การชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในเห็ดหลินจือ *Ganoderma lucidum* ที่สามารถย่อยสลายลิกนิน

นางสาว นภา จิรมิตตานนท์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3787-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ULTRAVIOLET-INDUCED MUTATION IN LIGNINOLYTIC LINGZHI MUSHROOM *Ganoderma lucidum.*

Miss Napa Jiramittanon

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-3787-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในเห็ดหลินจือ *Ganoderma lucidum* ที่สามารถย่อยสลายลิกนิน
โดย	นางสาวนภา จิรมิตตานนท์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นภา จิรมิตตานนท์: การชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในเห็ดหลินจือ *Ganoderma lucidum* ที่สามารถย่อยสลายลิกนิน. (ULTRAVIOLET-INDUCED MUTATION IN LIGNINOLYTIC LINGZHI MUSHROOM *Ganoderma lucidum*.) อ.ที่ปรึกษา: รศ.มุกดา คูหิรัญ อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์; 92 หน้า. ISBN 974-17-3787-4

เมื่อทำการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในเซลล์เดี่ยวที่ได้จากวิธีตัดเซลล์เดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS และทำการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีความต้านทานต่อคีโตโคนาโซล มีการผลิตวงสีบนอาหารที่มี guaiacol และมีการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุด จากโคโลนีทั้งหมด 70 โคโลนี พบว่า MUG001-50S-2 เป็นสายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุด คือ มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 0.00017 U/ml เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมเยื่อยูคาลิปตัสในภาวะนิ่งที่ระดับ pH 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 7 วัน ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในสายพันธุ์เดิม คือ MUG001 และมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 0.0015 U/ml เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมเยื่อยูคาลิปตัสในภาวะนิ่งที่ระดับ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 11 วัน ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสในสายพันธุ์เดิม คือ MUG001 และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม คือ MUG001 ที่ภาวะเดียวกันพบว่าสายพันธุ์ MUG001-50S-2 มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้นเป็น 5 และ 2.73 เท่า เมื่อนำ crude enzyme ของสายพันธุ์มิวแตนท์นี้มาฟอกเยื่อกระดาษโดยวิธีทางชีวภาพ (12.5 IU/gOD) เปรียบเทียบกับเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก พบว่าเยื่อกระดาษมีค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นจาก 48.6 เปอร์เซ็นต์เป็น 51.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงจาก 11.17 เป็น 6.89 และค่าต้านทานแรงดันทะลุเพิ่มขึ้นจาก 0.704 kPa.m^2/g เป็น 1.052 kPa.m^2/g อย่างมีนัยสำคัญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา……..พฤกษศาสตร์…	ลายมือชื่อนิสิต……..
สาขาวิชา…….พันธุศาสตร์…..	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา……..
ปีการศึกษา….2546…….	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม……

4372296723: MAJOR GENETICS

KEYWORDS: MUTATION/ GANODERMA/ LACCASE/ MANGANESE PEROXIDASE

NAPA JIRAMITTANON: ULTRAVIOLET-INDUCED MUTATION IN LIGNINOLYTIC LINGZHI MUSHROOM *Ganoderma lucidum*. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. MUKDA KUHIRUN. THESIS CO-ADVISOR: ASSIST. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK;
92 pp. ISBN 974-17-3787-4

The single cells of *Ganoderma lucidum*, MUG001 and MUGS, from the cutting cell under microscrope were induced for mutation with ultraviolet light. These single cells were screened for ketoconazole resistant, ability to produce colored precipitate on guaiacol-containing agar plates and the highest level of manganese peroxidase activity and laccase activity. From 70 colonies, there were one hyperligninolytic mutant, MUG001-50S-2, could produce the highest level of manganese peroxidase activity and laccase activity. The highest manganese peroxidase activity was 0.00017U/ml when cultivated in liquid medium containing eucalyptus paper pulp at pH 3, 25^0C and 7 days incubate. The highest laccase activity was 0.0015U/ml at pH 5, 30^0C and 11 days incubate. When it was compare with wild type, MUG001, it was found that manganese peroxidase activity and laccase activity of MUG001-50S-2 were increasing to 5 and 2.73 folds respectively. Biobleaching of hardwood kraft pulp by crude enzyme from this mutant strain (12.5 IU/gOD) was investigated and compared with unbleach hardwood kraft pulp. It was found that pulp brightness increased from 48.6% to 51.9% ISO brightness, kappa number decreased from 11.17 to 6.8, and burst index increase from 0.704 kPa.m^2/g to 1.052 kPa.m^2/g significantly.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department……Botany……	Student's signature……
Field of study…….Genetics....	Advisor's signature……
Academic year……2003…….	Co-advisor's signature …….

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ตลอดจนได้แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัยจนสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์ ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยและภาควิชาพฤกษศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย

ขอขอบคุณโรงงานเยื่อกระดาษ บริษัทสยามเซลลูโลส จำกัด อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเยื่อกระดาษที่ใช้ในการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณ จรวย ธงไชย และพี่ๆ ที่กรมวิทยาศาสตร์บริการทุกท่านที่กรุณาสอน ให้คำแนะนำและอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือในการทำวิจัยนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ รวมถึงบุคลากรในภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่เอื้อเฟื้อและช่วยเหลือเป็นกำลังใจให้แก่ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา สำหรับความรัก ความห่วงใย และเป็นกำลังใจให้เสมอมาจนทำให้สำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ซ

สารบัญภาพ.....ฎ

บทที่

1. บทนำ.....1
2. การตรวจเอกสาร.....5
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการทดลอง.....22
4. ผลการทดลอง.....31
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....52
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....60

รายการอ้างอิง.....64

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.....72

ภาคผนวก ข.....74

ภาคผนวก ค.....77

ภาคผนวก ง.....84

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....92

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีบนอาหารแข็ง PDA ที่มี guaiacol 0.015% (v/v) ในเห็ดหลินจือ 8 สายพันธุ์……..……..32

2 ค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคส ในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ที่ระดับ pH ต่างๆ……..……34

3 ค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือ สายพันธุ์ MUG001 และ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 และ pH 5 ที่อุณหภูมิต่างๆ…..……35

4 ค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือ สายพันธุ์ MUG001และสายพันธุ์ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ……..……..36

5 เซลล์เดี่ยวของสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS ที่ได้จากการใช้ homogenizer …..……38

6 ระยะเวลาการเริ่มแบ่งเซลล์ใหม่ของเส้นใยที่ถูกตัดเป็นเซลล์เดี่ยว……39

7 ระยะเวลาที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลตและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเห็ดหลินจือ สายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGSในช่วงเวลา0-3 นาที……40

8 จำนวนโคโลนีที่แยกได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต……...42

9 ความต้านทานต่อคีโตโคนาโซลของโคโลนีที่คัดแยกได้และค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสี…..……...……42

10 ความต้านทานต่อคีโตโคนาโซลและค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีของสายพันธุ์มิวแตนท์ก่อนและหลังทดสอบความเสถียร……45

11 ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม……..……47

12 ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคสของสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม……..……48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

13 การตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001-50S-2 เปรียบเทียบกับเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก..... .50
14 ค่า Factor (F) สำหรับแปลงผลลัพธ์ของค่าคัปปานัมเบอร์.....83
15 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีบนอาหาร PDA + 0.015% guaiacol (v/v) ในเห็ดหลินจือทั้ง 8 สายพันธุ์ วันที่ 1.....84
16 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีบนอาหาร PDA + 0.015% guaiacol (v/v) ในเห็ดหลินจือทั้ง 8 สายพันธุ์ วันที่ 2.....84
17 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีบนอาหาร PDA + 0.015% guaiacol (v/v) ในเห็ดหลินจือทั้ง 8 สายพันธุ์ วันที่ 3.....85
18 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีบนอาหาร PDA + 0.015% guaiacol (v/v) ในเห็ดหลินจือทั้ง 8 สายพันธุ์ วันที่ 4.....85
19 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ที่ระดับ pH ต่างๆ.....85
20 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของแลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ที่ระดับ pH ต่างๆ.....86
21 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ที่ระดับ pH ต่างๆ.....86
22 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ที่ระดับ pH ต่างๆ.....86
23 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 ที่อุณหภูมิต่างๆ.....87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

24 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสใน เห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 ที่อุณหภูมิต่างๆ……..87
25 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือ สายพันธุ์ MUG 001 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 5 ที่อุณหภูมิต่างๆ…..87
26 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือ สายพันธุ์ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 5 ที่อุณหภูมิต่างๆ.....88
27 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสใน เห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ……88
28 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสใน เห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ……88
29 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ……89
30 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ……89
31 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิด วงสีบนอาหาร PDA + 0.015% guaiacol (v/v) ในเห็ดหลินจือสายพันธุ์เดิมและ สายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคสขั้นต้นสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ……89
32 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสใน เห็ดหลินจือสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์……..90
33 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือ สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ ……..90

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

34 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าความขาวสว่างของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์และกระดาษไม่ผ่านการฟอก……..90
35 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าแรงฉีกขาดของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์และกระดาษไม่ผ่านการฟอก……..…91
36 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าแรงดันทะลุของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์และกระดาษไม่ผ่านการฟอก……..……..91
37 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าการต้านทานแรงดึงของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์และกระดาษไม่ผ่านการฟอก……..……91

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 โครงสร้างสารตั้งต้นของลิกนิน……..……...7
2 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน……..……...7
3 วัฏจักรการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส……11
4 วัฏจักรการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส……..13
5 ดอกและสปอร์ของเห็ดหลินจือ *Ganoderma lucidum*……..……..16
6 วงจรชีวิตของเห็ดหลินจือ……..16
7 การเกิด thymine dimer…..……..……..19
8 กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (a) photoreactivation (b) dark repair……...20
9 การเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีเฉลี่ยของเห็ดหลินจือทั้ง 8 สายพันธุ์
บนอาหารแข็ง PDA ที่มี guaiacol 0.015% (v/v)……..31
10 การเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และ
สายพันธุ์ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB……...33
11 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคีโตโคนาโซลกับการเจริญ
ของเส้นใยเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS……...37
12 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ฉายแสงกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด……..……..41
13 เส้นใยของสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์มิวแตนท์ MUG001-50S-2……...48
14 ตัวอย่างแผ่นทดสอบมาตรฐานที่ได้จากเยื่อที่ไม่ผ่านการฟอกและเยื่อที่ผ่าน
การฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG001-50S-2……..……...51
15 เครื่องทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ.....80
16 เครื่องมือการทำแผ่นทดสอบมาตรฐาน.....80
17 เครื่องวัดค่าความขาวสว่าง.....81
18 การตัดกระดาษออกเป็น 3 ส่วนเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบ.....81

บทที่ 1

บทนำ

โครงสร้างของเนื้อไม้ประกอบด้วยสารอินทรีย์ประเภทเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) จับกันแน่นในรูปของโครงสร้างผลึกที่ซับซ้อนโดยมีลิกนินทำหน้าที่เชื่อมเซลล์เข้าด้วยกัน สร้างความแข็งแรงและความยืดหยุ่นให้กับพืช แต่การมีลิกนินทำให้เยื่อกระดาษมีสีน้ำตาล การที่จะนำเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมกระดาษ จึงต้องมีการกำจัดลิกนินออกจากเยื่อกระดาษ เพื่อทำให้เยื่อกระดาษมีความขาวสว่างมากขึ้น การฟอกเยื่อกระดาษในอุตสาหกรรมประกอบด้วยหลายขั้นตอน โดยทั่วไปประกอบด้วยขั้น chlorination และ alkaline extraction จากขั้นตอนเหล่านี้ลิกนินจะถูกสกัดออกมาในรูปของสารประกอบจำพวก chlorinated organic เช่น chlorolignin chlorophenolic เป็นต้น สารเหล่านี้เป็นสารพิษ หรือสารก่อมะเร็ง ทำให้เกิดปัญหามลภาวะทางน้ำ ดังนั้นอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษอาจมีแนวทางใหม่ในการลดปัญหา โดยนำเทคโนโลยีทางชีวภาพมาใช้ เช่น การใช้วิธีฟอกเยื่อกระดาษแบบชีวภาพโดยใช้เชื้อรากลุ่มไวท์รอท (white-rot fungi) มาฟอกร่วมกับการฟอกเยื่อทางเคมี

เชื้อรากลุ่มไวท์รอทจะมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายลิกนิน ได้แก่ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase; MnP; EC.1.11.1.13) ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase; LiP; EC.1.11.1.14) และแลคเคส (laccase; LAC; EC.1.10.3.2) (Heinzkill และ Messner, 1997) ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสว่ามีบทบาทที่สำคัญในการย่อยสลายลิกนินในเยื่อกระดาษ (Miura และคณะ, 1998; Harazono และคณะ, 1996) เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส พบครั้งแรกใน *Phanerocheate chrysosporium* (Kuwahara และคณะ, 1984) เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วย heme มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 46,000 ดาลตัน (Dalton) โดยเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส จะออกซิไดซ์สารประกอบที่เป็น phenolic lignin ในภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และ แมงกานีสเป็นตัวร่วมปฏิกิริยา (Wariishi และคณะ, 1992) การเกิดปฏิกิริยาเริ่มจาก แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้เป็น oxidize intermediate (MnP I) จากนั้นสารตั้งต้นตัวแรก คือ Mn^{2+} จะถูกออกซิไดซ์โดย MnP I และ MnP II เกิดเป็น Mn^{3+} หลังจากนั้น Mn^{3+} จะรวมกับโครงสร้างของกรดอินทรีย์ (organic acid) เช่น lactate malonate oxalate เป็นต้น (Harazono และคณะ, 1996) และท้ายที่สุดสารประกอบที่เกิดขึ้นจะไปออกซิไดซ์กับ phenolic substrate ได้เป็นอนุพันธ์ของ cinnamyl

alcohol ต่างๆ ได้แก่ p-coumaryl alcohol coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol (Boominathan และ Reddy, 1991; Heinzkill และ Messner, 1997)

เห็ดหลินจือมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ganoderma lucidum* อยู่ใน Division Basidiomycota มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญคือ ใต้หมวกเห็ดไม่มีครีบ แต่มีรูเล็กๆจำนวนมากมาย ภายในรูเป็นที่เกิดของสปอร์ด้านบนของหมวกมีสีน้ำตาลแดงหรือสีเชสนัทไปจนถึงสีน้ำตาลม่วงและดำ ผิวหมวกเห็ดเป็นมันเงาเหมือนเคลือบด้วยแลคเกอร์ มีก้านสั้นๆ ดอกอ่อนมีขอบสีขาว เหลืองกลางดอกสีน้ำตาล ด้านใต้หมวกซึ่งเป็นรูเล็กๆ มีสีนวล ดอกเห็ดรูปร่างคล้ายพัด สปอร์เป็นผงสีน้ำตาล รูปร่างรี ปลายด้านหนึ่งตัด ผนังหนา มี 2 ชั้น ผนังชั้นนอกเรียบ ผนังชั้นในยื่นคล้ายหนามไปชนผนังชั้นนอก (สุทธพรรณ ตรีรัตน์, 2531) เห็ดหลินจือเป็นเห็ดสมุนไพรมีสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคต่างๆ ของมนุษย์ เช่นมีสรรพคุณในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Soxe และคณะ, 1985) ลดความดันโลหิต (Shiao และคณะ, 1988) เป็นต้น นอกจากมีสรรพคุณทางยาเห็ดหลินจือยังจัดเป็นรากลุ่มไวท์รอทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนิน เช่นในปี พ.ศ. 2541 เรือนแก้ว ประพฤติ ได้ศึกษาการฟอกเยื่อกระดาษแบบชีวภาพโดยใช้ *P. chrysosporium* และเห็ดหลินจือ พบว่าเห็ดหลินจือมีการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และทำให้เยื่อกระดาษมีค่าคัปปานัมเบอร์ลดลง 26.44 เปอร์เซ็นต์ และค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น 23.58 เปอร์เซ็นต์ และในปี พ.ศ. 2545 เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี ได้ตรวจพบเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคส และเมื่อนำเอนไซม์มาฟอกเยื่อกระดาษทำให้เยื่อกระดาษมีค่าคัปปานัมเบอร์ลดลง 13.24 เปอร์เซ็นต์ และค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น 4.48 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์เชื้อราโดยการชักนำให้เกิดมิวเตชันได้มีการใช้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งนิยมใช้กันมากในพวกจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตเป็นแสงที่มีอำนาจทะลุทะลวงต่ำ ทำให้ดีเอ็นเอเกิดความผิดปกติที่พันธะทางเคมีโดยชักนำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) (Drake, 1970) เช่น ในปี ค.ศ. 1991 Li และ Chang ได้ทำการคัดเลือกและศึกษาลักษณะต่างๆ ในสายพันธุ์มิวแตนท์ของ *Volvariella volvacea* ที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลต (crystal-violet) และมาลาไชท์กรีน (malachite-green) โดยนำเบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) และเส้นใยที่บดละเอียดมาฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่อัตราการตาย 95-99.5% และทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์มิวแตนท์ และในปี พ.ศ. 2542 ชาลินี คงสวัสดิ์ ได้ชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหลินจือโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีปริมาณโพลีแซคคาไรด์ที่สูงขึ้น ดังนั้นการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตในเห็ดหลินจืออาจทำให้มีการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือเพิ่มมากขึ้น

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นเพื่อหาสายพันธุ์มิวแตนท์ของเห็ดหลินจือที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสสูงกว่าสายพันธุ์เดิมเพื่อให้มีความสามารถในการฟอกเยื่อกระดาษโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตในการชักนำให้เกิดมิวเตชัน เพื่อให้เป็นทางเลือกหนึ่งในการฟอกเยื่อกระดาษแบบชีวภาพในอุตสาหกรรม ซึ่งถ้าทำได้ก็จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตในด้านพลังงาน สารเคมีและปัญหาทางมลพิษ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหลินจือ และคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินสูงกว่าสายพันธุ์เดิม เพื่อให้มีความสามารถในการฟอกเยื่อกระดาษและทำให้เยื่อกระดาษมีความขาวสว่าง

ขั้นตอนการวิจัย

1. การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหลินจือที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสสูงสุดและต่ำสุดในขั้นต้น
2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคส
3. การทำ Minimum Inhibitory Concentrations(MICs) เพื่อหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของคริสตัลไวโอเลตและคีโตโคนาโซลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเห็ดหลินจือเพื่อเป็น mutation marker
4. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลต
5. การชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในเห็ดหลินจือและการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์
6. การทดสอบความเสถียรของเห็ดหลินจือสายพันธุ์มิวแตนท์
7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม
8. การฟอกเยื่อกระดาษด้วย crude enzyme ของสายพันธุ์มิวแตนท์
9. วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นแนวทางหนึ่งในการนำเชื้อราหรือเอนไซม์จากเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินมาฟอกเยื่อกระดาษด้วยวิธีทางชีวภาพในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษเพื่อลดขั้นตอนการใช้สารเคมีในขั้นตอนการฟอกเยื่อกระดาษ

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และเอนไซม์แลคเคส ภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลต การคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ของเห็ดหลินจือที่ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดและสูงกว่าสายพันธุ์เดิม และทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของสายพันธุ์มิวแตนท์โดยการตรวจวัดค่าความขาวสว่าง (brightness) ค่าคัปปานัมเบอร์ (kappa number) การให้น้ำไหลผ่านเยื่อ (freeness) การวัดค่าแรงดันทะลุ (burst index) การวัดค่าแรงฉีกขาด (tear index) รวมถึงการวัดค่าความต้านทานแรงดึง (tensile index)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

โครงสร้างหลักของเนื้อไม้ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยพบเซลลูโลสมากที่สุดประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เซลลูโลสพบได้ตามผนังเซลล์ของพืชทุกชนิดในชั้นผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell wall) และผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell wall) มีหน้าที่ช่วยทำให้พืชมีโครงสร้างแข็งแรง ส่วนเฮมิเซลลูโลสพบเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส จะยึดติดกับเซลลูโลสในชั้นผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell wall) และลิกนินพบประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์รองจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส พบในชั้นผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell wall) ผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell wall) และ มิดเดิลลาเมลลา(middle lamella) โดยสร้างกระจายรอบเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจนและพันธะโควาเลนต์ เกิดเป็นสารประกอบลิกโนเซลลูโลสที่มีกิ่งก้านสาขามากมาย มีโมเลกุลขนาดใหญ่ตั้งแต่ 600,000-1,000,000 ดาลตัน (Kirk และ Farrell, 1987) ลิกนินทำหน้าที่เชื่อมเซลล์เข้าด้วยกัน สร้างความแข็งแรงและความยืดหยุ่นให้กับเนื้อเยื่อพืชและลดการซึมผ่านของน้ำข้ามผนังเซลล์ จึงทำให้ลิกนินเป็นตัวป้องกันการติดเชื้อที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ (Boominathan และ Reddy, 1991) นอกจากนี้ลิกนินยังเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำจึงทำให้กระบวนการย่อยสลายลิกนินเกิดขึ้นได้ช้า ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาเพื่อหาวิธีการย่อยสลายลิกนินออกจากวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสไปใช้ในอุตสาหกรรมได้

เซลลูโลส (Cellulose)

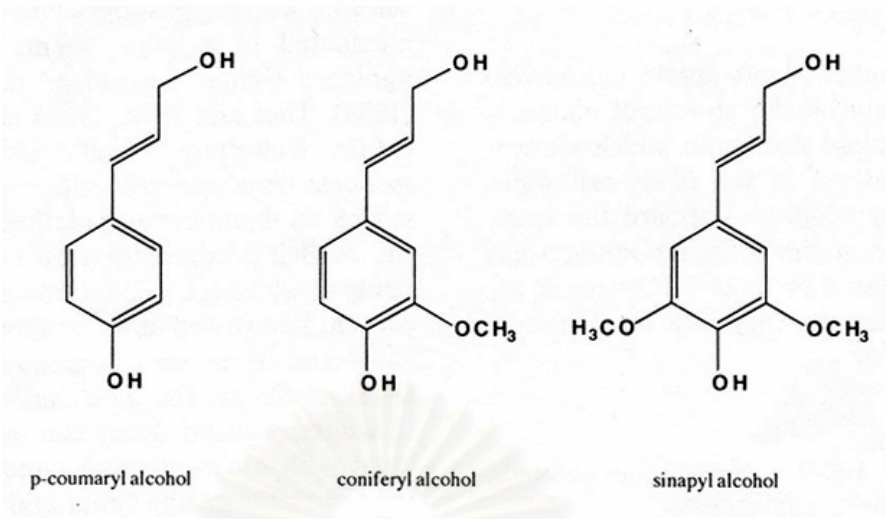
เซลลูโลสเป็นสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ที่เป็นโพลีแซคคาร์ไรด์ (polysaccharide) ประกอบด้วยโมเลกุลของดี-กลูโคส (D-glucose) หลายโมเลกุลเชื่อมต่อกันเป็นโครงสร้างคล้ายลูกโซ่ ด้วยพันธะบีต้า-1,4 ไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic bond) เซลลูโลสเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำที่อุณหภูมิปกติและไม่ละลายในตัวทำละลายส่วนใหญ่ เป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ในธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มักพบรวมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส กัม (gum) เพนโตแซน (pentosan) แทนนิน (tannin) เป็นต้น (Cowling และ Kirk, 1976)

เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

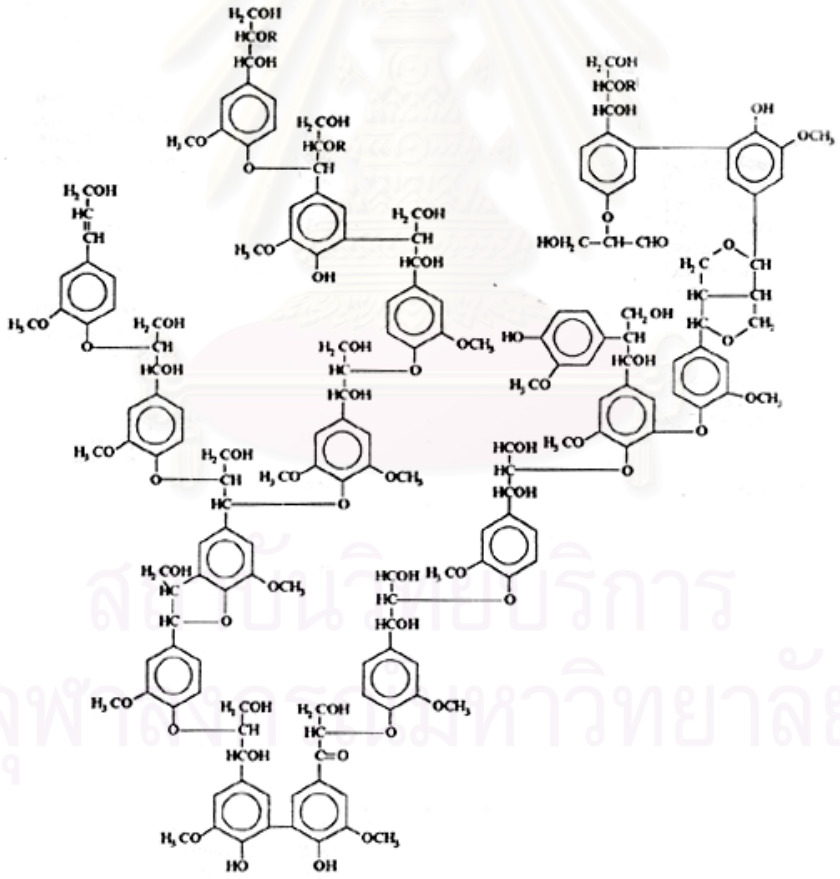
เฮมิเซลลูโลสเป็นอินทรีย์สารที่พบมากเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลส มีลักษณะโครงสร้างเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (pentose) ซึ่งส่วนมากเป็นดี-ไซแลน (D-xylan) ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส (xylose) หลายๆโมเลกุลต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4 ไกลโคซิดิก สายของเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดปนกัน ได้แก่ เพนโตแซน เฮกโซแซน (hexosan) โพลียูโรไนด์ (polyuronides) เป็นต้น (Ericksson และคณะ, 1990) ความแตกต่างระหว่างเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสคือ สายพอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขามากกว่าและมีความยาวของสายพอลิเมอร์สั้นกว่า โดยมีความยาวประมาณ 40 หน่วย (Kirk, 1983)

ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินเป็น complex aromatic biopolymer ไม่ละลายน้ำ เกิดจากการรวมตัวของ phenylpropane unit พบทั้งในพืช angiosperm และ gymnosperm (Boominathan และ Reddy, 1991; Wariishi และคณะ, 1992)ด้วยเหตุที่ลิกนินยากต่อการย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพจึงทำให้ลิกนินเป็นตัวป้องกันการติดเชื้อที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ ป้องกันการทำลายโครงสร้างของเนื้อไม้ และทำให้เส้นใยเซลลูโลส (cellulose fiber) จับกันหนาแน่น ลิกนินไม่มีโครงสร้างโมเลกุลที่แน่นอนเปลี่ยนแปลงตามชุดของสารตั้งต้น ลิกนินสังเคราะห์มาจากอนุพันธ์ของ cinnamyl alcohol 3 ชนิด ได้แก่ p-coumaryl alcohol coniferyl alcohol (guaiacyl unit) และ sinapyl alcohol (syringyl unit) (ภาพที่ 1) โดยสารตั้งต้นเกิดเป็น phenoxy radicals และเกิด polymerization เป็นโครงสร้างลิกนินขนาดใหญ่ (ภาพที่ 2) และเมื่อพิจารณาจากสัดส่วนของสารตั้งต้นของลิกนินแต่ละชนิดในพืชต่างๆ สามารถแบ่งได้เป็น 3 พวก ได้แก่ พืชพวก gymnosperms ไม้เนื้ออ่อน (softwood) ประกอบด้วย coniferyl alcohol เป็นส่วนใหญ่ รองลงมาคือ coumaryl alcohol พืชพวก angiosperms ไม้เนื้อแข็ง (hardwood) ประกอบด้วย coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol อย่างละ 46 % รองลงมาคือ p-coumary alcohol และในพืชพวกหญ้า (grass) ประกอบด้วย p-coumaryl alcohol เป็นส่วนใหญ่ (Kirk และ Farrell, 1987)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารตั้งต้นของลิกนิน (Davin และ Lewis, 2000)



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน (Alder, 1977)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุตสาหกรรมกระดาษ (Paper industrial)

อุตสาหกรรมกระดาษ คืออุตสาหกรรมที่มีการนำเนื้อไม้มาสลายให้เกิดเป็นเยื่อของเส้นใยเซลลูโลสและนำเส้นใยเซลลูโลสไปฟอกเพื่อให้ได้เยื่อกระดาษที่มีความขาวสว่างเพื่อนำไปทำกระดาษ เนื่องจากเยื่อกระดาษก่อนที่จะมีการฟอกจะมีสีน้ำตาล โครงสร้างของเนื้อไม้มีลิกนินเป็นส่วนประกอบ ดังนั้นลิกนินจึงทำให้เยื่อกระดาษมีสีน้ำตาล อุตสาหกรรมการทำกระดาษประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือขั้นตอนการผลิตเยื่อกระดาษและขั้นตอนการผลิตกระดาษ ลิกนินจะถูกกำจัดในขั้นตอนการผลิตเยื่อกระดาษ การผลิตเยื่อกระดาษแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการ คือ กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ (pulping) และกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษ (bleaching) (Casey, 1980)

กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ คือกระบวนการแยกเส้นใยเซลลูโลสที่ติดอยู่ในเนื้อไม้หรือพืชวัตถุดิบให้แยกออกจากกัน การผลิตเยื่อมีหลายวิธี การเลือกใช้วิธีใดขึ้นอยู่กับว่าจะนำเยื่อไปใช้ในการผลิตกระดาษชนิดใด และขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิต การผลิตเยื่อกระดาษแบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่

1. กรรมวิธีทางเคมี (Chemical process)

เป็นกรรมวิธีที่มีการใช้สารเคมีในการแยกเส้นใยในเนื้อไม้ออกมาเป็นเยื่อกระดาษ ผลผลิตเยื่อที่ได้จะต่ำคือต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่จะได้คุณภาพของเยื่อกระดาษสูงในด้านความเหนียว เส้นใยที่ได้สมบูรณ์ ฟอกให้ขาวได้ง่าย

2. กรรมวิธีทางกล (Mechanical process)

เป็นกรรมวิธีที่ใช้เครื่องจักรที่เรียกว่า Refiner หรือ Defibrator มาบดชิ้นไม้ให้กลายเป็นเส้นใย จึงเรียกเยื่อที่ได้ว่า เยื่อไม้บด (ground wood) วิธีนี้ได้ผลผลิตเยื่อสูงถึง 90-95 เปอร์เซ็นต์ เพราะไม่มีการละลายองค์ประกอบทางเคมีของไม้ออกไป แต่คุณภาพของเยื่อที่ได้จะต่ำกว่าเยื่อเคมีในด้านความเหนียว และฟอกให้ขาวก็ทำได้ยากกว่า เยื่อประเภทนี้จะมีราคาถูก ได้แก่เยื่อกระดาษหนังสือพิมพ์

3. กรรมวิธีกึ่งเคมี (Semi-Chemical process)

เป็นกรรมวิธีที่ผสมผสานระหว่างการใช้สารเคมีและการบดเข้าด้วยกัน วิธีนี้ผลผลิตเยื่อและคุณภาพของเยื่อกระดาษที่ได้จะอยู่ระหว่างการผลิตเยื่อทางเคมีและการผลิตเยื่อทางกล และเยื่อกระดาษที่ได้มีความหนาแน่นต่ำ (Reid, 1991)

กระบวนการฟอกเยื่อกระดาษ คือ กระบวนการกำจัดลิกนินออกจากเยื่อกระดาษ โดยใช้สารเคมีทำปฏิกิริยากับลิกนินในเยื่อกระดาษ ในกระบวนการฟอกเยื่อมีจุดประสงค์เพื่อทำให้เยื่อกระดาษมีความขาวสว่างโดยไม่ทำลายความแข็งแรงของเยื่อคือให้มีการสูญเสียเยื่อน้อยที่สุด และความแข็งแรงของเยื่อต้องไม่ลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน กระบวนการฟอกเยื่อประกอบด้วยหลายขั้นตอน มีชื่อเรียกตามสารเคมีที่ใช้ในการฟอกและเรียงตามลำดับตัวอักษรตัวแรกของแต่ละขั้นตอน (Casey, 1980) ดังนี้

สารเคมี	**สัญลักษณ์**	**ชื่อเรียกขั้นตอนการฟอก**
คลอรีน	C	คลอริเนชัน (chlorination stage)
โซเดียมไฮดรอกไซด์	E	แอกแทรกชัน (extraction stage)
แคลเซียมไฮโปคลอไรด์	H	ไฮโปคลอไรด์ (hypochlorite stage)
คลอรีนไดออกไซด์	D	คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide stage)
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	P	ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide stage)
ออกซิเจน	O	ออกซิเจน (oxygen stage)
โอโซน	Z	โอโซน (ozone stage)

โดยทั่วไปจะประกอบด้วยขั้นตอน chlorination และ alkaline extraction ตัวอย่างของขั้นตอนการฟอก เช่น CEH CEDED CEDEP CEOP เป็นต้น ซึ่งลิกนินจะถูกสกัดออกมาในรูป chlorinated organic ที่เป็นสารพิษ หรือสารก่อมะเร็ง เช่น chlorolignin chlorophenolic เมื่อมีการวัดสารพิษดังกล่าวในหน่วยของ absorbable organic halide (AOX) พบว่าในการฟอกเยื่อ 1 ตัน ทำให้เกิดสารกลุ่มนี้ถึง 5 กิโลกรัม ปล่อยออกมากับน้ำทิ้งของโรงงานสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ (Leatham, 1992) ดังนั้นเพื่อที่จะหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีและการปล่อยสารพิษจำนวนมาก ในหลายประเทศจึงได้มีการวิจัยเพื่อหาวิธีการลดปริมาณการใช้สารเคมีในการฟอกเยื่อให้น้อยลง ซึ่งการฟอกเยื่อกระดาษแบบชีวภาพโดยใช้เชื้อรากลุ่มไวท์รอท (white-rot fungi) นับเป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ในการกำจัดลิกนินออกจากเยื่อกระดาษ (Reid, 1991)

การย่อยสลายลิกนินด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

ในธรรมชาติกลุ่มเชื้อราที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตบนเนื้อไม้มักจะมีความสามารถในการย่อยสลาย ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสมาใช้ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ซึ่งก็แล้วแต่ความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อราแต่ละชนิด ได้มีการแบ่งกลุ่มเชื้อราตามการทำลายเนื้อไม้ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. soft rot fungi มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โดยย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด เนื้อไม้หลังการทำลายมีสีเข้มขึ้น เชื้อรากลุ่มนี้ส่วนใหญ่อยู่ใน Division Ascomycota และ Deuteromycota (Buswell และ Odier, 1987)

2. brown rot fungi มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินได้น้อยมาก แต่ย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ดี เนื้อไม้หลังการทำลายมีสีเข้มขึ้น เชื้อรากลุ่มนี้ส่วนใหญ่อยู่ใน Division Basidiomycota มีบ้างใน Division Ascomycota (Buswell และOdier, 1987)

3. white rot fungi มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินได้ดีที่สุด (Boominathan and Reddy, 1991) ทำให้เนื้อไม้หลังการทำลายมีสีซีดลงกว่าเดิม เชื้อรากลุ่มนี้ส่วนใหญ่อยู่ใน Division Basidiomycota ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มนี้เช่น *Phanerocheate* sp. *Ganoderma* sp. *Pleurotus* sp. *Trametes* sp. เป็นต้น (Gilbertson,1980; Agosin และคณะ, 1985)

เชื้อรากลุ่มไวท์รอท (White rot fungi)

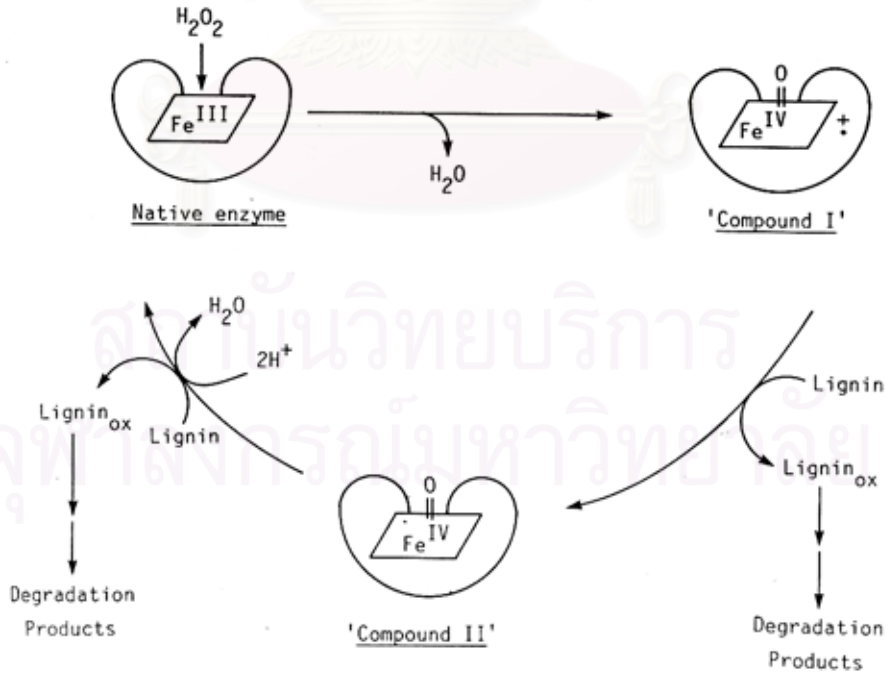
เชื้อรากลุ่มไวท์รอทมีความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน แต่ลิกนินก็ไม่ใช่สารตั้งต้นในการเจริญเติบโต การย่อยสลายลิกนินเป็น secondary metabolism จึงต้องมีการย่อยสลายเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสให้ได้กลูโคสก่อน เพื่อให้ได้พลังงานไปใช้ในการเจริญเติบโต การย่อยสลายลิกนินจะเกิดก็ต่อเมื่อมีการขาดสารอาหารบางอย่าง เช่น ไนโตรเจน (nitrogen) ซึ่งในธรรมชาติเนื้อไม้มีปริมาณไนโตรเจนที่จำกัด ทำให้สามารถเกิดการย่อยสลายลิกนินได้ และการย่อยสลายลิกนินจะหยุดก็ต่อเมื่อมีปริมาณคาร์บอน (carbon) หรือไนโตรเจนที่มากเกินในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Heinzkill และ Messner, 1997)

เชื้อรากลุ่มนี้สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนิน ได้แก่ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส เป็นต้น (Heinzkill และ Messner, 1997; Harazono และ คณะ, 1996) ซึ่งเชื้อราต่างชนิดกันจะมีการผลิตเอนไซม์ที่ต่างกัน บางชนิดอาจมีการผลิตเอนไซม์หลายชนิด หรือบางชนิดอาจมีการผลิตเอนไซม์เพียงชนิดเดียว เช่น ในปี 1992 De Jong และคณะ ได้ทำการศึกษาใน *Bjerkandera* sp. BOS55 พบว่ามีเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

และแลคเคสและในปี 1995 Heinzkill ได้ทำการศึกษาใน *Panaeolus papilionaceus* พบว่ามีเอนไซม์แลคเคสเพียงชนิดเดียว

เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase)

เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสพบครั้งแรกใน *P. chrysosporium* (Glenn และคณะ, 1983) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 41,000-42,000 ดาลตัน การเกิดปฏิกิริยาต้องการไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการเริ่มปฏิกิริยา สามารถย่อยสลายได้ทั้งสารที่เป็นหมู่ฟีนอลและไม่ใช่หมู่ฟีนอลรวมถึงสารประกอบอะโรมาติกอื่นๆที่เป็นหน่วยพื้นฐานของลิกนิน (Buswell และ Odier, 1987) กลไกการเกิดปฏิกิริยาเริ่มจากลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเปลี่ยนรูปไปเป็นสารตัวกลาง compoundI ซึ่งเป็นสารที่ไม่คงตัว จะไปออกซิไดซ์ลิกนิน แล้วเปลี่ยนรูปไปเป็น compound II เมื่อ compound II ไปออกซิไดซ์กับลิกนิน ท้ายที่สุดจะกลับสู่ภาวะปกติเป็นลิกนินเปอร์ออกซิเดสตั้งต้น (ภาพที่ 3) การเกิดปฏิกิริยาที่อาศัยเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ การกำจัดหมู่อัลคิล-เอริล (alkyl-aryl cleavage) การเปิดวงอะโรมาติก (aromatic ring cleavage) การเติมหมู่เมททิล (methylation) การเกิดโพลีเมอไรซ์เซชั่น (polymerization) ของ phenoxy radicals เป็นต้น (Tein และคณะ, 1987)

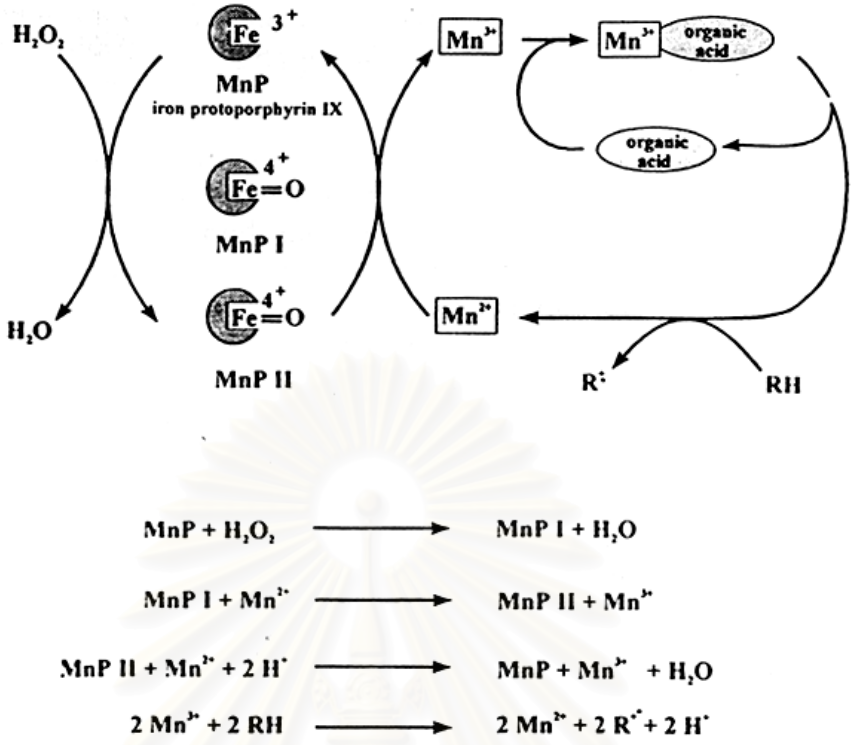


ภาพที่ 3 วัฏจักรการเกิดปฏิกิริยาของลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Buswell และ Odier, 1987)

เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase)

ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสว่ามีบทบาทที่สำคัญในการย่อยสลายลิกนินในเยื่อกระดาษ (Miura และคณะ, 1998; Harazono และคณะ, 1996) มีการค้นพบเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ครั้งแรกใน *P. chrysosporium* (Kuwahara และคณะ, 1984) เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วย heme มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 46,000 ดาลตัน การทำปฏิกิริยาจะมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแมงกานีสเป็นตัวร่วมปฏิกิริยา (Wariishi และคณะ, 1992) กลไกการเกิดปฏิกิริยาเริ่มจากแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ภาพที่ 4) ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้เป็น oxidize intermediate (MnP I) จากนั้นสารตั้งต้นตัวแรก คือ Mn^{2+} จะถูกออกซิไดซ์โดย MnP I และ MnP II เกิดเป็น Mn^{3+}หลังจากนั้น Mn^{3+}จะรวมกับโครงสร้างของกรดอินทรีย์ (organic acid) เช่น lactate malonate oxalate เป็นต้น (Harazono และคณะ, 1996) และท้ายที่สุดสารประกอบที่เกิดขึ้นจะไปออกซิไดซ์กับ phenolic substrate ได้เป็นอนุพันธ์ของ cinnamyl alcohol ต่างๆ ได้แก่ p-coumaryl alcohol coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol (Boominathan และ Reddy, 1991; Heinzkill และ Messner, 1997) เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเป็น secondary metabolite มีสมบัติในการ oxidation H_2O_2 –dependent lignin derivatives และ phenolic lignin การกำจัดหมู่อัลคิล-เฟนิล (alkyl-phenyl cleavage) และ Cα-Cβ cleavage เป็นต้น ในปี ค.ศ. 1996 Harazono และคณะ ได้ทำการสกัดแยกเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมาฟอกเยื่อกระดาษเพื่อศึกษาผลของกรดอินทรีย์ต่างๆที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส พบว่า การมีออกซาเลต (oxalate) ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้อย่างมีประสิทธิภาพ และในปี ค.ศ. 2001 Sasaki และคณะ ได้ทำการตรึงเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจาก *P. chrysosporium* ใน FSM-16 เพื่อใช้ในการฟอกเยื่อแบบ multiple pulp bleaching ร่วมกับการฟอกโดยใช้สารเคมีขั้น alkaline extraction พบว่าเยื่อกระดาษมีค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นจาก 59 เปอร์เซ็นต์เป็น 88 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเยื่อผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสซ้ำๆ 7 ครั้ง

นอกจากนี้ยังสามารถนำเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงและการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็นพิษและย่อยสลายได้ยากจากดินและในน้ำ โดยใช้สิ่งมีชีวิตพวกจุลินทรีย์ย่อยสลายสารพิษนั้นให้เป็นพิษน้อยลง (bioremediation) ทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำเป็นผลผลิตสุดท้าย นอกจากนี้ยังมีการใช้สิ่งมีชีวิตพวกจุลินทรีย์ในการกำจัดสีของน้ำเสีย (decolorization) (Matsubara และคณะ, 1996)



ภาพที่ 4 วัฏจักรการเกิดปฏิกิริยาของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Heinzkill และ Messner, 1997

เอนไซม์แลคเคส (Laccase)

เอนไซม์แลคเคส พบครั้งแรกในการทดลองของ Yoshida ปี 1883 เป็น extracellular glycoproteins ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของคอปเปอร์ (copper) ที่เรียกว่า blue copper oxidases (Thurston, 1994) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 60,000-80,000 ดาลตัน การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ที่ไม่ต้องมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวร่วมปฏิกิริยา การทำปฏิกิริยาที่อาศัยเอนไซม์แลคเคสในการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ การกำจัดหมู่อัลคิล-เฟนิล (alkyl-phenyl cleavage) และ phenolic lignindimer (Higuchi, 1990) การเติมหมู่เมททิล การกำจัดหมู่เมททอกซี่ (demethoxylation) การเกิดโพลีเมอร์ไรซ์เซชันของ phenoxy radicals และการเกิดดีโพลาไรซ์ เซชัน (depolymerization) ของ lignin substrate เป็นต้น นอกจากความสำคัญของเอนไซม์แลคเคสในการย่อยสลายลิกนิน ยังพบว่าเอนไซม์แลคเคสมีความสำคัญต่อการเกิดดอกเห็ด (Basidiocarp development) การเกิดสปอร์ การสร้างรงควัตถุในรา และการเกิดโรคของพืช (Yaver และคณะ, 1996)

เห็ดหลินจือ (Lingzhi)

เห็ดหลินจือเป็นสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต (Eukaryote) จำพวกรา อยู่ใน Division Basidiomycota มีชื่อวิทยาสตร์ว่า *G. lucidum* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญคือ ใต้หมวกเห็ดไม่มีครีบ แต่มีรูเล็กๆจำนวนมากมาย ภายในรูเป็นที่เกิดของสปอร์ด้านบนของหมวกมีสีน้ำตาลแดงหรือสีเชสนัทไปจนถึงสีน้ำตาลม่วงและดำผิวหมวกเห็ดเป็นมันเงาเหมือนเคลือบด้วยแลคเกอร์ มีก้านสั้นๆ ดอกอ่อนมีขอบสีขาว เหลือง กลางดอกสีน้ำตาล ด้านใต้หมวกซึ่งเป็นรูเล็กๆ มีสีนวล เป็นดอกเห็ดรูปร่างคล้ายพัด สปอร์เป็นผงสีน้ำตาล รูปร่างรี ปลายด้านหนึ่งตัด ผนังหนา มี 2 ชั้น ผนังชั้นนอกเรียบ ผนังชั้นในยื่นคล้ายหนามไปชนผนังชั้นนอก (สุทธพรรณ ตรีรัตน์, 2531) ดำรงชีวิตแบบ saprophyte มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual)และไม่อาศัยเพศ (asexual) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยมีการสร้าง sexual spore คือ basidiospore บน basidium ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยเกิดการหักของเส้นใยแล้วไปเจริญต่อ (fragmentation) เส้นใยของเห็ดหลินจือมีผนังกั้นเป็นแบบ dolipore septum และมี clamp connection เพื่อให้เส้นใยยังคงไว้ที่ n+n นอกจากเห็ดหลินจือเป็นเห็ดสมุนไพรมีสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคต่างๆ ของมนุษย์ (Soxe และคณะ, 1985) เห็ดหลินจือยังจัดเป็นรากลุ่มไวท์รอทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนิน โดยได้มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินในเห็ดหลิน จือ เช่นในปี พ.ศ. 2541 เรือนแก้ว ประพฤติ ได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในเห็ดหลินจือเปรียบเทียบกับ *P. chrysosporium* พบว่าในเห็ดหลินจือมีการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสต่ำกว่า *P. chrysosporium* ในทุกภาวะการทดลอง และในปี 2545 เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ในเห็ดชนิดต่างๆ พบว่าในเห็ดหลินจือมีการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสน้อยมากหรือแทบไม่มี แต่กลับพบว่ามีการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสที่สูงกว่า

