T_646004

การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์พีนอลออกซิเดส

นาย ณรงค์ชัย ชยเดช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5148-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6/4/47

RECEIVED
BY [signature] 2 ก.ย. 2547
DATE

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

การคัดแยกเห็ดราที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

นาย กมลชัย ชะเอม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5148-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING FOR PHENOLOXIDASE-PRODUCING FUNGI

Mr. Kamonchai Cha-aim

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Botany

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-5148-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกเห็ดราที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส
โดย	นายกมลชัย ชะเอม
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ ก้สกุล)

T-646021

กมลชัย ชะเอม: การคัดแยกเห็ดราที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (SCREENING FOR PHENOLOXIDASE - PRODUCING FUNGI) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. มุกดา คูหิรัญ; 109 หน้า. ISBN 974-17-5148-6

การเก็บตัวอย่างเห็ดรากลุ่มไวท์รอทในวงศ์ Ganodermataceae ในพื้นที่สำรวจ 9 จังหวัดของประเทศไทย พบเห็ดราจำนวน 24 ตัวอย่าง ใน 2 สกุล ได้แก่ สกุล *Ganoderma* และสกุล *Amauroderma* ในสกุล *Ganoderma* พบ 23 ตัวอย่าง ดังนี้ *Ganoderma* sp. (5 ตัวอย่าง) *G. lucidum* (7 ตัวอย่าง) *G. applanatum* (2 ตัวอย่าง) *G. fulvellum* (2 ตัวอย่าง) *G. brownii* (2 ตัวอย่าง) และชนิดละ 1 ตัวอย่างคือ *G. shandongense* *G.kunmingense* *G. multiplicatum* *G. gibbosum* และ*G. hainanense* ในสกุล *Amauroderma* พบ 1 ตัวอย่างคือ *Amauroderma rugosum* การศึกษาการเจริญของเส้นใยในอาหารสูตร PDB ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 แสดงให้เห็นว่าเส้นใยทุกตัวอย่างเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มฟีนอลออกซิเดสโดยการใช้สารละลายเคมี พบว่าเห็ดราที่คัดแยกส่วนใหญ่ให้ผลทดสอบบวกต่อเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส การตรวจสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินในขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส จากสายพันธุ์ที่คัดเลือก ระยะเวลา 1 เดือน พบว่า *G. gibbosum* LP2 *G. brownii* KH2 และ *G. lucidum* BK2 สามารถลดปริมาณลิกนินได้สูงสุด 16.52 – 19.49 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (แลคเคส และแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส) จากเห็ดรา 3 ชนิด โดยใช้ guaiacol ความเข้มข้น 4 ไมโครโมล เป็นตัวชักนำ และฟองน้ำสังเคราะห์เป็นวัสดุยึดเกาะของเส้นใย ภายใต้ภาวะเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคส และเอนไซม์แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส เท่ากับ 1.608 X 10^{-4} U/ml และ 2.532 X 10^{-4} U/ml สำหรับ *G. brownii* KH2 0.474 X 10^{-4} U/ml และ 2.052 X 10^{-4} U/ml สำหรับ *G. gibbosum* LP2 1.080 X 10^{-4} U/ml และ 5.244 X 10^{-4} U/ml สำหรับ *G. lucidum* BK2 ตามลำดับ การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (60-80 %w/v) จากเห็ดรา 3 ชนิดให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้น 6.06-9.38 เท่า และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส เพิ่มขึ้น 3.34-10.99 เท่า

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต กมลชัย ชะเอม

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา (ร่วม)

4372201023: MAJOR BOTANY

KEY WORD: PHENOLOXIDASE, WHITE-ROT FUNGI

KAMONCHAI CHA-AIM: THESIS TITLE: SCREENING FOR PHENOLOXIDASE-PRODUCING FUNGI. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. MUKDA KUHIRUN; 109 pp. ISBN 974-17-5148-6

Collection of white - rot fungi in the family Ganodermataceae was conducted in 9 provinces in Thailand. From 24 samples collected, they were found to be belong to 2 genera, *Ganoderma* and *Amauroderma*. In the genus *Ganoderma*, there were 23 samples identified as *Ganoderma* sp. (5 samples), *G. lucidum* (7 samples), *G. applanatum* (2 samples), *G. fulvellum* (2 samples), *G. brownii* (2 samples), and one sample for each following species: *G. gibbosum*, *G. hainanense*, *G.kunmingense*, *G. multiplicatum*, and *G. shandongense*. In the genus *Amauroderma* only one sample, *Amauroderma rugosum*, was found. All fungal isolates grew well in PDB medium at 30 Celsius and pH 5.0. The detection for phenoloxidase production was determined by chemical reagent. Most isolates gave positive result for laccase and peroxidase activity. To determine the ability of lignin degradation, each selected isolate was incubated in a medium containing eucalyptus sawdust for one month. Three isolates including *G. brownii* KH2, *G. gibbosum* LP2, and *G. lucidum* BK2 showed superior ability to decrease the lignin content in sawdust by 16.52-19.49 %. The production of phenoloxidases (laccase, Lac and manganese peroxidase, MnP) from these three species using 4 μM guaiacol as an inducer and synthetic sponge as the hyphal supporter was performed under shaking condition at 30±2 Celsius. The Lac and MnP activities in crude preparations were found to be 1.608×10^{-4} U/ml and 2.532×10^{-4} for *G. brownii* KH2, 0.474×10^{-4} U/ml and 2.052×10^{-4} U/ml for *G. gibbosum* LP2, and 1.080×10^{-4} U/ml and 5.244×10^{-4} U/ml for *G. lucidum* BK2, respectively. After a partial purification by ammonium sulfate precipitation, the activities of Lac increased 6.06 – 9.38 folds while those of MnP increased 3.34 – 10.99 folds for all species.

Department	Botany	Student's signature	Kamonchai Cha-aim
Field of Study	Botany	Advisor's signature	Hunsa Punnapayak
Academic year	2003	Co-advisor's signature	Mukda Kuhirun

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากความเมตตาและความอนุเคราะห์จากหลายๆ ฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ช่วยให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ. เตือนใจ โก้สกุล ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_646004

ขอขอบคุณ คุณอนิวรรต เฉลิมพงษ์ ข้าราชการบำนาญ กรมป่าไม้ ที่กรุณามอบเอกสารวิชาการการจัดจำแนกเห็ดรา และให้คำแนะนำในการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณ คุณจรวย ธงไชย ผู้อำนวยการกลุ่มงานวิจัย 3 กรมวิทยาศาสตร์บริการ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิเคราะห์เยื่อกระดาษ และพี่ๆ ทุกคนที่คอยแนะนำการฝึกปฏิบัติการครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสุนทร ยงค์วิบูลศิริ หัวหน้าแผนกผลิตเยื่อ กลุ่มกระดาษและบรรจุภัณฑ์ บริษัทสยามเซลลูโลส จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เยื่อกระดาษยูคาลิปตัส

ขอขอบคุณ คุณสุชาติ โสภณพัฒนะโภคา คุณสุภาพ โสภณพัฒนะโภคา และครอบครัวโสภณพัฒนะโภคา ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเห็ดราในทุกๆครั้ง รวมถึงคำขอบคุณเป็นพิเศษแด่นางสาว สุภาภรณ์ โสภณพัฒนะโภคา สำหรับกำลังใจ ความเอื้อเฟื้อที่มีให้ตลอดเวลา และความช่วยเหลือในการจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

นอกจากนี้ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณในความรักของคุณแม่ คุณพ่อ พี่สาว และครอบครัวที่อบอุ่นของข้าพเจ้า ที่ให้กำลังใจ ความเข้มแข็งในทุกโอกาสเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญภาพ.....ฌ
คำย่อ.....ฎ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. ตรวจเอกสาร.....3
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....17
4. ผลการทดลอง.....28
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....67
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....74

รายการอ้างอิง.....79
ภาคผนวก.....86
ภาคผนวก ก.....87
ภาคผนวก ข.....90
ภาคผนวก ค.....94
ภาคผนวก ง.....100
ภาคผนวก จ.....104
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....109

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 เห็ดรากลุ่มไวท์รอทที่สำรวจพบในจังหวัดต่างๆ และถิ่นอาศัย.....29
2 สันฐานวิทยาเปรียบเทียบของเห็ดราสกุล *Ganoderma* และสกุล *Amauroderma*.....31
3 การเจริญของเส้นใยของเห็ดราที่คัดแยกได้บนอาหารสูตร PDA ในวันที่ 7 ค่า pH 5.5.....44
4 ผลการทดสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสโดยใช้รีเอเจนท์.....46
5 เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยและวงสีที่เกิดขึ้นจากการใช้ 0.1% gallic acid ใน อาหารสูตร potato dextrose agar 49
6 เปอร์เซ็นต์ความต่างของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในการย่อยสลายขี้เลื่อย ไม้ยูคาลิปตัสจากเชื้อที่คัดแยกได้.....51
7 ค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (LiP) เอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (MnP) และเอนไซม์แลคเคส (Lac) จาก *G.lucidum* BK2.....55
8 ค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (LiP) เอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (MnP) และเอนไซม์แลคเคส (Lac) จาก *G. brownii* KH2.....55
9 ค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (LiP) เอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (MnP) และเอนไซม์แลคเคส (Lac) จาก *G. gibbosum* LP2.....56
10 ค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (LiP) เอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (MnP) และเอนไซม์แลคเคส (Lac) จาก *P. chrysosporium*.....56
11 ความบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 60% ที่ผลิตจาก *G. lucidum* BK2 58
12 ความบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 60 % ที่ผลิตจาก *G. brownii* KH2.....59
13 ความบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 80 % ที่ผลิตจาก *G. gibbosum* LP2.....60
14 ความบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 60 % ที่ผลิตจาก *P. chrysosporium*.....61
15 ผลของอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส.....63
16 คุณสมบัติของเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจากเห็ดรา กลุ่มไวท์รอท.....66

