บทคัดย่อ

168586

จากการเก็บตัวอย่างดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนด้วยเมล็ดมัสตาร์ดจำนวน 450 ตัวอย่าง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น NA และ PDA พบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจำนวน 167 และ 54 ชนิด ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารซินิกรินซึ่งมีแบเรียมซัลเฟตเพื่อตรวจสอบการผลิตไมโรซิเนสอย่างง่ายแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวมัสตาร์ดซึ่งมีกลูโคซิโนเลตเข้มข้น 5mM pH 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบเชื้อราที่ผลิตไมโรซิเนส 28 ชนิด เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อ ที่ผลิตไมโรซิเนสปริมาณสูงมาศึกษา 13 ชนิดเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไมโรซิเนส พบว่าเชื้อตระกูล N ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่ pH6.5-7.0 อุณหภูมิ 30-35 °C ระยะเวลา 36-48 ชั่วโมงส่วนเชื้อตระกูล F ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่ pH6.0-6.5 อุณหภูมิ 28-35 °C ระยะเวลา 36-54 ชั่วโมง

จากการทำให้เชื้อรากลายพันธุ์โดยกระบวนการทางฟิสิกส์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตและใช้สารเคมี Ethylmethane sulfonate และN-methyl-N-nitrosoguanidine และแยกเชื้อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต ได้เชื้อราที่กลายพันธุ์โดยใช้แสง UV 45 ชนิด ได้เชื้อรากลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี Ethylmethane sulfonate 32 ชนิด และได้เชื้อรากลายพันธุ์โดยใช้สาร N-methyl-N-nitrosoguanidine 32 ชนิด

เมื่อนำเชื้อรากลายพันธุ์มาผลิต crude enzyme และศึกษาความเสถียรของเอนไซม์เปรียบเทียบกับ wild typeและคัดเลือกเชื้อที่ผลิตไมโรซิเนสปริมาณสูงและมีเสถียรภาพมาศึกษา พบเชื้อกลายด้วยแสง UV 8 ชนิด(F4M2,F14M2,N3M2,N3M3,N3M4,N5,M2,N17M3,N17M5) และเชื้อกลายด้วยสารเคมี 8 ชนิด(8E3,13E1,14E3,17E1,5C1,13C3,21C1) มีแอคติวิตีสูงและมีเสถียรภาพดี เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไมโรซิเนส พบว่าเชื้อกลายจากแสง UV และสารเคมีส่วนใหญ่ทำงานที่อุณหภูมิ 30°C และ pH 5.5-7.5 .ในช่วงระยะเวลา42-48 ชั่วโมง

เมื่อนำcrude enzyme จากเชื้อราสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายมาทดลองย่อยสลายมัสตาร์ดเพื่อผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด(allylisothiocyanate , AIT) พบว่าในบรรดาwild typeที่เลือกใช้(N3,F4,F14,N21) เอนไซม์จากเชื้อ F14 เมื่อนำมาผลิต AIT จากมัสตาร์ดสามารถให้ AIT ปริมาณสูงสุดคือ 3.2 ml/kg ส่วนเอนไซม์จากเชื้อกลายที่นำมาผลิต AIT แล้วให้ AIT สูงกว่า wild typeคือเอนไซม์จากเชื้อกลายของ N3 ที่กลายพันธุ์โดยแสงUV (3M2,3M3,3M4) สามารถผลิต AIT ได้ 2.90-3.60 ml/kg

จากการนำค่าตัวเลข AIT ที่ผลิตได้ที่อุณหภูมิ 30°C ไปเปรียบเทียบกับการผลิตที่อุณหภูมิ 70°Cแบบโรงงานแต่ทำในห้องปฏิบัติการ(โดยให้ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการที่ ทำ ที่ 70°C

ให้ค่าเท่าของจริง โรงงาน คือ 1.2%) พบว่าเอนไซม์จากเชื้อกลาย 3M4 สามารถผลิต AIT ได้ 30 ลิตร ต่อตันมัสตาร์ดเค้ก ขณะที่ โรงงานสามารถผลิตได้ 12 ลิตร ต่อตันมัสตาร์ดเค้ก

Abstract 168586

450 samples of decayed mustard seed meal (solid and liquid) were collected and cultured on NA and PDA plates. 54 fungal and 167 bacterial strains were isolated and maintained on sinigrin- barium agar plates to asses the capability of microorganisms to produce myrosinase. The myrosinase producing strains were then confirmed by determination of myrosinase activity of cell free extract in liquid culture containing 5 mM of mustard glucosinolate in 0.1 M phosphate buffer pH 6.5, peptone 2.5 g/l and ammonium chloride 0.5 g/l. Results from this study revealed that 28 fungal strains showed myrosinase activity. 13 strains which found to have high myrosinase activity were selected to determine production conditions. It was found that during a period of 36-48 hours at 30-35 °C most of N- strains could produce the enzyme at pH 6.5-7.0 while F-strains could produce the enzyme at 28-35 °C , pH 6.0-6.5 during a period of 36-54 hours

Physicochemical treatments of spores from 13 parent strains by UV irradiation , ethylmethane sulfonate (EMS 2.4 % w/v) or N-methy-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG 0.4% w/v) produced 45,32 and 32 mutant strains respectively.

The stability of crude myrosinase produced from fungal mutant strains were verified by comparing with that of the parent enzyme. The strains which showed high activity of crude enzyme and high stability were chosen for the study of suitable production conditions. The optimal production conditions of mutant strains were at pH 5.5-7.5 , 30 °C in a period of 42-48 hours.

The crude enzymes from parent and mutant strains were used to produce essential oil allylisothiocyanate(AIT). The enzyme from parent strain F4 could produce 3.2 mg/Kg of AIT while the mutant strains produced by UV irradiation (3M2,3M3 and 3M4) gave a production yield of 2.9-3.6 mg/Kg .

Yields of AIT produced in laboratory at 30 °C and 70 °C were relatively compared to the factory production of 1.2% at 70 °C. Experimental data suggested that the enzymes from 3M4 strain could produce 30 L/Ton of AIT which was greater than current factory production of 12 L/Ton.