การจัดจำแนกชนิดของเห็ดหลินจือเป็นดังนี้ (Alexopoulos และคณะ, 1996)

Kingdom Fungi
Division Basidiomycota
Class Hymenomycetes
Subclass Holobasidiomycetidae
Order Aphyllophorales
Family Ganodermataceae
Genus *Ganoderma*
Species *Ganoderma lucidum*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดหลินจือ (Alexopoulos และคณะ, 1996) ประกอบด้วย 2 ระยะ

1. ระยะเส้นใย

เส้นใยของเห็ดหลินจือมีสีขาว เส้นใยมีผนังกั้น เส้นใยระยะที่สองจะพบ clamp connection แต่ละเซลล์มี 2 นิวเคลียส เรียก dikaryotic mycelium เมื่อเส้นใยเจริญเต็มที่จะมีการพัฒนาเป็นตุ่มยื่นออกมาเรียก sclerotia หรือ primodia ซึ่งจะพัฒนาเป็นดอกเห็ดต่อไป

2. ระยะดอกเห็ด ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ (ภาพที่ 5)

2.1 หมวกดอก (cap)

หมวกดอกเห็ดหลินจืออาจเกิดเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 3-4 ดอก หมวกดอกที่งอกออกมาใหม่ๆ จะมีลักษณะเป็นแท่งสีเหลือง สีของหมวกดอกเห็ดจะมีสีขาว สีเหลือง และสีน้ำตาล ส่วนบนของหมวกดอกจะแผ่คล้ายพัด ถ้าหมวกดอกเจริญเต็มที่ ขอบหมวกจะงองุ้มลงสีของหมวกดอกจะเข้มมากขึ้น ผิวของหมวกดอกมีลักษณะเป็นเงามันคล้ายทาด้วยแชลแลค มีสีน้ำตาลแดง ใต้หมวกดอกมีลักษณะเป็นรูเล็กๆสีขาวหรือสีเหลืองจำนวนมาก ภายในรูเป็นแหล่งกำเนิดสปอร์ มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล สปอร์มีรูปร่างรี ปลายด้านหนึ่งตัด ผนังหนา มี 2 ชั้น ผนังชั้นนอกเรียบ ผนังชั้นในยื่นคล้ายหนามไปชนผนังชั้นนอก (ภาพที่ 5)

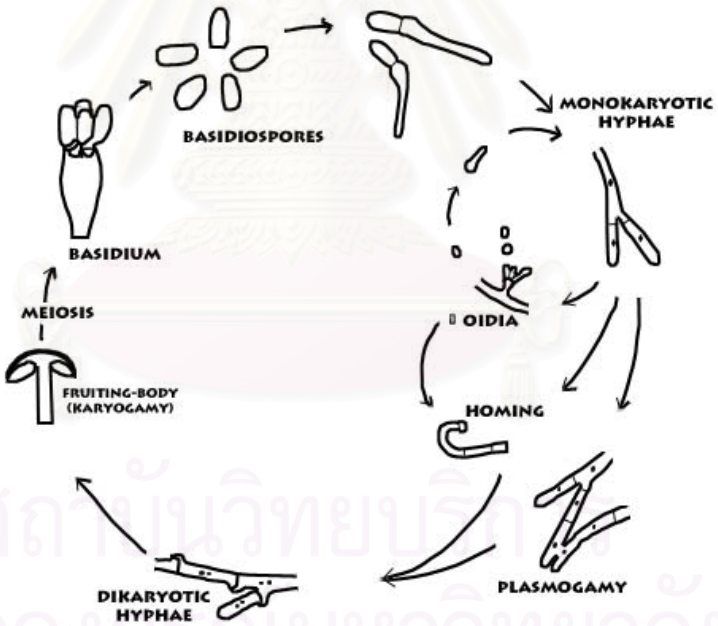
2.2 ก้านดอก (stalk)

ก้านดอกอาจมีก้านดอกหรือไม่มี ก้านดอกสั้น ก้านดอกอาจอยู่ตรงกลางหรือค่อนไปข้างใดข้างหนึ่งของหมวกดอก

<u>วงจรชีวิตของเห็ดแบบ Heterothallic Life cycle</u> (ภาพที่ 6)

เริ่มจากเบซิดิโอสปอร์งอกเส้นใยออกมาซึ่งเรียกว่า primary mycelium มีโครโมโซมเป็น haploid (n) (monokaryotic mycelium) เส้นใยที่งอกออกมานี้จะเกิดการรวมตัวกันของโพรโทพลาสซึม (plasmogamy) โดยเส้นใยที่จะรวมตัวกันต้องเป็นเส้นใยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกันมารวมกันเป็น secondary mycelium ซึ่งภายในมีสองนิวเคลียสเรียกเส้นใยระยะนี้ว่าเป็น dikaryon เส้นใยระยะนี้จะพบ clamp connection เชื่อมแต่ละเซลล์ไว้ เส้นใยขั้นที่สองจะเพิ่มปริมาณและสานกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนคล้ายเนื้อเยื่อพืชที่เรียก tertiary mycelium และเส้นใยระยะนี้จะสานกันเกิดเป็นตุ่มดอกเล็กๆ เรียกว่า sclerotia หรือ primodia มีการสร้างเบซิเดียม แต่ละเบซิเดียมจะมีนิวเคลียสอยู่สองนิวเคลียส (n+n) จากนั้นนิวเคลียสทั้งสองนิวเคลียสจะรวมตัวกันเป็น diploid (2n) และแบ่งตัวแบบ meiosis ได้ haploid (n) 4 nuclei จากนั้นเคลื่อนที่ไปอยู่ใน sterigma ทั้ง 4 และพัฒนาไปเป็นเบซิดิโอสปอร์ต่อไป

ภาพที่ 5 ดอกและสปอร์ของเห็ดหลินจือ *G. lucidum*



ภาพที่ 6 ลักษณะวงจรชีวิตของเห็ดที่เป็นแบบ Heterothallic life cycle (Norton, 1981)

มิวเตชัน (Mutation)

มิวเตชัน(mutation) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอหรือโครงสร้างของสารพันธุกรรม และการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไป โดยทั่วไปมิวเตชันสามารถเกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (spontaneous mutation) แต่มีโอกาสเกิดน้อยมากคือน้อยกว่าหนึ่งในล้านเซลล์ (Bos และ Stadier, 1996) ส่วนมิวเตชันที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation) เกิดจากมีมิวตาเจนมาชักนำให้เกิด ได้แก่

1. มิวตาเจนทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ อุณหภูมิและรังสีต่างๆ
2. มิวตาเจนทางเคมี (chemical mutagen) ได้แก่ สารเคมีต่างๆ

<u>มิวตาเจนทางกายภาพ</u>

จากที่ได้พบการเกิดมิวเตชันทางกายภาพโดยใช้รังสีเอ็กซ์ ในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) ทำให้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้รังสีต่างๆ กับสิ่งมีชีวิตตามมา (Bos และ Stadler, 1996) รังสีเป็นมิวตาเจนทางกายภาพที่สำคัญในการชักนำให้เกิดมิวเตชัน และด้วยความยาวคลื่นของรังสีที่ต่างกันทำให้มีผลต่อการชักนำให้เกิดมิวเตชันในรูปแบบที่แตกต่างกัน (Weaver และ Hedrick, 1997) สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีแอลฟา รังสีเบตา เป็นต้น รังสีเหล่านี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงสูง โดยทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อต่างๆ และทำให้อิเล็คตรอนที่เรียงอยู่วงนอกสุดในโครงสร้างอะตอมหลุดออกไปทำให้ไอออนเกิดเป็นประจุบวกส่วนอิเล็คตรอนที่หลุดออกมานี้จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงไปชนอะตอมอื่นๆ จนพลังงานของอิเล็คตรอนลดลง จากการเกิดประจุบวกและลบทำให้ต้องเกิดปฏิกิริยาเคมีทำให้มีประจุเป็นกลาง เพื่อให้โครงสร้างของอะตอมคงที่ ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นมีผลให้เกิดมิวเตชัน เช่น ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมและโครมาติด โดยบริเวณที่แตกหักนี้จะเกี่ยวข้องกับส่วนที่ต่อกันของน้ำตาล และหมู่ฟอสเฟตของสายโพลีนิวคลีโอไทด์ ทำให้เกิด deletion และ insersion

2. รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (nonionizing radiation) ได้แก่ แสงอัลตราไวโอเลต รังสีประเภทนี้จะไม่ก่อให้เกิดไอออนตามทางที่เคลื่อนผ่าน เนื่องจากมีอำนาจในการทะลุทะลวงต่ำกว่ารังสีประเภทแรก ทำให้เกิด substition

มิวตาเจนทางเคมี

เป็นการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้สารเคมีต่างๆ (Moore และ Frazer, 2002) ดังนี้

1. สารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบส (base analogues) เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสบางตัวในสายดีเอ็นเอ สามารถเข้าไปแทนที่ได้ จึงทำให้สายดีเอ็นเอมีสารเคมีนั้นเมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (replication) จึงทำให้มีการเข้าคู่แบบสุ่ม สายดีเอ็นเอที่ได้จึงผิดไปจากเดิม สารเคมีชนิดนี้ เช่น 5-bromouracil ที่มีโครงสร้างคล้ายกับเบสไทมีน (thymine) และ 2-aminopurine ที่มีโครงสร้างคล้ายกับเบสอะดีนีน (adenine) เป็นต้น

2. สารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเบส (base modifying agent) ได้แก่ nitrous acid ซึ่งทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายกลุ่มอะมิโน (amino group) ของเบสไซโทซีน (cytosine) ออกไปแล้วเปลี่ยนเป็นกลุ่มคีโตแทน (keto group) ทำให้เบสเปลี่ยนจากไซโทซีนเป็นยูราซิล (uracil) และไฮดรอกซีลามีน (hydroxylamine) ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนกลุ่มอะมิโน (amino group) ของเบสไซโทซีน (cytosine) เป็นกลุ่มไฮดรอกไซด์แทน (NOH group) ทำให้เบสเปลี่ยนจากไซโทซีนเป็นไฮดรอกซิลอะมิโนไซโทซีนแทน (hydroxylaminocytosine) เป็นต้น

3. สารเคมีที่ทำให้เกิดการขาดหายไปหรือเพิ่มนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอ (intercalating agent) สารกลุ่มนี้ได้แก่ proflavin และ acridine dye (Drake, 1970) โดยสารพวกนี้จะแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างเบสของสายดีเอ็นเอ เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทำให้การอ่านลำดับเบสผิดปกติซึ่งอาจเกิดการขาดหายไปหรือเพิ่มของเบส

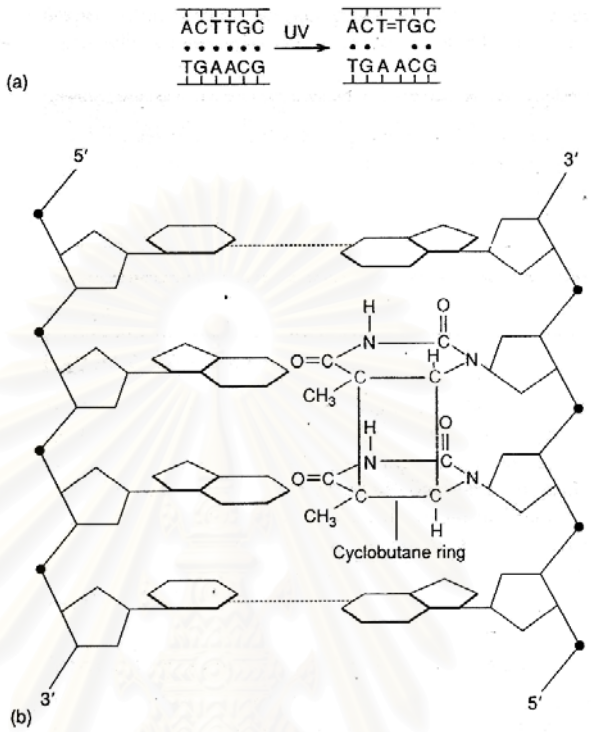
การชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

การชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตนิยมใช้กันมากในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Drake, 1970) เพราะง่ายและสะดวกในการชักนำ แสงอัลตราไวโอเลตเป็นแสงที่มีอำนาจทะลุทะลวงต่ำไม่ก่อให้เกิดไอออนตามทางที่เคลื่อนผ่าน (nonionizing radiation) มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 40-400 นาโนเมตร โดยดีเอ็นเอจะดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตสูงสุดที่ 254 นาโนเมตร พลังงานที่ดูดกลืนไว้สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงพันธะของเบสเพียวรีนและไพริมิดีน แต่พบว่าจะมีผลต่อไพริมิดีนมากกว่าเบสเพียวรีน 10-100 เท่า แสงอัลตราไวโอเลตมีผลต่อไพริมิดีน ดังนี้

1. ทำให้เกิดปฏิกิริยา hydrolysis ในไซโทซีนทำให้ไม่สามารถจับกับกวานีน (guanine) ได้ตามปกติ การจับคู่เบสจึงผิดพลาดและทำให้เกิดมิวเตชัน

2. ทำให้เกิด thymine dimer (ภาพที่ 7)โดยเบสไทมีน 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันบนสายโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) สายเดียวกันของโมเลกุลดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ทำให้ไม่สามารถจับคู่กับอะดีนีนของสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ตรงข้ามได้ นอกจากนี้ยังสามารถเกิด

cytosine dimer ได้และมีผลให้เกิดมิวเตชันได้เช่นเดียวกัน แสงอัลตราไวโอเลตเมื่อใช้ในอัตราที่สูงสามารถฆ่าสิ่งมีชีวิตได้ แต่ถ้าใช้ในอัตราที่ไม่สูงเกินไปจะกระตุ้นให้เกิดมิวเตชัน (Weaver และ Hedrick, 1997)



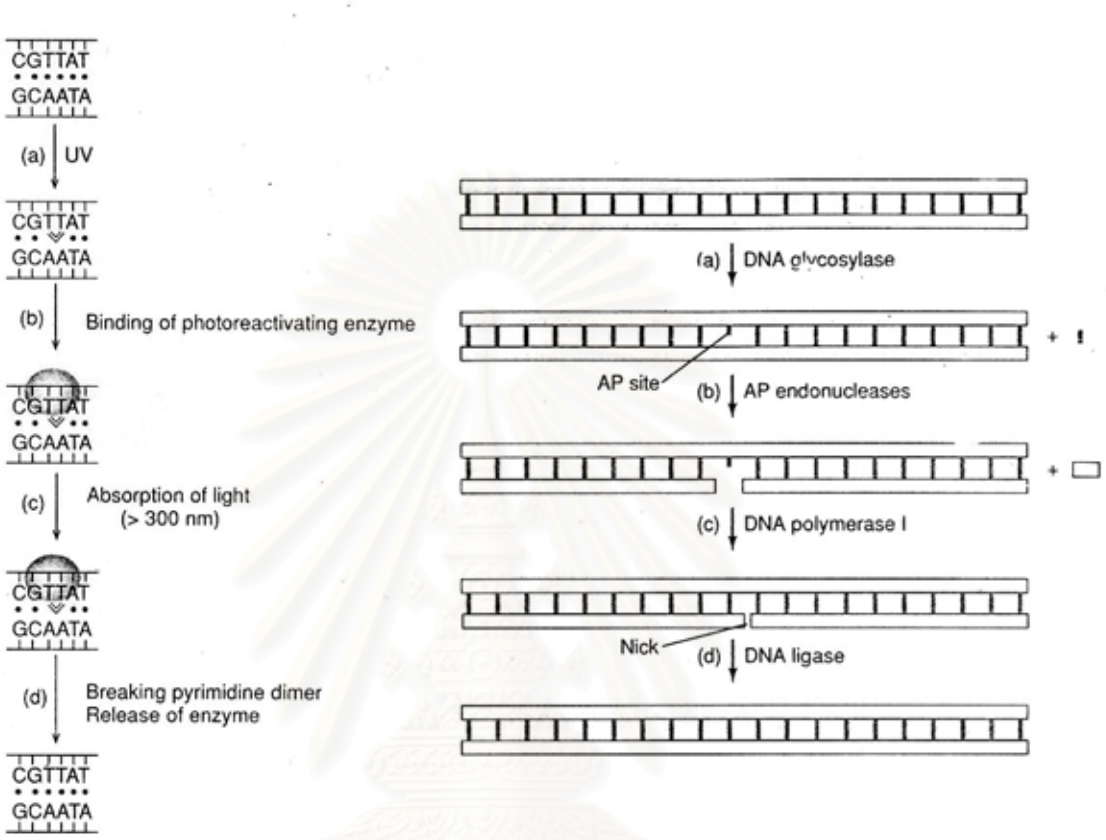
ภาพที่ 7 การเกิด Thymine dimer (a) เมื่อได้รับแสงอัลตราไวโอเลต และ(b) เกิดการเชื่อมเป็น (cyclobutane ring) (Weaver และ Hedrick, 1997)

กระบวนการซ่อมแซม (repair) ของ thymine dimer

การเกิดมิวเตชันโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต ทำให้เกิด thymine dimer ในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ ดังนั้นการที่จะสามารถอยู่รอดได้จึงต้องมีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอต่างๆ (Frfifelder, 1978) แบ่งได้ดังนี้

1. กลไกที่ต้องใช้แสง (photoreactivation) (Drake, 1970) เป็นกระบวนการซ่อมแซมความผิดปกติของโมเลกุลดีเอ็นเอเมื่อเกิด thymine dimer โดยเอนไซม์ photoreactivating หรือ เอนไซม์ DNA photolyase จะไปเกาะที่ตำแหน่งที่เกิด thymine dimer เมื่อเอนไซม์ดูดซับแสง (visible light) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เอนไซม์เข้าทำลายพันธะที่ยึดระหว่างไทมีนทำให้ไทมีน สามารถเข้าคู่กับอะดีนีนสายตรงข้ามได้เหมือนเดิม (ภาพที่ 8) ดังนั้นในการชักนำโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต จึงต้องระวังไม่ให้ target cell ที่จะชักนำให้เกิดมิวเตชันได้รับแสงในทันที

2. กลไกที่ไม่ต้องใช้แสง (dark repair) หรือ excision repair เป็นกระบวนการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ผิดปกติทั่วไป โดยมีการตัดส่วนของดีเอ็นเอที่ผิดปกติโดยใช้เอนไซม์ต่างๆ และมีการสร้างส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกต้องแทนส่วนที่ตัดออกไป cut-patch-cut-seal (ภาพที่ 8)



(a) (b)

ภาพที่ 8 กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (a) photoreactivation และ (b) excision repair (Weaver และ Hedrick, 1997)

ในการทำงานวิจัยที่เกี่ยวกับการชักนำให้เกิดมิวเตชันต้องมีการทำ survival curve ก่อนเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำ survival curve เป็นการศึกษาความสามารถในการมีชีวิตอยู่รอดและเจริญเติบโตต่อไปได้ ในเชื้อราการชักนำให้เกิดมิวเตชันมักใช้เซลล์เดี่ยว โดยอาจทำ สารละลายสปอร์ (spore suspension) เช่น ในปี 1981 Hayashida และ Flor ทดลองการลดลงของ protease activity ใน *Aspergillus awamori* var. kawashi โดยนำสารละลายสปอร์มาชักนำในสาร NTG และนำมาฉายแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าสายพันธุ์มิวแตนท์ HF-15 มี protease activity ลดลงถึง 93 % ในขณะที่ สายพันธุ์มิวแตนท์ HF-10 มี protease activity เพิ่มขึ้นถึง 5 เท่าเมื่องเทียบกับสายพันธุ์เดิม ในปี 1982 Gold และคณะ ทำการคัดแยก auxotrophic mutants สายพันธุ์ต่างๆ ของ

P. chrysosporium โดยนำสารละลายสปอร์ไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตและรังสีเอกซ์ โดยให้มีอัตราการอยู่รอด 10 % พบว่าได้ 33 มิวแตนท์ และเมื่อนำไปทำการย้อมพบว่าเป็นทั้ง mono-, di-, และ multinucleate ในปี 1990 Boominathan และคณะ ทำการแยกและศึกษาลักษณะของ lignin peroxidase negative mutant โดยใช้สารละลายสปอร์นำมากวนในน้ำและฉายแสงอัลตราไวโอเลต พบว่า lip mutant ไม่ผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดส แต่ยังคงมีการผลิตแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและกลูโคสออกซิเดส และในปี 1994 Kuhad และคณะ ได้ผลิต hypercellulolytic mutant จาก *Fusarium oxysporum* โดยนำสารละลายสปอร์มาฉายแสงอัลตราไวโอเลต พบว่า สายพันธุ์มิวแตนท์ UV-11 มีการผลิตเอนไซม์และมี % hydrolysis เพิ่มขึ้นมากกว่าสายพันธุ์เดิม ส่วนการชักนำโดยใช้สารละลายโปรโตพลาส (protoplast suspension) เช่น ในปี 1986 Mukherjee และ Sengupta ชักนำให้เกิดมิวเตชันใน *volvariella volvacea* โดยนำสารละลายโปรโตพลาสมาฉายแสงอัลตราไวโอเลต ได้ morphological mutant 4 ชนิด และ auxotrophic mutant 1 ชนิด และในปี 1995 Addleman และคณะ ได้ผลิตและศึกษาลักษณะของ *Trametes versicolor* mutant ที่ไม่สามารถฟอกเยื่อได้ โดยใช้สารละลายโปรโตพลาสของ monokaryotic strain 52j มาฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยให้มีอัตราการอยู่รอดเป็น 1% แล้วนำมาคัดเลือกบนอาหารที่มี guaiacol และเลือกโคโลนีที่ไม่มีการเกิดวงสีน้ำตาลแดง มาวัดแอคติวิตี พบว่าสายพันธุ์มิวแตนท์ M49 ไม่เกิดวงสี ไม่ผลิตแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แต่มีแลคเคสต่ำ และไม่มีความสามารถในการฟอกเยื่อกระดาษให้ขาวขึ้น และการชักนำโดยใช้สารละลายเซลล์เดี่ยว เช่น ในปี 1991 Li และ Chang ได้ทำการคัดเลือกและศึกษาลักษณะต่างๆ ในสายพันธุ์มิวแตนท์ของ *V. volvacea* ที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลต (crystal-violet) และมาลาไชท์กรีน (malachite-green) โดยนำเบซิดิโอสปอร์และเส้นใยที่บดละเอียดมาฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่อัตราการตาย 95-99.5% และมีการทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์มิวแตนท์ว่ายังสามารถเจริญและย้อมสีได้หรือไม่ และในปี 2542 ชาลินี คงสวัสดิ์ ได้ทำการชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG003 และ MUG004 โดยนำสารละลายเซลล์เดี่ยวที่ได้จากการนำเส้นใยมาบดด้วย homogenizer มาฉายแสงอัลตราไวโอเลต ทำให้ได้สายพันธุ์ที่มีปริมาณโพลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงกว่าเดิม การคัดเลือกมิวแตนท์มีหลายแบบ ได้แก่ Morphological mutants Resistance mutants Auxotrophic mutants Substrate utilizers และ Revertants (Brown, 1992) สามารถเลือกใช้ตามความเหมาะสมของงานวิจัย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscopes) รุ่น Wilover S (Hund, Germany)
2. เครื่องกระจายเยื่อ (Mavis engineering Ltd., London, England)
3. เครื่องเขย่าแบบธรรมดา ศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น TC205 (Denver Instrument Company, U.S.A.)
5. เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลท (UVItec CROSSLINKER) รุ่น CL-508 (ขนาดหลอดUV 5W จำนวน 8 หลอด) (Bio-active Co., Ltd., England)
6. เครื่องบดอย่างละเอียด (homogenizer) รุ่น Vertis Model 23 (VirTis Company, U.S.A.)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Servall refrigerated-automatic) (Ivan Servall, INC., Norwalk, Connecticut, U.S.A.)
8. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น 8453 (Hewlett Packard)
9. เครื่องวัดความขาวสว่าง Elrepho 2000 (Datacolor Ltd., Switzerland)
10. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น ion analyzer255 (Corning, U.S.A.)
11. เครื่องวัดค่าความอุ้มน้ำของเยื่อ (Freeness tester)
12. เครื่องวัดความต้านทานแรงดึงแบบ pendulum (Toyoseidi Tyoseisaka-SHO. Ltd., Tokyo, Japan.)
13. เครื่องวัดแรงฉีกขาด (Appita Elmendorf, Amityville, Newyork, U.S.A.)
14. เครื่องวัดแรงดันทะลุ (Testing machine Inc., Amityville, Newyork, U.S.A.)
15. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Binder)
16. ตู้อบ (oven) (Clayson, New Zealand)
17. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Stream sterilizer/ Autoclave) (Ta Chang Medical instrument Factory, Taiching, Taiwan)
18. Objective micrometer (Nikon, Japan.)
19. อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ของบริษัท Brand, Germany

