเลือกครั้งที่ 2

ตารางที่ 4.3.2 ความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสของ wild type [W] และ มีวแทนต์ของมันรวม ทั้ง $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant [N] โดยการวัดความยาวฟองก๊าซที่เชื้อสร้างขึ้นในหลอดเก็บก๊าซ จากการคัดเลือกครั้งที่ 2

หมายเลข สายพันธุ์	ความยาวฟองก๊าซ	
	* เฉลี่ย	S.D.
W	0.650	0.112
N	2.025	0.286
2.3B	1.450	0.128
2.5B	1.225	0.130
2.6B**	1.875	0.148
3.1B	1.150	0.287
3.1D**	1.650	0.335

หมายเลข สายพันธุ์	ความยาวฟองก๊าซ	
	* เฉลี่ย	S.D.
4.2A	1.300	0.316
4.2B**	1.750	0.229
5.1A	1.300	0.245
5.2B	1.275	0.327
5.3A	1.250	0.150
5.3D**	2.125	0.334

* เฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

** คือสายพันธุ์ ที่มีความยาวฟองก๊าซใกล้เคียง N ไม่ต่ำกว่า 80% ไปทำการคัดเลือกครั้งที่ 3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

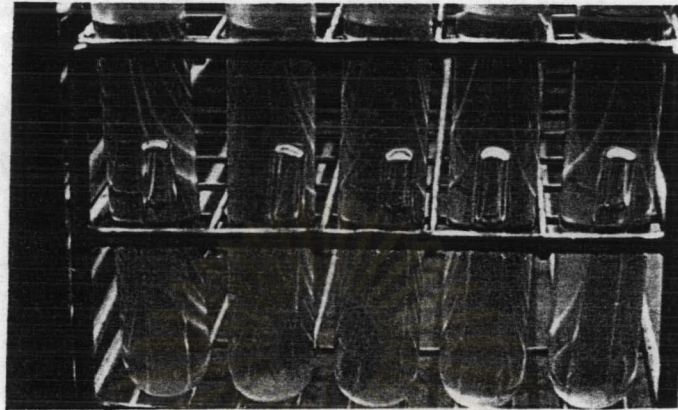
ตารางที่ 4.3.3 ความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสของ wild type [W] และ มีวแทนต์ของมันรวม ทั้ง $\text{NO}_3\text{-NO}_2$ mutant [N] โดยการวัดความยาวฟองก๊าซที่เชื้อสร้างขึ้นในหลอดเก็บก๊าซ จากการคัดเลือกครั้งที่ 3

หมายเลข สายพันธุ์	ความยาวฟองก๊าซ	
	* เฉลี่ย	S.D.
W **	1.280	0.116
N **	2.720	0.194
2.6B **	2.720	0.194
3.1 D	1.740	0.080
4.2 B	2.340	0.150
5.3 D **	3.040	0.215

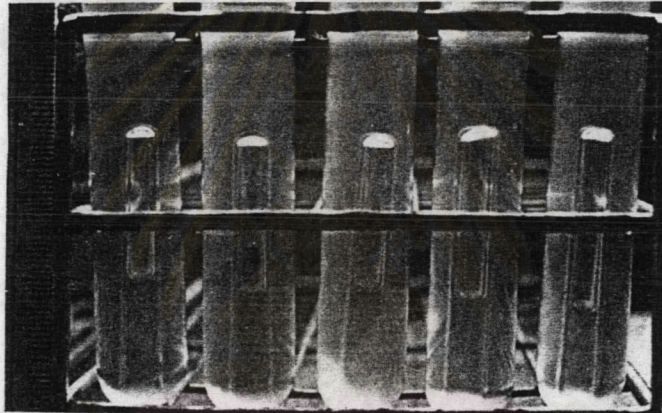
* เฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

** คือสายพันธุ์ ที่จะนำไปทำการหมักจริงในขั้นต่อไป

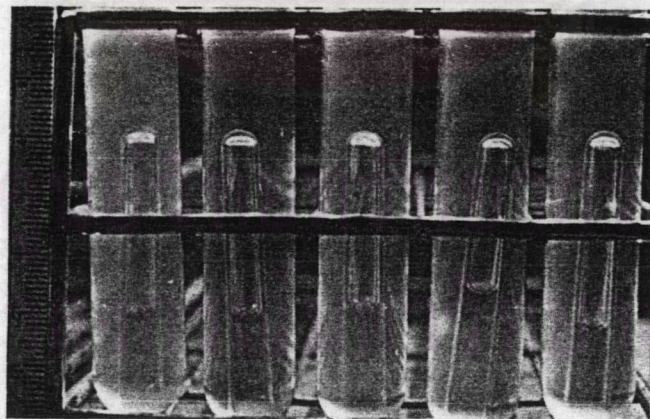
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก.



ข.



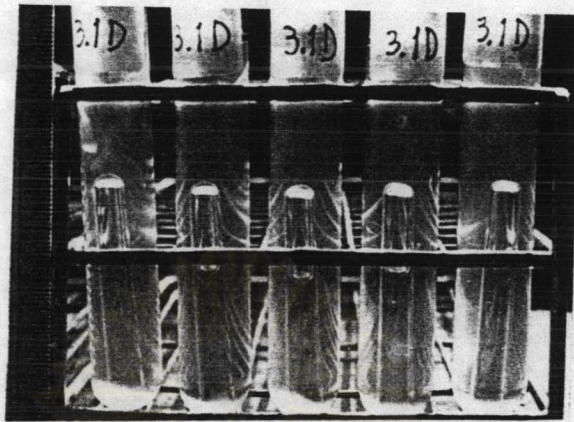
ค.

รูปที่ 4.3.1 ฟองก๊าซในแต่ละหลอดเก็บก๊าซ [Durham tube] ที่เชื่อมแต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้นจากการใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการหมักไซโลสครั้งที่ 3

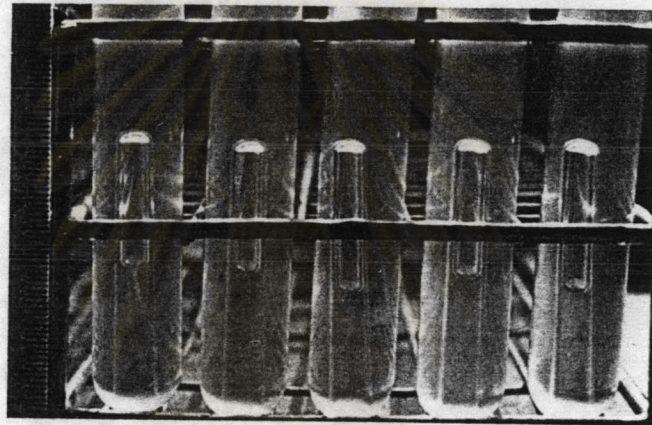
ก. สายพันธุ์ wile type

ข. สายพันธุ์ $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant

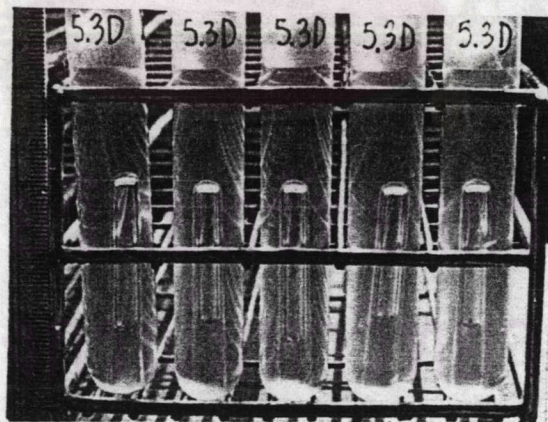
ค. สายพันธุ์ 2.6 B



ก.



ข.



ค.

รูปที่ 4.3.2 ฟองก๊าซในแต่ละหลอดเก็บก๊าซ [Durham tube] ที่เชื่อมแต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้นจากการใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการหมักไซโลสครั้งที่ 3

ก. สายพันธุ์ 3.1D

ข. สายพันธุ์ 4.2B

ค. สายพันธุ์ 5.3D

4. ความสามารถในการผลิตเอทานอลจากการหมักน้ำตาลไซโลสในสภาวะจำกัดอากาศ

เชื้อที่ใช้ในการหมักทั้งหมด 4 สายพันธุ์ จากการคัดเลือกครั้งที่ 3 ตามตารางที่ 4.3.3 ได้แก่ wild type [W] , $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant [N] , 2.6B และ 5.3D ทำการหมักทั้งหมด 10 วัน โดย 5 วันแรกเก็บตัวอย่างทุกวัน แล้วทิ้งช่วงในสภาวะเดิมไปอีก 5 วัน เก็บตัวอย่างครั้งสุดท้ายในวันที่ 10 ตัวอย่างที่เก็บแยกวิเคราะห์ 2 ส่วน ส่วนแรก วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือโดยวิธี DNS ส่วนที่สอง ส่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Gas Liquid Chromatography เพื่อหาปริมาณเอทานอลที่เชื้อสร้างขึ้น คำนวณหาปริมาณไซโลสที่ถูกใช้ไปแต่ละวัน โดยถือว่าครั้งแรกทุกตัวอย่างจะมีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนอยู่รวม 2.5% W/V (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลบออกจากปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละวัน อัตราการผลิตเอทานอล คำนวณจากปริมาณเอทานอลที่เชื้อสร้างขึ้น [มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร] หาค่าเฉลี่ย ปริมาณไซโลสที่ถูกใช้ในแต่ละวันพบว่า $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant มีอัตราการผลิตสูงสุดและสูงกว่าทุกสายพันธุ์ในทุกวัน สายพันธุ์ที่ 2.6B มีอัตราการผลิตสูงกว่า wild type เพียงเล็กน้อย ส่วนสายพันธุ์ที่ 5.3D มีอัตราการผลิตใน 2 วันแรกน้อยกว่า wild type แล้วกลับมีอัตราการผลิตตั้งแต่วันที่ 4 เพิ่มขึ้นมากกว่าและเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงในวันที่ 10 มีอัตราการผลิตสูงกว่า wild type และ 2.6B น้อยกว่า $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant เพียงเล็กน้อย ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.4.1 และกราฟที่ 4.4.1-4.4.4 แสดงอัตราการผลิตเอทานอลกับปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ในแต่ละวัน ส่วนอัตราผลิตเฉลี่ยทั้ง 10 วัน อัตราการผลิตสูงสุด [ในวันที่ 10] เปรียบเทียบกับอัตราการผลิตทางทฤษฎี [0.51กรัมเอทานอลต่อกรัมไซโลส] คำนวณเป็นค่าร้อยละ แสดงไว้ในตารางที่ 4.4.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4.1 การผลิตเอทานอล จากการหมักน้ำตาลไซโลสในสภาวะจำกัดอากาศ 32 องศาเซลเซียส
 ทั้ง 10 วัน ของเชื้อสายพันธุ์ wild type และมิวแทนต์ที่คัดเลือกไว้ จากตารางที่ 4.3.3

สายพันธุ์ที่ใช้ ในการหมัก	จำนวนวัน ที่ใช้หมัก	ปริมาณเอทานอล ที่ผลิตได้ในแต่ละวัน [มก./มล.]	ปริมาณไซโลสที่ถูกใช้ ในแต่ละวัน * [มก./มล.]	อัตราการผลิตเอทานอล ในแต่ละวัน** [ก./ก.-ไซโลส]
wild type	1	0.80	2.70	0.296
	2	1.17	3.87	0.316
	3	1.60	5.26	0.309
	4	2.40	7.80	0.315
	5	3.13	10.20	0.303
	10	8.04	24.94	0.333
NO ₃ -NO ₃ mutant	1	1.37	3.51	0.390
	2	3.24	7.62	0.456
	3	5.24	12.01	0.456
	4	7.03	15.98	0.451
	5	8.35	18.89	0.454
	10	11.14	24.86	0.467

ตารางที่ 4.4.1 (ต่อ)

สายพันธุ์ที่ใช้ ในการหมัก	จำนวนวัน ที่ใช้หมัก	ปริมาณเอทานอล ที่ผลิตได้ในแต่ละวัน [มก./มล.]	ปริมาณไซโลสที่ถูกใช้ ในแต่ละวัน * [มก./มล.]	อัตราการผลิตเอทานอล ในแต่ละวัน** [ก./ก.-ไซโลส]
2.6B	1	0.85	2.71	0.314
	2	1.41	4.41	0.329
	3	2.08	6.47	0.324
	4	2.83	8.71	0.335
	5	3.32	10.14	0.343
	10	8.33	24.33	0.353
5.3D	1	0.56	2.17	0.258
	2	0.91	3.30	0.309
	3	1.43	4.89	0.327
	4	2.21	7.07	0.358
	5	3.81	11.15	0.392
	10	9.43	24.72	0.413

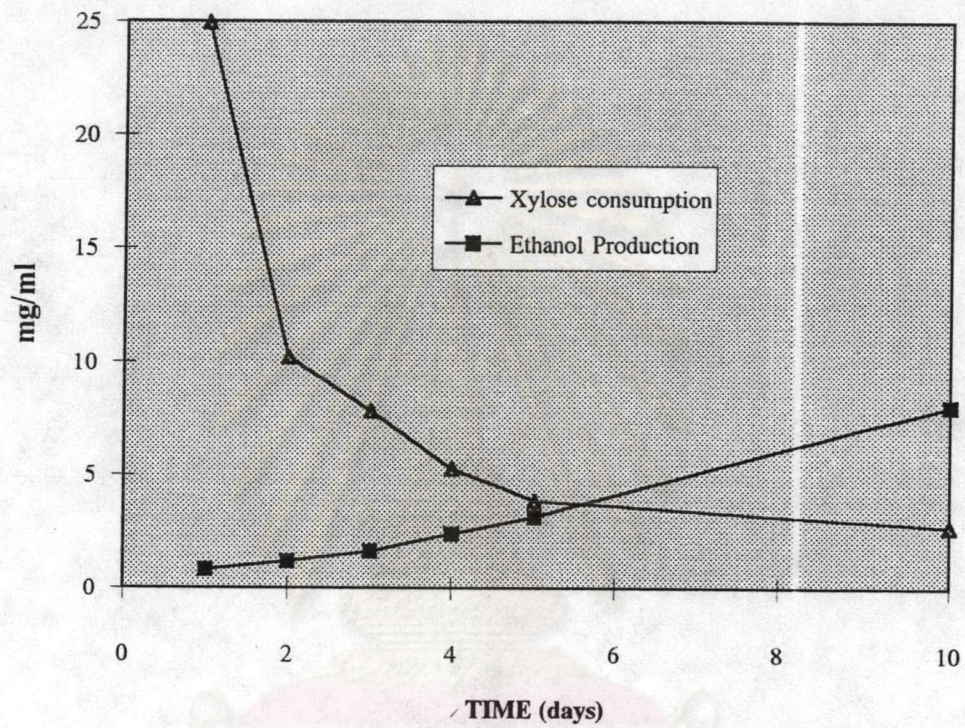
* จากปริมาณรวมเริ่มต้น 25 มก./มล.(มิลิกรัมต่อมิลิลิตร)

** หากจาก $\frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตวันนั้น} - \text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตวันก่อน}}{\text{ปริมาณไซโลสที่ถูกใช้วันนั้น} - \text{ปริมาณไซโลสที่ถูกใช้วันก่อน}}$

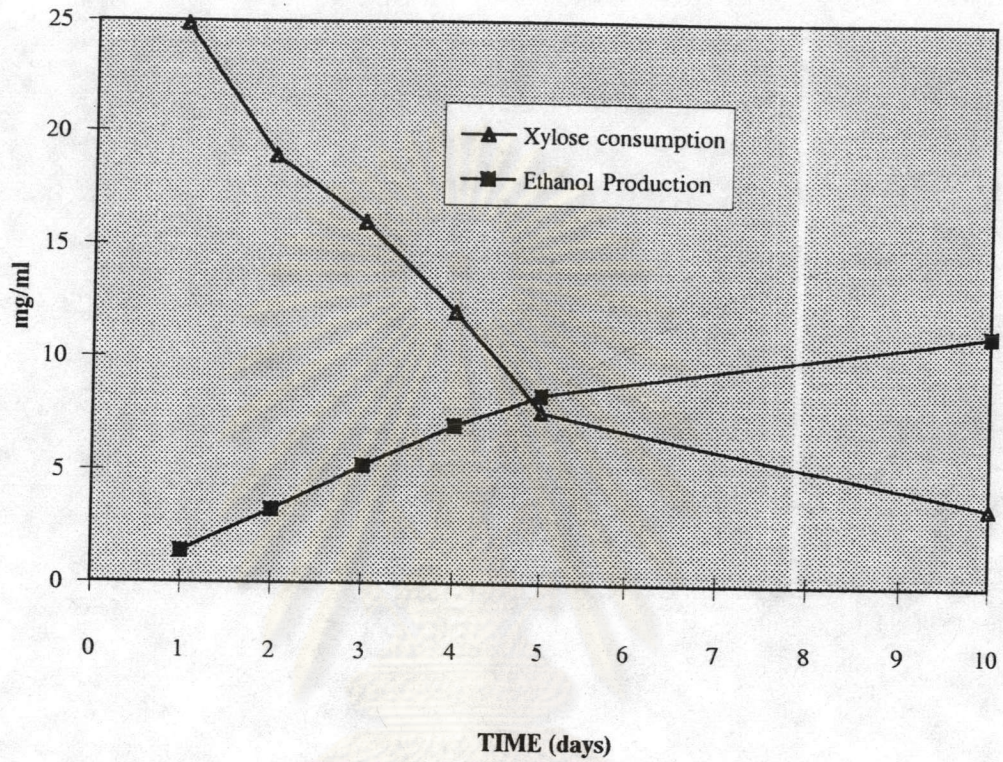
ตารางที่ 4.4.2 อัตราการผลิตเอทานอลเฉลี่ย อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุดและร้อยละอัตราการผลิตสูงสุดเมื่อเทียบค่ากับทางทฤษฎี ในการหมักน้ำตาลไซโลสทั้ง 10 วัน ของสายพันธุ์ wild type [W] , NO₃ - NO₃ mutant [N] , 2.6B และ 5.3D

สายพันธุ์ที่ใช้ ในการหมัก	อัตราการผลิตทั้ง 10 วัน		อัตราการผลิตสูงสุด (ก./ก.)	ร้อยละอัตราการผลิตสูงสุด เมื่อเทียบค่าทางทฤษฎี *
	* เฉลี่ย(ก./ก.)	S.D.		
W	0.312	0.012	0.333	65.29
N	0.446	0.025	0.467	91.57
2.6B	0.333	0.013	0.353	69.22
5.3D	0.343	0.052	0.413	80.98

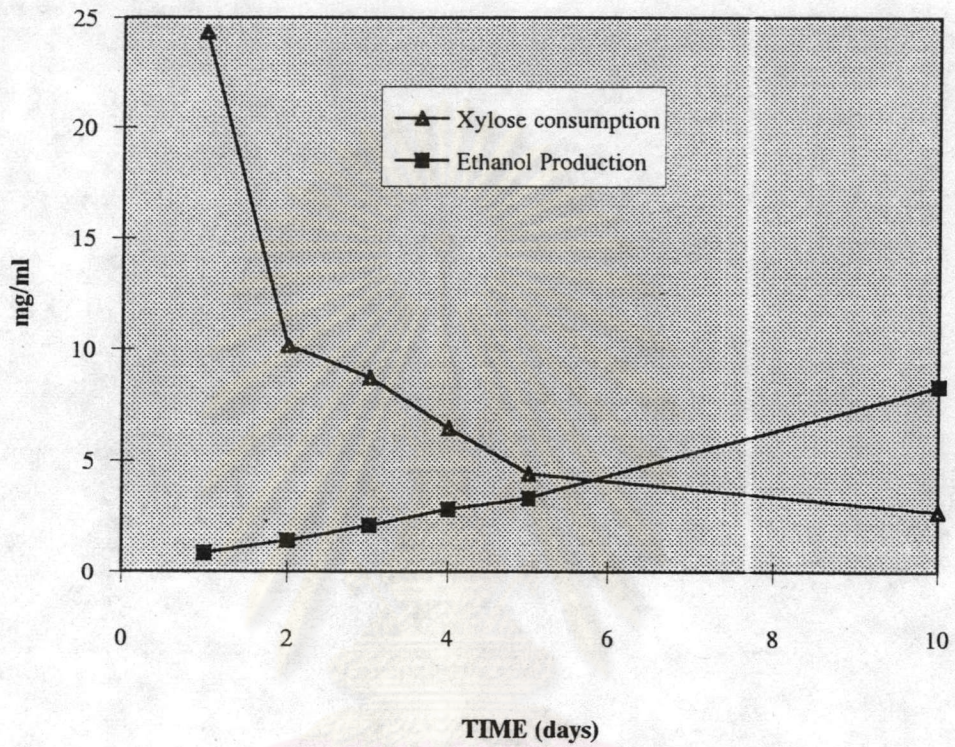
* หาจาก
$$\frac{\text{อัตราการผลิตสูงสุด [ก./ก.]}}{0.51 [ก./ก.]} \times 100$$



กราฟที่ 4.4.1 การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลไซโลสของ *P. tannophilus* NRRL Y-2460 ในอาหารเหลวสูตร YMB ที่มีไซโลส 2.5% เป็นแหล่งคาร์บอน สภาวะจำกัดอากาศ อุณหภูมิ 32 °C

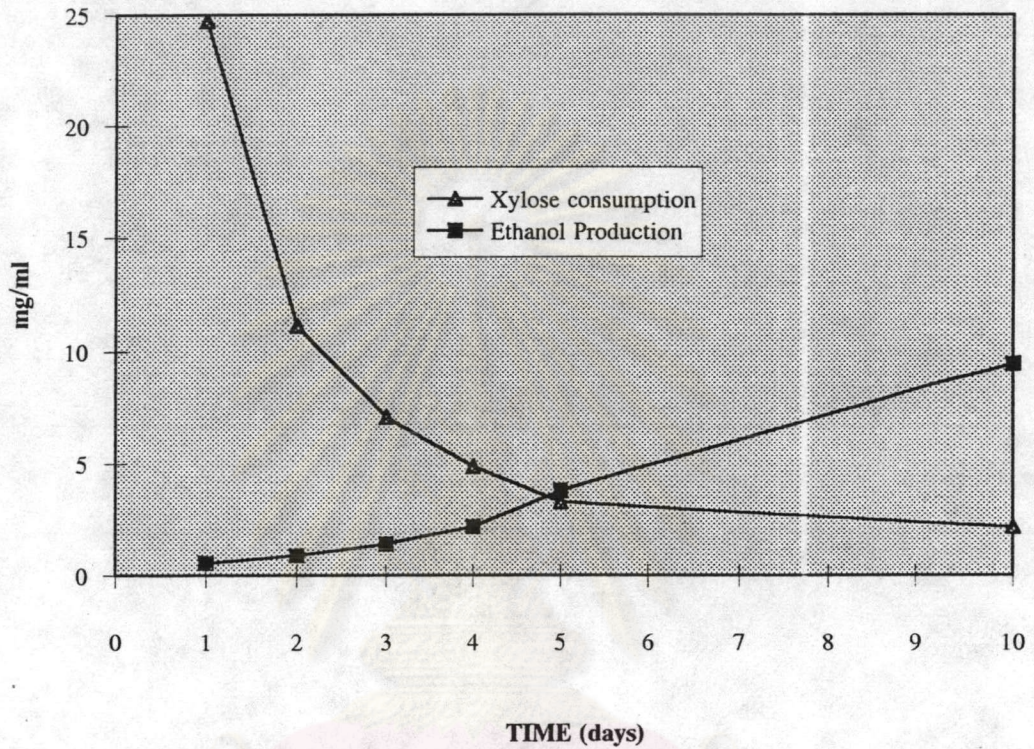


กราฟที่ 4.4.2 การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลไซโลสของ สายพันธุ์ $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant ในอาหารเหลวสูตร YMB ที่มีไซโลส 2.5% เป็นแหล่งคาร์บอน สภาวะจำกัดอากาศ อุณหภูมิ 32°C



กราฟที่ 4.4.3 การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลไซโลสของ สายพันธุ์ 2.6B ในอาหารเหลว สูตร YMB ที่มีไซโลส 2.5% เป็นแหล่งคาร์บอน สภาวะจำกัดอากาศ อุณหภูมิ 32 °C

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 4.4.4 การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลไซโลสของ สายพันธุ์ 5.3D ในอาหารเหลว สูตร YMB ที่มีไซโลส 2.5% เป็นแหล่งคาร์บอน สภาวะจำกัดอากาศ อุณหภูมิ 32 °C

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการหมักไซโลสได้ต่ำ และสายพันธุ์ที่ผลิตเอทานอลได้สูงเทียบกับ wild type

