รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

ประจำปีงบประมาณ 2560

การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus terreus* ด้วยวิธี Random mutagenesis เพื่อการเพิ่มการผลิตกรดอิทาโคนิค

Strain improvement of *Aspergillus terreus* by random mutagenesis for enhancing itaconic acid production

โดย

ดร. สิตานัน ธิติประเสริฐ

รศ.ดร. ณัฏฐา ทองจุล

อ. วาสนา โตเลี้ยง

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2561 การสนับสนุนดังกล่าวทำให้เกิดการดำเนินงานได้อย่างสะดวกและก่อให้เกิดคุณประโยชน์ของการศึกษา คณะผู้วิจัยขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัย มา ณ ที่นี้

บทคัดย่อ

กรดอิทาโคนิคนั้นมีความสำคัญต่อการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นทดแทนสารเคมีในกลุ่มที่ถูกผลิตขึ้นจากปิโตรเลี่ยม เช่น กรดอะคริลิก โดยกรดอิทาโคนิคได้ถูกบรรจุอยู่ใน 12 รายการสารเคมีตั้งต้น (12 building block chemicals) ที่ถูกบัญญัติขึ้นโดยกระทรวงพลังงานประเทศสหรัฐอเมริกา ว่ามีศักยภาพเพียงพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์ชีวภาพไม่ว่าจะเป็นอุตสหกรรมยานยนต์ในกลุ่มของสารเพิ่มความหล่อลื่นของเครื่องยนต์ อุตสาหกรรมสีย้อม อุตสาหกรรมพลาสติกและโพลิเมอร์ และอุตสาหกรรมกาว โดยในปัจจุบัน *Aspergillus terreus* เป็นสายพันธุ์ที่นำมาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิคในระดับอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามเชื้อราสายพันธุ์นี้ยังมีข้อจำกัดของระยะเวลาการผลิตที่ยาวนาน และให้ผลผลิตที่ต่ำกว่าผลผลิตทางทฤษฎี ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอิทาโคนิคของเชื้อรา *A. terreus* ด้วยการทำให้กลายพันธุ์โดยใช้รังสียูวีและสารเคมี ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เชื้อรา *A. terreus* ด้วยรังสียูวีและสารเคมี diethyl sulfate สามารถเพิ่มผลผลิตกรดอิทาโคนิคที่ใกล้เคียงกัน โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีนั้น พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ 555-8 ที่ถูกฉายรังสีแบบซ้ำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 นาที ให้การผลิตกรดอิทาโคนิคในระดับขวดเขย่าที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ 16.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้อราที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี diethyl sulfate ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 75 นาที เป็นผลให้การผลิตกรดอิทาโคนิคเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ 14 – 15 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการผลิตกรดอิทาโคนิคของเชื้อรา *A. terreus* นั่นคือลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการเตรียมหัวเชื้อให้อยู่ในรูปของสารละลายสปอร์นั้นส่งผลให้การผลิตกรดอิทาโคนิคสูงกว่าการเตรียมหัวเชื้อโดยการใช้สารละลายเส้นใย(mycelia)

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
สารบัญ	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญรูป	5
บทนำ	6
วัตถุประสงค์	6
วิธีการดำเนินงาน	7
เชื้อจุลินทรีย์	7
การเก็บรักษาเชื้อ	7
การเตรียมสารละลายสปอร์และหัวเชื้อตั้งต้น	7
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *A. terreus* NRRL1960 ด้วยวิธี Random mutagenesis	8
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวี	8
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี diethyl sulfate	8
การทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยการฉายรังสียูวีครั้งที่สอง	8
การทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยการฉายรังสียูวีครั้งที่สาม	9
การคัดเลือกเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์	9
การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (primary screening)	9
การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (secondary screening)	10
วิธีวิเคราะห์	10
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	11
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวี	11
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *A. terreus* ด้วยสารเคมี Dietyl sulfate	14
การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดอิทาโคนิคของเชื้อรา *A. terreus* ที่ถูกชักนำให้กลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสียูวี	16
สรุปผลการทดลอง	17
เอกสารอ้างอิง	18
ภาคผนวก	20
ประวัติคณะวิจัย	21

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอิทาโคนิคเบื้องต้นเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's ที่ผสม bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ 13

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตกรดอิทาโคนิคของสายพันธุ์ตั้งต้น (NRRL 1960) และ สายพันธุ์ 5-12 ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า 14

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบผลการผลิตกรดอิทาโคนิคด้วยเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น NRRL 1960 และเชื้อรา *A. terreus* ที่ถูกชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี Diethyl sulfate ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 75 นาที 15

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความสามารถของการผลิตกรดอิทาโคนิคของเชื้อรา *A. terreus* ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำครั้งที่ 2 และ 3 ด้วยรังสียูวีเป็นระยะเวลา 5 นาที 16