เคมีภัณฑ์

เคมีภัณฑ์สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง PDA (potato dextrose agar) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
2. อาหารเหลว PDB (potato dextrose broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
3. กรดฟูมาริค (Fumaric acid) ($C_4H_4O_4$) (MAY&BAKER LTD. Ltd., Dagenham, England)
4. ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) (MAY&BAKER LTD. Ltd., Dagenham, England)
5. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Carlo Erba, Milan, Italy.)
6. ดี-กลูโคส (D-glucose) (Sigma Chemical, St. Louis, Mo. U.S.A.)
7. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Scharlau Chemic, Barcelona, Spain.)
8. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) (Carlo Erba, Milan, Italy.)
9. แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) (Merck, Germany)
10. แอล-แอสพาราจีน (L-asparagine) ($C_4H_8N_2O_3$) (Sigma Chemical, St. Louis, MO. U.S.A.)
11. ไอรออนทรีซัลเฟต ($Fe_2(SO_4)_3$) (MAY&BAKER LTD. Ltd., Dagenham, England)
12. Guaiacol ($C_7H_8O_2$) (Fluka)
13. เยื่อกระดาษยูคาลิปตัสจากบริษัทสยามเซลลูโลส จำกัด ตำบลวังศาลา อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี

เคมีภัณฑ์สำหรับวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

1. 2,6 ไดเมททอกซีฟีนอล (2,6 Dimethoxyphenol) (Fluka)
2. โซเดียมทาร์เทรต (Na tartrate) (Carlo Erba, Milan, Italy.)
3. แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) (Merck, Germany.)
4. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Merck, Germany)

เคมีภัณฑ์สำหรับวัดค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อ

1. โปแตสเซียมเปอร์มังกาเนต ($KMnO_4$) (Carlo Erba,Milan,Italy)
2. โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) (Carlo Erba, Milan, Italy)
3. โปแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) (Carlo Erba, Milan, Italy)
4. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) (Carlo Erba, Milan, Italy)
5. แป้ง (starch)

เคมีภัณฑ์สำหรับคัดเลือกมิวแตนท์

คริสตัลไวโอเลต (crystalviolet) (Merck, Germany.)
คีโตโคนาโซล 200 มิลลิกรัมต่อเม็ด (Ketoconazole) (Biolab, Thailand)

เชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เห็ดหลินจือจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 8 สายพันธุ์ ได้แก่ MUG001 MUG002 MUG003 MUG004 MUG005 และ MUG006 MUGK และ MUGS

วิธีดำเนินการวิจัย

1. **การคัดเลือกสายพันธุ์ต่าง ๆของเห็ดหลินจือที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสสูงสุดและต่ำสุดขั้นต้น**

นำเส้นใยเห็ดหลินจือทั้ง 8 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ MUG001 MUG002 MUG003 MUG004 MUG005 MUG006 MUGK และ MUGS มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยแต่ละสายพันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่มี guaiacol 0.015 % (v/v) (Addleman และคณะ,1995) ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส (^0C) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ วัดการเจริญของเส้นใยและการเกิดวงสีรอบเส้นใยทุกวันเป็นเวลา 4 วัน โดยลากเส้นตั้งฉากกันบน petridish แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 2 แนว (ภาคผนวก ก) นำมาหาอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีเฉลี่ย โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีอัตราส่วนเฉลี่ยต่ำสุดและสูงสุดมาทำการทดลองต่อไป นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดย

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT)

2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคส

2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยในอาหารเหลว PDB

นำเส้นใยเห็ดหลินจือ ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เจาะเส้นใย 2 แว่นนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการจดบันทึกน้ำหนักแห้งของเส้นใยเฉลี่ยทุก 2 วัน เป็นเวลา 20 วัน ชั่งน้ำหนักแห้งโดยนำเส้นใยมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ด้วยเครื่องกรองระบบสูญญากาศ แล้วนำเส้นใยไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงในตู้อบจนน้ำหนักแห้งของเส้นใยคงที่ นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟเพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อ

2.2 ศึกษาภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เตรียมอาหารสูตร production (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกและมีค่าความขาวสว่างเริ่มต้นเท่ากับ 48.60 เปอร์เซ็นต์ และค่าคัปปานัมเบอร์เริ่มต้นเท่ากับ 11.17 จำนวน 6.25 กรัมลงไป จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในแต่ละขวดทดลองด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ให้ได้ระดับความเป็นกรด-ด่างที่ต้องการคือ 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น นำหัวเชื้อเห็ดหลินจือที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 มาถ่ายลงในอาหารสูตร production บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในภาวะนิ่งเป็นเวลา 7 วัน ทำการเขย่าเชื้อให้กระจายทุก 3 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างของเหลวโดยการบีบคั้นเส้นใยและเยื่อกระดาษผ่านผ้าขาวบาง แล้วนำของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนที่เป็นสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร แล้วนำผลไปคำนวณค่า Unit of enzyme ตามวิธีดัดแปลงของ Tein และ Kirk ในปี

1988 (ภาคผนวก ข) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยของหน่วยเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เพื่อหาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-RangeTest (DMRT)

2.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เตรียมอาหารสูตร production เหมือนในข้อ 2.2 จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอาหารสูตร production ให้เท่ากับภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์จากข้อ 2.2 นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น นำหัวเชื้อเห็ดหลินจือที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 มาถ่ายลงในอาหาร production ทำการศึกษาที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียสในภาวะนิ่ง เป็นเวลา 7 วัน ทำการเขย่าเชื้อให้กระจายทุก 3 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างของเหลว นำส่วนที่เป็นสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำผลไปคำนวณค่า Unit of enzyme เหมือนในข้อ 2.2

2.4 ศึกษาระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เตรียมอาหารสูตร production เหมือนในข้อ 2.2 จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอาหารสูตร production ให้เท่ากับภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์จากข้อ 2.2 นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น นำหัวเชื้อเห็ดหลินจือที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 มาถ่ายลงในอาหารสูตร production บ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ จากข้อ 2.3 ในภาวะนิ่ง เป็นเวลา 4 7 11 และ 14 วัน ทำการเขย่าเชื้อให้กระจายทุก 3 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างของเหลว แล้วนำของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง และเก็บส่วนที่เป็นสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำผลไปคำนวณค่า Unit of enzyme เหมือนในข้อ 2.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. **การทำ** minimum inhibitory concentrations **เพื่อหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของคริสตัลไวโอเลตและคีโตโคนาโซลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเห็ดหลินจือเพื่อเป็น** mutation marker

นำเส้นใยเห็ดหลินจือที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่มีคริสตัลไวโอเลตและคีโตโคนาโซลที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 20 40 60 80 100 120 และ 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดการเจริญของเส้นใยเปรียบเทียบกับ control เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ เลือกความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ต่อไป

4. **การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลต**

4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการทำเส้นใยให้เป็นเซลล์เดี่ยว

4.1.1 ใช้วิธีบดอย่างละเอียดด้วย homogenizer

นำเส้นใยเห็ดหลินจือที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.68 มิลลิเมตร เจาะเส้นใย 1 แว่นไปเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน flask 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 6 และ 8 วัน เก็บเส้นใยมาบดอย่างละเอียดด้วย homogenizer ที่ความเร็ว 2,300 4,600 และ 6,900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 15 และ 20 นาที (ขณะบดต้องเอาน้ำแข็งมาหล่อถ้วยเพื่อไม่ให้เครื่องร้อนเกินไป) จากนั้นนำมากรองผ่านผ้ากรองขนาดรู 50 ไมครอน (μ) และนับจำนวนเซลล์เดี่ยวโดยใช้ อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) (ภาคผนวก ก) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

4.1.2 ใช้วิธีตัดเซลล์เดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำเส้นใยเห็ดหลินจือที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เมื่อเส้นใยมีอายุประมาณ 3 วัน นำเส้นใยมาตัดด้วยมีดผ่าตัด โดยจะเลือกตัดเส้นใยที่ส่วนปลายด้านนอกของโคโลนี แล้วจึงใช้มีดผ่าตัดลากเส้นใยออกให้ห่างจากโคโลนี (ขณะลากเส้นใยควรมีส่วนของเส้นใยที่ยังอยู่บนอาหารแข็ง PDA) เพื่อความสะดวกในการย้ายเส้นใยที่เป็นเซลล์เดี่ยวไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ต่อไปเมื่อตัดเส้นใยเซลล์เดี่ยวที่เหมาะสมได้แล้วให้ทำการจับเวลาเพื่อหาระยะเวลาที่เส้นใยเซลล์เดี่ยวนั้นเริ่มแบ่งตัวอีกครั้ง ทำการตัดเส้นใยเป็นเซลล์เดี่ยวสายพันธุ์ละ 20 เซลล์

4.2 การทำ survival curve เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

นำเส้นใยที่ตัดเป็นเซลล์เดี่ยว (จากข้อ 4.1.2) มาเลี้ยงบน PDA แล้วนำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลา 0 1 2 และ 3 นาที และ 0 10 20 30 40 50 60 และ 70 วินาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5-7 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น นำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ฉายแสงกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

5. การชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลทในเห็ดหลินจือและการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์

ย้ายเส้นใยเซลล์เดี่ยวมาไว้บนอาหารแข็ง PDA จำนวน 10 เซลล์ นำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลา 10 20 30 40 50 และ 60 วินาที ทำการทดลอง 3 ชุดการทดลอง แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5-7 วัน นำโคโลนีสายพันธุ์มิวแตนท์มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่มี mutation marker ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ในสายพันธุ์เดิม จากข้อ 3 เลือกโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสขั้นต้นโดยนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่มี guaiacol 0.015% (v/v) เหมือนในข้อ 1 ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 5 ซ้ำ วัดการเจริญของเส้นใยและการเกิดวงสีรอบเส้นใยทุกวันเป็นเวลา 4 วัน นำมาหาอัตราส่วนเฉลี่ยการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสี และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีอัตราส่วนเฉลี่ยน้อยที่สุดมาทำการทดสอบความเสถียร แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-RangeTest (DMRT)

6. การทดสอบความเสถียรของเห็ดหลินจือสายพันธุ์มิวแตนท์

นำเส้นใยเห็ดหลินจือสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้จากข้อ 5 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA 5 ครั้ง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA อีก 5 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปทดสอบความต้านทานบนอาหารแข็ง PDA ที่มี mutation marker ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ในสายพันธุ์เดิม จากข้อ 3 และความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสขั้นต้นเหมือนในข้อ 1 อีกครั้งหนึ่ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely

Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-RangeTest (DMRT)

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม

นำสายพันธุ์มิวแตนท์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 6 มาศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคส (ในข้อ 2) โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์เดิมมาเปรียบเทียบ ทำการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุด โดยนำผลที่ได้ไปคำนวณค่า Unit of enzyme ตามวิธีดัดแปลงของ Tein และ Kirk ในปี 1988 (ภาคผนวก ข) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยของหน่วยเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสายพันธุ์เดิมกับสายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดโดยวิธี Duncan's New Multiple-RangeTest (DMRT)

8. การฟอกเยื่อกระดาษด้วย crude enzyme ของสายพันธุ์มิวแตนท์

8.1 การฟอกเยื่อกระดาษ

เลือกสายพันธุ์มิวแตนท์จากข้อ 7 ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์สูงที่สุดมาทำการเตรียม crude enzyme (ภาคผนวก ข) เพื่อนำไปใช้ในการฟอกเยื่อ ทำการทดลอง 2 ชุดเพื่อเปรียบเทียบ คือ ชุดควบคุมเป็นเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสที่ไม่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์และเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์ของสายพันธุ์มิวแตนท์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 12.5 IU ต่อกรัมแห้งของเยื่อกระดาษ (oven dry:OD) แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิระหว่าง 45-50 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที จากนั้นนำเยื่อกระดาษมากรองแล้วล้างเยื่อกระดาษด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง ผึ่งลมให้แห้ง นำเยื่อมาหาความชื้น (moisture content) โดยนำเยื่อกระดาษที่ผึ่งลม (air dry:AD) 1 กรัมไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนัก (oven dry:OD) เพื่อหาส่วนต่างของน้ำหนัก ทำ 2 ซ้ำ

8.2 การตรวจสอบสมบัติของกระดาษ

ชั่งเยื่อกระดาษที่ได้จากข้อ 8.1 มา 30 กรัม (OD) นำไปทำการขึ้นแผ่น (handsheet) ตามวิธีการของ TAPPI T205 sp-95 (TAPPI, 1995) (ภาคผนวก ค) แล้วนำไปตรวจสอบสมบัติต่างๆ ตามวิธีการของ TAPPI (ภาคผนวก ค) ดังนี้

1. ทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ (Freeness T227 om-94) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ
2. วัดค่าความขาวสว่าง (Brightness T452 om-92) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ
3. ทดสอบค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อ (Kappa number T236 cm-85)
4. ทดสอบความต้านทานการฉีกขาดของกระดาษ (Tearing strength T414 om-88) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ
5. ทดสอบความต้านทานแรงดันทะลุ (Bursting strength T403 om-91) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ
6. ทดสอบความต้านทานแรงดึง (Tensile strength T404cm-92) (TAPPI,1995.) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ

โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบของเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์กับค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบของเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก แล้วจึงนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-RangeTest (DMRT)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ต่าง ๆของเห็ดหลินจือที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสสูงสุดและต่ำสุดขั้นต้น

เมื่อนำเส้นใยเห็ดหลินจือทั้ง 8 สายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่มี guaiacol 0.015 % (v/v) (ภาพที่ 9) และทำการวัดการเจริญของเส้นใยเทียบกับการเกิดวงสีทุกวันเป็นเวลา 4 วัน จากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสขั้นต้นสูงสุดคือสายพันธุ์ MUGS คือมีอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีเฉลี่ยต่ำที่สุดเท่ากับ 0.651 และสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสขั้นต้นต่ำสุดคือสายพันธุ์ MUG 001 คือมีอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 0.808 (ตารางที่ 1) และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติหาค่าความแปรปรวนพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 15-18, ภาคผนวก ง) ดังนั้นจึงนำ 2 สายพันธุ์นี้มาทำการศึกษาต่อไป

ภาพที่ 9 การเจริญของเส้นใยกับการเกิดวงสีของเห็ดหลินจือทั้ง 8 สายพันธุ์บนอาหารแข็ง PDA ที่มี guaiacol 0.015 % (v/v)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีบนอาหารแข็ง PDA ที่มี guaiacol 0.015 % (v/v) ในเห็ดหลินจือ 8 สายพันธุ์

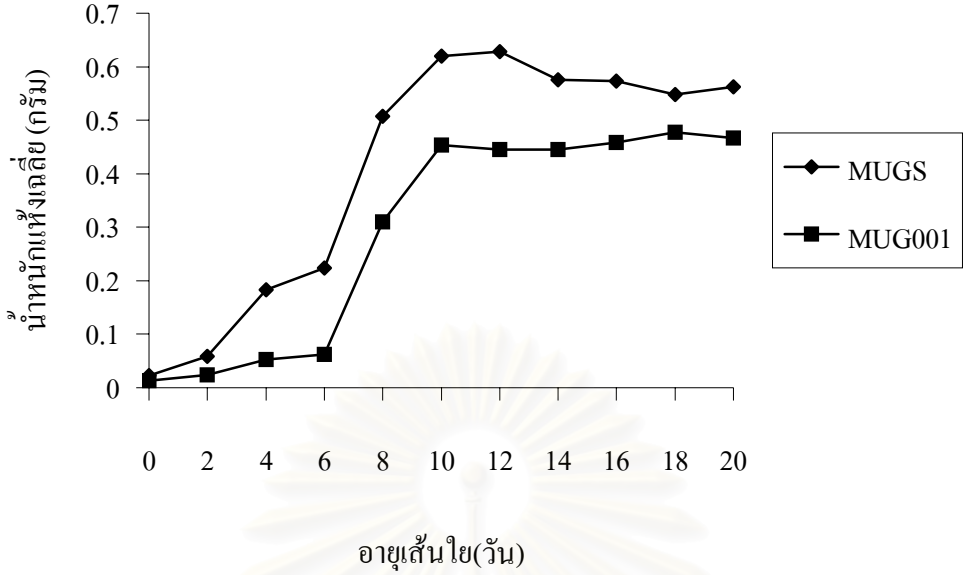
สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสี				เฉลี่ย
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	
MUG 001	0.603	0.867	0.888	0.875	0.808[a]
MUG 002	0.615	0.667	0.763	0.882	0.732[b]
MUG 003	0.637	0.819	0.739	0.781	0.744[b]
MUG 004	0.580	0.702	0.775	0.905	0.740[b]
MUG 005	0.561	0.693	0.821	0.875	0.737[b]
MUG 006	0.477	0.765	0.799	0.942	0.746[b]
MUGK	0.531	0.611	0.759	0.852	0.688[c]
MUGS	0.537	0.544	0.705	0.819	0.651[c]

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันหมายถึงอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีเฉลี่ยแต่ละสายพันธุ์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคส

2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยในอาหารเหลว PDB

เมื่อนำเส้นใยเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUGS และสายพันธุ์ MUG 001 มาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB และนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟการเจริญเติบโตของเส้นใยทำให้ทราบอัตราการเจริญเติบโตและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อ คือเส้นใยเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 มีการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase เมื่อเข้าสู่วันที่ 10 โดยน้ำหนักแห้งของเส้นใยจะมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 0.4532 กรัม และเริ่มลดลงจนคงที่ (ภาพที่ 10) ส่วนเส้นใยเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUGS มีการเจริญเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 12 โดยน้ำหนักแห้งของเส้นใยจะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 0.6283 กรัม และเริ่มคงที่ ดังนั้นจึงเลือกเส้นใยเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 เมื่อมีอายุ 10 วันมาเตรียมหัวเชื้อ และเลือกเส้นใยเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUGS เมื่อมีอายุ 12 วันมาเตรียมหัวเชื้อ



ภาพที่ 10 การเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 และสายพันธุ์ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 20 วัน

2.2 ศึกษาภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

จากผลการศึกษาภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสของเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS พบว่าสายพันธุ์ MUG 001 มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดเมื่อเจริญในอาหารที่มี pH 3 คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.000079 U/ml (ตารางที่ 2) และมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดที่ pH 5 คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.00124 U/ml ส่วนสายพันธุ์ MUGS มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดที่ pH 3 คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.000055 U/ml และมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดเมื่อเจริญในอาหารที่มี pH 5 คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.0014 U/ml เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 19-22, ภาคผนวก ง) ดังนั้นจึงเตรียมอาหารสูตร production ที่ระดับ pH 3 ในการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสทั้ง 2 สายพันธุ์ต่อไป และเตรียมอาหารสูตร production ที่ระดับ pH 5 ในการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสทั้ง 2 สายพันธุ์ต่อไป

ตารางที่ 2 ค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสใน เห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 และสายพันธุ์ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ที่ระดับ pH ต่างๆ

ระดับ pH	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml)			
	MUG 001		MUGS	
	MnP	Lac	MnP	Lac
3.0	0.000079	0.00014	0.000055	0.00018
4.0	0.000000	0.00021	0.000000	0.00011
5.0	0.000000	0.00124	0.000000	0.00140
6.0	0.000000	0.00013	0.000000	0.00090
7.0	0.000000	0.00019	0.000000	0.00110

2.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

จากผลการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสของเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS พบว่าสายพันธุ์ MUG 001 มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.00008 u/ml (ตารางที่ 3) และมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.0013 u/ml ส่วนสายพันธุ์ MUGS มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.00012 u/ml และมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.0016 u/ml เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 23-26, ภาคผนวก ง) ดังนั้นจึงเตรียมอาหารสูตร production ที่ระดับ pH 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในการศึกษาระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสทั้ง 2 สายพันธุ์ต่อไป และเตรียมอาหารสูตร production ที่ระดับ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในการศึกษาระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสทั้ง 2 สายพันธุ์ต่อไป

ตารางที่ 3 ค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 และสายพันธุ์ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 และ pH 5 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (^{0}C)	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml)			
	MUG 001		MUGS	
	MnP	Lac	MnP	Lac
25	0.00008	0.000900	0.000120	0.00110
30	0.00000	0.001300	0.000000	0.00160
35	0.00000	0.000034	0.000000	0.00061
40	0.00000	0.000008	0.000013	0.00004

2.4 ศึกษาระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

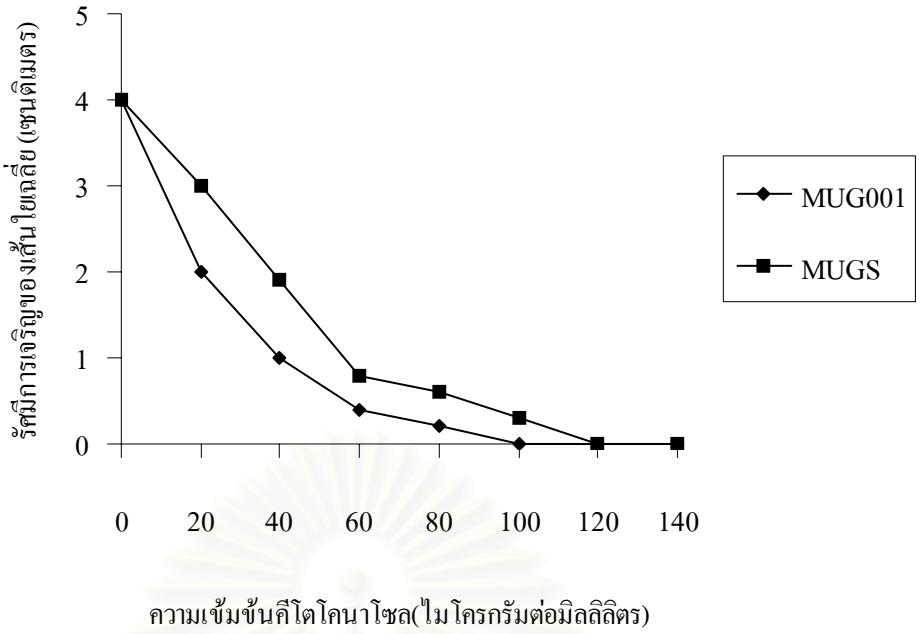
จากผลการศึกษาระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสของเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS พบว่าสายพันธุ์ MUG 001 มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดที่ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 7 วัน คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.000034 u/ml (ตารางที่ 4) และมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดที่ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 11 วัน คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.00087 u/ml ส่วนสายพันธุ์ MUGS มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดที่ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 7 วัน คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.000057 u/ml และมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดที่ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 11 วัน คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.00094 u/ml เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 27-30, ภาคผนวก ง) ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส คือ pH 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 7 วัน ส่วนภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคส คือ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 11 วัน จึงนำภาวะที่เหมาะสมนี้ไปใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ระหว่างสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิมต่อไป

ตารางที่ 4 ค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 และสายพันธุ์ MUGS ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และระดับ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ (วัน)	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml)			
	MUG 001		MUGS	
	MnP	Lac	MnP	Lac
4	0.000000	0.00010	0.000000	0.00011
7	0.000034	0.00048	0.000057	0.00061
11	0.000000	0.00087	0.000034	0.00094
14	0.000000	0.00012	0.000000	0.00010

3. **การทำ** minimum inhibitory concentrations **เพื่อหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของคริสตัลไวโอเลตและคีโตโคนาโซลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเห็ดหลินจือเพื่อเป็น** mutation marker

เมื่อนำเส้นใยทั้ง 2 สายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่มีคริสตัลไวโอเลตและคีโตโคนาโซลที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่ายังมีการเจริญเติบโตของเส้นใยทั้ง 2 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่มีคริสตัลไวโอเลต คือไม่สามารถยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่มีคีโตโคนาโซลพบว่ามีการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ MUGS ในอาหารที่มีคีโตโคนาโซลความเข้มข้น 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสายพันธุ์ MUG001 ในอาหารที่มีคีโตโคนาโซลความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 11) ดังนั้นจึงใช้คีโตโคนาโซลเป็น mutation marker ในการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ต่อไป



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคีโตโคนาโซลกับการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 และสายพันธุ์ MUGS

4. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการทำเส้นใยให้เป็นเซลล์เดี่ยว