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 โครงสร้างชีวมวลของพืชในไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง....3

2 โครงสร้างของ lignin precursor ทั้ง 3 ชนิด....6

3 โครงสร้างของ softwood lignin....6

4 กระบวนการเปลี่ยนชีวมวลของพืชโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส....8

5 โครงสร้างของเอนไซม์แลคเคส type 1 – type 3....10

6 กลไกการย่อยสลายลิกนินโดยเอนไซม์แมงนีสเพอร์ออกซิเดส....12

7 สารกลุ่มฟีนอลิกบางชนิดที่ใช้ในการตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส....13

8 พื้นที่เก็บตัวอย่างเห็ดรา....28

9 ลักษณะดอก *G. lucidum* BK1....32

10 ลักษณะดอก *G. lucidum* BK2....32

11 ลักษณะดอก *G. lucidum*. BK3....33

12 ลักษณะดอก *Ganoderma* sp. BK4....33

13 ลักษณะดอก *G. fulvellum*. BK5....34

14 ลักษณะดอก *G. lucidum* KC1....34

15 ลักษณะดอก *Ganoderma* sp. KC2....35

16 ลักษณะดอก *G. lucidum* KC3....35

17 ลักษณะดอก *G. lucidum* KH1....36

18 ลักษณะดอก *G. brownii* KH2....36

19 ลักษณะดอก *G. fulvellum* CB....37

20 ลักษณะดอก *Ganoderma* sp. TD1....37

21 ลักษณะดอก *G. applanatum* TD2....38

22 ลักษณะดอก *G. kunmingense* NP1....38

23 ลักษณะดอก *G. applanatum* NP2....39

24 ลักษณะดอก *G. multiplicatum* NP3....39

25 ลักษณะดอก *G. hainanense* NP4....40

26 ลักษณะดอก *G. lucidum* NP5....40

27 ลักษณะดอก *G. brownii* NRM1....41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

28 ลักษณะดอก *Ganoderma* sp. NRM2.....41

29 ลักษณะดอก *Ganoderma* sp. LB.....42

30 ลักษณะดอก *G. shandongense* LP1.....42

31 ลักษณะดอก *G. gibbosum* LP2.....43

32 ลักษณะดอก *Amauroderma rugosum* LP3.....43

33 วงสีที่เกิดขึ้นบนโคโลนีเส้นใยของเห็ดสกุล Ganoderma สายพันธุ์ NP1 – NP5.....47

34 ฟองอากาศที่เกิดขึ้นบนโคโลนีเส้นใยโดยใช้ 0.03% hydrogen peroxide ทดสอบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส.....47

35 วงสีที่ไม่เกิดขึ้นบนโคโลนีเส้นใยของเห็ดสกุล Ganoderma 47

36 วงสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นในการทดสอบเอนไซม์แลคเคสด้วย 0.1 % gallic acid.....48

37 เห็ดราที่เจริญในอาหารสูตรขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส ในเวลา 1 เดือน.....50

38 กราฟแสดงการเจริญของเส้นใยในอาหารสูตร PDB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียสของ *G. lucidum* BK2 52

39 กราฟแสดงการเจริญของเส้นใยในอาหารสูตร PDB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียสของ *G. brownii* KH2.....52

40 กราฟแสดงการเจริญของเส้นใยในอาหารสูตร PDB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียสของ *G. gibbosum* LP2.....53

41 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *P. chrysosporium* ในอาหารสูตร PDB.....53

42 แผ่นกระดาษทดสอบที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากเห็ดรากลุ่มไวท์รอท.....65

43 กราฟมาตรฐานโปรตีน เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Biuret method.....93

คำย่อ

CTAB	=	cetyl trimethyl ammonium bromide
EDTA	=	ethylene diamine tetra-acetic acid
g	=	กรัม
g/g	=	กรัมต่อกรัม (สับสเตรท)
g/L	=	กรัมต่อลิตร
μ	=	ไมโครเมตร
μg	=	ไมโครกรัม
kg	=	กิโลกรัม
L	=	ลิตร
M	=	โมลาร์
mM	=	มิลลิโมลาร์
mg	=	มิลลิกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
U/ml	=	หน่วยต่อมิลลิลิตร
v/v	=	ปริมาตรต่อปริมาตร
w/v	=	น้ำหนักต่อปริมาตร
%	=	เปอร์เซ็นต์

บทที่ 1

บทนำ

เห็ดราเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายอินทรียสารซึ่งเป็นองค์ประกอบของซากต้นไม้ ใบไม้ ให้มีขนาดเล็กลงและอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำอินทรียสารนั้นไปใช้ประโยชน์ได้อีก ชีวมวลของพืชที่มีเนื้อเยื่อลำเลียงหรือพืชที่มีเนื้อไม้มีองค์ประกอบหลัก คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยที่ลิกนินเป็นสารกลุ่มอะโรมาติคที่ประกอบด้วยหน่วยของ phenylpropane อย่างซับซ้อน ในลักษณะโครงสร้างสามมิติ โดยทั่วไปลิกนินในชีวมวลของพืชมีอยู่ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ มีสีน้ำตาล จึงทำให้เนื้อไม้มีสีน้ำตาลมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณลิกนินในพืชนั้นๆ เห็ดราในกลุ่มไวท์รอทมีบทบาทสำคัญในเชิงนิเวศน์ สามารถเจริญอยู่บนเนื้อไม้ที่ยังมีชีวิตหรือไม่มีชีวิตในธรรมชาติ และสามารถย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้ได้ ทำให้เนื้อไม้มีสีขาวหรือซีดจางลง เนื่องจากเห็ดรากลุ่มไวท์รอทสามารถผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส อันได้แก่ แลคเคส เพอร์ออกซิเดส (ลิกนินเพอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโครงสร้างลิกนิน เห็ดรากลุ่มนี้ส่วนใหญ่อยู่ในดิวิชั่นเบสิดิโอไมโคตา ที่สำคัญได้แก่วงศ์ Polyporaceae เช่น *Coriolus versicolor Trametes elegans* และวงศ์ Ganodermataceae เช่น *Ganoderma lucidum G. tsugae* และอยู่ในดิวิชั่นแอสโคไมโคตา ที่สำคัญได้แก่สกุล *Xylaria* spp. *Hypoxylon* spp. เป็นต้น

เนื่องจากเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้ จึงได้มีการศึกษาเพื่อนำเอนไซม์นี้มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การฟอกเยื่อกระดาษให้ขาวขึ้น ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มค่าความขาวสว่างและลดค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อกระดาษได้ระดับหนึ่ง การใช้เอนไซม์นี้ลดสีของน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษซึ่งมีสีน้ำตาลของสารประกอบที่เกิดจากกระบวนการทำกระดาษซึ่งมีลิกนินเป็นสารตั้งต้น และการใช้แลคเคสซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มนี้ย่อยสลายสารประกอบพอลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polyaromatic hydrocarbon, PAH) ซึ่งเป็นสารปนเปื้อนที่เป็นพิษอยู่ตามแหล่งน้ำและดินในธรรมชาติ

ปัจจุบันการศึกษาเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสนั้นมีการศึกษาในเชื้อราและเห็ดไม่กี่ชนิดที่ได้รับความนิยมเช่น *Phanerocheate chrysosporium Coriolus versicolor Trametes elegans* และ *Ganoderma lucidum* จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าในประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น มีความหลายหลากทางชีวภาพสูง เห็ดราก็เป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มหนึ่งที่มีความหลากหลายมาก แต่ในสภาพธรรมชาติและป่าธรรมชาติของประเทศไทยยังมีเห็ดราอีกหลายชนิดที่ยังมิได้มี

การนำมาศึกษาถึงรูปอนุกรมวิธาน รวมถึงการศึกษาเพื่อเป็นแนวทางที่จะนำเห็ดราเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ในเชิงเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การฟอกเยื่อกระดาษโดยการใช้เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งมีผลช่วยลดการใช้สารเคมีและช่วยอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ดังนั้นการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดราในกลุ่มไวท์รอทเพื่อศึกษาถึงการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สำคัญในการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยเพื่อให้เกิดประโยชน์

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดแยกเห็ดราที่อาศัยบนเนื้อไม้จากสภาพธรรมชาติ การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และการนำเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจากเห็ดราที่คัดแยกได้มาใช้ในขั้นตอนฟอกเยื่อกระดาษให้มีค่าความสว่างเพิ่มขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงสภาพธรรมชาติของเห็ดรากลุ่มไวท์รอท การแยกเส้นใยเห็ดราและแนวทางการใช้คู่มือสำหรับการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง การเลือกใช้สารละลายเคมีในการทดสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และให้ประสิทธิภาพในการตรวจสอบที่ดี รวมถึงการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในภาวะที่เหมาะสม เพื่อนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ในขั้นตอนของอุตสาหกรรมการฟอกเยื่อกระดาษ

ขอบเขตของงานวิจัย

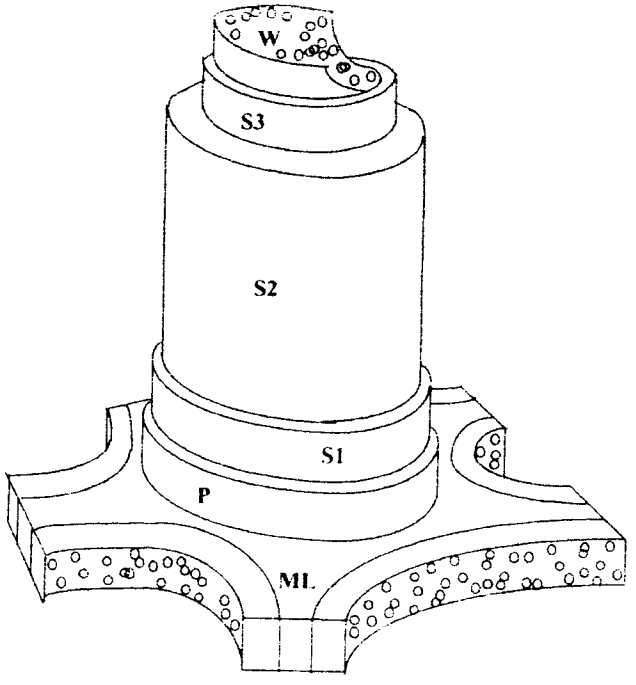
สำหรับงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการสำรวจ การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ การเก็บรักษา และการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรชีวภาพ อันได้แก่ เห็ดราวงศ์ Ganodermataceae และ Polyporaceae ที่เจริญอยู่บนเนื้อไม้ เพื่อการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในภาวะที่เหมาะสม และศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ รวมถึงการนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในขั้นตอนการย่อยสลายลิกนินสำหรับอุตสาหกรรมการฟอกเยื่อกระดาษ

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ชีวมวลของพืช

โครงสร้างชีวมวลของพืชประกอบด้วยเซลล์หลายกลุ่มที่ทำหน้าที่ต่างกัน เช่น tracheid หรือ vessel อาจเป็นเซลล์ที่ยังทำงานอยู่ (functional cell) หรือเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว โดยเริ่มตั้งแต่ชั้นผนังเซลล์นอกสุด (primary wall, P) ถัดเข้ามาจะเป็นผนังเซลล์ชั้นที่สอง (secondary wall) จะเป็นชั้นที่แบ่งออกเป็น S_1 ทำหน้าที่เป็นผนังเซลล์ในชั้นนอกสุดของผนังเซลล์ชั้นที่สอง ถัดมาเป็นชั้น S_2 ที่มีความหนาที่สุด มีการจัดเรียงตัวของคาร์โบไฮเดรตและลิกนิน หรือเป็นชั้นที่เรียกว่า middle lamella ที่อยู่ติดกับชั้น S_3 ถัดจากชั้น S_3 เข้าไปเป็นส่วนที่ลำเลียงน้ำ สารอาหาร หรือสะสมอาหาร (Eriksson et al., 1990) ดังภาพที่ 1



P = Primary wall
S_1 = Outer layer
S_2 = Middle layer } Secondary
S_3 = Inner layer } wall
W = Warty layer
ML = Middle lamella

ภาพที่1 โครงสร้างชีวมวลของพืชในไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง (Eriksson et al., 1990)

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบ พบว่าชีวมวลพืชประกอบด้วยสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่เชื่อมต่อกันโดยหน่วยของน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม และ 5 อะตอม อย่างเป็นระเบียบได้แก่ โครง

สร้างที่เรียกว่า เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และโครงสร้างของสารกลุ่มฟีนอลิก หรืออะลิฟาติคที่จัดเรียงอย่างซับซ้อนที่เรียกว่า ลิกนิน (Waldner et al., 1988)

เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์สายตรงของ β-D-glucopyranose โดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -glycosidic linkage ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4 เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่มีรูปแบบง่ายๆ โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุล สายของกลูแคนจะมีแกนสมมาตรที่เป็นเกลียวพับสองทบ ซึ่งมีความคงตัวและแข็งเพราะพันธะภายในและระหว่างโมเลกุล บริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นจะเรียกว่า มีรูปแบบที่เป็น crystalline ซึ่งยากต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ส่วนบริเวณที่เป็น amorphus จะมีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นน้อย จึงย่อยสลายได้ง่ายกว่า ขนาดของโมเลกุลเซลลูโลสจะนิยามอยู่ในรูปของ Degree of polymerization (DP) ซึ่งบอกถึงจำนวนของกลูโคสในสายพอลิเมอร์ (Eriksson et al., 1990) โดยทั่วไปสายของเซลลูโลสจะประกอบด้วยกลูโคส 8,000-12,000 หน่วย (Saha and Bothast, 1997) และอาจมากถึง 14,000 หน่วย ในพืชชั้นสูงบางชนิด (Eriksson et al., 1990)

เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์สายตรงที่มีกิ่งก้านสาขา ซึ่งประกอบขึ้นจากพอลิเมอร์ของน้ำตาลหลายชนิด ส่วนที่เป็นสายตรงของเฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่จะเป็นหน่วยของไซโลสที่เชื่อมต่อกันที่ตำแหน่ง β -1,4 ส่วนกิ่งก้านสาขาจะเป็นหน่วยของ อะราบิโนส แมนโนส กลูโคส กาแลคโตส กรดกลูคูโรนิค และน้ำตาลเพนโตสชนิดอื่น (Bungay, 1981) เฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่จะมีน้ำตาล 2-6 ชนิด เฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็งจะมีค่า DP 150-200 ปริมาณของเฮมิเซลลูโลสในเนื้อไม้แห้งมักจะมีค่าอยู่ระหว่าง 20-30% ในไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งจะมีความแตกต่างของลักษณะในองค์ประกอบและโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (Eriksson et al., 1990)

ลิกนิน

ลิกนินเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลลิก อะโรมาติกและอะลิฟาติกที่จัดเรียงกันเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพสามมิติซับซ้อน (Waldner et al., 1988; Yee et al., 1996; Lara et al., 2003) พบในเนื้อไม้ของพืชชั้นสูง (Mester and Field, 1998; Hofrichter, 2002) ให้ความแข็งแรงกับเนื้อไม้ (Reid, 1994; Lara et al., 2003) ทำหน้าที่เปรียบเสมือนกาวช่วยยึดเนื่อเยื่อลำเลียงทุกส่วนของพืช (vascular tissue) หรือเส้นใย (fiber) ให้ยึดติดแน่นแทรกอยู่ในชั้น middle lamella ของผนัง

ชั้นที่สองในเซลล์พืช (Eriksson et al., 1990) เป็นแนวกั้นในการเคลื่อนตัวของน้ำในพืช (Hofrichter, 2002) และป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ที่จะทำให้เกิดโรคในพืช (Waldner et al., 1988; Orth et al., 1991) เนื่องจากเป็นพอลิ เมอร์ชีวภาพที่พืชสร้างขึ้น จึงมีปริมาณชีวมวลของพืชมากเป็นอันดับสองรองมาจากเซลลูโลส (Kirk, 1987; Yee et al., 1996; Collins et al., 1998; Eggert et al., 1996; Leonowicz et al., 1999) และเป็นสารประกอบกลุ่มคาร์บอนอะโรมาติกจากพืชที่มีปริมาณมากที่สุด (Bergbauer, 1991; Hofrichter, 2002) จัดเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน สามารถมีการหมุนเวียนนำมาใช้ได้ใหม่ (renewable aromatic biopolymer) ในวัฏจักรคาร์บอนบนโลก (Kirk, 1987; Thakker et al., 1992; Collins et al., 1998; Eggert et al., 1996; Souza et al., 1999)

ลิกนินเป็นภาษาละตินมาจากคำว่า "lignum" ซึ่งแปลว่าไม้ ซึ่งถูกนำมาใช้ครั้งแรกโดย Anselme Payen นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน ในปี ค.ศ. 1838 (Leonowicz et al., 1999) เนื่องจากลิกนินพบได้ในพืชชั้นสูงรวมถึงพืชกลุ่มเฟิร์นขึ้นมา แต่ไม่พบในลิเวอร์เวิรท์ (liverwort) มอส (moss) หรือกลุ่มที่จัดอยู่ในอนุกรมวิธานของพืชที่ต่ำกว่านี้ โดยทั่วไปลิกนินในเนื้อไม้และเนื้อเยื่อลำเลียงของพืชจะมีอยู่ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ (Kirk, 1987)

กระบวนการสังเคราะห์ลิกนินทางชีวภาพเกิดขึ้นจาก precursor alcohol 3 ชนิด (Kirk, 1987) (ภาพที่ 2) หรือ phenyl propanoid unit ที่มีพันธะโควาเลนท์ระหว่าง C-C และ C=O ยึดติดกัน (Orth et al., 1991; Hofrichter, 2002) ได้แก่

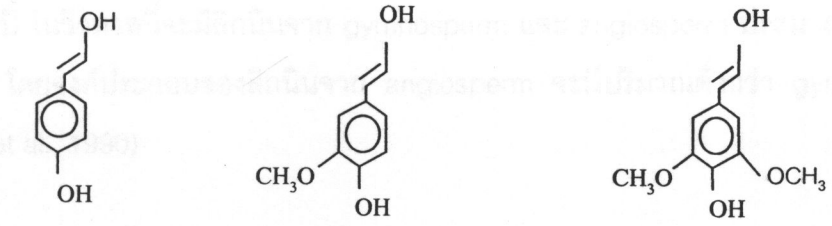
p – hydroxycinnamyl alcohol (coumaryl) ซึ่งให้เกิดโครงสร้าง p – hydroxyphenyl unit ในโครงสร้างพอลิเมอร์

4 - hydroxy – 3 methoxycinnamyl alcohol (coniferyl) หรือ guaiacyl unit

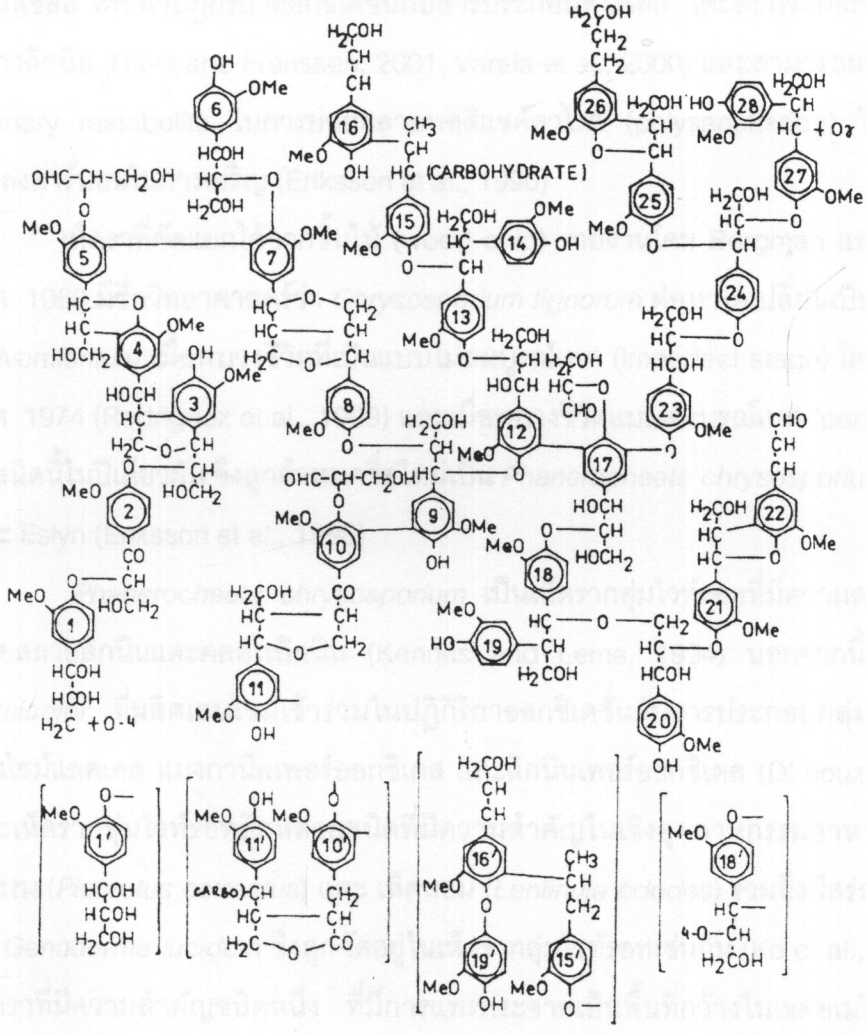
3,5 – dimethoxy – 4 – hydoxycinnamyl alcohol (sinapyl) หรือ syringyl unit

ทั้งสามชนิดมีความแตกต่างกันของจำนวนหมู่ methoxy บนวงแหวนอะโรมาติก (Reid, 1995) โครงสร้างลิกนินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8,000 – 11,000 กิโลดาลตัล (Lara et al., 2003) และมีความซับซ้อน (ภาพที่ 3) (Leonowizc, et al., 1999)

ลิกนินที่พบในพืชกลุ่มเมล็ดเปลือย (gymnosperm) หรือที่เรียกว่า softwood ประกอบด้วย guaiacyl unit และในพืชมีดอก (angiosperm) หรือ hardwood ประกอบด้วย guaiacyl และ syringyl unit ในปริมาณที่เท่ากันโดยประมาณ สำหรับพืชวงศ์หญ้า ลิกนินจะประกอบด้วย coumaryl unit



ภาพที่2 โครงสร้างของ lignin precursor ทั้ง 3 ชนิด (Reid, 1995)



ภาพที่3 โครงสร้างของ softwood lignin (Leonowicz et al., 1999)

ในทุกๆ ปีที่พืชมีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง จะมีชีวมวลเกิดขึ้นโดยประมาณ 10^{11} – 10^{12} ตันต่อปี ในชีวมวลนี้จะมีลิกนินจาก gymnosperm และ angiosperm ประมาณ 15 – 36 เปอร์เซ็นต์ โดยองค์ประกอบของลิกนินจาก angiosperm จะมีปริมาณต่ำกว่า gymnosperm (Eriksson et al., 1990)

เห็ดรากลุ่มไวท์รอท

เห็ดรากลุ่มไวท์รอท เป็นเห็ดราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินและองค์ประกอบอื่นๆ ในเนื้อไม้ เช่น เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส (Eriksson et al., 1990; Ko et al., 2001; Rodriguez et al., 1999) โดยการผลิตเอนไซม์ที่เป็น secondary metabolite ออกมานอกเซลล์ เพื่อทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับสารประกอบฟีนอลิก และอะโรมาติกพอลิเมอรในโครงสร้างลิกนิน (Have and Franssen, 2001; Varela et al., 2000) และสามารถผลิตเอนไซม์ที่เป็น primary metabolite ในการย่อยสลายพอลิแซค์คาไรด์ (polysaccharide) ในเนื้อไม้เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ (Eriksson et al., 1990)

เห็ดราที่คัดแยกได้จากชิ้นไม้ (wood chip) รายงานโดย Bergman และ Nilsson ในปี ค.ศ. 1966 มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Chrysosporium lignorum* ต่อมาได้เปลี่ยนเป็น *Sporotrichum pulverulentum* เมื่อพบวงชีวิตที่เป็นแบบไม่สมบูรณ์เพศ (imperfect stage) โดย Hofsten ในปี ค.ศ. 1974 (Rodriguez et al., 1999) และเมื่อพบวงชีวิตแบบสมบูรณ์เพศ (perfect stage) ของราชนิดนี้ในปีเดียวกัน จึงถูกกำหนดชื่อใหม่เป็น *Phanerocheate chrysosporium* โดย Burdsall และ Eslyn (Eriksson et al., 1990)

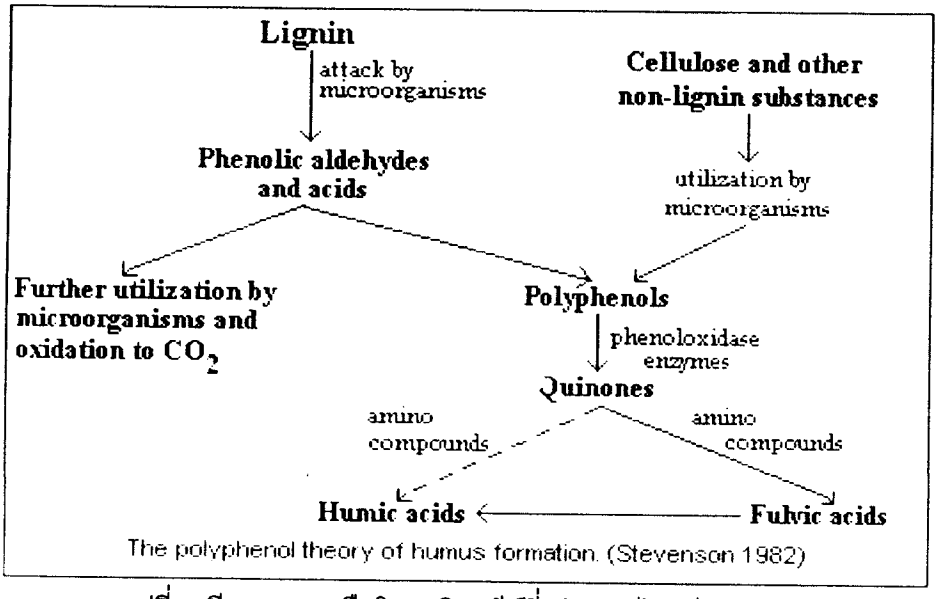
Phanerocheate chrysosporium เป็นเห็ดรากลุ่มไวท์รอทที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายลิกนินและคลอโรลิกนิน (Kennes and Lema, 1994) นอกจากนี้ยังมี *Trametes versicolor* ที่ผลิตเอนไซม์เข้าร่วมในปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ เอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และลิกนินเพอร์ออกซิเดส (D' souza et al., 1999) และเห็ดรากลุ่มไวท์รอทอีกหลายชนิดที่มีความสำคัญในเชิงอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) และ เห็ดหอม (*Lentinula edodes*) รวมถึงมีสรรพคุณทางยา ได้แก่ *Ganoderma lucidum* ซึ่งถูกจัดอยู่ในเห็ดรากลุ่มไวท์รอทเช่นกัน (Ko et al., 2001) และเป็นเห็ดราที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง ที่มีการแพร่กระจายเป็นพื้นที่กว้างในเขตอเมริกาเหนือและทั่วโลก ในการย่อยสลายไม้เนื้อแข็ง (D' souza et al., 1999)

ปัจจุบันมีเห็ดรากลุ่มไวท์รอทจำนวนมากที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินจากเนื้อไม้หลายชนิด แต่เห็ดรากลุ่มไวท์รอทนี้ไม่ได้เลือกย่อยสลายเฉพาะลิกนินเท่านั้น แต่ยัง

สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ด้วย ตัวอย่างเช่น *Trametes versicolor* (Esposito et al., 1993) การย่อยสลายลิกนินสามารถเกิดขึ้นได้ในเศษซากใบไม้ โดย *Marasmius quercophilus* ซึ่งเป็นเห็ดรากลุ่มไวท์รอทชนิดหนึ่งที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในการย่อยเศษใบต้นโอ๊ค (oak) และองค์ประกอบอื่นๆ ของเศษใบไม้ ได้แก่ เซลลูโลส ไซแลน แมนแนน เพคติน และลิกนิน (Tagger et al., 1998)

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

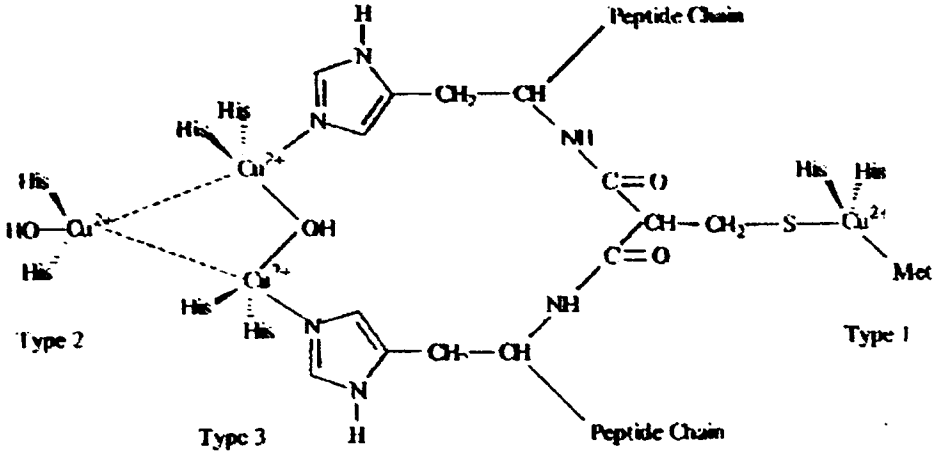
ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) พอลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase) หรือ ฟีนอลเลส (phenolase) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์แลคเคส (laccase) และเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) อันได้แก่ ลิกนินเพอร์ออกซิเดส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) (Griffith, 1994; Rahauti et al., 1995; Tagger et al., 1998; Criquet et al., 2000) มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายลิกนินและองค์ประกอบฟีนอลในลิกนินเพื่อให้ได้กรดฮิวมิค และเปลี่ยนเป็นฮิวมัส ในที่สุด (Stevenson, 1982) (ภาพที่ 4) โดยเอนไซม์ ฟีนอลออกซิเดสพบได้ในพืชและจุลินทรีย์ (Rahauti et al., 1995) รวมถึงเห็ดรากลุ่มไวท์รอทที่สามารถผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสซึ่งพบครั้งแรกโดย Bavendamm ในปี ค.ศ. 1928 และ Davidson และคณะ ในปี ค.ศ. 1938 โดยการใช้สีที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีจาก gallic acid และ tannic acid ในอาหารเลี้ยงเชื้อบ่งชี้การมีเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Eriksson et al., 1990)



ภาพที่ 4 กระบวนการเปลี่ยนชีวมวลของพืชโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Stevenson, 1982)

เมื่อชีวมวลของพืช อันได้แก่ ใบไม้ กิ่งก้าน หรือลำต้นล้มตายลง การย่อยสลายจากจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (saprophytic microorganisms) เช่น เห็ดรา จะปลดปล่อยเอนไซม์หลายชนิดออกมาย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยลิกนินจะเกิดกระบวนการที่เรียกว่า depolymerization ทำให้โครงสร้างของลิกนินเปลี่ยนไปเนื่องจากเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยปฏิกิริยาที่เกิดกับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยโมเลกุลออกซิเจนเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการแยกของพันธะ aryl – alkyl ในโมเลกุลของลิกนิน (Criquet et al., 2000)

เอนไซม์แลคเคส (benzenediol : oxygen oxidoreductase [EC1.10.3.2]) เป็นเอนไซม์หนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ที่พบได้ในพืชและเห็ดราจำนวนมาก (Johannes and Majcherczyk, 2000; Oda et al., 1991; Bourbonnais et al., 1995) เอนไซม์แลคเคสจากเห็ดราหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนิน เช่นในคลาสแอสโคไมซิติส (Ascomycetes) ได้แก่ *Aspergillus nidulans Neurospora crassa* และ *Podospora ansirina* ในคลาสดิวเทอโรไมซิส (Deuteromyces) ได้แก่ *Botrytis cinerea* และเห็ดราหลายสกุลในคลาสเบสิดิโอไมซิติส (Basidiomycetes) (Bollag and Leonowicz, 1984) เอนไซม์แลคเคสเป็นคิวโปรโปรตีน (cuproprotein) ที่มีทองแดง (copper) เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตส ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและรีดักชั่นของซับสเตรตในสารประกอบอะโรมาติกหลายชนิด หรืออะโรมาติกเอมีน โดยใช้โมเลกุลออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำ (Munoz et al., 1997; Duran et al., 2002) โดยทั่วไปแล้วแอคทีฟไซต์ของเอนไซม์แลคเคสประกอบด้วยคอปเปอร์ 4 อะตอม และแบ่งออกเป็นแลคเคส 3 รูปแบบ (type) ซึ่งจัดจำแนกโดยใช้ electron paramagnetic resonance (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของเอนไซม์แลคเคส type 1 – type 3 (Duran et al., 2002)

เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (Peroxidases)

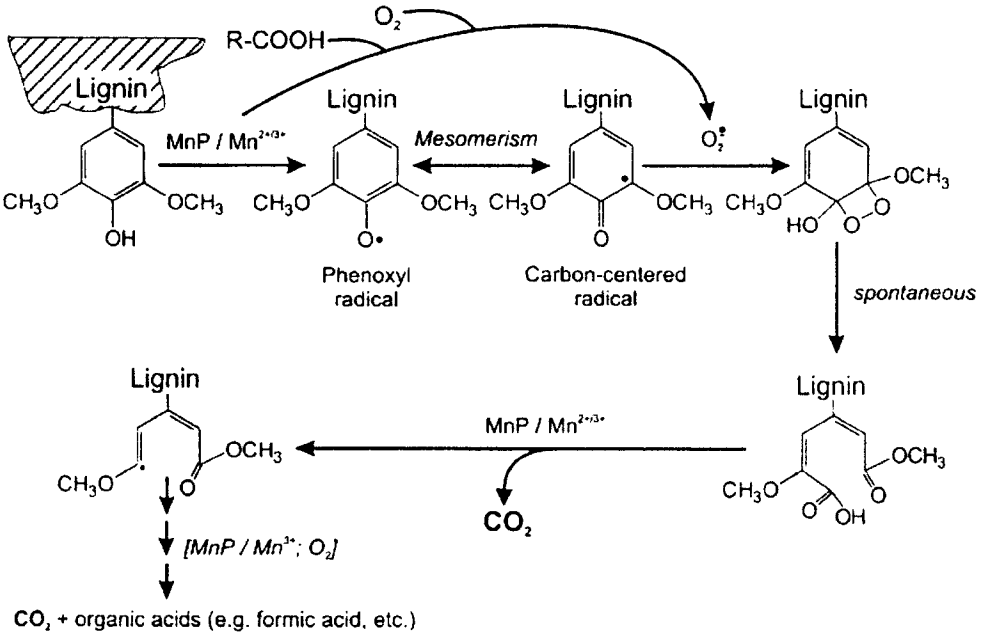
เพอร์ออกซิเดสเป็นฮีโมโปรตีน (hemoprotein) ที่มี heme เป็นองค์ประกอบใน glycoprotein (Hofrichter, 2002) ถูกสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์และเซลล์พืชซึ่งปฏิกิริยาจะถูกกระตุ้นเมื่อมีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เข้าร่วม (Duran and Esposito, 2000) สามารถจำแนกเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่

<u>ฮอสราดิช เพอร์ออกซิเดส</u> (Horseradish peroxidase, HRP; EC.1.11.1.7) สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในฟีนอล (phenol) ไบฟีนอล (biphenol) อะนิลีน (anilines) เบนซิดีน (benzidines) และสารประกอบที่เป็นเฮเทอโร อะโรมาติก (heteroaromatic) อื่นๆ เอนไซม์ HRP มีความเหมาะสมสำหรับการใช้บำบัดน้ำเสีย เนื่องจากเอนไซม์มีความเสถียรสูง สามารถทนต่อค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิในช่วงกว้างได้ดี (Duran and Esposito, 2000)

<u>คลอโรเพอร์ออกซิเดส</u> (Chloro peroxidase, CPO;) ในเห็ดรา *Caldariomyces fumago* ได้เคยมีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์ CPO ที่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับสารประกอบฟีนอลลิกหลายชนิด นอกจากนี้สามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับเอทานอลได้ผลิตภัณฑ์เป็นอัลดีไฮล์ (aldehyde) และสามารถทำปฏิกิริยากับคลอไรด์ไอออน เอนไซม์ CPO สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยวิธีการตรึงเซลล์บนใยแก้วชนิด aminopropyl หรือบนผงแร่ (talc) หรือบน reverse micelles (Duran and Esposito, 2000)

ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase, LiP; EC.1.11.1.14) หรือ ลิกนิเนส (Ligninase) เป็นเอนไซม์ที่รู้จักกันดีจากเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* ในเห็ดราคลาส เบสิดิโอไมซีส (Basidiomyces) และเห็ดราบางชนิดในคลาสแอสโคไมซีส (Ascomyces) (Duran and Esposito, 2000) เห็ดรากลุ่มไวท์รอทชนิดอื่นที่สามารถผลิตเอนไซม์ LiP ได้แก่ *Phlebia radiata Panus tigrinus Trametes versicolor Pluerotus ostreatus* และ *Bjerkanderra adusta* อย่างไรก็ตามเอนไซม์ LiP ก็ไม่ได้พบในเห็ดรากลุ่มไวท์รอททุกชนิด (Hofrichter, 2002) ภายใต้ภาวะจำกัดแหล่งไนโตรเจน *P. chrysosporium* จะปลดปล่อย เอนไซม์ LiP ซึ่งเป็นกลุ่มของไอโซไซม์ (Tien and Kirk, 1988) อย่างน้อย 6 ไอโซไซม์ ที่มีช่วงน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 38 – 45 กิโลดาลตัล โดยไอโซไซม์ของ LiP จำแนกเป็น H1 H2 H6 H7 H8 และ H10 (Cai and Tien, 1991) โดย H8 จัดเป็นไอโซไซม์หลักที่เริ่มต้นศึกษาถึงลักษณะและ โปรตีน โดย Tien และ Kirk ใช้ข้อมูลทางไคเนติค (kinetic) และสเปคโตรสโคปิค (spectroscopic) ที่แสดงถึงค่า ferric heme ที่สูงสุด ซึ่งเหมือนกับ HRP แต่ LiP สามารถที่จะกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชั่นให้ได้ 1 – 2 อิเลคตรอนได้ดีกว่า (Tien and Kirk, 1988)

แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase, MnP; EC 1.11.1.13) ภายใต้ภาวะการย่อยสลายลิกนินของ *P. chrysosporium* จะปลดปล่อยเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสออกมานอกเซลล์ ได้แก่ LiP และ MnP โดยเอนไซม์ MnP มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 46 กิโลดาลตัล (Miura et al., 1997; Cai and Tien, 1991) หรือมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 40 – 50 กิโลดาลตัล ในเห็ดราที่ย่อยสลายลิกนิน (Hofrichter, 2002) ใน *Lenzites betulinus* เอนไซม์ MnP มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 40 กิโลดาลตัล (Hoshino et al., 2002) เอนไซม์ MnP จะกระตุ้น Mn^{2+} ที่ส่วนใหญ่มีในเนื้อไม้และในดิน โดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นให้กลายเป็น Mn^{3+} ที่เหมาะสมกับเห็ดราในการที่จะใช้เป็น mediator สำหรับการย่อยสลายฟีนอลลิกในโครงสร้างลิกนิน (Hofrichter) กลไกหรือวัฏจักรในการกระตุ้น MnP จะคล้ายกับ heme peroxidase อื่น เช่น HRP และ LiP โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นระหว่างสารประกอบที่1 และสารประกอบที่2 โดย MnP จะใช้ Mn^{2+} เป็นตัวให้อิเลคตรอน (electron donor) (ภาพที่ 6)



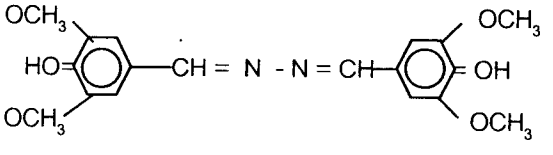
ภาพที่ 6 กลไกการย่อยสลายลิกนินโดยเอนไซม์แมงนีสเพอร์ออกซิเดส (Hofrichter, 2002)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase, EC 1.14.18.1, monophenol monooxygenase) พบได้ตั้งแต่แบคทีเรียจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและมีลักษณะที่แสดงออกแตกต่างกันในแต่ละอวัยวะของสิ่งมีชีวิตเดียวกัน เช่น ในรากและใบของพืชชั้นสูง เป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบซึ่งแคทตาไลซ์ได้ทั้ง hydroxylation ของโมโนฟีนอล (monophenol) เช่น ไทโรซีนเป็น o–diphenols โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส และปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ o – diphenols เป็น o – quinone (EC 1.10.3.1, catechol oxidase) (Duran et al., 2002; Lee et al., 2000) ในอุตสาหกรรมอาหารเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งอยู่ในกลุ่ม พอลีฟีนอลออกซิเดส จะทำให้เกิดสีน้ำตาลในอาหารเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์หลังการเก็บเกี่ยวและการสุก เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลลิก ที่ประกอบด้วย o – dihydroxy group ร่วมกันเปลี่ยนไปเป็น o – quinone ทำให้สี รสชาติ และคุณค่าทางอาหารเปลี่ยนไป ซึ่งระดับการเปลี่ยนสีน้ำตาลขึ้นกับความแตกต่างขององค์ประกอบฟีนอลและแอคติวิตีของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Lee et al., 2000) ในเห็ดหลายชนิด เอนไซม์ไทโรซิเนสจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีของดอกเห็ดในระยะเจริญเต็มที่ (mature stage) การควบคุมเอนไซม์นี้หลังการเก็บเกี่ยวได้แก่ การป้องกันไม่ให้ได้รับแสง และการใช้สารกลุ่ม sulfite ช่วยชะลอการเปลี่ยนสีน้ำตาลในเห็ดรา (Ingebrigtsen et al., 1989)

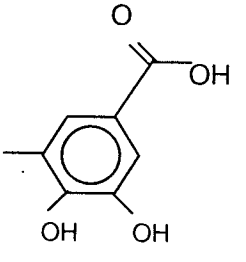
การตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

Bavendamm (1928) ได้ใช้อาหารวุ้นที่มีกรดแทนนิค (tannic acid) หรือกรดกาลิค (gallic acid) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ผสมลงไปในอาหารวุ้น เพื่อทดสอบการปลดปล่อยเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจากเห็ดรา โดยจะเกิดผลทดสอบเป็นบวกเมื่อเกิดวงแหวนสีน้ำตาล (color – brown zone) บนอาหารวุ้นรอบโคโลนีของเส้นใย (Harkin and Obst, 1973) แต่ในปี ค.ศ. 1973 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Harkin และ Obst พบว่าการใช้ syringaldazine (ภาพที่ 7) เป็นสับสเตรตที่ดีในการตรวจสอบเอนไซม์แลคเคสหรือเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่ง่ายและรวดเร็ว โดยการหยดด้วย capillary pipette ลงบนเส้นใยเห็ดราที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง โคโลนีของเส้นใยจะเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูแดงจนถึงสีม่วงเข้ม ข้อดีของการใช้ syringaldazine คือ ไม่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดราเมื่อใช้เพื่อการตรวจสอบ สำหรับ gallic acid (ภาพที่ 7) หรือ tannic acid ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถที่จะยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ ในปี ค.ศ. 1958 Lyr ได้ทดลองความเข้มข้นของ gallic acid และ tannic acid ที่เห็ดรากลุ่มไวท์รอทส่วนใหญ่เจริญได้ที่ความเข้มข้น 0.08 – 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Harkin and Obst, 1973)

Marr และคณะ (1986) ได้ทำการตรวจสอบเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดราที่สร้างดอก (fruiting body) จำนวน 359 ตัวอย่าง จาก 22 วงศ์ (family) โดยใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) syringaldazine ใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอลเป็นตัวทำละลายสำหรับตรวจสอบเอนไซม์แลคเคส และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) *p*–cresol ในการตรวจสอบเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าเห็ดราวงศ์ Ganodermataceae ได้แก่ *Ganoderma tsugae* สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์ไทโรซิเนส ในอัตราส่วน 2.3 : 1



Syringaldazine



Gallic acid

ภาพที่ 7 สารกลุ่มฟีนอลิกบางชนิดที่ใช้ในการตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

Nishida และคณะ (1989) ได้ทำการคัดแยกเห็ดราที่สามารถย่อยสลายลิกนิน โดยใช้ gallic acid guaiacol และrhemazol – brilliant blue R (RBBR) ผสมในอาหารสูตร potato dextrose agar (PDA) เพื่อหาอัตราส่วนของสีที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีอันเนื่องมาจากการปลดปล่อยเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจากเห็ดราแต่ละชนิด และนำเห็ดราที่คัดแยกได้มาใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกเยื่อกระดาษ

นอกจากนี้การตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ที่มีการใช้สารละลายเคมีทดสอบ (reagents) ชนิดอื่นๆ ที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนอล ได้แก่ benzidine o – anisidine pyrogallol alpha – naphthol guaiacal gallic acid และ tyrosine ที่ความเข้มข้น 0.1 โมล ใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล หรือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ syringaldazine ใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ hydrogen peroxide สำหรับตรวจสอบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส ในรากลุ่ม Micromycetes จำนวน 1059 สายพันธุ์ พบว่ามีจำนวน 600 สายพันธุ์ที่ให้ผลตรวจสอบเป็นบวก (Rahouti et al.,1985)

การนำเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมาใช้ในอุตสาหกรรม

เห็ดรากลุ่มไวท์รอทยังมีความไม่มากนักในการใช้ในอุตสาหกรรม แต่อย่างไรก็ตามเห็ดรากลุ่มนี้ยังมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้กับเทคโนโลยีชีวภาพ ตัวอย่างที่รู้จักกันดีในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้แก่ *Lentinula edodes* ที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอาหาร และ *Phanerochaete chrysosporium* ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ การบำบัดทาง ชี วภาพจากการปนเปื้อนในดิน และยังใช้ในการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ในอุสาหกรรมอาหารสัตว์ นอกจากนี้ยังมีเห็ดรากลุ่มไวท์รอทที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ *Ceriporiopsis subvermispora* *Phanerochaete sordida* และ *Trametes versicolor* (Burdsall, 1998)

ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษเห็ดรากลุ่มไวท์รอทมีศักยภาพที่ลดปริมาณลิกนิน (delignification) ในขั้นตอนของการเตรียมเยื่อ (wood pulping) และขั้นตอนของการฟอกเยื่อกระดาษ (pulp bleaching) (Hammel, 1996) อาจเป็นการใช้เอนไซม์ที่ได้จากการผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือทำการบ่มเชื้อโดยตรงกับเยื่อกระดาษ โดย Katagiri และคณะ (1995) ได้ใช้วิธี solid – state fermentation ในการบ่มเชื้อ *Trametes versicolor* และ *Phanerochaete chrysosporium* พร้อมกับเยื่อไม้เนื้อแข็งที่ยังไม่ผ่านการฟอกทางเคมี ในภาวะจำกัดไนโตรเจนและอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนสูง พบว่าหลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วันเยื่อกระดาษมีความขาวเพิ่มขึ้น และค่าคัปปาลดลง