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อรา *A. terreus* ที่ถูกฉายรังสียูวีที่เวลาตั่งต่าง 12

บทนำ

เนื่องจากผลกระทบของวิกฤติการณ์พลังงาน ผลักดันให้ประเทศต่างๆ มีการพัฒนาการผลิตสารเคมีที่ได้มาจากชีวมวล (bio-based chemicals) เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีที่ได้จากเชื้อเพลิงฟอสซิล (fuel-based chemicals) ซึ่งกรดอิทาโคนิค (Itaconic acid) เป็นหนึ่งในสารเคมีที่สามารถผลิตขึ้นได้จากกระบวนการหมักทางชีวภาพ โดยมีความสำคัญต่อการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นทดแทนสารเคมีในกลุ่มที่ถูกผลิตขึ้นจากปิโตรเลี่ยม เช่น กรดอะคริลิก โดยกรดอิทาโคนิคนั้นได้ถูกบรรจุอยู่ใน 12 รายการสารเคมีตั้งต้น (12 building block chemicals) ที่ถูกบัญญัติขึ้นโดยกระทรวงพลังงานประเทศสหรัฐอเมริกา ว่ามีศักยภาพเพียงพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์ชีวภาพไม่ว่าจะเป็น อุตสหกรรมยานยนต์ในกลุ่มของสารเพิ่มความหล่อลื่นของเครื่องยนต์ อุตสาหกรรมสีย้อม อุตสาหกรรมพลาสติกและโพลิเมอร์ และอุตสาหกรรมกาว (Choi และคณะ, 2015)

โดยในปัจจุบันกรดอิทาโคนิคถูกผลิตทางการค้าโดยกระบวนการทางชีวภาพ และมีการคาดการณ์การผลิตกรดอิทาโคนิคทั่วโลกต่อปีประมาณ 80,000 ตัน ด้วยราคาเฉลี่ย 2 ดอลลาห์สหรัฐต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ยังมีการคาดคะเนว่าตั้งแต่ช่วงปี ค.ศ. 2016 – 2023 ประสิทธิภาพในการผลิตกรดอิทาโคนิคจะเพิ่มขึ้นในทุกๆ ปี ด้วยอัตราร้อยละ 5.5 ต่อปี ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากการประยุกต์ใช้กรดอิทาโคนิคได้ในอุตสหกรรมที่หลากหลาย (Transparency Market Research 2015) ส่งผลให้การพัฒนากระบวนการทางชีวภาพในการผลิตกรดอิทาโคนิคเพื่อรองรับความต้องการและการเติบโตของตลาดเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในปัจจุบัน

แม้ว่ากรดอิทาโคนิคจะถูกผลิตทางการค้าโดยกระบวนการหมักของเชื้อรา *Aspergillus terreus* โดยปริมาณการผลิตอยู่ที่ 80 กรัม/ลิตร (Okabe และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตามการผลิตกรดอิทาโคนิคด้วยกระบวนการทางชีวภาพนั้นยังคงพบข้อจำกัดของผลผลิตที่ไม่เสถียร ที่ยากต่อการทำผลผลิตแบบซ้ำ (Reproduction) และระยะเวลาในการผลิตที่ใช้เวลาค่อนข้างนาน ซึ่งส่งผลต่อต้นทุนการผลิตที่สูง (Kuenz และคณะ, 2012) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอิทาโคนิคของเชื้อรา *A. terreus* ด้วยการทำให้กลายพันธุ์โดยใช้รังสีและสารเคมี

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *A. terreus* ด้วยวิธี random mutagenesis เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดอิทาโคนิค โดยทำการแปรเวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีและสารเคมี diethyl sulfate รวมถึงศึกษาผลของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ราสายพันธุ์ดั้งเดิมเปรียบเทียบกับเชื้อราสายพันธุ์ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีและสารเคมี diethyl sulfate ในระดับขวดเขย่า

วิธีการดำเนินงาน

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ตั้งต้นที่ใช้สำหรับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้แก่เชื้อรา *Aspergillus terreus* NRRL1960 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Agricultural Research Service Culture Collection, US Department of Agriculture, เมืองพีโอเรีย รัฐอิลลินอยส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา

การเก็บรักษาเชื้อ

โดยเขี่ยเชื้อรา *A. terreus* NRRL1960 ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ แล้วลากเชื้อลงบนผิวหน้าผิวอาหารแข็ง Czapek's บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เก็บเชื้อในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำการต่อเชื้อทุกๆ 1 เดือนเพื่อรักษากิจกรรมภายในเซลล์ของเชื้อรา