จากการทดลองที่ 4.3 ในตารางที่ 4.3.1 คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสได้ต่ำ จากความยาวฟองก๊าซในหลอดเก็บก๊าซต่ำกว่า wild type ไม่ถึง 50% ได้ 7 สายพันธุ์ คือ 1A , 2.4B , 2.6C , 3.1A , 3.2C , 3.3B และ 4.1C จากการทดลองที่ 4.4 สายพันธุ์ที่ผลิตเอทานอลได้สูงสุด คือ $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant รวมทั้ง 5.3D กับ 2.6B ที่มีอัตราการผลิตต่ำกว่า แต่ยังสูงกว่า wild type รวมสายพันธุ์ที่ทำการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาทั้งหมด 11 สายพันธุ์ เชื้อทุกสายพันธุ์เลี้ยงไว้ในหลอดแก้วปิดจุกเกลียว บรรจุอาหารเหลวสูตร YMB ที่ $28^\circ\text{C} - 33^\circ\text{C}$ นาน 1 เดือน นำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยหาบริเวณที่พบการสร้างแอสคัสเป็นหลัก ในพื้นที่วงกลมของภาพที่มองเห็นจากเลนส์ใกล้วัตถุ กำลังขยาย 100 เท่า และเลนส์ใกล้ตา กำลังขยาย 10 เท่า (กำลังขยายรวม 1000 เท่า) จำนวน 50 - microscopical fields ต่อ 1 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการหมักไซโลสได้ต่ำ ส่วนใหญ่จะสร้างแอสโคสปอร์ ปกติเหมือน wild type และแอสโคสปอร์ที่มีลักษณะแตกต่างออกไป กล่าวคือ ใน wild type แอสโคสปอร์ที่พบจะมีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอกยาว งดจาก vegetative cells ที่จะสร้างแอสคัสผนังหนาทึบแสง มีกระเปาะตรงปลายผนังบางใส ซึ่งก็คือแอสคัสภายในบรรจุ 1-4 แอสโคสปอร์ เมื่อแก่จะแตกออกปล่อยสปอร์หลุดออกไป เป็นผลให้ส่วนปลายแอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปยู หรือ วี [U or V shaped] และจะไม่แตกสาขา ส่วนแอสโคสปอร์ที่ผิดปกติจะแตกสาขาดังแต่ 1-5 สาขาหรือติดกันเป็นกระจุก บางครั้งพบลักษณะที่คล้ายเส้นใยหรือเส้นใยเทียมกล่าวคือ เป็นสายยาวต่อกันเป็นข้อ ๆ อาจแตกสาขามีผนังบางจนเห็น nuclei มากมายอยู่ภายใน พบในสายพันธุ์ที่ 1A , 2.6C , 4.1C และใน $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant ส่วนสายพันธุ์ ที่ 2.4B กับ 3.2C ไม่พบการสร้างแอสคัสหรือเส้นใยใด ๆ เลย แต่ทั้งสองพันธุ์มีลักษณะคล้ายกันคือมีเซลล์ลักษณะเป็นเหลี่ยมสั้นมากกว่า wild type [ในสายพันธุ์ที่ 2.4B พบใน budding cells] สำหรับสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด คือ $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant พบสิ่งที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่น ๆ ก็คือ กระจุกเซลล์ ซึ่งแตกต่างจาก budding cells ปกติ ตรงที่ขนาดเซลล์เล็กพอ ๆ กันประมาณ $1 \times 1 \mu$ ถึง $2 \times 2 \mu$ ติดกันเป็นก้อนไม่แผ่ราบ พบตั้งแต่ 7-29 เซลล์ต่อ 1 กระจุก ซึ่ง budding cells ที่ตรวจพบตามปกติจะมีเซลล์เมฆขนาดใหญ่ที่สุดที่สร้าง bud ขนาดประมาณ $3 \times 3 \mu$ ถึง $7 \times 8 \mu$ เซลล์ที่ bud ต่อ ๆ ไป จะเล็กลงตามลำดับ เมื่อรีดกดแผ่น cover slip จะแผ่แบนออก พบอยู่รวมกันตั้งแต่ 2 เซลล์ แต่ไม่เกิน 12 เซลล์ กระจุกเซลล์นี้ไม่พบในสายพันธุ์อื่นทั้ง 10 สายพันธุ์ที่ศึกษา ส่วนสายพันธุ์ที่ผลิตเอทานอลได้สูง รองลงมาได้แก่ 2.6B กับ 5.3D มีลักษณะ

แบบเดียวกัน กล่าวคือ ไม่สร้างเส้นใยหรือสิ่งแตกต่างอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type แอสโคสปอร์ของ 5.3D อาจพบการคดงออยู่บ้าง ซึ่งอาจเกิดจากการกดทับแอสโคสปอร์ที่เป็นแท่งยาว แต่โดยรวมไม่พบสิ่งแตกต่างอย่างชัดเจนจาก wild type ซึ่งทั้งหมดนี้แสดงไว้ในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.5- 4.13



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 จำนวนและขนาดแอสโคสปอร์ หรือสิ่งทีเซลล์สร้างขึ้นจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 50 microscopic field ของสายพันธุ์ wild type [W]
 $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant [N] และสายพันธุ์มิวแทนต์ที่คัดเลือกไว้

หมายเลขสายพันธุ์	จำนวนเซลล์	ขนาดเซลล์ (u)	จำนวนแอสโคสปอร์ปกติ *	ขนาดแอสโคสปอร์ปกติ (u)	จำนวนสิ่งทีเซลล์สร้างขึ้นนอกเหนือจากแอสโคสปอร์ปกติ							
					แอสโคสปอร์แตกสาขา		กระจุกแอสโคสปอร์		เส้นใย **		กระจุกเซลล์	
					จำนวนที่พบ	ขนาด (u)	จำนวนที่พบ	ขนาด (u)	จำนวนที่พบ	ขนาด (u)	จำนวนที่พบ	ขนาด (u)
W	763	กว้าง 1-6 ยาว 1-7	58	กว้าง 1-4 ยาว 8-32	-	-	-	-	-	-	-	-
# N	421	กว้าง 1-5 ยาว 1-7	51	กว้าง 1-5 ยาว 7-35	-	-	-	-	8	กว้าง 1-3 ยาว 10-29	21	***
# 2.6B	341	กว้าง 1-8 ยาว 2-8	51	กว้าง 2-6 ยาว 13-30	-	-	-	-	-	-	-	-
# 5.3D	389	กว้าง 1-7 ยาว 1-7	57	กว้าง 1-5 ยาว 10-30	-	-	-	-	-	-	-	-
## 1A	856	กว้าง 1-6 ยาว 1-7.5	59	กว้าง 1-5 ยาว 11-20	15	กว้าง 11-20 ยาว 14-38	10	กว้าง 15-30 ยาว 19-40	7	กว้าง 1-5 ยาว 20-41	-	-
## 2.4B	344	กว้าง 1-6 ยาว 1-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

หมายเลข สายพันธุ์	จำนวนเซลล์	ขนาดเซลล์ (u)	จำนวนแอสโค ฟอร์ปกติ *	ขนาดแอสโค ฟอร์ปกติ (u)	จำนวนสิ่งมีชีวิตที่เซลล์สร้างขึ้นนอกเหนือจากแอสโคฟอร์ปกติ							
					แอสโคฟอร์แตกสาขา		กระจุกแอสโคฟอร์		เส้นใย **		กระจุกเซลล์	
					จำนวน ที่พบ	ขนาด (u)	จำนวน ที่พบ	ขนาด (u)	จำนวน ที่พบ	ขนาด (u)	จำนวน ที่พบ	ขนาด (u)
## 2.6C	525	กว้าง 1-4 ยาว 1-5	52	กว้าง 2-5 ยาว 12-28	20	กว้าง 7-17 ยาว 8-19	5	กว้าง 10-20 ยาว 16-30	4	กว้าง 1-3 ยาว 18-41	-	-
## 3.1A	357	กว้าง 1-7 ยาว 1-7	54	กว้าง 1-5 ยาว 10-26	17	กว้าง 6-14 ยาว 8-21	3	กว้าง 14-30 ยาว 18-34	-	-	-	-
## 3.2C	275	กว้าง 1-5 ยาว 1-7	-	- -	-	-	-	-	-	-	-	-
## 3.3B	291	กว้าง 1-6 ยาว 1-8	53	กว้าง 1-4 ยาว 9-35	9	กว้าง 8-14 ยาว 10-20	13	กว้าง 13-18 ยาว 15-27	-	-	-	-
## 4.1C	327	กว้าง 1-3 ยาว 1-7	52	กว้าง 1-5 ยาว 12-36	13	กว้าง 8-22 ยาว 16-27	6	กว้าง 11-22 ยาว 14-40	10	กว้าง 1-4 ยาว 10-53	-	-