Bourbonnais และคณะ (1995) ได้ทำการฟอกเยื่อกระดาษที่ยังไม่ผ่านการฟอกทางเคมี ด้วยเอนไซม์แลคเคส Type I และ Type II จาก *Trametes versicolor* ที่ 0.1 U/ml ต่อ 4 กรัมเยื่อกระดาษแห้ง ใน 0.05 M sodium acetate buffer ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์แลคเคส Type I มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินได้ดีกว่าเอนไซม์แลคเคส Type II เล็กน้อย โดยค่าคัปปาที่ได้เท่ากับ 14.7 และ 14.9 ตามลำดับ นอกจากกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์จากเห็ดรากลุ่มไวท์รอทแล้ว น้ำทิ้ง (black liquors) จากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ยังมีสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และลิกนินปนเปื้อนในสภาพที่เป็นด่าง การใช้เห็ดรากลุ่มไวท์รอทได้แก่ *Trametes elegans* มาบำบัดน้ำเสียจากโรงงานเยื่อกระดาษโดยตรง พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของสารแขวนลอยที่ปนเปื้อนในน้ำเสียมีค่าลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าการกระจายตัวของแสง (dispersity) เพิ่มขึ้น 2 เท่า (Lara et al., 2003)

Edwards และคณะ (2002) ได้ใช้เอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสจาก *Trametes versicolor* เพื่อขจัดสารกลุ่มอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดยการตรึงเส้นใยของ *T. versicolor* กับอัลตราฟิวเตรชั่น เมมเบรน (polysulphone) ในถัง reactor แล้วตรวจสารปนเปื้อนโดยการวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าสารกลุ่มอะโรมาติกมีปริมาณลดลง

เอนไซม์ฟีนอลลออกซิเดสจากเห็ดรากลุ่มไวท์รอท ยังมีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางชีววิธี (biotransformation) ในสารกลุ่มที่เรียกว่า organopollutants อันได้แก่ กลุ่มยาฆ่าแมลง (insecticide) เช่น 1,1,1 – trichloro – 2,2 – bis (4 – chlorophenyl) ethane (DDT) กลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) เช่น อนุพันธ์ของเบนซิน กลุ่มสีย้อยสังเคราะห์ (synthetic dyes) กลุ่มพอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymers) เช่น พลาสติก โดยเห็ดรากลุ่มไวท์รอทที่มีประสิทธิภาพในการที่จะเปลี่ยนหรือย่อยสลายโครงสร้างสารกลุ่มต่างๆ เหล่านี้ ได้แก่ P. *chrysosporium T. versicolor Pleurotus* sp. *Bjerkandera adusta Coriolopsis polyzona* (Pointing, 2001)

Schultz และคณะ (2001) ใช้เอนไซม์แลคเคสจาก *Pycnoporus cinabarinus* ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารกลุ่ม polychlorinate biphenyls (PCBs) พบว่าสายของ PCBs ที่มีลักษณะเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomers) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นแขนและวงแหวนอะโรมาติกถูกเปลี่ยนเป็นโครงสร้างที่ลดความเป็นพิษลงเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC

Sutherland (1992) รายงานว่าเห็ดราหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs ได้แก่ *Aspergillus ochraceus Cunnimghamella elegans P. chrysosporium Saccharomyces cerevisiae* และ *Syncephalastrum racemosum* โดยกระบวนการ transformation แม้ว่าสารบางชนิดเป็นสารก่อมะเร็งและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (mutagenic) แต่เห็ดราหลายชนิดก็สามารถลดความเป็นพิษของสารเหล่านี้ให้ลดน้อยลงได้

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Model BL610, Sartorius, Germany)
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Model TC-205, Denver Instrument Company)
3. กล้องจุลทรรศน์ (Model CH30RF200, Olympus, Japan)
4. Plant microtome
5. เครื่องบดตัวอย่างไม้ยูคาลิปตัส
6. ตะแกรงร่อนขนาด 200 mesh และ 35 mesh
7. Vortex (Model Genie 2, Scientific industries)
8. Hot plate (Cimarec 3)
9. Hot plate (Model 210T, Thermix, Fisher Scientific, USA)
10. เครื่องทำความร้อนสำหรับกลั่น (Electromantle, Electrothermal, England)
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แบบควบคุมอุณหภูมิ (Model Universal 32R, Hettich, Germany)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แบบควบคุมอุณหภูมิ (Model B-22M, Thermo IEC, International Equipment Company, USA)
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Model NovaSpec 4049, LKB Biochrom, England)
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Model 8453, Hewlett Packard)
15. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Model PP-50, Sartorius, Germany)
16. Dialysis membrane (Model 1487, Spectra, USA)
17. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker, Model G25, New Brunswick Scientific Co.Inc., USA)
18. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (BINDER, Germany)
19. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (Model IV10000, TEQ)
20. ตู้อบความร้อนสูง (Hot Air Oven) (Model U50 790,387, Memmert)

21. ตู้อบความร้อนสูง (Hot Air Oven) (Binder)
22. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) (TA CHANG, Taichang, Taiwan)
23. ตู้ถ่ายเชื้อ (lamina flow) (Model B∀T123, ISSCO)
24. เครื่องกระจายเยื่อ (Mavis engineering Ltd., London, England)
25. เครื่องวัดความขาวสว่าง Elrepho 2000 (Datacolor Ltd., Switzerland)
26. เครื่องวัดความอุ้มน้ำของเยื่อ (Canadian standard Freeness tester No. 3543, Robert Mitchell Inc., Quebec, Canada)
27. เครื่องวัดความต้านทานแรงดึงแบบ pendulum (Toyoseidi Tyoseisaka-SHO. Ltd., Tokyo, Japan)
28. เครื่องวัดแรงฉีกขาด (Appita Elmendorf, Amityville, New York, USA)
29. เครื่องวัดแรงดันทะลุ (Testing machine Inc., Amityville, New York, USA)

เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณลิกนินในพืช

1. Sodium lauryl sulfate (APS)
2. Disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) (APS)
3. Sodium borate decahydrate ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) (APS)
4. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Merck)
5. 2-Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoehyl ether) (Merck)
6. Sodium Sulfite ($NaSO_3$) (Scharlau)
7. Decahydronaphthalene (Fluka)
8. Acetone (Merck)
9. Sulfuric acid (Merck)
10. Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) (SERVA)
11. Potassium permanganate ($KMnO_4$) (Carlo Erba)
12. Silver sulfate (Ag_2SO_4) (Carlo Erba)
13. Ferric nitrate nanohydrate ($Fe(NO_3)_3.9H_2O$) (APS)
14. Silver nitrate ($AgNO_3$) (Merck)
15. Potassium acetate (Scharlau)
16. Acetic acid, glacial (Merck)

17. Tertiary butyl alcohol (Butanol) (APS)
18. Oxalic acid dihydrate (Carlo Erba)
19. 95% Ethanol
20. Hydrochloric acid (HCl) (Merck)

เคมีภัณฑ์สำหรับการตรวจสอบเอนไซม์ด้วยสารละลายทดสอบ

1. Hydrogen peroxide (APS)
2. p-cresol (Sigma)
3. Syringaldazine (Sigma)
4. 95 % เอทานอล

เคมีภัณฑ์สำหรับการตรวจสอบเอนไซม์แลคเคส

1. Gallic acid
2. Potato dextrose broth
3. Agar

เคมีภัณฑ์สำหรับการเลี้ยงเชื้อราและการผลิตเอนไซม์

1. Glucose (Sigma)
2. Asparagine (Merck)
3. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Merck)
4. Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$) (Merck)
5. Fumaric acid (APS)
6. Sodium carbonate (Na_2CO_3) (MercK)
7. $Fe_2(S0)_4$ (Merck)
8. Zinc sulfate ($ZnS0_4$) (Merck)
9. Manganese sulfate ($MnS0_4$) (Carlo Erba)
10. Guaiacol (Sigma)

เคมีภัณฑ์สำหรับการวัดปริมาณเอนไซม์และโปรตีน

1. 2,6-Dimethyl phenol (Sigma)

2. Sodium tartate (Carlo Erba)
3. Tartaric acid (Carlo Erba)
4. Manganese sulfate (Merck)
5. Hydrogen peroxide (APS)
6. Veratyl alcohol (Sigma)
7. Sodium hydroxide (Mallinckrodt)
8. Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$) (APS)

เคมีภัณฑ์สำหรับการเตรียมบัฟเฟอร์

1. Acetic acid, glacial (Merck)
2. Sodium acetate (Merck)
3. 1 N Hydrochloric acid (APS)
4. 1 N Sodium hydroxide (Merck)

เคมีภัณฑ์สำหรับวัดค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อ

1. Potassium permanganate ($KMnO_4$) (Carlo Erbra)
2. Sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3$) (Fisher)
3. Potassium Iodine (KI) (Merck)
4. Sulfuric acid (H_2SO_4) (APS)
5. Starch (Merck)

เชื้อราที่ใช้ในการวิจัย

เห็ดราในสกุล Ganodermataceae ที่คัดแยกสภาพธรรมชาติ ใน 9 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี ขอนแก่น ชลบุรี ตราด นครปฐม นครราชสีมา ลพบุรี และลำพูน เชื้อ *Phaenerocheate chrysosporium* จากหน่วยปฏิบัติการการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. **การสำรวจ การเก็บตัวอย่าง และการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์เห็ดรากลุ่มไวท์รอท**

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดราใน 9 จังหวัดของประเทศไทย ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2544 ถึงเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2546 โดยเก็บตัวอย่างเห็ดราซึ่งเจริญอยู่ในพื้นที่สาธารณะ สวนป่าและริมถนน นำตัวอย่างเห็ดราที่ได้มาตรวจสอบเพื่อหาชื่อวิทยาศาสตร์ การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ดราใช้หลักการของ Dichotomous Key ของ J. D. Zhao จากหนังสือที่ใช้ในประกอบในการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ คือ The Ganodermataceae in China, Bibliotheca Mycologica Band 132, J. Cramer ปี 19 89 เอกสารประกอบการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของ Gilbertson และ Ryvarden ปี 1986 และเอกสารการจำแนกชนิดพันธุ์เห็ดราขนาดใหญ่ในระบบนิเวศป่าไม้ (อนิวรรต เฉลิมพงษ์, 2541)