การเตรียมสารละลายสปอร์และหัวเชื้อตั้งต้น

โดยเลี้ยงเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็ง Czapek's ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ปิเปตน้ำที่ขจัดไอออนออกแล้ว 10 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง เขี่ยสปอร์ให้กระจายในน้ำ ปิเปตเซลล์แขวนลอยที่ได้ ไปนับปริมาณสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ heamacytometer จากนั้นปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการโดยใช้น้ำที่ขจัดไอออนออกแล้วเพื่อใช้เป็นสารละลายสปอร์สำหรับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นต่อไป

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *A. terreus* NRRL1960 ด้วยวิธี Random mutagenesis

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวี

นำสารละลายสปอร์ที่ปรับความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มา spread ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek's ที่ผสม bromocresol green 0.1 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปฉายรังสี UV โดยใช้หลอด UV ขนาด 15 วัตต์ จำนวน 4 หลอด โดยมีระยะห่างแหล่งกำเนิดรังสีกับจานเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นระยะ 80 เซนติเมตร โดยเวลาที่ใช้ในการฉายรังสียูวีจะถูกแปรออกเป็น 0.10 0.20 0.30 0.45 1.15 1.30 1.45 2.00 5.00 10.00 และ 15.00 นาที จากนั้นทำการบ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ถูกฉายรังสียูวีของแต่ละเวลาแบบทึบแสงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการวัดการเจริญของโคโลนีและการสร้างกรดของเชื้อราโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของ bromocresol green ในอาหารที่เปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นเหลือง และคำนวณหาร้อยละของการรอดที่ระยะเวลาตั่งต่าง

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี diethyl sulfate

ทำการถ่ายสารละลายสปอร์ที่ให้ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์เริ่มต้น 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตรลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ที่มีสารเคมี diethyl sulfate ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ จากนั้นบ่มส่วนผสมข้างต้นที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 30 45 60 และ 75 นาที ตามด้วยการปั่นแยกสปอร์ที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สปอร์ที่ถูกปั่นแยกจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek's ที่ผสม bromocresol green 0.1 กรัมต่อลิตร และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการวัดการเจริญของโคโลนีและการสร้างกรดของเชื้อราโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของ bromocresol green ในอาหารที่เปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นเหลือง และคำนวณหาร้อยละของการรอดที่ระยะเวลาตั่งต่าง

การทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยการฉายรังสียูวีครั้งที่สอง

ไอโซเลทจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 5-6 5-7 5-8 5-9 และ 5-12 ที่แสดงความสามารถในการสร้างกรดสูงกว่าในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ ได้ถูกนำมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยการเตรียมสารละลายสปอร์ของแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นที่ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และทำการกระจายสารละลายสปอร์ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek's ที่

ผสม bromocresol green 0.1 กรัมต่อลิตร และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการบ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อแบบทึบแสง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาทำการเพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek's บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการศึกษาความเสถียรของการผลิตกรดอิทาโคนิคในระดับขวดเขย่าต่อไป

การทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยการฉายรังสียูวีครั้งที่สาม

ทำการกระจายสารละลายสปอร์ที่ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตรของแต่ละไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 5-6 5-7 5-8 5-9 และ 5-12 ที่ถูกทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีซ้ำครั้งที่สองลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek's ที่ผสม bromocresol green 0.1 กรัมต่อลิตร และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการบ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อแบบทึบแสง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาทำการเพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek's บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการศึกษาความเสถียรของการผลิตกรดอิทาโคนิคในระดับขวดเขย่าต่อไป

การคัดเลือกเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์

การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (primary screening)

จากขั้นตอนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้รังสียูวีและสารเคมี diethyl sulfate นั้น จานเพาะเลี้ยงเชื้อราที่แสดงให้ผลของอัตราการรอดของโคโลนีของเชื้อราที่ร้อยละ 10 และแสดงวงสีเหลือง (clear zone) กว้างกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราที่ไม่ถูกทำให้กลายพันธุ์ จะถูกนำมาคัดแยกต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek's ที่ผสม bromocresol green 0.1 กรัม/ลิตร โดยใช้ crock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรเจาะเส้นใยและเขี่ยลงบนอาหารแข็ง ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และวัดการเจริญของโคโลนีและการสร้างกรดของเชื้อราโดยวัดจากพื้นที่ที่อินดิเคเตอร์ (bromocresol green) เปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นเหลือง จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีพื้นที่ที่เกิดการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์สูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้นมากทำการศึกษาผลของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวระดับขวดเขย่าต่อไป

การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (secondary screening)

นำเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ มาเลี้ยงบนผิวหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek's เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นทำการเตรียมสาระละลายสปอร์ให้มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลิลิตร สารละลายสปอร์ 1% (v/v) ถูกถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดอิทาโคนิค น้ำตาล ผลิตภัณฑ์ข้างเคียง และน้ำหนักแห้งของเซลล์