4.1.1 ใช้วิธีบดอย่างละเอียดด้วย homogenizer

เมื่อนำเส้นใยเห็ดหลินจือที่เลี้ยงบนอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 4, 6 และ 8 วัน มาบดด้วย homogenizer ที่ความเร็ว 2,300 4,600 และ 6,900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10, 15 และ 20 นาที แล้วนำมากรองผ่านผ้ากรองขนาดรู 50 ไมครอน และนับจำนวนเซลล์เดี่ยวโดยใช้อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) พบว่าสายพันธุ์ MUG001 สามารถแยกเซลล์เดี่ยวมากที่สุดเมื่อใช้เส้นใยอายุ 6 วัน ความเร็ว homogenizer 6,900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยมีจำนวนเซลล์เดี่ยวเป็น 3×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 5) และสายพันธุ์ MUGS มีจำนวนเซลล์เดี่ยวมากที่สุดที่เส้นใยอายุ 8 วัน ความเร็ว homogenizer 6,900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยมีจำนวนเซลล์เดี่ยวเป็น 9×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเส้นใยที่ผ่านการบดด้วย homogenizer จะได้เส้นใยที่ไม่เป็นเซลล์เดี่ยวต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดเท่ากับ 4.3 เปอร์เซ็นต์ และ 3.03 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เนื่องจากวิธีนี้เป็นการบดเส้นใยแบบสุ่มทำให้ยังมีเส้นใยที่ไม่เป็นเซลล์เดี่ยว และสภาพของเส้นใยที่ได้จากวิธีนี้มีความเสียหายมาก จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมที่จะนำเส้นใยที่ได้ไปฉายแสงอัลตราไวโอเลต

ตารางที่ 5 เซลล์เดี่ยวของสายพันธุ์ MUG 001 และ MUGS ที่ได้จากการใช้ homogenizer

อายุเส้นใย (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	เวลาที่บด (นาที)	จำนวนเซลล์เดี่ยว (เซลล์ /มิลลิลิตร):จำนวนเซลล์ที่ไม่เป็นเซลล์เดี่ยวต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด (%)	
			MUG 001	MUGS
4	2,300	10	$1.4 \times 10^5 : 4.51$	$1.6 \times 10^5 : 3.9$
		15	$1.9 \times 10^5 : 4.32$	$1 \times 10^5 : 4.25$
		20	$5.8 \times 10^4 : 2$	$1.2 \times 10^5 : 3.66$
	4,600	10	$1.3 \times 10^5 : 3.77$	$1 \times 10^5 : 3.89$
		15	$7.2 \times 10^4 : 4$	$1.1 \times 10^5 : 4.06$
		20	$1.2 \times 10^5 : 4.35$	$9 \times 10^4 : 4.17$
	6,900	10	$1.2 \times 10^5 : 4.35$	$8.9 \times 10^4 : 3$
		15	$7.9 \times 10^4 : 4$	$9.3 \times 10^4 : 4$
		20	$8.3 \times 10^4 : 3.03$	$8 \times 10^4 : 3.8$
6	2,300	10	$7.4 \times 10^5 : 4.01$	$7 \times 10^5 : 3.9$
		15	$9.1 \times 10^5 : 4$	$9.3 \times 10^5 : 4$
		20	$9.8 \times 10^5 : 4.5$	$9.5 \times 10^5 : 4.3$
	4,600	10	$1.2 \times 10^6 : 6$	$8 \times 10^5 : 5$
		15	$3 \times 10^5 : 4$	$2 \times 10^6 : 3.8$
		20	$8.4 \times 10^5 : 4.4$	$8.4 \times 10^6 : 3.8$
	6,900	10	$3 \times 10^6 : 4.3$	$2.6 \times 10^6 : 3$
		15	$1 \times 10^6 : 3.9$	$1 \times 10^6 : 3.2$
		20	$9.8 \times 10^5 : 1$	$1.3 \times 10^6 : 2.6$
8	2,300	10	$3 \times 10^5 : 3$	$6.3 \times 10^5 : 4$
		15	$5.4 \times 10^5 : 3$	$6 \times 10^5 : 4.25$
		20	$7.2 \times 10^5 : 3.8$	$6 \times 10^5 : 4.7$
	4,600	10	$6.2 \times 10^5 : 3.4$	$6.2 \times 10^5 : 4.01$
		15	$8 \times 10^5 : 4.6$	$1 \times 10^6 : 5.7$
		20	$7 \times 10^5 : 7.8$	$8 \times 10^5 : 7.1$
	6,900	10	$9.1 \times 10^5 : 4.8$	$9 \times 10^6 : 3.03$
		15	$3 \times 10^5 : 4.1$	$4.7 \times 10^5 : 3.7$
		20	$8.1 \times 10^5 : 3.5$	$5 \times 10^5 : 4.1$

4.1.2 ใช้วิธีตัดเซลล์เดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เมื่อตัดเส้นใยตัดด้วยมีดผ่าตัด สามารถได้เส้นใยที่เป็นเซลล์เดี่ยวทุกเส้น ซึ่งการเลือกตัดให้ได้เส้นใยเดี่ยวมีดังนี้ คือ เลือกเส้นใยที่อยู่ด้านนอกของโคโลนี เส้นใยหลักส่วนปลายยังไม่มีการสร้าง clamp connection และบริเวณเส้นใยหลักส่วนโคนเส้นกิ่งที่แตกออกจากเส้นหลักต้องยังไม่สร้าง clamp connection และเมื่อตัดเส้นใยเดี่ยวได้แล้วควรนำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตภายในเวลาไม่เกิน 30 นาที สำหรับสายพันธุ์ MUG 001 และในเวลาไม่เกิน 60 นาทีสำหรับสายพันธุ์ MUGS เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวทั้งหมดที่จะนำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลต (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ระยะเวลาการเริ่มแบ่งเซลล์ใหม่ของเส้นใยที่ถูกตัดเป็นเซลล์เดี่ยว

เวลาที่เริ่มแบ่งเซลล์หลังเส้นใยถูกตัดเป็นเซลล์เดี่ยว (นาที)	จำนวนเซลล์เดี่ยวที่มีการแบ่งตัว (เซลล์)	
	MUG001	MUGS
10	0	0
20	0	0
30	0	0
40	2	0
50	10	0
60	6	0
70	2	3
80	0	11
90	0	5
100	0	1
110	0	0
120	0	0
140	0	0

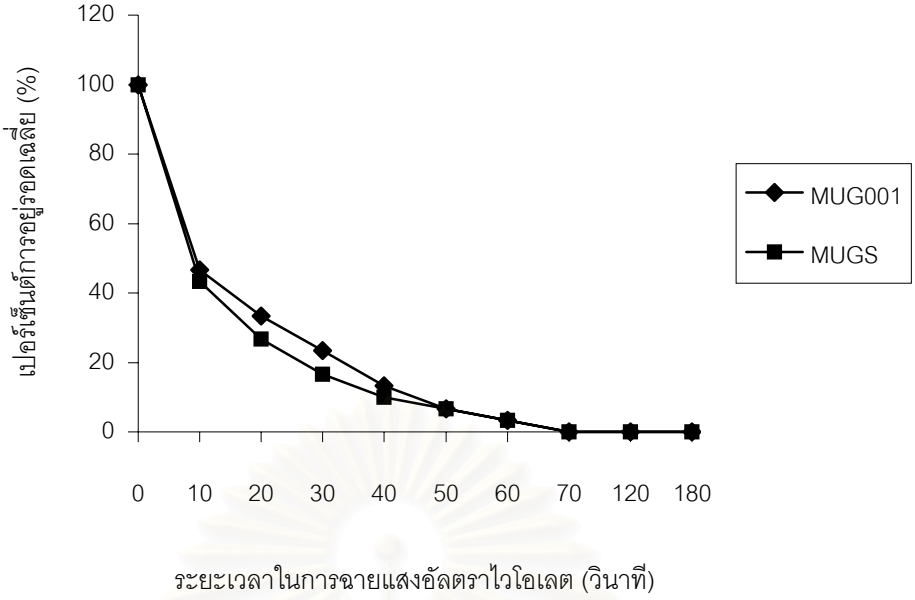
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การทำ survival curve เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

เมื่อได้วิธีที่เหมาะสมในการทำเส้นใยให้เป็นเซลล์เดี่ยว คือวิธีตัดเซลล์เดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ให้นำเซลล์เดี่ยวที่ได้มาฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลาต่างๆ บ่มเชื้อในที่มืดเป็นเวลา 5-7 วัน นับจำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตบนอาหาร PDA เพื่อหาระยะเวลาในการฉายแสงที่เหมาะสม พบว่าเมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเลตในช่วงเวลา 0-3 นาที ที่เวลา 1 นาที สายพันธุ์ MUG 001 และสายพันธุ์ MUGS จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด เท่ากับ 3.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) และเมื่อลดช่วงเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตลง คือฉายแสงในช่วงเวลา 0-70 วินาที พบว่าที่เวลา 50 วินาที สายพันธุ์ MUG 001 จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด เท่ากับ 6.7 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 40 วินาที สายพันธุ์ MUGS จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ นำผลที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ฉายแสงกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 7 ระยะเวลาที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลตในช่วงเวลา 0-3 นาที และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 และสายพันธุ์ MUGS

เวลาที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต (วินาที)	MUG001		MUGS	
	จำนวนโคโลนี	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)	จำนวนโคโลนี	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)
0	30.00	100.00	30.00	100.00
10	4.67	46.67	4.33	43.33
20	3.33	33.33	2.67	26.67
30	2.33	23.33	1.67	16.67
40	1.33	13.33	1.00	10.00
50	0.67	6.70	0.67	6.70
60	0.33	3.30	0.33	3.30
70	0.00	0.00	0.00	0.00
120	0.00	0.00	0.00	0.00
180	0.00	0.00	0.00	0.00



ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ฉายแสงกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

4. การชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลทในเห็ดหลินจือและการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์

เมื่อนำเซลล์เดี่ยวบนอาหารแข็ง PDA ไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลา 10-60 วินาที สามารถแยกได้ทั้งหมด 70 โคโลนี (ตารางที่ 8) เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มีคีโตโคนาโซล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับโคโลนีที่ได้จากสายพันธุ์ MUG 001 และนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มีคีโตโคนาโซลความเข้มข้น 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับโคโลนีที่ได้จากสายพันธุ์ MUGS พบว่ามี 16 โคโลนีที่ได้จากสายพันธุ์ MUG 001 ที่ต้านทานต่อคีโตโคนาโซล และมี 18 โคโลนีที่ได้จากสายพันธุ์ MUGS ที่ต้านทานต่อคีโตโคนาโซล และเมื่อนำโคโลนีที่เจริญมาเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง PDA ที่มี guaiacol 0.015% (v/v) เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสขั้นต้น พบว่ามี 9 โคโลนีที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสขั้นต้นสูงสุดและมากกว่าสายพันธุ์เดิม คือมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีที่ต่ำกว่าสายพันธุ์ MUGS หรือต่ำกว่า 0.7 ได้แก่ MUG 001-20S-1 MUG 001-30S-1 MUG 001-30S-2 MUG 001-40S-1 MUG 001-40S-2 MUG 001-50S-2 MUGS-10S-1 MUGS-20S-1 และ MUGS-50S-1 ซึ่งการให้ชื่อจะให้ชื่อตามสายพันธุ์เดิมและตามด้วยระยะเวลาที่ได้รับการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 จำนวนโคโลนีที่แยกได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

สายพันธุ์	จำนวนโคโลนีที่คัดแยกได้ (โคโลนี)			รวม
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
MUG001	10	12	16	38
MUGS	8	11	13	32

ตารางที่ 9 ความต้านทานต่อคีโตโคนาโซลของโคโลนีที่คัดแยกได้ทั้งหมดและค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสี

โคโลนี	ความต้านทานต่อ คีโตโคนาโซล	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสี *				เฉลี่ย
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	
MUG 001-10s-1	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-10s-2	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-10s-3	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-10s-4	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-10s-5	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-10s-6	ต้านทาน	0.57	0.60	0.83	0.91	0.727
MUG 001-10s-7	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-10s-8	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-10s-9	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-10s-10	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-10s-11	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-10s-12	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-10s-13	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-10s-14	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-20s-1	ต้านทาน	0.44	0.33	0.70	0.95	0.605
MUG 001-20s-2	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-20s-3	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-20s-4	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-20s-5	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-

ตารางที่ 9 ความต้านทานต่อคีโตโคนาโซลของโคโลนีที่คัดแยกได้ทั้งหมดและค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสี (ต่อ)

โคโลนี	ความต้านทานต่อคีโตโคนาโซล	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสี *				เฉลี่ย
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	
MUG 001-20s-6	ต้านทาน	0.49	0.57	0.80	0.94	0.700
MUG 001-20s-7	ต้านทาน	0.60	0.51	0.82	0.96	0.723
MUG 001-20s-8	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-20s-9	ต้านทาน	0.52	0.55	0.79	0.95	0.703
MUG 001-20s-10	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-30s-1	ต้านทาน	0.55	0.46	0.79	0.96	0.690
MUG 001-30s-3	ต้านทาน	0.59	0.50	0.88	0.90	0.717
MUG 001-30s-4	ต้านทาน	0.58	0.60	0.81	0.90	0.723
MUG 001-30s-5	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-30s-6	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-30s-7	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUG 001-40s-1	ต้านทาน	0.43	0.41	0.79	0.98	0.653
MUG 001-40s-2	ต้านทาน	0.62	0.51	0.73	0.93	0.698
MUG 001-40s-3	ต้านทาน	0.55	0.63	0.80	0.91	0.723
MUG 001-40s-4	ต้านทาน	0.59	0.50	0.82	0.93	0.710
MUG 001-50s-1	ต้านทาน	0.51	0.75	0.80	0.89	0.737
MUG 001-50s-2	ต้านทาน	0.44	0.40	0.57	0.67	0.520
MUG 001-60s-1	ต้านทาน	0.52	0.83	0.95	0.98	0.820
MUGS-10s-1	ต้านทาน	0.54	0.47	0.85	0.88	0.685
MUGS –10s-2	ต้านทาน	0.51	0.57	0.91	0.92	0.727
MUGS –10s-3	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –10s-4	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –10s-5	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –10s-6	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –10s-7	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –10s-8	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-

ตารางที่ 9 ความต้านทานต่อคีโตโคนาโซลของโคโลนีที่คัดแยกได้ทั้งหมดและค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสี (ต่อ)

โคโลนี	ความต้านทานต่อคีโตโคนาโซล	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสี *				เฉลี่ย
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	
MUGS –10s-9	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –10s-10	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –10s-11	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –10s-12	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –10s-13	ต้านทาน	0.44	0.53	0.92	0.97	0.715
MUGS –20s-1	ต้านทาน	0.44	0.50	0.81	0.98	0.683
MUGS –20s-2	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –20s-3	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –20s-4	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –20s-5	ต้านทาน	0.51	0.57	0.81	0.98	0.683
MUGS –20s-6	ไม่ต้านทาน	-	-	-	-	-
MUGS –20s-7	ต้านทาน	0.55	0.63	0.85	0.89	0.730
MUGS –20s-8	ต้านทาน	0.52	0.58	0.93	0.95	0.745
MUGS –30s-1	ต้านทาน	0.61	0.64	0.70	0.95	0.725
MUGS –30s-2	ต้านทาน	0.55	0.70	0.84	0.96	0.763
MUGS –30s-3	ต้านทาน	0.54	0.69	0.81	0.98	0.755
MUGS –30s-4	ต้านทาน	0.53	0.59	0.87	0.91	0.725
MUGS –30s-5	ต้านทาน	0.48	0.61	0.88	0.96	0.733
MUGS –40s-1	ต้านทาน	0.49	0.68	0.79	0.94	0.725
MUGS –40s-2	ต้านทาน	0.44	0.70	0.88	0.91	0.733
MUGS –40s-3	ต้านทาน	0.52	0.57	0.91	0.94	0.735
MUGS –50s-1	ต้านทาน	0.36	0.47	0.75	0.99	0.643
MUGS –50s-2	ต้านทาน	0.51	0.55	0.87	0.91	0.710
MUGS –60s-1	ต้านทาน	0.42	0.54	0.91	0.99	0.713

*หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีวัดเมื่อสายพันธุ์มิวแตนท์มีความต้านทานต่อคีโตโคนาโซล

6. การทดสอบความเสถียรของเห็ดหลินจือสายพันธุ์มิวแตนท์

เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ 9 โคโลนี ที่มีความต้านทานต่อคีโตโคนาโซล และมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสที่สูงมาทดสอบความเสถียร พบว่าได้สายพันธุ์มิวแตนท์ที่ยังคงมีสมบัติเดิมเพียง 5 โคโลนี และมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 31, ภาคผนวก ง) คือ MUG001-20S-1 MUG 001-40S-1 MUG 001-50S-2 MUGS -10S-1 และ MUGS -50S-1 (ตารางที่ 10) ดังนั้นจึงนำ 5 โคโลนีนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ต่อไป

ตารางที่ 10 ความต้านทานต่อคีโตโคนาโซลของโคโลนีและค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีของสายพันธุ์มิวแตนท์ก่อนและหลังทดสอบความเสถียร

โคโลนี	วันที่	ก่อนการทดสอบความเสถียร		หลังการทดสอบความเสถียร		
		อัตราส่วนเฉลี่ย	เฉลี่ย	คีโตโคนาโซล	อัตราส่วนเฉลี่ย	เฉลี่ย
MUG 001-20S-1	1	0.44	0.605	ต้านทาน	0.44	0.603
	2	0.33			0.40	
	3	0.70			0.68	
	4	0.95			0.89	
MUG 001-30S-1	1	0..55	0.690	ไม่ต้านทาน	-	-
	2	0.46			-	
	3	0.79			-	
	4	0.96			-	
MUG 001-30S-2	1	0.65	0.615	ต้านทาน	0.70	0.790
	2	0.52			0.67	
	3	0.48			0.85	
	4	0.81			0.94	
MUG 001-40S-1	1	0.43	0.653	ต้านทาน	0.45	0.653
	2	0.41			0.50	
	3	0.79			0.78	
	4	0.98			0.88	

ตารางที่ 10 ความต้านทานต่อคีโตโคนาโซลและค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีของสายพันธุ์มิวแตนท์ก่อนและหลังทดสอบความเสถียร (ต่อ)

โคโลนี	วันที่	ก่อนการทดสอบความเสถียร		หลังการทดสอบความเสถียร		
		อัตราส่วนเฉลี่ย	เฉลี่ย	คีโตโคนาโซล	อัตราส่วนเฉลี่ย	เฉลี่ย
MUG 001-40S-2	1	0.62	0.698	ต้านทาน	0.64	0.753
	2	0.51			0.54	
	3	0.73			0.88	
	4	0.93			0.95	
MUG 001-50S-2	1	0.44	0.520	ต้านทาน	0.42	0.518
	2	0.40			0.40	
	3	0.57			0.60	
	4	0.67			0.65	
MUGS –10S-1	1	0.54	0.685	ต้านทาน	0.50	0.688
	2	0.47			0.52	
	3	0.85			0.80	
	4	0.88			0.93	
MUGS –20S-1	1	0.44	0.683	ต้านทาน	0.51	0.733
	2	0.50			0.67	
	3	0.81			0.85	
	4	0.98			0.90	
MUGS –50S-1	1	0.36	0.643	ต้านทาน	0.37	0.643
	2	0.47			0.45	
	3	0.75			0.77	
	4	0.99			0.98	

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม

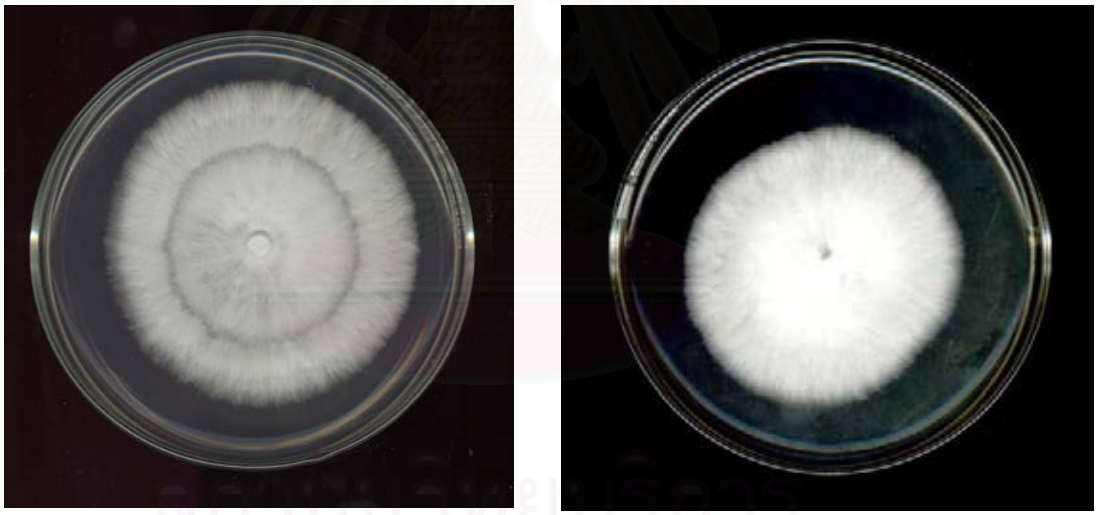
เมื่อนำสายพันธุ์มิวแตนท์ทั้ง 5 โคโลนี มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ พบว่าสายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุด คือ MUG 001-50S-2 โดยมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.00017 U/ml (ตารางที่ 11) เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคส พบว่า MUG 001-50S-2 มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดเช่นกัน โดยมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.0015 U/ml (ตารางที่ 12) เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 11 วัน และเมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีกับสายพันธุ์เดิม คือ MUG 001 พบว่าสายพันธุ์มิวแตนท์มีค่าแอคติวิตีของทั้ง 2 เอนไซม์มากกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 32-33, ภาคผนวก ง) ดังนั้นจึงเลือก MUG 001-50S-2 ไปทำการศึกษาการฟอกเยื่อต่อไป และพบว่าลักษณะของเส้นใยในสายพันธุ์ MUG001 กับสายพันธุ์มิวแตนท์ MUG001-50S-2 มีความแตกต่างกัน โดยเส้นใยของสายพันธุ์มิวแตนท์ MUG001-50S-2 มีความหนาแน่นของเส้นใยและมีความฟูมากกว่าในสายพันธุ์ MUG001 (ภาพที่ 13)

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม

สายพันธุ์	ค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (U/ml)			
	วันที่ 4	วันที่ 7	วันที่ 11	วันที่ 14
MUG001	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
MUG001-20S-1	0.000000	0.000066	0.000000	0.000000
MUG001-40S-1	0.000020	0.000140	0.000080	0.000030
MUG001-50S-2	0.000090	0.000170	0.000100	0.000070
MUGS	0.000000	0.000057	0.000034	0.000000
MUGS-10S-1	0.000000	0.000073	0.000030	0.000000
MUGS-50S-1	0.000060	0.000100	0.000090	0.000050

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคสของสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม

สายพันธุ์	ค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคส (U/ml)			
	วันที่ 4	วันที่ 7	วันที่ 11	วันที่ 14
MUG 001	0.000100	0.000480	0.000550	0.000120
MUG 001-20S-1	0.000098	0.000083	0.000130	0.000120
MUG 001-40S-1	0.000040	0.000054	0.000143	0.000100
MUG 001-50S-2	0.000800	0.000900	0.001500	0.000200
MUGS	0.000110	0.000610	0.000730	0.000100
MUGS-10S-1	0.000090	0.000140	0.000197	0.000110
MUGS-50S-1	0.000091	0.000031	0.000230	0.000120



(a) (b)

ภาพที่ 13 เส้นใยของสายพันธุ์ MUG001 (a) และสายพันธุ์มิวแตนท์ MUG001-50S-2 (b)

8. การฟอกเยื่อกระดาษของสายพันธุ์มิวแตนท์

8.1 การฟอกเยื่อกระดาษ

เมื่อนำเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกมาล้างแล้วผึ่งให้แห้ง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส พบว่าเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีความชื้น 8.51 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีความชื้น 10.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้ำหนักที่ลดลงก็คือปริมาณความชื้นในเยื่อกระดาษ ในการนำเยื่อกระดาษไปทำแผ่นทดสอบมาตรฐานและตรวจสอบสมบัติต่างๆ ต้องใช้ปริมาณเยื่อกระดาษ 30 กรัมแห้ง (OD) ดังนั้นต้องชั่งเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกเท่ากับ 32.78 กรัม และชั่งเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 เท่ากับ 33.33 กรัม