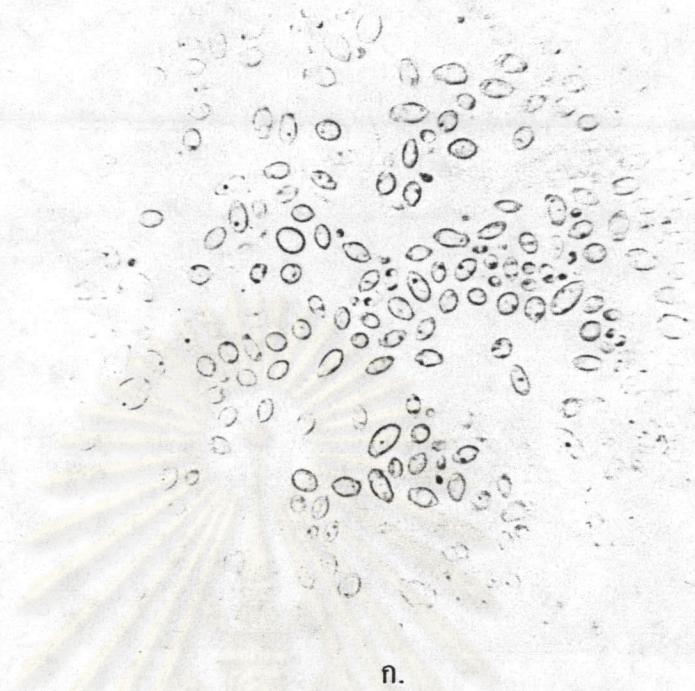
สายพันธุ์ที่มี activity สูง

สายพันธุ์ที่มี activity ต่ำ

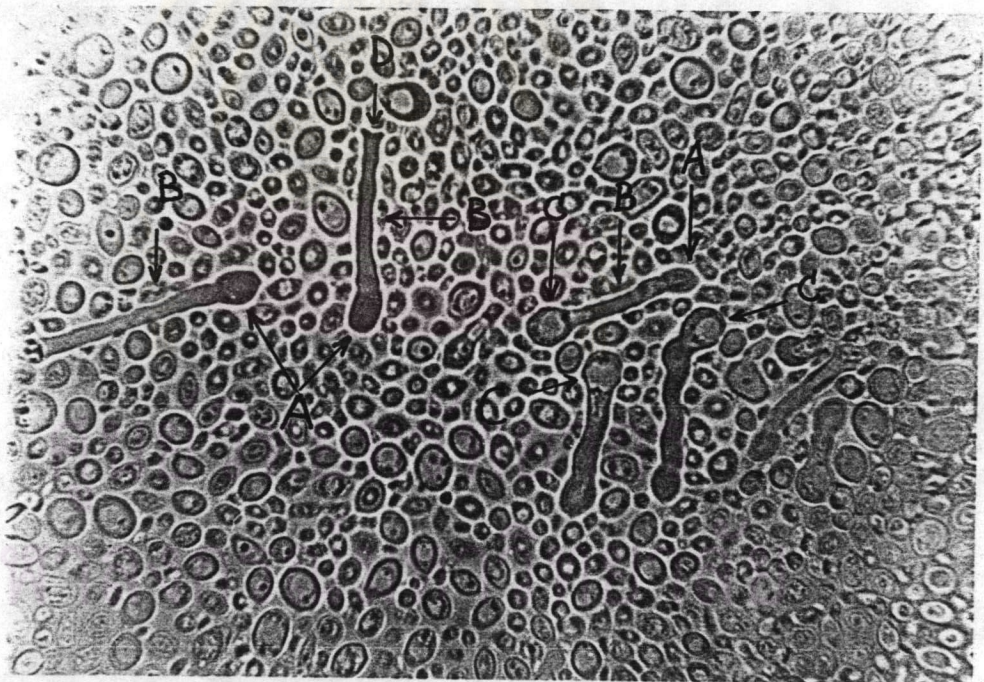
* แอสโคฟอร์ปกติพิจารณาตามหลักของ Wickerham [1961]

** อาจเป็น true หรือ pseudo-mycelium

*** ขนาดเซลล์ 1x1 ถึง 2x2 u , 7-29 เซลล์ต่อ 1 กระจุก



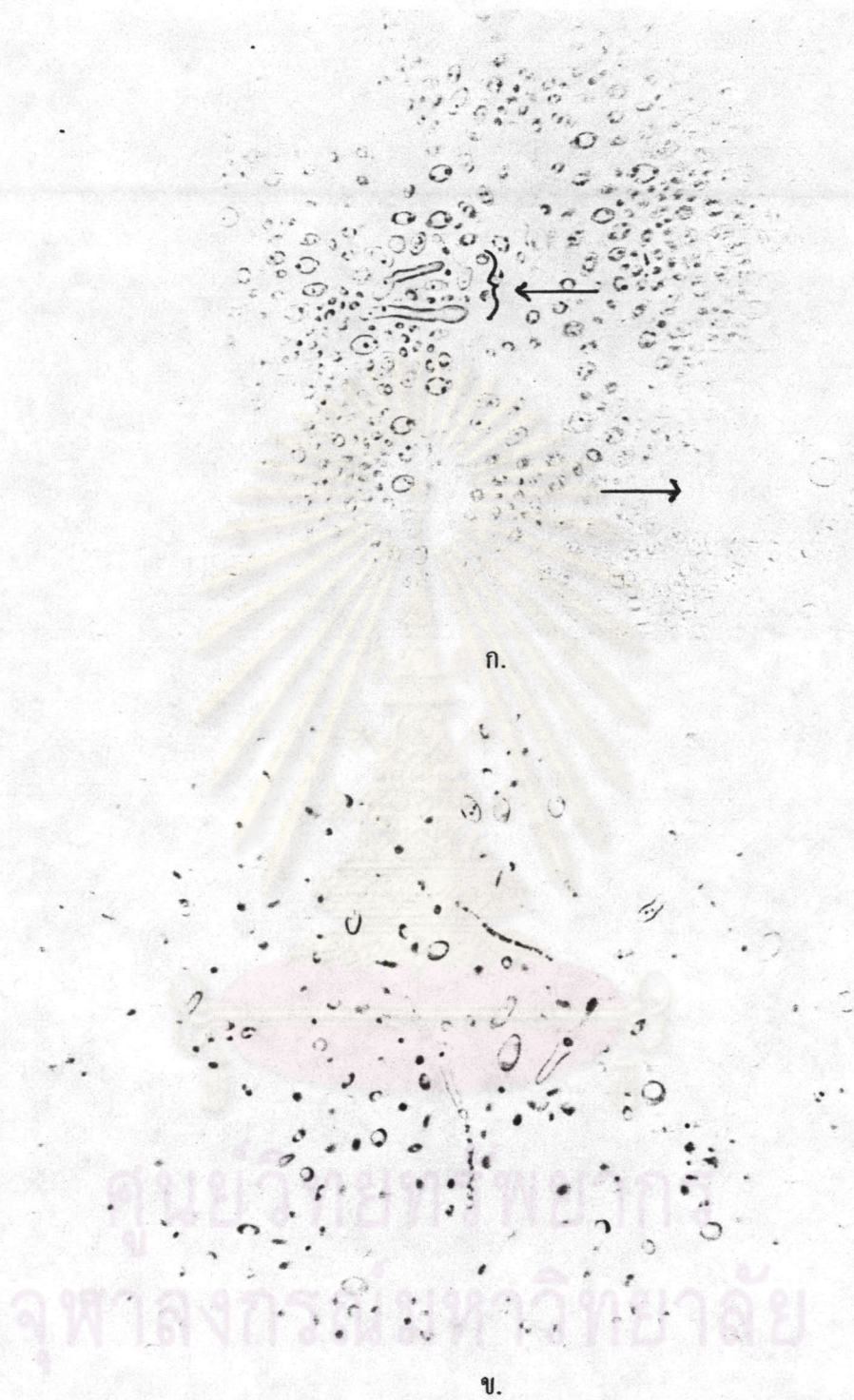
ก.



ข.

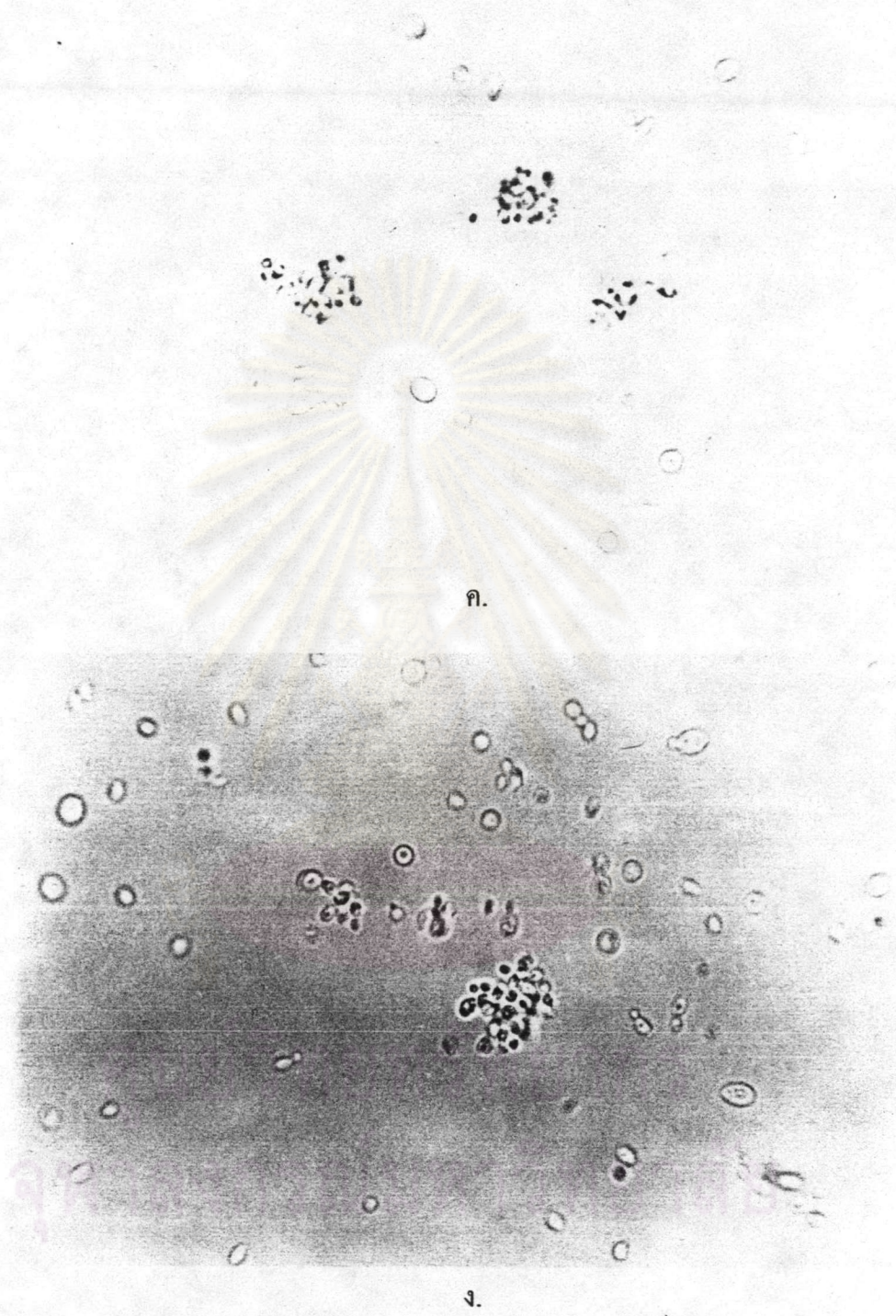
รูปที่ 4.5 ก. เซลล์กลมและรีของ wild type

ข. แอสโคฟอร์รูปวงช้าง (สรชี) บริเวณส่วนหัว ซึ่งเป็นเซลล์ที่สร้างแอสคัส (A) บริเวณก้านชูแอสคัสทรงกระบอกผนังหนาที่บวม (B) และส่วนปลายที่สร้างแอสคัสผนังบางก่อนแตก (C) หลังแตกจะเป็นรูปตัว U หรือ V (D)

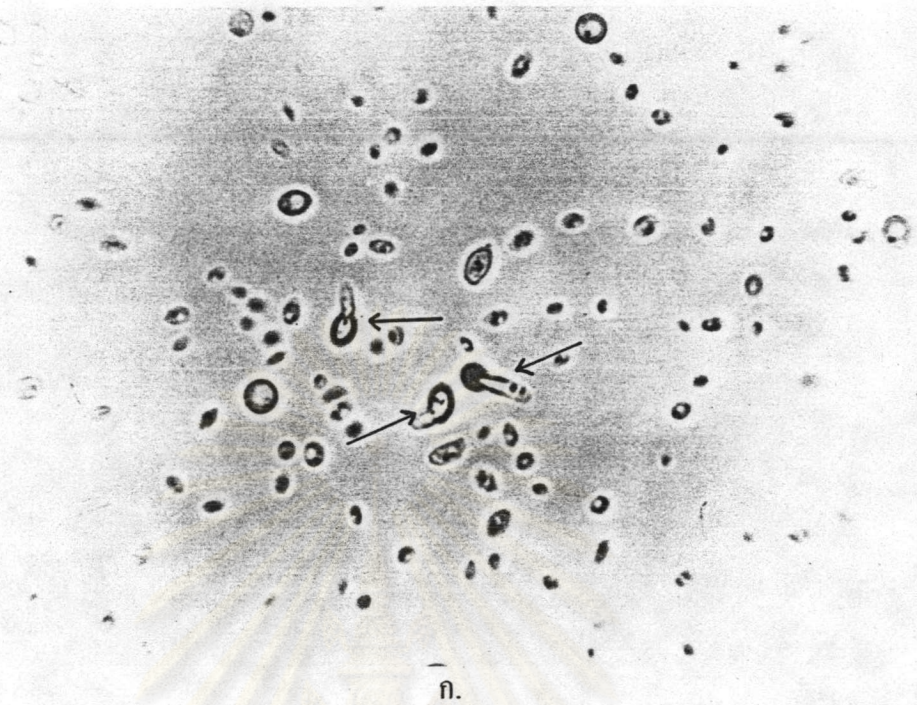


รูปที่ 4.6 ก. แอสคัสที่พบใน $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant (ศรชี้)

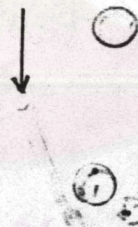
ข. ลักษณะคล้าย “เส้นใย” คือเป็นสายยาวเป็นข้อ ๆ ผนังบางของ $\text{NO}_3\text{-NO}_3$ mutant



รูปที่ 4.6 ก.-ง. กระจกเซลล์ ที่พบเฉพาะ NO₃-NO₃ mutant

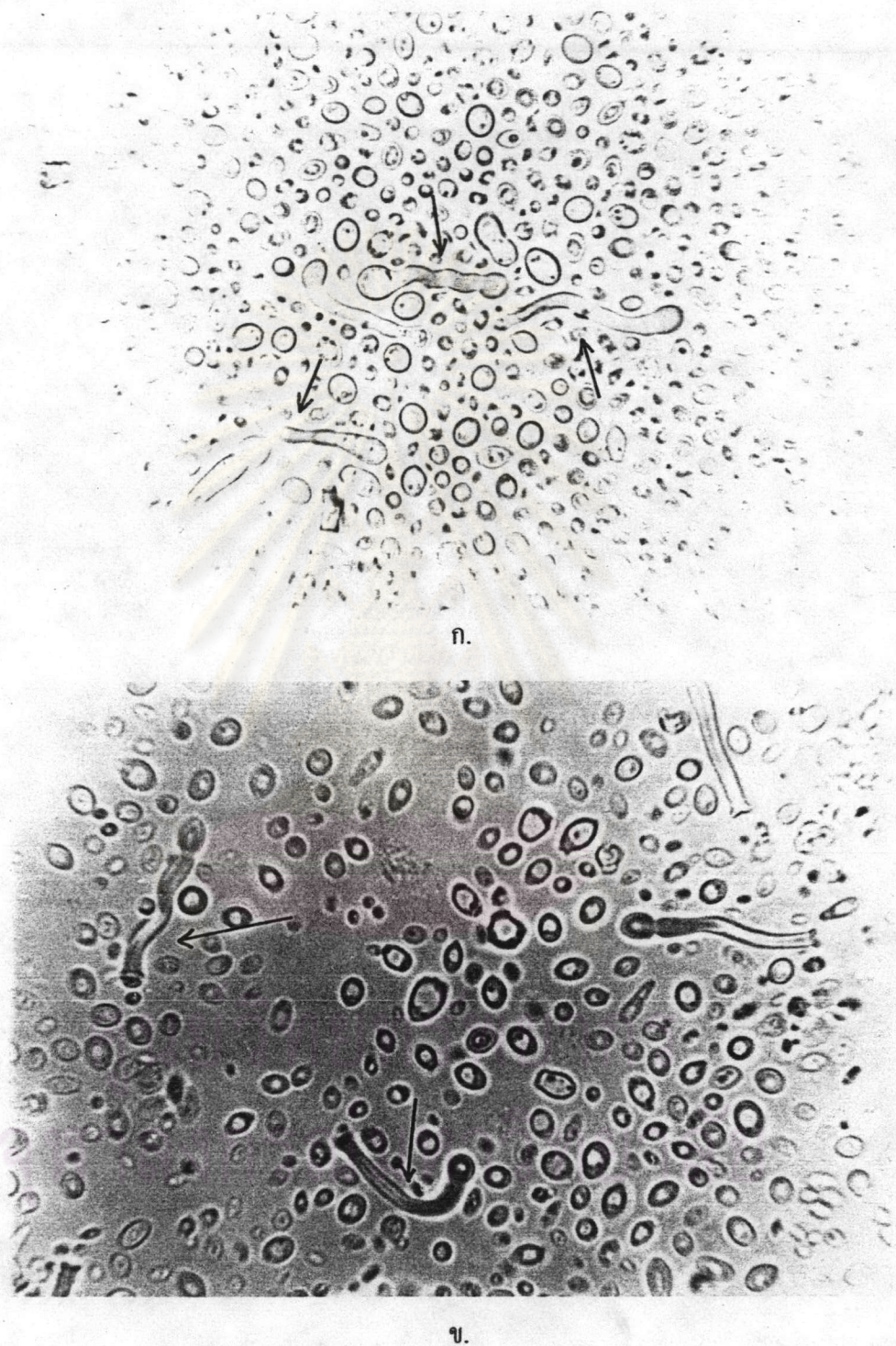


ก.

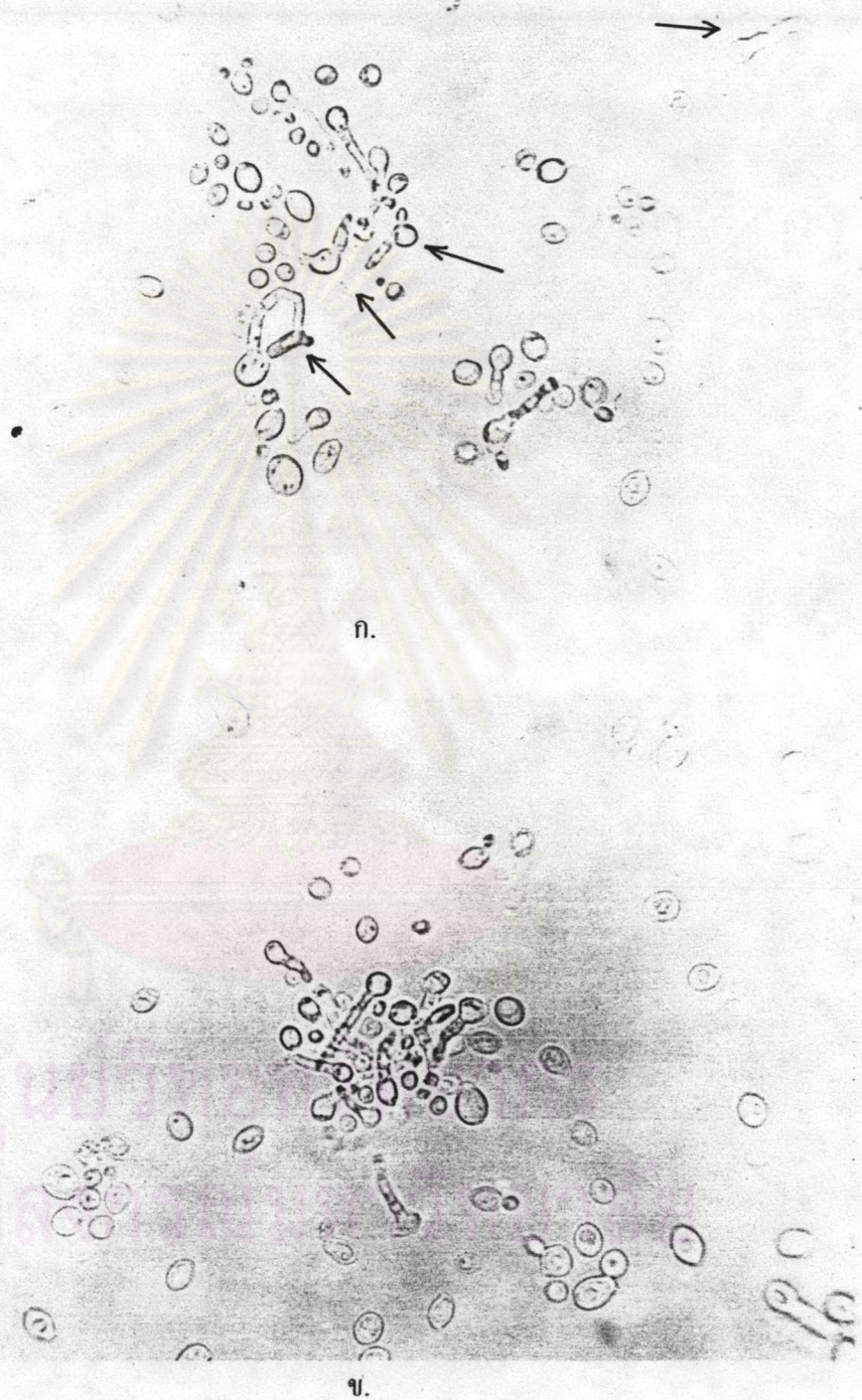


ข.

- รูปที่ 4.7 ก. สายพันธุ์ 2.6B สังเกตเซลล์ที่กำลังสร้างแอสกัสน์ (สรชี)
 ข. แอสโกสปอร์ที่แอสกัสน์แตกแล้วของสายพันธุ์ 2.6B (สรชี) จะเห็นว่าไม่แตกต่าง
 จาก wild type

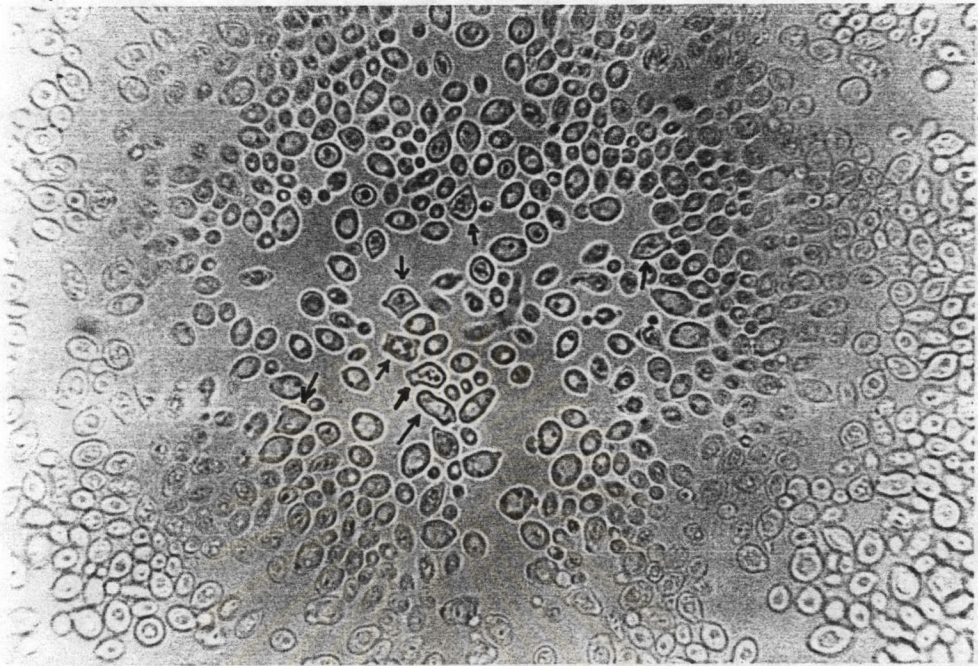


รูปที่ 4.8 ก.-ข. สายพันธุ์ที่ 5.3D ไม่แตกต่างจาก wild type แต่พบแอสโคพอร์โค้งงอมากกว่า (สรชี้) ซึ่งอาจเกิดจากการเลื่อนหรือรีดแผ่น cover slip บนแผ่นทับแอสโคพอร์ที่ขาวและอาจอ่อนตัวกว่าแอสโคพอร์ wild type



รูปที่ 4.9 ก. สายพันธุ์ที่ 1A สังเกตแอสโคฟอร์แตกสาขา (ศรชี้)

ข. กระจุกแอสโคฟอร์ของสายพันธุ์ 1A



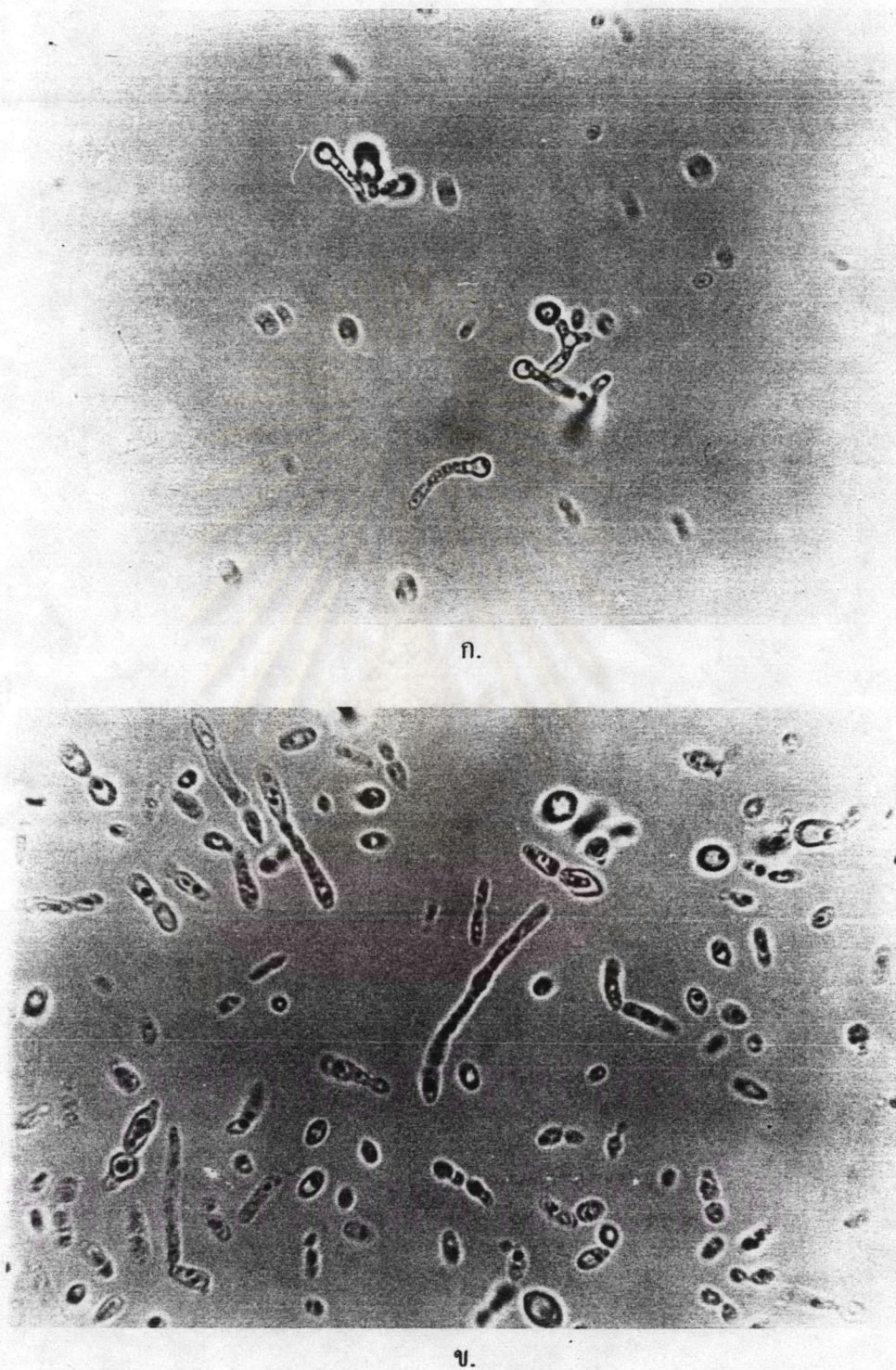
ก.



ข.

รูปที่ 4.10 ก. สายพันธุ์ที่ 3.2C พบเซลล์เป็นเหลี่ยมเป็นส่วนใหญ่มากกว่า wild type (ศรีซี่)
ไม่พบการสร้างแอสคัส

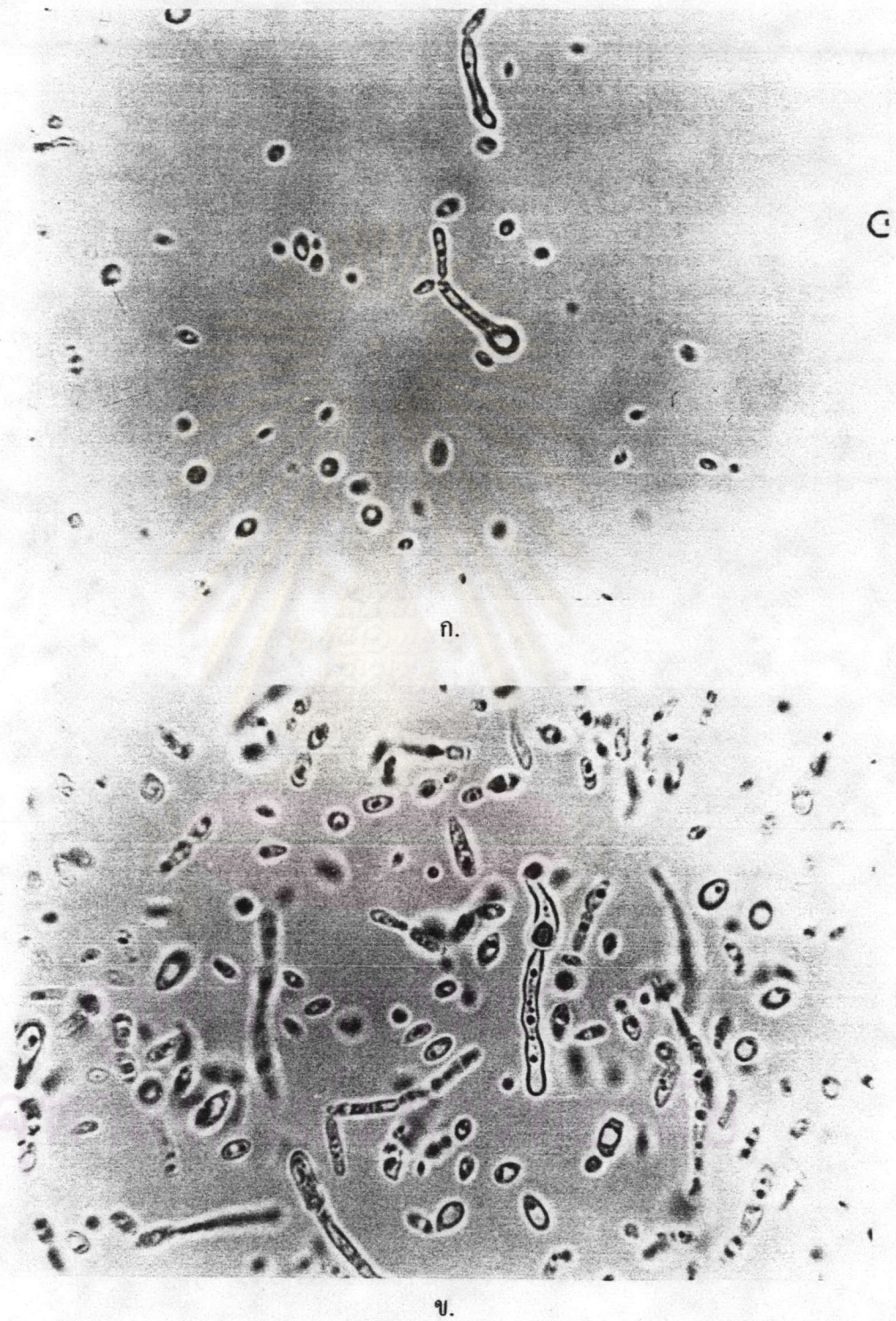
ข.สายพันธุ์ที่ 2.4B พบ budding cells ลักษณะเป็นเหลี่ยมส่วนใหญ่ ไม่พบการสร้าง
แอสคัสเช่นเดียวกับ 3.2C



รูปที่ 4.11 ก. แอสโคเฟอร์แตกสาขาและกระจุกแอสโคเฟอร์ (สรชี) ของสายพันธุ์ 2.6C
ข. ลักษณะคล้าย “เส้นใย” ที่สร้างขึ้นในสายพันธุ์ 2.6C



รูปที่ 4.12 ก. แอสโคเฟอร์แตกสาขาของสายพันธุ์ 3.1A
ข. กระจุกแอสโคเฟอร์ของสายพันธุ์ 3.3B



รูปที่ 4.13 ก. ลักษณะคล้ายแอสโคเฟอร์แตกสาขาหรือ “เส้นใย” ของสายพันธุ์ 4.1C (ศรีชัย)
ข. ลักษณะคล้าย “เส้นใย” ที่สร้างขึ้นในสายพันธุ์ 4.1C