วิธีวิเคราะห์

การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมัก น้ำหมักและเซลล์เชื้อราในขวดเขย่าจะถูกแยกเซลล์โดยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.4 ที่รู้น้ำหนักแห้งที่แน่นอนแล้ว ซึ่งเซลล์ที่ผ่านการกรองบนกระดาษกรองจะถูกนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ส่วนส่วนใสที่ได้จากการกรองจะถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอิทาโคนิค น้ำตาล และผลิตภัณฑ์ข้างเคียงต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณหาปริมาณกรดอิทาโคนิค น้ำตาล และผลิตภัณฑ์ข้างเคียง ด้วยกระบวนการ HPLC

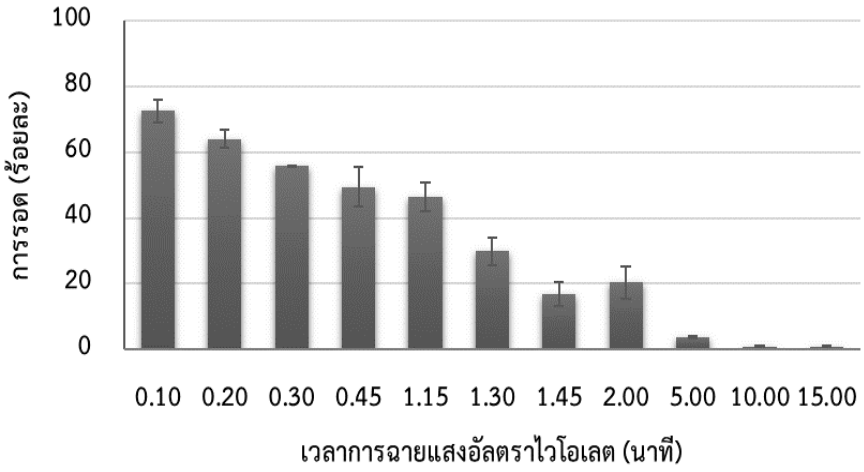
ทำการวิเคราะห์ด้วยการนำตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการแยกนำเอาส่วนเซลล์ออกมากรองผ่านเมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตทขนาด 0.45 µm และเจือจางให้อยู่ในช่วงของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (0.25 – 2 กรัมต่อลิตร) จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Biorad Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid column ขนาด 300 มิลลิเมตร x 7.8 มิลลิเมตร โดยใช้กรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหลที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 45 องศาเซลเซียสและใช้เครื่องตรวจวัดชนิด refractive index (RI) ปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคส การผลิตกรดอิทาโคนิคและผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่นจะถูกเปรียบเทียบโดยการใช้กราฟสารละลายมาตรฐาน

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวี

ในการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *A. terreus* NRRL1960 ด้วยรังสียูวีที่มีการแปรระยะเวลาตั่งต่างนั้น พบว่า อัตราการรอดของเชื้อรามีค่าลดลงตามระยะเวลาที่ถูกฉายรังสียูวีเพิ่มขึ้น โดยเชื้อราที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสียูวีเป็นระยะเวลา 5 10 และ 15 นาที ส่งผลให้เชื้อรามีอัตราการรอดที่ต่ำกว่าร้อยละ 10 เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น (wild type) (รูปที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าช่วงระยะเวลา 5 – 15 นาที เป็นช่วงที่เหมาะสมเพื่อการถูกทำให้เกิดการกลายพันธุ์และมีการปรับตัวเพื่อการอยู่รอด นอกจากนี้ปีนไปตามหลักการโดยปกติที่ร้อยละของการรอดจะแปรผกผันกับระยะเวลาของการฉายรังสี (Lin และ Wang, 2001) จากอัตราการรอดที่ต่ำกว่าร้อยละ 10 ที่ช่วงเวลา 5 – 15 นาทีนั้น งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกโคโลนีจำนวน 18 ไอโซเลท ที่สร้างวงสีเหลือง (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek's ที่ผสม bromocresol green 0.1 กรัมต่อลิตร มาทำการศึกษาต่อในขั้นการคัดเลือกระดับปฐมภูมิ (Primary screening) ซึ่งประกอบด้วย ไอโซเลทที่ถูกฉายรังสียูวีเป็นเวลา 5 นาที จำนวน 12 ไอโซเลท การฉายรังสียูวีเป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ไอโซเลท และการฉายรังสีที่ 15 นาที จำนวน 3 ไอโซเลท

ไอโซเลทจำนวน 18 ไอโซเลท ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอิทาโคนิคเบื้องต้นในขั้นตอนการคัดเลือกระดับปฐมภูมิ โดยแต่ละไอโซเลทถูกนำมาเพาะเลี้ยงลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek's ที่ผสม bromocresol green 0.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งในขั้นการคัดเลือกระดับปฐมภูมินี้ พบเชื้อราจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 5-6 5-7 5-8 5-9 และ 5-12 ที่สามารถแสดงความสามารถการผลิตกรดได้สูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม (ตารางที่ 1) กล่าวคือมีพื้นที่ที่อินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง (yellow zone) มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่งไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกดังกล่าวได้ถูกนำไปศึกษาผลของการผลิตกรดอิทาโคนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวต่อไป



รูปที่ 1 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อรา *A. terreus* ที่ถูกฉายรังสียูวีที่เวลาตั่งต่าง

จาก 5 ไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกจากขั้นปฐมภูมิ ไอโซเลท 5-12 ได้ถูกนำมาศึกษาความสามารถการผลิตกรดอิทาโคนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวระดับขวดเขย่า พบว่า ไอโซเลท 5-12 แสดงประสิทธิภาพของการเพิ่มการผลิตกรดอิทาโคนิคเมื่อเปรียบเทียบกับ *A. terreus* ที่ไม่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (wild type) โดยให้ความเข้มข้นของกรดอิทาโคนิค เท่ากับ 64 กรัมต่อลิตร ผลผลิตกรดอิทาโคนิค เท่ากับ 0.56 กรัมต่อกรัมน้ำตาลกลูโคส อัตราการผลิตกรดอิทาโคนิค เท่ากับ 0.50 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเพิ่มขึ้นจากการผลิตกรดอิทาโคนิคด้วยเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมร้อยละ 39 ของความเข้มข้นกรดอิทาโคนิค ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *A. terreus* สามารถถูกทำให้กลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสียูวีที่ระยะเวลาที่เหมาะสมและเพิ่มความสามารถในการผลิตกรดอิทาโคนิคได้ อย่างไรก็ตาม จากการทดลองทำการผลิตกรดอิทาโคนิคซ้ำด้วยไอโซเลท 5-12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวระดับขวดเขย่า พบว่า ไอโซเลท 5-12 ให้การผลิตกรดอิทาโคนิคที่ไม่เสถียร กล่าวคือ ความสามารถในการผลิตกรดอิทาโคนิคของไอโซเลท 5-12 ในครั้งที่ 2 ให้ผลผลิตที่ลดต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองการผลิตกรดอิทาโคนิคในครั้งแรก รวมถึงให้ผลผลิตที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ไม่ได้ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ นั่นแสดงให้เห็นว่า ไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกมายังไม่มีความเสถียรของการถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวี ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความไม่เสถียรของยีนที่เกิดการกลายพันธุ์ในสายพันธุ์ 5-12 ที่ยีนที่เกิดการกลายหรือเกิดความผิดปกตินั้นเกิดการซ่อมแซม ซึ่งในยูคาร์ริโอตนั้นมีกลไกหลากหลายในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) ที่เสียหายที่เกิดเนื่องจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติหรือการชักนำ (Wood, 1996) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV ซึ่งหลังเกิดการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV ดีเอ็นเอจะสามารถเกิดการคืนสู่สภาพเดิมได้เมื่อสายดีเอ็นเอนั้นถูกกระตุ้นด้วยแสงในช่วง visible light (300-500 นาโนเมตร) ซึ่งแสงจะไปกระตุ้นให้เกิดการ

ทำงานของ photoreactivating enzyme หรือ photolyase ทำให้เกิด photoreactivation (Sinha และคณะ, 2002)

ตารางที่ 1 การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอิทาโคนิคเบื้องต้นเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's ที่ผสม bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์

สายพันธุ์	**ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)**	**ขนาดโซนสีเหลือง (ตารางเซนติเมตร)**
Control	2.37± 0.06	26.48± 3.43
5-1	2.37± 0.06	33.53± 1.31
5-2	2.43± 0.06	32.68± 0.50
5-3	2.40± 0.10	33.25± 0.49
5-4	2.43± 0.11	31.75± 0.88
5-5	2.43± 0.06	33.82± 2.85
5-6	2.67± 0.15	34.91± 2.07
5-7	2.50± 0.00	35.42± 2.88
5-8	2.40± 0.10	36.74± 3.35
5-9	2.50± 0.00	35.19± 1.70
5-10	2.33± 0.06	33.54± 0.49
5-11	2.47± 0.06	32.96± 0.86
5-12	2.63± 0.11	35.62± 0.23
10-1	2.50± 0.10	31.46± 2.61
10-2	2.50± 0.10	33.53± 0.98
10-3	2.50± 0.10	31.17± 2.39
15-1	2.57± 0.06	31.19± 1.79
15-2	2.33± 0.06	30.59± 1.90
15-3	2.50± 0.00	33.25± 0.49

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตกรดอิทาโคนิคของสายพันธุ์ตั้งต้น (NRRL 1960) และ สายพันธุ์ 5-12 ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า

สายพันธุ์	เซลล์ (กรัมต่อกรัมกลูโคส)	กรดอิทาโคนิค		
		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตต่อกรัมกลูโคส (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
NRRL1960	0.06	46.30	0.48	0.37
5-12 (1)*	0.04	64.00	0.56	0.50
5-12 (2)*	0.11	34.6	0.41	0.25