8.2 การตรวจสอบคุณสมบัติของกระดาษ

การทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ (freeness) ในเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีค่าเท่ากับ 615 (ตารางที่ 13) ส่วนเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีค่าเท่ากับ 620 ซึ่งมีค่ามากกว่าในเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก และระหว่างทำการขึ้นแผ่นได้มีการวัดการระบายน้ำ (drainage time) (ตารางที่ 13) พบว่าเยื่อทั้ง 2 ตัวอย่างใช้เวลาการระบายน้ำเท่ากันคือเท่ากับ 4 วินาที เมื่อนำมาทดสอบการหดตัวพบว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีการหดตัวมากกว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก โดยแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกและแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีการหดตัว 1.15 และ 2.31 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13) การวัดค่าคัปปานัมเบอร์ในเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกและที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 พบว่ามีค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 11.17 และ 6.89 ตามลำดับ โดยเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีค่าลดลงจากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก 38.32 เปอร์เซ็นต์ การวัดค่าความขาวสว่าง (brightness) (ตารางที่ 13) พบว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีความแตกต่างจากที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 34, ภาคผนวก ง) คือมีค่าความขาวสว่างเท่ากับ 48.6 และ 51.9 เปอร์เซ็นต์ โดยแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีค่าเพิ่มขึ้นจากแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก 6.79 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 13) เมื่อทดสอบ

ความต้านทานการฉีกขาดของกระดาษ (tearing strength) และทดสอบความต้านทานแรงดึง (tensile strength) พบว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีความแข็งแรงน้อยกว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก คือมีค่า tear index เท่ากับ 0.385 $N.m^2/kg$ และมีค่า tensile index เท่ากับ 0.0154 kN.m/kg ขณะที่แผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีค่า tear index เท่ากับ 0.4 $N.m^2/kg$ และมีค่า tensile index เท่ากับ 0.0166 kN.m/kg (ตารางที่ 13) แต่เมื่อทดสอบความต้านทานแรงดันทะลุ (bursting strength) พบว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 กลับมีความแข็งแรงมากกว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกถึง 51.8 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13) โดยแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกและแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีค่า burst index เท่ากับ 0.693 $kPa.m^2/g$ และ 1.052 $kPa.m^2/g$ ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 35-37, ภาคผนวก ง)

ตารางที่ 13 การตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 เปรียบเทียบกับเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก

การตรวจสอบสมบัติต่างๆ	เยื่อกระดาษยูคาลิปตัส	
	ไม่ผ่านการฟอก (control)	ฟอกด้วย crude enzyme
Freeness (ml)	615	620
Drainage time (s)	4	4
Shrinkage (%)	1.15	2.31
Moisture content (%)	6.99	6.04
Kappa number	11.17	6.89
Brightness (%)	48.6	51.9
Basis weight (g/m^2)	63.44	62.45
Tear index ($N.m^2/kg$)	6.46	6.16
Burst index ($kPa.\ m^2/g$)	0.704	1.052
Tensile index (kN.m/kg)	0.017	0.015

ภาพที่ 14 ตัวอย่างแผ่นทดสอบมาตรฐานที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกและเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหลินจือที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสสูงสุดและต่ำสุดขั้นต้น

จากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ MUG001 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสขั้นต้นต่ำสุด คือมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีสูงสุด เท่ากับ 0.808 ส่วนสายพันธุ์ MUGS มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสขั้นต้นสูงสุด คือมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีต่ำสุด เท่ากับ 0.651 การคัดเลือกทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ไปทำการชักนำให้เกิดมิวเตชันต่อไปเพื่อที่แสดงให้เห็นว่าในสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ต่ำสามารถชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลตให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่สูงได้ และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะนำไปเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มิวแตนท์และเพื่อให้แน่ชัดว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่ยีน ในการวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในขั้นต้นเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการคัดแยกสายพันธุ์ที่มีจำนวนมากและการคัดเลือกบนอาหารแข็งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว จึงมีการใช้วิธีนี้ในการคัดเลือกขั้นต้นก่อนจะศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ โดยได้มีการศึกษาตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1973 โดย Harkin และ Obst ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ reagent ในการตรวจสอบเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเชื้อราชนิดต่างๆ ซึ่งก็มีการใช้ 0.1% syringaldazineในอาหารแข็ง ในปี ค.ศ. 1990 Boominathan และคณะได้ทำการคัดเลือกมิวแตนท์ที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจาก *P. chrysosporium* โดยเลือกมิวแตนท์ที่ไม่มีความสามารถในการลดสีของ poly-R ในการคัดเลือกขั้นต้นก่อน จากนั้นจึงนำไปตรวจวัดแอคติวิตี นอกจากนี้ยังมีการใช้ phenol red medium ในการตรวจสอบมิวแตนท์ขั้นต้นที่สามารถผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ในปี ค.ศ. 1992 Freitag และ Morrell ได้ศึกษาการลดสีของ polymericdye Poly R-478 ในเชื้อราที่เจริญบนเนื้อไม้ต่างๆ โดยวัดการเจริญของเส้นใยเทียบกับการลดสีของ Poly R-478 ในที่มืด ในปี ค.ศ. 1995 Srinivasan และคณะ ได้ทำการทดลองว่ามีเอนไซม์แลคเคสใน *P. chrysosporium* BKM-F1767 โดยใช้ ABTS [2,2-azinobis(3-ethylbenzathiazoline-6-sulfonic acid)] มาตรวจในเจลก่อน ซึ่งถ้ามีการผลิตเอนไซม์แลคเคสก็จะมีวงสีเขียวเข้มเกิดขึ้น จากนั้นจึงนำไปตรวจวัดแอคติวิตีด้วยเครื่องการดูดกลืนแสง และในปี ค.ศ. 1995 Addleman และคณะ ได้มีการใช้ guaiacol ในการคัดเลือกมิวแตนท์ของ *T.*

แตนท์ของ *T. versicolor* ที่ไม่สามารถฟอกเยื่อกระดาษในขั้นต้นก่อน จากนั้นจึงนำไปตรวจวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในขั้นต่อไป การใช้ guaiacol ซึ่งเป็น phenolic compound ที่มีสมบัติในการชักนำการสร้างเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคส เมื่อเกิดการออกซิเดชันจะเกิดเป็นวงสีน้ำตาลรอบโคโลนีจึงได้มีการนำ guaiacol มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันใน selective media เพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นต้นและการเกิดวงสีอาจมีบางสายพันธุ์ที่เกิดสีต่างกัน เช่น น้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้ม น้ำตาลแดง เป็นต้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องนำไปตรวจวัดหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส

ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความชื้น อาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณหัวเชื้อ เป็นต้น กระบวนการย่อยสลายลิกนินในเชื้อราเป็นกระบวนการทุติยภูมิ (secondary metabolism) จะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อรามีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary phase (Kirk และคณะ, 1978) ซึ่งเป็นระยะเวลาเหมาะสมที่เชื้อราจะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายลิกนิน ดังนั้นการศึกษาการเจริญของเส้นใยจึงมีความสำคัญต่อการผลิตหัวเชื้อที่จะใช้ในการศึกษาภาวะต่างๆจากผลการทดลองพบว่าเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และ MUGS มีการเจริญของเส้นใยเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 10 และวันที่ 12 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นที่เลี้ยงเส้นใยในอาหาร PDB และชั่งน้ำหนักแห้งเหมือนกัน พบว่าในปีพ.ศ. 2541 เรือนแก้ว ประพฤติ ได้ศึกษาการเจริญของเส้นใยใน *P. chrysosporium* และ *G. lucidum* พบว่ามีการเจริญเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 7 และวันที่ 10 ตามลำดับ ในปีพ.ศ. 2542 ชาลินี คงสวัสดิ์ ได้ศึกษาการเจริญของเส้นใยใน *G. lucidum* สายพันธุ์ MUG003 และMUG004 พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์มีการเจริญเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 10 และในปีพ.ศ. 2545 เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี ได้ศึกษาการเจริญของเส้นใยใน *G. lucidum* พบว่ามีการเจริญเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 11 และในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้ออาจเป็นขั้นตอนที่ทำให้การวัดค่าแอคติวิตีในขั้นตอนต่อไปมีความแปรปรวน เนื่องจากในขั้นตอนนี้ไม่ได้เลี้ยงเชื้อในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นอย่างคงที่ แต่ได้ใช้เครื่องเขย่าซึ่งเป็นระบบเปิดอุณหภูมิและความชื้นเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล จึงอาจทำให้ปริมาณหัวเชื้อที่ได้ไม่คงที่

ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในอาหารที่เลี้ยงเชื้อก็มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยทั่วไปเชื้อรามักเจริญอยู่ในภาวะที่เป็นกรด และจากผลการทดลองพบว่าการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS มีความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ที่ระดับ pH เดียวกันคือ pH 3 ส่วนความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

ในการผลิตเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS ก็อยู่ที่ระดับ pH เดียวกันอีกคือ pH 5 และในเชื้อราต่างชนิดกันอาจมีระดับความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกัน เช่น ในปี ค.ศ. 1985 Glenn และ Gold ได้ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสใน *P.chrysosporium* พบว่ามีระดับที่เหมาะสม คือ pH 4.5 ในปีค.ศ. 1990 Boominathan และคณะได้ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสใน *P. chrysosporium* พบว่ามีระดับที่เหมาะสม คือ pH 4.5 ในปีค.ศ. 1995 Srinivasan และคณะได้ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสใน *P. chrysosporium* BKM-F1767 พบว่ามีระดับที่เหมาะสม คือ pH 3 ในปีค.ศ. 1995 Addleman และคณะได้ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสใน *T. versicolor* พบว่ามีระดับที่เหมาะสม คือ pH 5 ในปีค.ศ. 1996 Yaver และคณะได้ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสใน *T. villosa* พบว่ามีระดับที่เหมาะสม คือ pH 6 ในปีค.ศ. 2000 Abadulla และคณะได้ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสใน *T. hirsuta* พบว่ามีระดับที่เหมาะสม คือ pH 5 และในปีค.ศ. 2000 Dedeyan และคณะ ได้ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสใน *Marasmius quercophilus* พบว่ามีระดับที่เหมาะสม คือ pH 6 นอกจากความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการเจริญแล้วอุณหภูมิก็เป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราเช่นกัน จากผลการทดลอง พบว่าเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และ สายพันธุ์ MUGS มีการเจริญของเส้นใยได้ดีในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส และมีการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสมากที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียสตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงเชื้อร่วมกับเยื่อกระดาษในภาวะ semi-solid วิธีนี้เยื่อกระดาษจะช่วยพยุงเส้นใยของเชื้อราทำให้มีการเจริญของเส้นใยและการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสารจำพวกลิกโนเซลลูโลสในเยื่อกระดาษได้ดีขึ้น

และปัจจัยสุดท้ายที่ทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความแปรปรวน คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดค่าแอคติวิตีต่างๆของเอนไซม์ ในการวัดแอคติวิตีควรทำในเวลาที่ไม่ต่างกันมาก เมื่อเก็บเอนไซม์แล้วควรรีบตรวจวัดให้เร็วที่สุด เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไปค่าแอคติวิตีของเอนไซม์อาจลดลงหรือถ้ามีการเจริญของเส้นใยใน crude enzyme ต่ออาจทำให้ค่าแอคติวิตีสูงขึ้นได้ โดยจากผลการทดลองในการศึกษาภาวะความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมพบว่า สายพันธุ์ MUG001 มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมากกว่าสายพันธุ์ MUGS ขณะที่การทดลองอื่นๆ เช่น การหาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม การหาระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสม การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ระหว่างสายพันธุ์เดิมกับสายพันธุ์มิวแตนท์ เป็นต้น กลับพบว่าสายพันธุ์ MUG001 มีค่าแอคติวิตีน้อย

กว่าสายพันธุ์ MUGS ทุกการทดลอง จึงอาจเป็นไปได้ว่าเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดค่าแอคติวิตีในขั้นตอนนี้ใช้เวลานานเกินไป จึงทำให้ค่าแอคติวิตีที่ได้ในสายพันธุ์ MUGS มีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง

3. **การทำ** Minimum Inhibitory Concentrations(MICs) **เพื่อหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของคริสตัลไวโอเลตและคีโตโคนาโซลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเห็ดหลินจือเพื่อเป็น** mutation marker

จากผลการทดลองพบว่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS เมื่อใช้คริสตัลไวโอเลตไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในอาหารแข็ง PDA มีการตกตะกอนของคริสตัลไวโอเลตซึ่งอาจเป็นการทำให้ความเข้มข้นน้อยกว่าที่ต้องการ แต่เมื่อใช้คีโตโคนาโซลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของคีโตโคนาโซล 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้จากสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS ต้องมีความสามารถในการเจริญของเส้นใยได้บนอาหาร PDA ที่มีคีโตโคนาโซล 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การเจริญของเส้นใยจะถูกยับยั้งเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารเคมีที่มากพอทำให้มีผลต่อการเจริญของเส้นใย และสารนั้นสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เป็นสายพันธุ์มิวแตนท์ได้ สารที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยนอกจากคีโตโคนาโซล เช่น แอมโฟเทอริซินบี (amphotericinB) ไซโคเฮกซาไมด์ (cyclohexamide) ไนสเตติน (nystatin) และมาลาไชท์กรีน (malachite-green) เป็นต้น ในปี ค.ศ. 1991 Li และChang ได้ใช้คริสตัลไวโอเลตและมาลาไชท์กรีนในการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์จาก *Volvariella volvacea* ที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ในปี พ.ศ. 2542 พิสุทธิ์ พวงนาค ได้ใช้ไซโคเฮกซาไมด์ และแอมโฟเทอริซินบี ในการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์จาก *Acrophialophora* sp. ที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและการชักนำด้วยสาร NTG และในปี พ.ศ. 2542 ชาลินี คงสวัสดิ์ ได้ใช้ไนสเตตินและ คริสตัลไวโอเลตในการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์จาก *G. lucidum* สายพันธุ์ MUG003 และ MUG004 ที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต นอกจากนี้อาจมีการใช้ mutation marker ในการคัดเลือกมากกว่า 1 ชนิดเพื่อให้ได้สายพันธุ์มิวแตนท์เพิ่มขึ้น

4. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

โดยปกติในงานวิจัยที่เกี่ยวกับการชักนำให้เกิดมิวเตชันจำเป็นต้องหาภาวะที่เหมาะสมในการชักนำก่อน คือต้องทราบ survival curve เพื่อที่จะใช้ภาวะนั้นในการชักนำ และการเลือกส่วนของสิ่งมีชีวิตมาชักนำโดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตจำพวกเชื้อรา มักเลือกใช้ สปอร์หรือเส้นใยเซลล์เดี่ยวจึงต้องมีการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสปอร์หรือในการทำเส้นใยให้เป็นเซลล์เดี่ยว ซึ่งอาจนำมาเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดการสร้างสปอร์ แต่เนื่องจากสปอร์มีผนังหนา การใช้เส้นใยเดี่ยวมาชักนำให้เกิดมิวเตชันจะทำให้ได้ผลที่ดีกว่า ดังนั้นการใช้เส้นใยจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมกว่า จากผลการทดลอง ใช้วิธีบดอย่างละเอียดด้วย homogenizer ให้ได้เส้นใยที่เป็นเซลล์เดี่ยว พบว่าสายพันธุ์ MUG001 มีจำนวนเซลล์เดี่ยวมากที่สุดที่เส้นใยเห็ดอายุ 6 วัน ความเร็ว homogenizer 6,900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คือมีจำนวนเซลล์เดี่ยวเป็น 3×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสายพันธุ์ MUGS มีจำนวนเซลล์เดี่ยวมากที่สุดที่เส้นใยเห็ดอายุ 8 วัน ความเร็ว homogenizer 6,900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คือมีจำนวนเซลล์เดี่ยวเป็น 9×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แม้วิธีบดนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งมีความสะดวกและรวดเร็ว และเป็นวิธีที่ทำให้ได้เส้นใยที่เป็นเซลล์เดี่ยวจำนวนมาก แต่เส้นใยที่ได้นั้นไม่เป็นเซลล์เดี่ยวทั้งหมดแม้จะมีการกรองผ่านผ้ากรองขนาด 50 ไมครอนแล้วก็ตาม ซึ่งยังคงมีเส้นใยที่เป็น 2 เซลล์ 3 เซลล์ เกิดขึ้นประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้วิธีนี้ไม่ได้เซลล์เดี่ยว 100 เปอร์เซ็นต์ และสภาพเซลล์ที่ผ่านการบดมีความเสียหายมาก ซึ่งในการคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอาจทำให้ค่าที่ได้เป็นค่าที่ไม่ถูกต้องเมื่อคำนวณเทียบกับจำนวนเซลล์เดี่ยวทั้งหมด นอกจากนี้เส้นใยที่นำมาใช้ถ้ามีอายุมากขึ้นอาจมีผนังเส้นใยหนาและเหนียวทำให้การบดอย่างละเอียดได้เส้นใยที่เป็นเซลล์เดี่ยวน้อยลง ในปีพ.ศ. 2545 คมสัน นันทสุนทร ได้ทำการทดลองตัดเส้นใยให้เป็นเซลล์เดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้ได้เส้นใยที่เป็นเซลล์เดี่ยว 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตัดเซลล์แล้วจะมีการชะงักการเจริญเติบโตของเส้นใยชั่วคราวดังนั้นเซลล์ที่นำไปฉายแสงจึงยังคงเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่

5. การชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในเห็ดหลินจือและการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์

โดยปกติเมื่อทราบ survival curve ก็จะใช้ภาวะที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 5-10 เปอร์เซ็นต์ในการชักนำให้เกิดมิวเตชัน เพื่อให้ได้ผลที่ดี หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตจะต้องเก็บเชื้อในที่มืดเป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อป้องกันการเกิดกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอโดยใช้แสง (photoreactivation) ในการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลตทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลบนสายโพลีนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม เนื่องจากเมื่อเกิด thymine dimer บนสายโพลีนิวคลีโอไทด์ทำให้เบสไทมีนไม่สามารถจับคู่กับเบสอะดีนีนสายตรงข้ามได้ เมื่อเกิดการสังเคราะห์

ดีเอ็นเอทำให้ดีเอ็นเอที่ได้มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และเมื่อเกิดการพิมพ์รหัสก็ทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนไปด้วย (วิสุทธิ์ ใบไม้) ซึ่งหากเกิดมิวเตชันบนรหัสพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ ก็จะทำให้ได้สายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปด้วย จากนั้นจึงทำการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ จากผลการทดลองเมื่อชักนำสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS ให้เกิดมิวเตชันสามารถคัดเลือกได้ทั้งหมด 70 โคโลนี จากนั้นนำมาทดสอบความต้านทานต่อคีโตโคนาโซลได้สายพันธุ์มิวแตนท์ทั้งหมด 34 โคโลนี และเมื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสขั้นต้น สามารถคัดเลือกได้เพียง 9 โคโลนี ที่จะนำไปทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์ต่อไป

6. การทดสอบความเสถียรของเห็ดหลินจือสายพันธุ์มิวแตนท์

เมื่อชักนำให้เกิดมิวเตชันแล้วจำเป็นต้องมีการทดสอบความเสถียรเพื่อให้ได้สายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีสมบัติที่ต้องการอย่างถาวรไม่เปลี่ยนสมบัติไปและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ ซึ่งการทดสอบความเสถียรมักเป็นการเปลี่ยนภาวะแวดล้อมภายนอกที่สายพันธุ์มิวแตนท์ว่าจะมีผลต่อการปรับตัวของสายพันธุ์นั้นอย่างไร จากผลการทดลองเมื่อทดสอบความเสถียรแล้วเหลือเพียง 5 โคโลนี จาก 9 โคโลนี ที่ยังคงมีสมบัติเดิม และสามารถนำไปตรวจหาประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ต่อไป โดยสายพันธุ์มิวแตนท์บางสายพันธุ์ที่ไม่คงสมบัติเดิมเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ การเปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ได้แก่ MUG001-30S-1 คือก่อนทดสอบความเสถียรมีความต้านทานต่อคีโตโคนาโซล แต่หลังทดสอบความเสถียรกลับไม่มีความต้านทานต่อคีโตโคนาโซล ส่วน MUG001-30S-2 กับ MUGS-20S-1 ก่อนและหลังทดสอบความเสถียรยังคงมีความต้านทานต่อคีโตโคนาโซล แต่มีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีที่เปลี่ยนแปลงไป คือ ก่อนทดสอบความเสถียร MUG001-30S-2 และ MUGS-20S-1 มีอัตราส่วนการเจริญต่อการเกิดวงสีเฉลี่ยเท่ากับ 0.615 และ 0.683 แต่หลังทดสอบความเสถียรกลับมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีเพิ่มขึ้น เท่ากับ 0.79 และ 0.733 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม

การปรับปรุงพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อได้สายพันธุ์มิวแตนท์แล้ว การเปรียบเทียบสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิมเป็นสิ่งที่ต้องปฏิบัติในขั้นต่อไปเพื่อเปรียบเทียบว่าในภาวะเดียวกันสายพันธุ์ต่างๆ จะมีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างไร จากผลการทดลองพบว่า MUG001-50S-2 ซึ่งเป็นโคโลนีที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ

6.7 เปอร์เซ็นต์ เป็นสายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุด คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.00017 U/ml และมีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดเช่นกัน คือมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.0015 U/ml และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมคือสายพันธุ์ MUG001 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 32-33,ภาคผนวก ง) โดยสายพันธุ์ MUG001 มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 0 U/ml และมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 0.00055 U/ml ทั้งนี้การชักนำให้เกิดมิวเตชันอาจมีการเปลี่ยนแปลงในยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคส จึงทำให้สายพันธุ์มิวแตนท์มีการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสสูงกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือก MUG001-50S-2 ไปทำการสกัดแยก crude enzyme เพื่อใช้ในการฟอกเยื่อกระดาษต่อไป

8. การฟอกเยื่อกระดาษด้วย crude enzyme ของสายพันธุ์มิวแตนท์

การทดสอบสมบัติต่างๆของเยื่อกระดาษ มีปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทดสอบ ตั้งแต่ตัวอย่างเยื่อ อุณหภูมิ ความชื้น เวลา น้ำที่ใช้ในการกระจายเยื่อ เครื่องมือที่ใช้ทำแผ่นทดสอบ ความสะอาดของเครื่องมือ และตัวผู้ทำการทดสอบจะมีผลมากที่สุด จากผลการทดลองพบว่าการทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ (freeness) ในเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกและเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG001-50S-2 มีค่าเท่ากับ 615 และ620 ตามลำดับ ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบการให้นำไหลผ่านเยื่อ ได้แก่ ความละเอียดของเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาตรน้ำที่ไหลออกมา การเทน้ำเยื่อลงกระเปาะอาจมีการกระเด็นออกนอกกระเปาะ หรือในกระเปาะอาจล้างไม่สะอาดทำให้ยังมีเยื่อตกค้างอยู่ และการทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อต้องทำการทดลองอย่างต่อเนื่องและเร็ว เนื่องจากอุณหภูมิระหว่างทำการทดลองจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ การทดสอบการหดตัวพบว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีการหดตัว 1.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีการหดตัวถึง 2.31 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก การวัดค่าคัปปานัมเบอร์พบว่าในเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกและที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 11.17 และ 6.89 ตามลำดับ โดยมีค่าลดลงจากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก 38.32 เปอร์เซ็นต์ และการวัดค่าความขาวสว่าง (brightness) พบว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกและที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีค่าความขาวสว่างเท่ากับ 48.6 และ 51.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยมีค่าเพิ่มขึ้นจากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก 6.79 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบความต้านทานการฉีกขาดของกระดาษ (tearing strength) และทดสอบความต้านทานแรงดึง (tensile strength) พบว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย

crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีความแข็งแรงน้อยกว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก คือมีค่า tear index เท่ากับ 0.385 $N.m^2/kg$ และมีค่า tensile index เท่ากับ 0.0154 kN.m/kg ขณะที่แผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีค่า tear index เท่ากับ 0.4 $N.m^2/kg$ และมีค่า tensile index เท่ากับ 0.0166 kN.m/kg แต่เมื่อทดสอบความต้านทานแรงดันทะลุ (bursting strength) พบว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 กลับมีความแข็งแรงมากกว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกถึง 51.8 เปอร์เซ็นต์ คือมีค่า burst index เท่ากับ 1.052 $kPa.m^2/g$ ขณะที่แผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีค่า burst index เท่ากับ 0.693 $kPa.m^2/g$

ลักษณะทางกายภาพของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากเชื้อราบางชนิดก็ทำให้กระดาษมีคุณภาพที่ดีขึ้น โดยการทำงานของเอนไซม์จะส่งผลต่อพันธะไฮโดรเจนของเส้นใย ทำให้การเรียงตัวของเส้นใยมีระเบียบขึ้น (Akhtar และคณะ, 1996.) แม้ว่าการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์สามารถลดปริมาณลิกนินได้ในระดับหนึ่งคือทำให้ค่าความขาวสว่างเพิ่มมากขึ้นประมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์และค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงประมาณ 5-7 แต่การที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษโดยนำมาใช้ทดแทนการฟอกเยื่อทางเคมีเลยยังทำไม่ได้ เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบค่าความขาวสว่างที่ฟอกทางเคมี พบว่ายังคงมีความต่างกันมาก คือ กระดาษที่ฟอกด้วยวิธีทางเคมีมีค่าความขาวสว่างประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และค่าคัปปานัมเบอร์ในกระดาษที่ฟอกด้วยวิธีทางเคมีมีค่าน้อยกว่า 1 ในขณะนี้จึงทำได้เพียงนำเอนไซม์มาฟอกร่วมกับวิธีทางเคมีเพื่อลดขั้นตอนบางขั้นตอนทางเคมีอาจมีการเพิ่มขั้นตอนการใช้เอนไซม์มาฟอกก่อน (prebleaching) แล้วนำไปฟอกเยื่อทางเคมีต่อ โดยอาจต่อด้วยขั้นตอน chlorination หรือ extraction

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหลินจือที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสสูงสุดและต่ำสุดขั้นต้น

จากผลการทดลองพบว่าในเห็ดหลินจือ 8 สายพันธุ์ สายพันธุ์ MUGS มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสขั้นต้นสูงสุด คือมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีต่ำที่สุดเท่ากับ 0.651 และสายพันธุ์ MUG001 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสขั้นต้นต่ำสุด คือมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีสูงที่สุดเท่ากับ 0.808 และการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 15-18, ภาคผนวก ง)

2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคส

การศึกษาภาวะความเป็นกรด-ด่าง ผลของอุณหภูมิ และระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสของเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดที่ pH 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 7 วันและมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดที่ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 11 วัน และผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกปัจจัย (ตารางที่ 19-30,ภาคผนวก ง)

3. **การทำ** Minimum Inhibitory Concentrations(MICs) **เพื่อหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของคริสตัลไวโอเลตและคีโตโคนาโซลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเห็ดหลินจือเพื่อเป็น** mutation marker

คริสตัลไวโอเลตไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบความเข้มข้นของคีโตโคนาโซลในการยับยั้งการเจริญเติบโตในสายพันธุ์ MUG001 และสายพันธุ์ MUGS คือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยสามารถยับยั้งการเจริญได้ 100 เปอร์เซ็นต์

4. **การหาภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลต**

การใช้วิธีตัดเซลล์เดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีที่เหมาะสม เนื่องจากเมื่อตัดเส้นใยด้วยมีดผ่าตัด สามารถได้เส้นใยที่เป็นเซลล์เดี่ยวทุกเส้น เมื่อตัดเส้นใยเดี่ยวได้ 10 เซลล์แล้วต้องนำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตภายในเวลาไม่เกิน 30 นาที นับจากเริ่มตัดเซลล์แรก สำหรับสายพันธุ์ MUG 001 และในเวลาไม่เกิน 60 นาทีสำหรับสายพันธุ์ MUGS นำไปบ่มเชื้อในที่มืดเป็นเวลา 5-7 วัน นับจำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตบนอาหาร PDA เพื่อหาระยะเวลาในการฉายแสงที่เหมาะสม พบว่าช่วงเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เหมาะสม คือในช่วงเวลา 10-60 วินาที โดยพบว่าที่เวลา 50 วินาที สายพันธุ์ MUG 001 จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด เท่ากับ 6.7 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 40 วินาที สายพันธุ์ MUGS จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์

5. **การชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหลินจือและคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์**

จากผลการทดลอง พบว่ามีสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้จากสายพันธุ์ MUG 001 ที่ต้านทานต่อคีโตโคนาโซล 16 โคโลนี ส่วนสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้จากสายพันธุ์ MUGS ที่ต้านทานต่อคีโตโคนาโซลมี 18 โคโลนี และเมื่อนำโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีคีโตโคนาโซลมาเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง PDA ที่มี guaiacol 0.015% (v/v) เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสขั้นต้น พบว่ามีสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ขั้นต้นที่สูงทั้งหมด 9 โคโลนี คือมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีต่ำ ได้แก่ MUG 001-20S-1 MUG 001-30S-1 MUG 001-30S-2 MUG 001-40S-1 MUG 001-40S-2 MUG 001-50S-2 MUGS-10S-1 MUGS-20S-1 และ MUGS-50S-1

6. การทดสอบความเสถียรของเห็ดหลินจือสายพันธุ์มิวแตนท์

หลังจากคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ 9 โคโลนี ที่มีความต้านทานต่อคีโตโคนาโซล และมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสขั้นต้นสูงมา ทดสอบความเสถียร พบว่าได้สายพันธุ์มิวแตนท์ที่ยังคงมีสมบัติเดิม 5 โคโลนี คือ MUG 001-20S-1 MUG 001-40S-1 MUG 001-50S-2 MUGS -10S-1 และ MUGS -50S-1

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม

เมื่อนำสายพันธุ์มิวแตนท์ทั้ง 5 โคโลนี มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ พบว่า สายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุด คือ MUG 001-50S-2 โดยมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.00017 U/ml เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคส พบว่า MUG 001-50S-2 มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดเช่นกัน โดยมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.0015 U/ml เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 11 วัน และเมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีกับสายพันธุ์เดิมคือ MUG 001 ณ ภาวะเดียวกัน พบว่า MUG 001-50S-2 มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสมากกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 32-33, ภาคผนวก ง)

8. การฟอกเยื่อกระดาษด้วย crude enzyme ของสายพันธุ์มิวแตนท์

การทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ (freeness) ในเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีค่าเท่ากับ 615 ส่วนเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีค่าเท่ากับ 620 การวัดการระบายน้ำ (drainage time) พบว่าเยื่อทั้ง 2 ตัวอย่างใช้เวลาการระบายน้ำเท่ากันคือเท่ากับ 4 วินาที ส่วนการหดตัวพบว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีการหดตัว 1.15 เปอร์เซ็นต์ และแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีการหดตัวถึง 2.31 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก ค่าคัปปานัมเบอร์ในเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีค่าเท่ากับ 11.17 ส่วนในเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีค่าคัปปานัมเบอร์ เท่ากับ 6.89 โดยมีค่าลดลงจากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก 38.32 เปอร์เซ็นต์ ค่าความขาวสว่าง (brightness) ในแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีค่าเท่ากับ 48.6 เปอร์เซ็นต์ และแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีค่าความขาวสว่าง

เท่ากับ 51.9 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเพิ่มขึ้นจากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก 6.79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบความต้านทานการฉีกขาดของกระดาษ (tearing strength) และทดสอบความต้านทานแรงดึง (tensile strength) พบว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีความแข็งแรงน้อยกว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก โดยแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีค่า tear index เท่ากับ 0.4 $N.m^2/kg$ และมีค่า tensile index เท่ากับ 0.0166 kN.m/kg ขณะที่แผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีค่า tear index เท่ากับ 0.385 $N.m^2/kg$ และมีค่า tensile index เท่ากับ 0.0154 kN.m/kg แต่เมื่อทดสอบความต้านทานแรงดันทะลุ (bursting strength) พบว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 กลับมีความแข็งแรงมากกว่าแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกถึง 51.8 เปอร์เซ็นต์ โดยแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกมีค่าเท่ากับ 0.693 kPa. m^2/g ส่วนแผ่นทดสอบที่ได้จากเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย crude enzyme ของ MUG 001-50S-2 มีค่าเท่ากับ 1.052 kPa. m^2/g โดยค่าความขาวสว่าง ค่าต้านทานการฉีกขาดของกระดาษ ค่าต้านทานแรงดึง และค่าต้านทานแรงดันทะลุมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 34-37, ภาคผนวก ง)

9. ข้อเสนอแนะ

1. อาจมีการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของ MUG001-50S-2 ต่อไป
2. เมื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมแล้วอาจนำมาทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อให้มีค่าแอคติวิตีเพิ่มขึ้น
3. นำเอนไซม์บริสุทธิ์ไปทดลองฟอกเยื่อร่วมกับวิธีทางเคมีแล้วตรวจสอบสมบัติของกระดาษเปรียบเทียบกับกระดาษที่ฟอกทางเคมีในอุตสาหกรรม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คมสัน นันทสุนทร. 2545. การเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk) Sing.ด้วยโคลชิซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชาลินี คงสวัสดิ์. 2542. การชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหมื่นปี *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.โดยแสงอัลตราไวโอเลต. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดำรง ทิพย์โยธา. 2541. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติและความน่าจะเป็นด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows & MATHCAD. ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 309 หน้า.

เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี. 2545. การผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากรากลุ่มไวท์รอทบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิสุทธิ์ พวงนาค. 2542. การกลายพันธุ์ของรา *Acrophialophora* sp. ที่ย่อยสลายเซลลูโลส. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ. บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เรือนแก้ว ประพฤติ. 2541. การฟอกเยื่อกระดาษแบบชีวภาพโดยเชื้อรา *Phanerocheate chrysosporium* and *Ganoderma lucidum.* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2538. การเปลี่ยนแปลงโครโมโซม. พันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ. เอ็นพีซับพลายพริ้นติ้ง. 177 หน้า.

สุทธพรรณ ตรีรัตน์. 2531. เห็ดหมื่นปี (*Ganoderma lucidum*). วารสารวิทยาศาสตร์ ปีที่ 42. ฉบับที่ 2. :69-74.

ภาษาอังกฤษ

Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., paulo, A.C., and Gubitz, G.M. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Applied and Environmental Microbiology. 66(8): 3357-3362.

Addleman, K., Kumonceaux, T., Paice, M.G., Bourbonnais, R. and Archibald, F.S. 1995. Production and Characterization of *Trametes versicolor* Mutants Unable To Bleach Hardwood Kraft Pulp. Applied and Environmenatal Microbiology. 61(10): 3687-3694.

Agosin, E., Daudin, J.J., and Odier, E. 1985. Solid-state fermentation, lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermentation by selected white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology. 21: 391-403.

Akhtar, M., Kirk, T.K., and Blanchette, R.A. 1996. Biopulping: An overview of consortia research. In Ewald, S. and Kurt, M. (eds.), Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Vienna, Austria: 187-192.

Alder, E. 1977. Lignin chemistry. Past, present and future. In Wood Science. Technology. 11: 169-218.

Alexopoulos, C.J., C.W. Mims and M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. 4th ed. New York. John Wiley. 868 pp.

Boominathan, K., Balachandra, D., Randall, T.A., Kelley, R.L.and Reddy, C.A. 1990. Lignin peroxidase-negative mutant of the white-rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Bacteriology. 172 (1): 260-265.

Boominathan, K., and Reddy, C.A. 1991. Fungal degradation of lignin: Biotechnological applications. Handbook of Applied Mycology: Fungal Biotechnology. 4.

Bos, C. J., and Stadler, D.1996. Fungal Genetics.: Principle and Practive. New York: Marcel Dekker.

Brown, T.A. 1992. Genetics a Molecular Approach. 2nd ed. London: Chapman&Hall.

Buswell, J.A. 1991. Fungal degradation of lignin. In Arora, K.K., Rai, B. Mukerji, K.G. and Knudsen, G.R. (eds.) Handbook of Applied Mycology. Vol.1: Soil and Plants. New York, USA.: Marcel Kekker. 1: 425-480.

Buswell, J.A., and Odier, E. 1987. Lignin Biodegradation. CRC Critical Reviews in Biotechnology. Vol. 6. Issue1: 1-60.

Casey, J.P. 1980. Pulp and Paper Chemistry and Chemical technology. 3rd edition. Vol.1. New York. John Wiley. 820 pp.

Cowling, E.B., and Kirk, T.K. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. Biotechnology and Bioengineering Symp. 6: 95-123.

Davin, L.B., and Lewis, N.G. 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. Plant Physiology. 123: 453-461.

Dedeyan, B., Klonowska, A., Tagger, S., Tron, T., Iacazio, G., gil, G., and Petit, J.L. 2000. Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus.* Applied and Environmental Microbiology. 66(3): 925-929.

Devlin, T.M. 1982. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. New York: John Wieley&Sons.

Drake, J.W. 1970. The Molecular Basis of Mutation. California. Holden-day.

Ericksson, K.-E.L., Blanchette, R.A. and Ander, P. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. Germany, Ozach Gmbn and cb., Berlin: 225-332.

Freitag, M., and Morrell, J.J. 1992. Decolorization of the polymeric dye Poly R-478 by wood-inhabiting fungi. Canadian Journal of Microbiology. (38): 811-822.

Gardner, E.J. 1975. Principles of Genetics 5th ed. New York.: John Wiley & Sons.

Gilbertson, R.L. 1980. Wood-rotting fungi of North America. Mycologia. 71: 1-49.

Glenn, J.K., and Gold, M.H. 1985. Purification and Characterization of an Extracellular Mn (II)-Dependent Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium.* Archives of Biochemistry and Biophysics 242(2): 329-341.

Godfrey,B.J., Mayfield, M.B., Brown, J.A. and Gold, M.H. 1990. Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium.* Gene. 93: 119-124.

Gold, M.H., and Alic, M. 1993. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium.* Microbiology Review. 57(3): 605-622.

Gold, M.H., Cheng, T.M. and Mayfield, M.B. 1982. Isolation and Complementation Studies of Auxotrophic Mutants of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium.* Applied and Environmental Microbiology. 44: 996-1000.

Harazono, K., Kondo, R., and Sakai, K.1996. Bleaching of Hardwood Kraft Pulp with Manganese Peroxidase from *Phanerochaete sordida* YK-624 without Addition of $MnSO_4$. Applied and Environmental Microbiology.62(3): 913-917.

Harkin, J.M., and Obst, J.R. 1973. Syringaldazine, an Effective Reagent for Detecting Laccase and peroxidase in Fungi. Experientia. 29: 381-387.

Hayashida S. and Flor P.Q. 1981. Raw Starch-digestive Glucoamylase Productivity of Protease-less Mutant from *Aspergillus awamori* var. kawachi. Agriculture Biology Chemistry. 45 (12): 2675-2681.

Heinzkill, M., and Messner, K. 1997. The Ligninolytic system of fungi. Fungal Biotechnology. Weinheim: Chapman&Hall.

Higuchi, T. 1990. A biodegradation of lignin and its potential applications. In Bioprocess Engineering T.K. Ghose (eds.). Elis Harwood Limited. London: 39-58.

Jong, E.D., Field, J.A., and Bont, J.A.M.D. 1992. Evidence for a new extracellular peroxidase manganese-inhibited peroxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. FEBS. 299(1): 107-110.

Kirk, T.K., Ulmer, D., Haltmeir, T., and Fiecher, A. 1983. Rapid solubilization and depolymerization of purified kraft lignin by thin layer of *Phanerochaete chrysosporium.* Applied and Microbiology Biotechnology. 17: 117-120.

Kirk, T.K. 1987. Enzymatic “Combustion” : The Microbial Degradation of Lignin. Annual Review of Microbiology. 41: 465-505.

Kirk. T.K., and Farrel, R.L. 1987. Enzymatic “combustion”: The Microbial Degradation of Lignin. Annual Review of Microbiology. 41: 465-505.

Kirk, T.K., Higuchi, T., and Chang, H-M. 1978. Lignin biodegradation: Microbiology Chemistry and Potential. Applications vols. 1,2. CRC press Boca Raton. pp. 436.

Kondo, R., Tsuchikawa, K., Harazono, K., and Sakai, K. 1996. Biobleaching of kraft pulp with lignin-degrading fungi and their enzymes. In S.Ewald and M. Kurt (eds.) Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Vienna, Austria: 33-37.

Kuhad R.C., Kumar M. and Singh A. 1994. A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. Letters in Applied Microbiology. 19: 397-400.

Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., and Gold, M.H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS. 169: 247-250.

Leatham, G.F. (ed). 1992. Frontiers in Industrial Mycology. USA.: Routledge: chapman & Hall. 222 pp.

Li S. and Chang S.T. 1991. Selection and characterization of crystal – violet – and malachite – green – resistant mutants in *Volvariella volvacea*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 7: 113-126.

Mansur, M., Suarez, T., Fernandez, L.J.B., Brizuela, M.A., and Gonzalez, A.E. 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin degrading Basidiomycete CECT 20197. Applied and Environmental Microbiology. 63(7): 2637-2646.

Matsubara, M., Suzuki, J., Deguchi, T., Miura, M., and Kitaoka, Y. 1996. Characterization of manganese peroxidases from the hyperlignolytic fungus IZU-154. Applied and Environmental Microbiology. 62(1): 4066-4072.

Miura, M., Kitaoka, Y., Kakezawa, M., and Nishika, T. 1998. Biobleaching of hardwood kraft pulp with cellulase-deficient mutant from hyperligninolytic fungus IZU-154. Applied Biochemistry and Biotechnology. 73: 113-126.

Moore, D., and Frazer, L.A.N. 2002. Essential Fungal Genetics. New York. Springer-Verlag: 357pp.

Mukherjee M. and Sengupta S. 1986. Mutagenesis of protoplasts and regeneration of mushroom *Volvariella volvacea*. Applied and Environmental Microbiology. 52 (6): 1412-1414.

Nerud, F., Zouchova, Z., and Misurcova, Z.1991. :Ligninolytic properties of different white-rot fungi. In Biotechnology. Letter. 13: 657-660.

Nishida, T., Katagiri, N., Ehara, K., and Tustsume, Y. 1996. New analysis of lignin degrading enzymes related to biobleaching of kraft pulp by white-rot fungi. In S.Ewald and M. Kurt (eds.) Biotechnology in Pulp and Paper Industry. Vienna, Austria: 51-54.

Norton, C.F. 1981. Microbiology. Addison-Wesley Publishing Company.

Reid, I.D. 1991. Biological pulping in paper manufacture. Trends in Biotechnology. 9: 262-265.

Rios, S., and Eyzaguirre, J. 1992. Conditions for selective degradation of lignin by the fungus *Ganoderma australis.* Applied Microbiology Biotechnology. 37: 667-669.

Sasaki, T., Kajino, T., Li, B., Sugiyama, H., and Takahashi, H. 2001. New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. Applied and Environmental Microbiology. 67(5): 2208-2212.

Shiao, M.S., Lin, L.J., and Yeh, S.F. 1988. Triterpenes in Ganoderma lucidum. Phytochemistry. 26:873-875.

Soxe, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., and Misaki, A. 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharide Isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium *Ganoderma lucidum.* Agriculture Biology Chemistry. 49: 2641-2653.

Srinivasan, C., D'souza, T.M., Boominathan. K., and Reddy, C.A. 1995. Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. Applied Environmental Microbiology. 61(2): 4247-4277.

TAPPI. 1995. Brightness of pulp, paper, and paperboard (directional reflectance at 457 nm) T452 om-92. TAPPI test methods T200-T1210 1994-1995.

TAPPI. 1995. Bursting strength of paper T403 om-91. TAPPI test methods T200-T1210 1994-1995.

TAPPI. 1995. Forming handsheets for physical tests of pulp T205 sp-95. TAPPI test methods T200-T1210 1994-1995.

TAPPI. 1995. Freeness of pulp (Canadian standard method) T227 om-94. TAPPI test methods T200-T1210 1994-1995.

TAPPI. 1995. Internal tearing resistance of paper (Elmendorf-type method) T414 om-88. TAPPI test methods T200-T1210 1994-1995.

TAPPI. 1995. Kappa number of pulp T236 cm-85. TAPPI test methods T200-T1210 1994-1995.

TAPPI. 1995. Tensile breaking strength and elongation of paper and paperboard (using pendulum-type tester) T404 cm-92. TAPPI test methods T200-T1210 1994-1995.

Tein, M., kersten, P.J., and Kirk, T.K. 1987. Selection and improvement of lignin-degrading microorganisms: Potential strategy based on lignin Model-amino acid adducts. Applied and Environmental Microbiology. 2: 242-245.

Tein, M., and Kirk, T.K. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science. 221: 661-663.

Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology. 140: 19-26.

Wariishi, H., Valli, K., and Gold, M.H. 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium.* The Journal of Biological Chemistry. 267(33): 23688-23695.

Watanabe, T., Shirai, N., Okada, H., Honda, Y., and Kuwahara, M. 2001. Production and chemiluminescent free radical reactions of glyoxal in lipid peroxidation of linoleic acid by the ligninolytic enzyme, manganese peroxidase. European Journal of Bichemistry. 268: 6114-6122.

Weaver, R.F., and Hedrick, P.W. 1977. Genetics. 3 rd edition. U.S.A. W.M.C. Brown Publishers.

Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown. S.H., Rey, M.W., Schneider, P.. Halkier, T., Mondorf, K., and Dalboge, H. 1996. Applied. and Environmental Microbiology. 62(3).: 834-841.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

1. การเตรียมอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาล Dextrose	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นเล็กขนาดลูกเต๋า ต้มมันฝรั่งให้สุก แต่อย่าให้เละ กรองเอากากมันฝรั่งออก เอาน้ำมาต้มต่อ เติมน้ำตาล Dextrose ลงไป จากนั้นค่อยๆเติมวุ้นลงไปอย่าให้จับเป็นก้อน ต้มให้เดือด นำ PDA มาใส่ใน Flask ปิดจุกสำลี หุ้มด้วยกระดาษ และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. การเตรียมอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาล Dextrose	20	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นเล็กขนาดลูกเต๋า ต้มมันฝรั่งให้สุก แต่อย่าให้เละ กรองเอากากมันฝรั่งออก เอาน้ำมาต้มต่อ เติมน้ำตาล Dextrose ลงไป นำ PDB มาใส่ใน Flask ปิดจุกสำลี หุ้มด้วยกระดาษ และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. การเตรียมอาหารสูตร production 1 ลิตร

Glucose	25	กรัม	Na_2CO_3	1.12	กรัม
L-Asparagine	1	กรัม	$Fe_2(SO_4)_3$	0.2	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	1	กรัม	$ZnSO_4$	0.2	มิลลิกรัม
$MgSO_4 .7H_2O$	0.5	กรัม	$MnSO_4$	0.2	มิลลิกรัม
Fumaric acid	1.32	กรัม	Guaiacol	0.4	มิลลิโมล

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ตามต้องการ รินใส่ใน Flask ที่มีเยื่อกระดาษ ปิดจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemacytometer

Haemacytometer เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือด แต่นำมาประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนจุลินทรีย์และสปอร์ของเชื้อรา สไลด์บริเวณที่มีขีดคิดเป็นความลึก 0.1-0.2 มิลลิเมตร ขีดที่กำหนดไว้นี้ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2 x 0.2 ตารางมิลลิเมตร ในแต่ละช่องใหญ่มีขีดแบ่งออกเป็นช่องเล็กอีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีเนื้อที่ 0.05 x 0.05 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในช่องจะมีปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิลิตร (0.05 x 0.05 x 0.1) cover glass ที่ใช้จะมีขนาดและความหนาจำเพาะ ตรวจนับโดยใช้ objective กำลังขยาย 20 เท่า

ตัวอย่างการคำนวณ

สมมติค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ต่อหน่วยช่องเล็กเท่ากับ A เซลล์ ดังนั้น

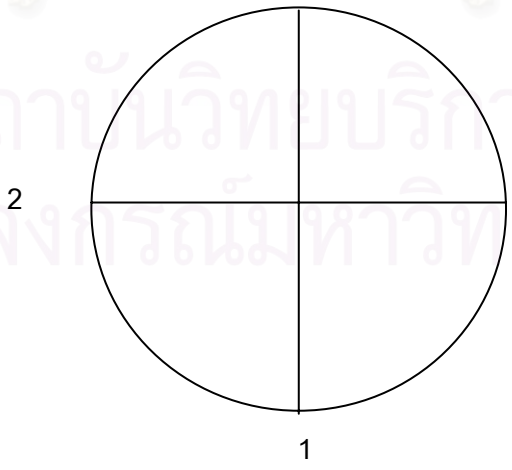
ตัวอย่าง 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ = A เซลล์

ตัวอย่าง 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ = $\frac{A \times 10^3}{0.00025}$ เซลล์

= $4A \times 10^6$ เซลล์

การวัดการเจริญของเส้นใยบนอาหารแข็ง

การรวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยบนอาหารแข็งให้ขีดเส้นตรงลงบน petridish ด้านล่างเป็น 2 แนว ให้ตั้งฉากกันแล้วจึงวัดการเจริญตามแนวเส้นที่ขีดไว้ ดังภาพ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการเตรียม crude enzyme เพื่อนำมาตรวจวัดหาแอคติวิตีของเอนไซม์

1. ฟอกเยื่อกระดาษด้วยเชื้อราในอาหารสูตร production ในภาวะที่เหมาะสม
2. แยก supernatant ออกจากเยื่อกระดาษโดยการบีบคั้น supernatant กรองผ่านผ้าขาวบางให้ได้มากที่สุด
3. นำส่วน supernatant มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที เพื่อแยกตะกอนออก
4. รินส่วนของสารละลายใสซึ่งเป็นส่วนของ crude enzyme นำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

การตรวจวัดแอคติวิตีเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (วิธีดัดแปลง Tein และ Kirk, 1988)

ค่าหน่วยของเอนไซม์ MnP ที่แท้จริง

= ค่าหน่วยของเอนไซม์ MnP – ค่าหน่วยของเอนไซม์ Lac – ค่าหน่วยเอนไซม์ของ MIP

<u>การตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส</u>

มีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

1. การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

4 mM	2,6 Dimethoxyphenol	50 ไมโครลิตร
0.1 M	Na Tartrate pH5	650 ไมโครลิตร
5 mM	$MnSO_4$	100 ไมโครลิตร
1 mM	H_2O_2	100 ไมโครลิตร (ใส่เป็นลำดับสุดท้าย)
	Crude enzyme	100 ไมโครลิตร

2. นำ reaction mixture ในข้อ 1 มาผสมกันในคิวเวต โดยเติม 1 mM H_2O_2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรเป็นลำดับสุดท้าย
3. นำสารละลายในข้อ 2 ไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectophotometer แบบ kinetic ที่ initial rate ณ ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที โดยมีแบลงค์เป็นสารละลายผสมดังกล่าวที่ไม่มี crude enzyme

<u>การคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส</u>

จาก Law of Beer & Lambert

จาก $A = \varepsilon bc$

เมื่อ A = Absorbance change (ค่าเปลี่ยนแปลง) T_o, T_1 (ค่าการดูดกลืนแสง)

ε = Molar extinction coefficient ($M^1\ cm^{-1}$)

b = cell length (cm) ความกว้างของ cuvett

c = absorptivity constant (M) โมลาร์

ตัวอย่างการคำนวณ

1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์ 1 µmol ของ 2,6 DMP ใน 1 นาที แทนค่า เมื่อ ε ที่ 470 นาโนเมตรของ 2,6 DMP เป็น 496000 $M^{-1}\ cm^{-1}$

$A = 49600x1xC\ M^{-1}\ cm^{-1}cm\ min^{-1}$

$C = A / 4.96 \times 10^{-4}$ mol/min/ml

$= 0.01\ A$ µmol/min/ml

แต่ปฏิกิริยาดำเนินในคิวเวตซึ่งมีเอนไซม์ 0.1ml ให้ C = 0.02 A µmol/min/ml

ถ้าใช้เอนไซม์ปริมาตร 1 ml จะให้ C = 0.2 A U/ml

<u>การตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคส</u>

มีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

1. การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

4 mM 2,6 Dimethoxyphenol	50	ไมโครลิตร
0.1 M Na Tartrate pH5	850	ไมโครลิตร
Crude enzyme	100	ไมโครลิตร

2. นำ reaction mixture ในข้อ 1 มาผสมกันในคิวเวต
3. นำสารละลายในข้อ 2 ไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectophotometer แบบ kinetic ที่ initial rate ณ ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที โดยมีแบลงค์เป็นสารละลายผสมดังกล่าวที่ไม่มี crude enzyme

<u>การคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคส</u>

ใช้หลักการเดียวกันกับ การคำนวณค่าหน่วยเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

<u>การตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ Manganese independent peroxidase</u>

มีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

1. การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

4 mM 2,6 Dimethoxyphenol	50	ไมโครลิตร
0.1 M Na Tartrate pH5	750	ไมโครลิตร
1 mM H_2O_2	100	ไมโครลิตร
Crude enzyme	100	ไมโครลิตร

2. นำ reaction mixture ในข้อ 1 มาผสมกันในคิวเวต โดยเติม 1 mM H_2O_2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรเป็นลำดับสุดท้าย
3. นำสารละลายในข้อ 2 ไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectophotometer แบบ kinetic ที่ initial rate ณ ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที โดยมีแบลงค์เป็นสารละลายผสมดังกล่าวที่ไม่มี crude enzyme

<u>การคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ Manganese independent peroxidase</u>

ใช้หลักการเดียวกันกับ การคำนวณค่าหน่วยเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ (freeness) (TAPPI T227 om-94) (TAPPI, 1995)

การทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อทำให้ทราบความแข็งแรงของเยื่อ ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของเยื่อ มีขั้นตอนการทดสอบ ดังนี้

1. ทำการ calibrate เครื่องก่อน โดยใช้น้ำกลั่นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 1000 มิลลิลิตร เทใส่ลงในเครื่องวัดการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ โดยปริมาตรน้ำที่ไหลออกมาต้องอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือ ระหว่าง 880-890 มิลลิลิตร ทำ 2 ครั้ง ถ้าค่าที่ได้ไม่อยู่ระหว่าง 880-890 มิลลิลิตร ให้นำกระเปาะไปล้างแล้วทำการ calibrate เครื่องใหม่
2. นำเยื่อ 30 กรัมแห้ง (OD) ที่ได้แช่น้ำไว้อย่างน้อย 4 ชั่วโมงมากระจายที่ 2000รอบ ในน้ำกลั่น 2 ลิตร ปรับปริมาตรน้ำเยื่อเป็น 10 ลิตร อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส คนน้ำเยื่อกระจายให้ทั่วตวงน้ำเยื่อมา 1000 มิลลิลิตร เทใส่ลงในเครื่องวัดการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ ทำ 2 ครั้ง ค่าที่ได้ทั้ง 2 ครั้ง ต้องต่างกันไม่เกิน 10 มิลลิลิตร
3. นำเยื่อที่ได้ทั้ง 2 ครั้งไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียสแล้วชั่งน้ำหนักเยื่อไว้เพื่อนำไปคำนวณค่าการให้น้ำไหลผ่านเยื่อที่แท้จริง

การทำแผ่นทดสอบมาตรฐาน (handsheets) (TAPPI T205 sp-95) (TAPPI, 1995)

แผ่นทดสอบมาตรฐานที่นำมาใช้ทดสอบสมบัติต่างๆ จะมีปริมาณเยื่อ 60 กรัมต่อ1 ตารางเมตร มีขั้นตอนในการเตรียม ดังนี้

1. นำเยื่อ 8 ลิตรที่เหลือจากการทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อมาปรับปริมาตรเป็น 16 ลิตร คือให้มีความข้นเยื่อเป็น 0.15 %consistency จากความข้นเยื่อ 0.3 %consistency
2. นำเยื่อมาขึ้นแผ่นขนาด 200 ตารางเซนติเมตร ดังนั้นการขึ้นแผ่นครั้งแรกให้ตวงมา 800 มิลลิลิตร เทลงในเครื่องขึ้นแผ่น ปล่อยน้ำออกให้เยื่อกระจายเป็นแผ่น นำกระดาษ (test sheet) ที่ได้มากด (press) ตามลำดับ ดังนี้
    - แผ่น plate
    - กระดาษซับ 2 แผ่น
    - test sheet
    - กระดาษซับ 2 แผ่น
    - แผ่น plate

3. นำไปรีดด้วยเตารีดให้แผ่นทดสอบแห้ง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้ควรอยู่ประมาณ 1.2 กรัม นำน้ำหนักมาคำนวณกลับว่าจะต้องตวงน้ำเยื่อมาขึ้นแผ่นทดสอบมาตรฐานปริมาตรเท่าไร และระหว่างการขึ้นแผ่นให้ทำการจับเวลาการระบายน้ำด้วย (drainage time)

4. ขึ้นแผ่นทดสอบแผ่นต่อไป นำมากดเหมือนในข้อ 2 จากนั้นรีดน้ำออกโดยใช้กระดาษซับและใช้แรงกด 345 kPa เป็นเวลา 5 นาที และ 2 นาที จากนั้นนำแผ่นทดสอบมาขึงกับตะแกรงวง (ring) ซ้อนทับกันแล้วใช้ตุ้มน้ำหนักกดทับไว้ ผึ่งแผ่นทดสอบให้แห้ง แล้วจึงนำไปใช้ทดสอบต่อไป

การวัดค่าความสว่างของเยื่อ (Brightness) (TAPPI T452 om-92.) (TAPPI, 1995)

ความขาวสว่างของเยื่อ (pulp brightness) หมายถึง ค่าแฟกเตอร์ของการสะท้อนแสงของแผ่นเยื่อหรือกระดาษซึ่งวัดที่ช่วงคลื่นแสง 457 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ MgO หรือ perfect reflecting diffuser โดยถือว่า MgO หรือ perfect reflecting diffuser มีค่า factor การสะท้อนแสงเป็น 100 โดยค่าความขาวสว่างมีหน่วยเป็นร้อยละ (%)

<u>วิธีวัดค่าความขาวสว่าง</u>

เมื่อแผ่นทดสอบแห้งแล้วให้นำมาวัดค่าความขาวสว่างก่อน (ไม่เกิน 24 ชั่วโมงนับจากเวลาที่เริ่มในการทำแผ่นทดสอบ)

1. อ่านค่า working standard ตรงกับ assign value+0.3
2. วาง test sheet ซ้อนกันทั้งหมด 10 แผ่นลงในเครื่อง จากนั้นกดปุ่มบันทึกค่าความขาวสว่าง
3. วัดแผ่นต่อไปโดยยังคงซ้อนแผ่นกระดาษทั้งหมดไว้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบความต้านทานการฉีกขาดของกระดาษ(Tearing strength T414 om-88) (TAPPI, 1995)

การวัดแรงดึงที่กระทำในระนาบเดียวกับกระดาษ ก่อนเริ่มการวัดจะต้องตัดแผ่นกระดาษทั้ง 10 แผ่น แยกไว้เป็นส่วนๆเพื่อทดสอบสมบัติอื่น (ภาพที่ 16) วิธีการทดสอบความต้านทานแรงฉีกขาด มีดังนี้

1. เลือกขนาดของ pendulum
2. ปรับเส้นให้ตรง
3. ใส่เข็มชี้ ปรับให้เป็น 0
4. ทำการ calibrate เครื่องให้เป็น 0 ก่อน
5. ใช้กระดาษ 4 แผ่นวางซ้อนกัน โดยใช้ด้านที่มีความยาว 6.5 เซนติเมตรมาทดสอบ
6. ตัดกระดาษนำก่อน 2 เซนติเมตร
7. ปล่อย pendulum ให้เครื่องเหวี่ยงมาตัดกระดาษที่ตัดนำไว้
8. บันทึกค่าไปคำนวนหา tear index

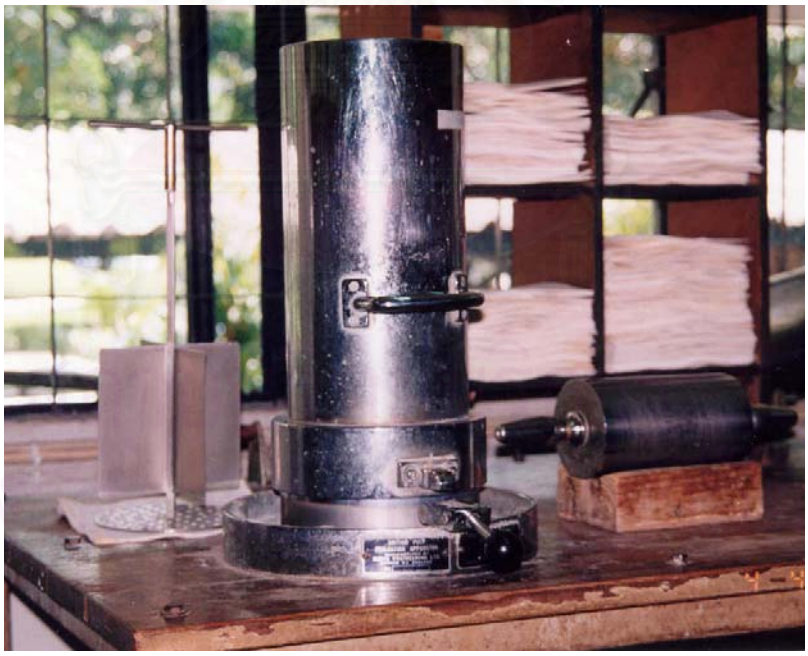
การทดสอบความต้านทานแรงดันทะลุ (Bursting strength T403 om-91) (TAPPI,1995.)

เป็นค่าที่บ่งบอกการยึดเหนี่ยวระหว่างเส้นใยและการยืดตัวของกระดาษ นำแผ่นกระดาษมาทดสอบที่ละแผ่นโดยวางให้ตรงกับปุ่ม เมื่อกดปุ่มกระดาษจะทะลุเป็นวงรอบ บันทึกค่าเพื่อนำไปคำนวณ burst index

การทดสอบความต้านทานแรงดึง (Tensile strength T404cm-92) (TAPPI,1995.)

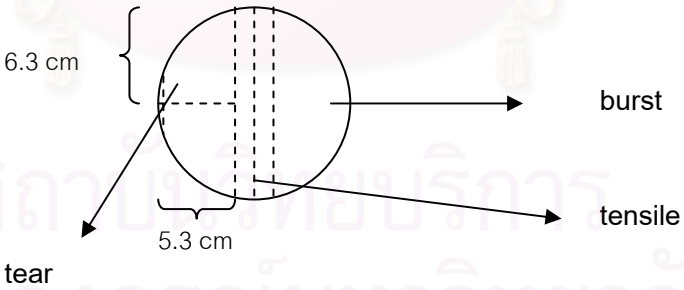
เป็นค่าความยาวของกระดาษที่มากพอจนทำให้กระดาษขาดโดยน้ำหนักของกระดาษเองเมื่อแขวนในแนวดิ่ง ระยะทดสอบ 10 เซนติเมตร ช่วงกระดาษขาดอยู่ภายใน 10-20 นาที บันทึกค่าเพื่นำไปคำนวณ tensile index

ภาพที่ 15 เครื่องทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ



ภาพที่ 16 เครื่องมือในการทำแผ่นทดสอบมาตรฐาน

ภาพที่ 17 เครื่องวัดค่าความขาวสว่างของเยื่อ



ภาพที่ 18 การตัดกระดาษออกเป็น 3 ส่วนเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวัดค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อ

ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อ คือ จำนวนมิลลิลิตรของโปแตสเซียมเปอร์มังกาเนตความเข้มข้น 1 นอร์มัล ที่ใช้ไปต่อเยื่อ 1 กรัมแห้ง ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด โดยผลลัพธ์ที่ได้จะถูกแปลงให้สมดุลย์กับปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของ 0.1 นอร์มัล โปแตสเซียมเปอร์มังกาเนตที่ใช้ไปในการทดลอง

<u>วิธีวัดค่าคัปปานัมเบอร์</u>

1. จากสูตร $k = \frac{P \times f}{w}$ ให้สมมติค่า p = 50 f = 1 k = ค่าคัปปานัมเบอร์ที่คาดไว้
2. คำนวณหาน้ำหนักแห้ง (OD) ที่ต้องใช้
3. ชั่งเยื่อ (AD) มาตีกระจายในน้ำกลั่นจนกระทั่งเยื่อกระจายตัวดี
4. ใส่เยื่อตัวอย่างลงในบีกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 795 มิลลิลิตร วางบีกเกอร์บน magnetic stirrer และคุมอุณหภูมิให้ได้ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส
5. ปิเปต 0.1 นอร์มัล $KmnO_4$ จำนวน 100 มิลลิลิตร และ 4 นอร์มัล H_2SO_4 จำนวน 100 มิลลิลิตร เทลงในบีกเกอร์พร้อมกัน ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานาน 10 นาที
6. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 16.6% KI จำนวน 20 มิลลิลิตร
7. ไตเตรตหาปริมาณไอโอดีนอิสระ (I_2) ที่เกิดขึ้นด้วย 0.1 นอร์มัล $Na_2S_2O_3$ จะเกิดสารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีน้ำเงิน ไตเตรตต่อไปจนสีน้ำเงินจางหายไปจนไม่มีสี บันทึกปริมาตร 0.1 นอร์มัล $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไปก็จะทราบถึง 0.1 นอร์มัล $KMnO_4$ ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยา
8. นำปริมาตร 0.1 นอร์มัล $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไปมาคำนวณกลับเพื่อหาค่า P

   จากสูตร $P = \frac{(b - a)\ N}{0.1}$

   เมื่อได้ค่า P แล้วจึงคำนวณกลับหาค่า k ต่อไป
9. การทำ blank test

   9.1 เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ 2000 มิลลิลิตร

   9.2 เติม 0.1 นอร์มัล $KmnO_4$ และ 4 นอร์มัล H_2SO_4 อย่างละ 100 มิลลิลิตร พร้อมกัน

   9.3 เติม 16.6% KI จำนวน 20 มิลลิลิตร

   9.4 ไตเตรตด้วย 0.1 นอร์มัล $Na_2S_2O_3$ จะเกิดสารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีน้ำเงิน ไตเตรตต่อไปจนสีน้ำเงินจางหายไปจนไม่มีสี บันทึกปริมาตร 0.1 นอร์มัล $Na_2S_2O_3$ โดยปริมาตรของ 0.1 นอร์มัล $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 48-52 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การ correction เพื่อหาค่าคัปปานัมเบอร์ที่แท้จริง

จากสูตร kappa number = $\frac{P \times f}{W\,[1+0.013(25-t)]}$.

โดยที่

P = จำนวนมิลลิลิตร 0.1 นอร์มัล $KmnO_4$ ที่ถูกใช้ไปในตัวอย่าง

b = จำนวนมิลลิลิตร0.1 นอร์มัล $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไปในการทำ blank test

a = จำนวนมิลลิลิตร0.1 นอร์มัล $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไปในการทดลองตัวอย่างเยื่อ

N = จำนวนนอร์มัลของ $Na_2S_2O_3$

f = ค่า factor สำหรับแปลงผลลัพธ์ให้สมดุลย์กับปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของ 0.1 นอร์มัล $KmnO_4$ ที่เติมลงไปในการทดลอง

t = อุณหภูมิระหว่างทำการทดลอง (องศาเซลเซียส)

ตารางที่ 14 ค่า factor (f) สำหรับแปลงผลลัพธ์ของค่าคัปปานัมเบอร์

f	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
30	0.958	0.960	0.962	0.964	0.966	0.963	0.970	0.973	0.975	0.977
40	0.979	0.981	0.983	0.985	0.987	0.989	0.991	0.994	0.996	0.998
50	1.000	1.002	1.004	1.006	1.009	1.011	1.013	1.015	1.017	1.019
60	1.022	1.024	1.026	1.028	1.030	1.033	1.035	1.037	1.039	1.042
70	1.044									

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ตาราง ANOVA

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีบนอาหาร PDA + 0.015% guaiacol (v/v) ในเห็ดหลินจือทั้ง 8 สายพันธุ์ วันที่ 1

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	7	0.89	0.127	15.006
ERROR	94	0.797	0.00847	
TOTAL	101	1.687		

Significant at 95% level

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีบนอาหาร PDA + 0.015% guaiacol (v/v) ในเห็ดหลินจือทั้ง 8 สายพันธุ์ วันที่ 2

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	7	0.202	0.02879	2.523
ERROR	47	0.536	0.01141	
TOTAL	54	0.738		

Significant at 95% level

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีบนอาหาร PDA + 0.015% guaiacol (v/v) ในเห็ดหลินจือทั้ง 8 สายพันธุ์ วันที่ 3

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	7	0.141	0.02011	7.076
ERROR	60	0.170	0.002841	
TOTAL	67	0.311		

Significant at 95% level

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีบนอาหาร PDA + 0.015% guaiacol (v/v) ในเห็ดหลินจือทั้ง 8 สายพันธุ์ วันที่ 4

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	7	0.08772	0.01253	20.398
ERROR	32	0.01966	0.0006143	
TOTAL	39	0.107		

Significant at 95% level

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ที่ระดับ pH ต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	4	6.556×10^{-5}	1.639×10^{-5}	14.938
ERROR	25	2.743×10^{-5}	1.097×10^{-6}	
TOTAL	29	9.3×10^{-5}		

Significant at 95% level

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของแลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ที่ระดับ pH ต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F	
TREATMENTS	4	3.828×10^{-6}	9.571×10^{-7}		40.967
ERROR	24	5.607×10^{-7}	2.336×10^{-8}		
TOTAL	28	4.389×10^{-5}			

Significant at 95% level

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์สวนจิตรลดาที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ที่ระดับ pH ต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	4	8.969×10^{-5}	2.242×10^{-5}	16.933
ERROR	19	2.516×10^{-3}	1.324×10^{-6}	
TOTAL	23	1.149×10^{-4}		

Significant at 95% level

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์สวนจิตรลดาที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ที่ระดับ pH ต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F	
TREATMENTS	4	9.402×10^{-6}	2.351×10^{-6}		10.215
ERROR	23	5.293×10^{-6}	2.301×10^{-7}		
TOTAL	27	1.470×10^{-5}			

Significant at 95% level

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 ที่อุณหภูมิต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	3	7.694×10^{-7}	2.565×10^{-7}	5.562
ERROR	12	5.533×10^{-7}	4.611×10^{-8}	
TOTAL	15	1.323×10^{-6}		

Significant at 95% level

ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์สวนจิตรลดาที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 ที่อุณหภูมิต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	3	2.346×10^{-7}	7.821×10^{-8}	7.661
ERROR	12	1.225×10^{-7}	1.021×10^{-8}	
TOTAL	15	3.571×10^{-7}		

Significant at 95% level

ตารางที่ 25 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 5 ที่อุณหภูมิต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	3	7.204×10^{-7}	2.401×10^{-7}	7
ERROR	35	1.201×10^{-6}	3.430×10^{-8}	
TOTAL	38	1.921×10^{-6}		

Significant at 95% level

ตารางที่ 26 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ สวนจิตรลดาที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 5 ที่อุณหภูมิต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	3	9.281×10^{-6}	3.094×10^{-6}	41.412
ERROR	35	2.615×10^{-6}	7.470×10^{-8}	
TOTAL	38	1.190×10^{-5}		

Significant at 95% level

ตารางที่ 27 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	3	9.263×10^{-9}	3.088×10^{-9}	7.68
ERROR	12	4.828×10^{-9}	4.023×10^{-10}	
TOTAL	15	1.409×10^{-8}		

Significant at 95% level

ตารางที่ 28 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์สวนจิตรลดาที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	3	1.677×10^{-8}	5.589×10^{-9}	17.15
ERROR	12	3.910×10^{-9}	3.259×10^{-10}	
TOTAL	15	2.068×10^{-8}		

Significant at 95% level

ตารางที่ 29 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MUG 001 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	3	1.484×10^{-6}	4.947×10^{-7}	81.79
ERROR	12	7.258×10^{-8}	6.048×10^{-9}	
TOTAL	15	1.557×10^{-6}		

Significant at 95% level

ตารางที่ 30 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์ สวนจิตรลดาที่เลี้ยงในอาหารสูตร production ระดับ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	3	1.861×10^{-6}	6.204×10^{-7}	175.06
ERROR	12	4.253×10^{-8}	3.544×10^{-9}	
TOTAL	15	1.904×10^{-6}		

Significant at 95% level

ตารางที่ 31 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราส่วนการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีบนอาหาร PDA + 0.015% guaiacol (v/v) ในเห็ดหลินจือสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสขั้นต้นสูงกว่าสายพันธุ์เดิม

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	1	0.211	0.211	16.229
ERROR	8	0.104	1.301×10^{-2}	
TOTAL	9	0.315		

Significant at 95% level

ตารางที่ 32 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	1	7.605×10^{-8}	7.605×10^{-8}	37.70
ERROR	6	1.210×10^{-8}	2.017×10^{-9}	
TOTAL	7	8.815×10^{-8}		

Significant at 95% level

ตารางที่ 33 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์แลคเคสในเห็ดหลินจือสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	1	1.575×10^{-6}	1.575×10^{-8}	44.09
ERROR	6	2.144×10^{-7}	3.573×10^{-9}	
TOTAL	7	1.790×10^{-6}		

Significant at 95% level

ตารางที่ 34 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าความขาวสว่างของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์และกระดาษไม่ผ่านการฟอก

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	1	54.285	54.285	1118.039
ERROR	18	0.874	4.855×10^{-2}	
TOTAL	19	55.159		

Significant at 95% level

ตารางที่ 35 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าแรงฉีกขาดของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์และกระดาษไม่ผ่านการฟอก

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	1	37822.5	37822.5	42.98
ERROR	8	7040	880	
TOTAL	9	44862.5		

Significant at 95% level

ตารางที่ 36 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าแรงดันทะลุของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์และกระดาษไม่ผ่านการฟอก

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	1	2283.384	2283.384	231.329
ERROR	18	177.673	9.871	
TOTAL	19	2461.057		

Significant at 95% level

ตารางที่ 37 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าการต้านทานแรงดึงของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์และกระดาษไม่ผ่านการฟอก

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	1	0.166	0.166	10.725
ERROR	18	0.278	1.544×10^{-2}	
TOTAL	19	0.444		

Significant at 95% level

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนภา จิรมิตตานนท์ เกิดวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2521 จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2542 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2543 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย