

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกเชื้อจากแหล่งตัวอย่างดิน ตะกอนน้ำมันและส่วนต่าง ๆ ของพืชน้ำมัน ที่คาดว่าจะมีราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสรวม 21 แหล่ง สามารถคัดแยกราได้ทั้งสิ้น 70 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA โดยนำราทั้งหมดที่แยกได้ไปทำการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ที่เติมด้วยโรดามีน บี และคัดเลือกราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเพสได้ทั้งสิ้นจำนวน 38 ไอโซเลต และพบว่าราไอโซเลต NAN103 ซึ่งแยกได้จากดินในป่าเต็งรัง จ.น่านมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงที่สุด และมีข้อมูลลำดับเบสเหมือนกับ *Fusarium solani* เมื่อเปรียบเทียบกับ GenBank

จากการนำสารละลายเอนไซม์ของราไอโซเลต NAN103 มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลได้ทดสอบการใส่เมทานอลใน 2 รูปแบบ คือ โดยการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น และการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง นำไปศึกษาปริมาณของผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC พบว่าการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่องจะมีค่าผลิตภัณฑ์มากกว่าการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น และนอกจากนี้ก็นำสารละลายเอนไซม์ของราไอโซเลต NAN103 มาทำการตรึงรูป ด้วยวิธีการตรึงแบบดูดซับทางกายภาพบนวัสดุจำจน 2 ชนิด คือ โดโลไมต์ และ ไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ พบว่า ไลเพสตรึงรูปจากวัสดุจำจุนดังกล่าว สามารถดูดซับปริมาณโปรตีนต่อกรัมวัสดุจำจุนใกล้เคียงกัน แต่การตรึงบนวัสดุจำจุนไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธก็มีประสิทธิภาพมากกว่าตรึงบนวัสดุจำจุนโดโลไมต์ จากการนำไปศึกษาปริมาณของผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC พบว่าการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอล ไลเพสตรึงรูปบนวัสดุจำจุนไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธเร่งปฏิกิริยาได้สูงกว่าไลเพสตรึงรูปบนวัสดุจำจุนโดโลไมต์

เมื่อนำราไอโซเลต NAN103 ไปชักนำให้เกิดมิวเทชัน เริ่มจากการคัดเลือกสปอร์เดี่ยวจากราไอโซเลต NAN103 พบว่าราไอโซเลต NS4 มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสสูงที่สุดและยังสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลแล้วเกิดเมทิลเอสเทอร์ได้ จึงนำราไอโซเลต NS4 มาชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่าราไอโซเลต UV2002 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงและสูงกว่าสายพันธุ์เดิมราไอโซเลต NS4 และมิวแทนต์อื่น ๆ ทั้งในชั่วรุ่นที่ 2 และชั่วรุ่นที่ 6 และยังสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลแล้วเกิดเมทิลเอสเทอร์ จึงนำราไอโซเลต UV2002 ไปชักนำให้เกิดมิวเทชันโดยใช้สาร NTG พบว่าราไอโซเลต NTG022 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเปลี่ยนระหว่างชั่วรุ่นที่ 2 และ 6 ไม่มากนักเมื่อเทียบกับ ไอโซเลตอื่น ๆ และสามารถเร่งปฏิกิริยา

ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลแล้วยังเกิดเมทิลเอสเทอร์ได้ จึงทำการเลือก ไอโซเลต NTG022 มาใช้ในการทดลองต่อไป

จากการนำரசายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์ที่คัดเลือกมาศึกษาลักษณะโคโลนีและเส้นใย อัตราการเจริญเติบโตจากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA และตรวจวัดน้ำหนักแห้งเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว PDB พบว่ามีความใกล้เคียงกัน จึงได้ทำการตรวจสอบมิวแทนต์โดยใช้สารปฏิชีวนะแอมโฟเทอรีซิน บี ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเส้นใยของราสายพันธุ์เดิม ไอโซเลต NS4 เจริญได้น้อยจนไม่สามารถวัดขนาดโคโลนีได้ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่มิวแทนต์ราไอโซเลต UV2002 และ NTG022 ยังสามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นนี้อยู่ เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ไลเปสจากราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลโดยใช้เมทานอลแบบต่อเนื่องและปริมาณเอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักน้ำมัน ชั่วโมงที่ 48 นำไปทดสอบปริมาณของผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์ที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต และสาร NTG มีปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่ต่างกัน