หมายเหตุ (1) คือ ไอโซเลท 5-12 ที่ถูกทำการทดลองการผลิตกรดอิทาโคนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวครั้งที่ 1

(2) คือ ไอโซเลท 5-12 ที่ถูกทำการทดลองการผลิตกรดอิทาโคนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวครั้งที่ 2

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *A. terreus* ด้วยสารเคมี Dietyl sulfate

จากศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เชื้อรา *A. terreus* ด้วยสารเคมี Diethyl sulfate ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน พบว่า การบ่มสารละลายสปอร์ในสารเคมี Diethyl sulfate เป็นเวลา 75 นาที ส่งผลให้อัตราการรอดน้อยกว่าร้อยละ 10 และการเจริญและสร้างกรดจานเพาะเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek's ที่ผสม bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ มีไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกจำนวน 6 ไอโซเลท จากนั้นทั้ง 6 ไอโซเลทได้ถูกศึกษาผลของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อการเพิ่มการผลิตกรดอิทาโคนิคในระดับขวดเขย่า ซึ่งพบ 3 ไอโซเลทที่แสดงผลของการถูกปรับปรุงให้มีการผลิตกรดอิทาโคนิคเพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 14-15 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น NRRL 1960 (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้สารเคมีนั้น ชนิดและความเข้มข้นของสารเคมี เป็นอีกปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์อีกด้วย โดยในปีค.ศ. 2013 ได้มีรายงานการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ด้วยสารเคมี ethyl methanesulfonate (EMS) ที่ความเข้มข้นในช่วง 50 – 6400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า การใช้ EMS ที่ความเข้มข้น 1600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ *A. oryzae* เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสมและสามารถผลิตสารต้านแบคทีเรียได้

(Leonard และคณะ, 2014) รวมถึงการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เชื้อ *Ashbya gossypii* เพื่อการเพิ่มการผลิต riboflavin ด้วยสาร N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า *A. gossypii* ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย MNNG ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต riboflavin ในเชื้อ *A. gossypii* ได้ 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ *A. gossypii* สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild strain) (Tajima และคณะ, 2009) นอกจากนี้ Reibiro และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ *A. gossypii* ด้วยการใช้สาร EMS เพื่อการเพิ่มการปลดปล่อยโปรตีนออกจากนอกเซลล์สู่น้ำหมัก โดยทำการทดลองควบคู่กับการใช้เทคนิคการตัดต่อยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยโปรตีนออกจากเซลล์ ซึ่งผลของการศึกษาพบว่า EMS สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโปรตีนภายในเซลล์ได้ 2 – 3 เท่า เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม อย่างไรก็ตามการตัดต่อยีนส์ที่เกี่ยวข้องในการปลดปล่อยโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ พบว่า การตัดยีนส์ AgGAS1B ของ *A. gossypii* ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์นั้นส่งผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของ *A. gossypii* (Reibiro และคณะ, 2013)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบผลการผลิตกรดอิทาโคนิคด้วยเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น NRRL 1960 และเชื้อรา *A. terreus* ที่ถูกชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี Diethyl sulfate ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 75 นาที

สายพันธุ์	เซลล์ (กรัมต่อกรัมกลูโคส)	กรดอิทาโคนิค		
		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (กรัมต่อกรัมกลูโคส)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
ตั้งต้น NRRL 1960	0.15± 0.02	37.03± 1.38	0.36± 0.01	0.19± 0.02
C1	0.13± 0.02	35.35± 3.03	0.38± 0.04	0.18± 0.05
C2	0.20± 0.03	30.48± 1.08	0.42± 0.07	0.16± 0.02
C3	0.17± 0.02	38.13± 2.86	0.42± 0.04	0.20± 0.03
C4	0.19± 0.01	39.70± 1.06	0.39± 0.05	0.21± 0.01
C5	0.18± 0.01	29.78± 2.37	0.32± 0.01	0.15± 0.03
C6	0.17± 0.01	39.23± 2.64	0.41± 0.01	0.20± 0.04

การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดอิทาโคนิคของเชื้อรา *A. terreus* ที่ถูกชักนำให้กลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสียูวี

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถการผลิตกรดอิทาโคนิคของแต่ละไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำครั้งที่ 2 และ 3 ด้วยรังสียูวี ที่ทำการฉายรังสียูวีครั้งละ 5 นาที จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำให้ผลการผลิตกรดอิทาโคนิคที่ใกล้เคียงกับเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น NRRL 1960 อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่า การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำครั้ง 3 คือ ไอโซเลท 555-8 ที่แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของการผลิตกรดอิทาโคนิคร้อยละ 16.3 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น NRRL 1960

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความสามารถของการผลิตกรดอิทาโคนิคของเชื้อรา *A. terreus* ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำครั้งที่ 2 และ 3 ด้วยรังสียูวีเป็นระยะเวลา 5 นาที

สายพันธุ์	เซลล์ (กรัมต่อกรัมกลูโคส)	กรดอิทาโคนิค		
		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (กรัมต่อกรัมกลูโคส)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
ตั้งต้น NRRL 1960	0.15± 0.02	37.03± 1.38	0.36± 0.01	0.19± 0.01
55-6	0.13± 0.01	30.42± 1.73	0.30± 0.02	0.16± 0.03
55-7	0.14± 0.02	30.87± 1.17	0.30± 0.01	0.16± 0.04
55-8	0.17± 0.03	29.80± 3.03	0.36± 0.02	0.15± 0.01
55-9	0.18± 0.02	34.23± 1.03	0.41± 0.01	0.17± 0.02
55-12	0.21± 0.03	29.55± 0.71	0.33± 0.02	0.15± 0.01
555-6	0.13± 0.01	33.48± 3.20	0.34± 0.03	0.17± 0.02
555-7	0.24± 0.02	29.05± 7.03	0.38± 0.10	0.15± 0.03
555-8	0.17± 0.04	41.43± 1.52	0.36± 0.03	0.22± 0.01
555-9	0.13± 0.01	29.57± 0.49	0.30± 0.00	0.15± 0.02
555-12	0.19± 0.01	32.87± 3.34	0.33± 0.02	0.17± 0.01

ทั้งนี้การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสียูวีนั้นเป็นการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสายเกลียว DNA โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณของนิวคลีโอไทด์เบสกลุ่มไพริมิดีน จึงเป็นผลให้กระบวนการการ replication เกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ (Sambrook และ Russell, 2001) อีกทั้งการชักนำให้เกิดการ

กลายพันธุ์ด้วยวิธี random mutagenesis เป็นการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม ที่ไม่ได้เกิดความจำเพาะเจาะจงต่อสายนิวคลีโอไทด์ที่ส่งผลต่อการผลิตกรดอิทาโคนิคในเชื้อรา *A. terreus* จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ลดประสิทธิภาพของการปรับปรุงการผลิตกรดอิทาโคนิคได้ ซึ่งในปี 2016 Cyrus และ Juwon ได้รายงานผลของ random mutagenesis ต่อการผลิตสารอัลฟลาทอกซินใน *Aspergillus flavus* SWtS01 ซึ่งจากการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าการฉายรังสียูวีที่เวลาต่างกัน รังสียูวีส่งผลให้มีการเพิ่มและ/หรือลดการผลิตสารอัลฟลาทอกซินใน *A. flavus* SWtS01 ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำ random mutagenesis ด้วยรังสียูวีนั้นทำให้เกิดการกดหรือกระตุ้นการทำงานของยีนส์ที่เกี่ยวข้องต่อวิถีเมแทบอลิซึมของการผลิตสารอัลฟลาทอกซินในเชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวได้ (Cyrus และ Juwon, 2016) ด้วยเหตุของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มและความไม่เสถียรของ mutant ที่เกิดขึ้นในปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ร่วมกับการทำ genome sequencing เพื่อทำการศึกษาส่วนที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ จากนั้นข้อมูลที่ได้จากการทำ genome sequencing ได้ถูกนำมาใช้เพื่อการศึกษาต่อในการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการตัดต่อยีนส์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการปรับปรุงต่อไปเพื่อให้ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพและเสถียรในการผลิตผลิตภัณฑ์เป้าหมายต่อไป (Nevalainen และ Peterson, 2014)

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการปรับปรุงเชื้อรา *A. terreus* ด้วยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธี random mutagenesis เพื่อเพิ่มการผลิตกรดอิทาโคนิคนั้น สามารถทำได้ด้วยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีและสารเคมี Diethyl sulfate ที่ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายและค่าใช้ไม่สูง อย่างไรก็ตามการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธี random mutagenesis นี้ ต้องมีการใช้เวลานานเพื่อให้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพและมีเสถียรภาพที่สูง ซึ่งจากผลการทดลองทำให้เห็นว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เชื้อรา *A. terreus* ด้วยรังสียูวีที่เวลา 5 นาที ด้วยการฉายซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง และการบ่มสารละลายสปอร์ด้วยสาร Diethyl sulfate ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 75 นาที สามารถช่วยเพิ่มการผลิตกรดอิทาโคนิคของ A. tereus ได้ร้อยละ 14 – 16 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากนี้เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพของการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อให้มีมากยิ่งขึ้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม ได้แก่ การเพิ่มความเข้มข้นและชนิดของสารเคมี ศึกษาการทำ genome sequencing รวมถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการหมัก เช่น ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

Choi, S., C.W. Song, J.H. Shin, and S.Y. Lee. 2015. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. Metabolic Engineering, 28:223-239

Cyrus, E.T. and Juwon, A.D. 2016. Repression of aflatoxigenic traits in *Aspergillus flavus* SWtS01through random mutagenesis. Microbiology Journal, 6: 25-33.

Krull, S., Hevekerl, A., Kuenz, A., and Prube, U. 2017. Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers. Applied Microbiology and Biotechnology. 101: 4063–4072.

Kuenz, A., Gallenmüller, Y., Willke, T., and Vorlop, K.-D. 2012. Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. Applied Microbiology and Biotechnology, 96 (5): 1209–1216.

Leonard, C.A., Brown, S.D., and Hayman, J.R. 2013. Random Mutagenesis of the *Aspergillus oryzae* Genome Results in Fungal Antibacterial Activity. International Journal of Microbiology, 2013: 901697

Lin, K. and Wang, A. 2001. UV mutagenesis in *Escherichia coli* K-12: Cell survival and mutation frequency of the chromosomal genes lacZ, rpoB, ompF, and ampA. Journal of Experimental Microbiology and Immunology, 1:32-46.

Nevalainen, H. and Peterson R. 2014. Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? Frontiers in Microbiology, 5(75): https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00075

Okabe, M., Lies, D., Kanamasa, S., and Park, E.Y. 2009. Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 84: 597–606.

Ribeiro, O., Magalhes, F., Aguiar, T.Q., Wiebe, M.G., Penttil, M., and Domingues, L. 2013. Random and direct mutagenesis to enhance protein secretion in *Ashbya gossypii*. Bioengineered 4:5, 322–331

Sambrook, J. and D.W. Russell, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA., ISBN-13: 9780879695774, Pages: 2344.

Sinha, R.P. and Hader, D.P. 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review.

Photochemical and Photobiological Sciences, 1: 225–236.

Tajima, S., Itoh, Y., Sugimoto, T., Tatsuya Kato, T. and Park, E.Y. 2009. Increased riboflavin production from activated bleaching earth by a mutant strain of *Ashbya gossypii*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 108(4): 325-329.

Wood, R. D., 1996. DNA repair in eukaryotes. Annual Review of Biochemistry, 65: 135-167.

ภาคผนวก

การเตรียมสูตรอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดไอทาโคนิค (Krull และคณะ 2017)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย		
กลูโคส (glucose)	180	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3)	3	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	5	กรัม
ไอออน(III)คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$)	1.67	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	8	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	15	มิลลิกรัม
ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เป็น 3.01		

ประวัติคณะนักวิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นามสกุล-~~นาย~~ นางสาว ~~นาง~~ ยศ สิตานัน ธิติประเสริฐ
   ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) นามสกุล-~~Mr.~~, Miss, ~~Mrs.~~, Rank Sitanan Thitiprasert
2. เลขหมายบัตรประชาชน 3809900436579
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย AR5
   เวลาที่ใช้ทำวิจัย (ชั่วโมงต่อสัปดาห์) 15
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์)e-mail)
   สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
   โทรศัพท์ 022188064 โทรสาร 022533543
   e-mail: sitanan.t@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปี พที่ .ศ.ได้รับ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	Ph.D.	เทคโนโลยีชีวภาพ	2557
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	B.Sc.	เทคโนโลยีการหมัก	2548

คณะผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นามสกุล-~~นาย~~ นางสาว ~~นาง~~ ยศ ณัฏฐา ทองจุล
   ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) นามสกุล-~~Mr.~~, Miss, ~~Mrs.~~, Rank Nuttha Thongchul
2. เลขหมายบัตรประชาชน 3120101630208
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
   เวลาที่ใช้ทำวิจัย (ชั่วโมง:สัปดาห์) 5
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
   สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
   โทรศัพท์ 022188073 โทรสาร 022533543 e-mail: Nuttha.T@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปี พ .ศ.ที่ได้รับ
The Ohio State University	Ph.D.	Chemical Engineering	2548
Asian Institute of Technology	M.Eng.	Bioprocess Technology	2541
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	B.Eng.	วิศวกรรมเคมี	2538

คณะผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นามสกุล-~~นาย~~ ~~นางสาว~~ นาง ยศ วาสนา โตเลี้ยง
   ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) นามสกุล-~~Mr.~~, ~~Miss~~, Mrs., Rank Vasana Tolieng
2. เลขหมายบัตรประชาชน 3102002151826
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
   เวลาที่ใช้ทำวิจัย (ชั่วโมง:สัปดาห์) 5
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
   สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
   โทรศัพท์ 022188073 โทรสาร 022533543 e-mail: vasanato@hotmail.com
5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปี พที่ .ศ. ได้รับ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	M.S.	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม	2528
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	B.S.	วิทยาศาสตร์ทั่วไป (ชีวเคมี-เคมี)	2523