2. **การแยกเส้นใยบริสุทธิ์ และการเก็บรักษา**

ตัวอย่างเห็ดราที่เก็บมาจากสภาพธรรมชาติ นำมาเช็ดผิวด้านนอกด้วย 70 % เอทานอล ในตู้แยกเชื้อ ใช้มีดผ่าตัดเฉือนเนื้อเยื่อด้านใน ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1-2 มิลลิเมตร นำมาวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0-5.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 อง ศเซลเซียส) ประมาณ 2-3 วันจะเห็นเส้นใยของเห็ดรานั้นเจริญมาจากชิ้นเนื้อเยื่อ ตัดเส้นใยบริสุทธิ์ใส่ลงในอาหารแข็งเอียง PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือในตู้เย็น ทำการย้ายเส้นใยลงในอาหารใหม่ทุกๆ 3 เดือน

3. **การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารสูตร** Potato Dextrose Agar (PDA)

เมื่อแยกเส้นใยเห็ดราที่มีความบริสุทธิ์แล้ว ทำการศึกษาการเจริญของเห็ดราที่คัดแยกได้ในภาวะอุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ โดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารสูตร PDA ที่ 5.5 โดยนำเส้นใยเห็ดรามาเลี้ยงในอาหารสูตร PDA อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ใช้ cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใยรอบโคโลนี นำเส้นใยที่เจาะ 1 ชิ้นมาวางตรงกลางบนจานเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.0 เซนติเมตร ที่มีอาหารสูตร PDA ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยในวันที่ 5 ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส

4. การตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

เมื่อทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดราที่คัดแยกได้แล้ว จึงนำมาตรวจสอบการมีอยู่ของเอนไซม์กลุ่มฟีนอลออกซิเดส โดยมีวิธีตรวจสอบดังนี้

4.1 <u>วิธีที่ 1</u> เลี้ยงเส้นใยเห็ดราบนอาหารสูตร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 แล้วทำการตรวจสอบเอนไซม์ ดังนี้

เอนไซม์แลคเคส	ใช้ 0.1 %(w/v) Syringaldazine ใน 95 % เอทานอล หยดบนเส้นใยเห็ดราโดยตรง เห็ดราที่มีเอนไซม์แลคเคสจะเกิดสีชมพูบนเส้นใย
เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส	ใช้ 0.03 % Hydrogen Peroxide หยดบน เส้นใยเห็ดราโดยตรง เห็ดราที่มีเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส จะเกิดฟองอากาศขึ้นบนเส้นใย
เอนไซม์ไทโรซิเนส	ใช้ 0.1 M *p*-cresol ใน 95 % เอทานอล หยดบน เส้นใยเห็ดราโดยตรง เห็ดราที่มีเอนไซม์ไทโรซิเนส จะเกิดสีส้มหรือสีน้ำตาลบนเส้นใย

การตรวจสอบเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ใช้ 95 % เอทานอล เป็นรีเอเจนท์ควบคุม

4.2 <u>วิธีที่ 2</u> การตรวจสอบเอนไซม์แลคเคส โดยใช้ 0.1 % (w/v) Gallic acid ผสมในอาหารสูตร PDA ที่ความเป็นกรดด่าง 5.5 ในขั้นแรกเป็นการเลี้ยงเส้นใยหัวเชื้อในอาหารสูตร PDA ความเป็นกรดด่าง 5.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เจาะปลายเส้นใยรอบโคโลนี นำหัวเชื้อมาวางบนอาหารสูตร PDA ที่ผสม Gallic acid ความเป็นกรดด่าง 5.0 (ไม่ได้ปรับค่า pH) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยและเส้นผ่าศูนย์กลางของสีที่เกิดขึ้นรอบเส้นใย (color zone) เพื่อคำนวนหาค่าอัตราส่วนในการคัดเลือกเห็ดราเพื่อไปทดสอบการย่อยสลายลิกนินต่อไป

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิกนินในขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส

เห็ดราที่คัดแยกได้หลังจากการตรวจสอบการมีอยู่ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 แล้ว จะถูกคัดเลือกเพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิกนินในขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส ที่มีอนุภาค 500 – 75 ไมครอน โดยชั่งน้ำหนักขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส 1.0000 – 1.0020กรัมแห้งที่ผ่านการสกัดสารกลุ่ม extractive อันได้แก่ โปรตีน และไขมัน

ออกจากขี้เลื่อยด้วยตัวทำละลาย benzene และ ethanol ในอัตราส่วน 1 : 2 โดยปริมาตร (ภาคผนวก ง) โดยใส่ลงในหลอดแก้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เพื่อให้น้ำซึมผ่านอนุภาคขี้เลื่อยอย่างทั่วถึง ปิดฝาเกลียว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรเจาะปลายเส้นใยเห็ดราที่ถูกคัดเลือกและเชื้อ *Phanerocheate chrysosporium* ใส่ลงในหลอดทดสอบ หลอดละ 3 ชิ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน นำมาทดสอบหาค่าปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ตามวิธีของ Goering และ Van Soest (1970) (ภาคผนวก ง)

6. **การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารสูตร** Potato Dextrose Broth (PDB)

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินในขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัสแล้ว จึงคัดเลือกสายพันธุ์ของเห็ดราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินสูงสุด เพื่อนำมาศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารสูตร Potato Dextrose Broth (PDB) (ภาคผนวก ก) โดยเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดราที่ถูกคัดเลือกที่เจริญอยู่บนอาหารสูตร PDA ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 ด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 3.0 4.0 5.0 และ 6.0 นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 35 และ40 องศาเซลเซียสบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วัน เก็บผลทุก 3 วัน โดยนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เอาแต่เส้นใย ล้างเส้นใยด้วย normal saline เข้มข้น 0.85% (w/v) แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยที่ได้มาสร้างกราฟแสดงการเจริญเติบโตเทียบกับเวลา และหาค่า maximum specific growth rate (ภาคผนวก จ) เพื่อวิเคราะห์หาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเจริญของเห็ดราแต่ละสายพันธุ์สำหรับนำไปใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป

7. **การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส**

เมื่อทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดราที่ถูกคัดเลือก ทำการเลี้ยงเชื้อเห็ดราแต่ละสายพันธุ์ และ *Phanerochaete chrysosporium* ในอาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) โดยเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดราที่ถูกคัดเลือกที่เจริญอยู่บนอาหารสูตร

PDA ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 7 วัน ด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 จากนั้นนำไปบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับผลิตเป็นหัวเชื้อ (seed culture) เมื่อเส้นใยเข้าสู่ช่วง log phase นำหัวเชื้อถ่ายลงในอาหารสูตร Production (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีฟองน้ำขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 50 ชิ้นเป็นวัสดุยึดเกาะ และใช้ 4 ไมโครโมล guaiacol เป็นตัวชักนำ (inducer) ในการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ทำการปรับสภาพค่าความเป็นกรดด่างในอาหารสูตร Production ที่ 3.0 4.0 5.0 และ6.0 ตามลำดับ นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

เก็บเอนไซม์ทุก 3 วัน นำมา centrifuge ที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที (7441.4 g, r = 10.4 cm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำส่วนน้ำใส (crude enzyme) มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคส (Lac) แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส (MnP) แมงกานีสอิน ดิเพนเดนท์เพอร์ออกซิเดส (MiP) ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (LiP) และ เวอแรทิล แอลกอฮอล์ ออกซิเดส (VAO)

8. **การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์**

วิเคราะห์เอนไซม์โดยทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ 5 ชนิด คือ

8.1 เอนไซม์แลคเคส โดยนำ reaction mixture (ภาคผนวก ข) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร แล้วนำผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ initial rate ไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ (unit of enzyme) ตามวิธีของ Watanabe และคณะ (2001)

8.2 เอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส โดยนำ reaction mixture (ภาคผนวก ข) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร แล้วนำผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ initial rate ไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ ตามวิธีของ Watanabe และคณะ (2001)

8.3 เอนไซม์แมงกานีส อินดิเพนเดนท์ เพอร์ออกซิเดส โดยนำ reaction mixture (ภาคผนวก ข) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร แล้วนำผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ initial rate ไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ ตามวิธีของ Watanabe และคณะ (2001)

8.4 เอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส โดยนำ reaction mixture (ภาคผนวก ข) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วนำผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ initial rate ไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ ตามวิธีของ Tien และ Kirk (1988)

8.5 เอนไซม์เวอแรทิล แอลกอฮอล์ ออกซิเดส โดยนำ reaction mixture (ภาคผนวก ข) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วนำผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ initial rate ไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ ตามวิธีของ Presnell และคณะ (1995)

9. **การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนและการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์**

เมื่อทราบค่าความเป็นกรดด่างในการเลี้ยงเชื้อเห็ดราในอาหารสูตร production เพื่อผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสแล้ว นำเห็ดราแต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารสูตร production ในฟลาส์ก 1 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 400 มิลลิลิตร เพื่อผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในปริมาณที่มากขึ้นสำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยเก็บเอนไซม์ในวันที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด โดยกรองผ่านผ้าขาวบาง และเก็บส่วนของเหลวใสที่ได้นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อนแขวนลอยและตะกอนให้ตกลงสู่ก้นหลอดเก็บส่วนสารละลายใสของเอนไซม์สำหรับขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อไป

<u>การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต</u>

นำส่วนสารละลายใสของเอนไซม์มาตวงให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์ก 250 มิลลิลิตร จำนวน 4 ฟลาส์ก เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดลงในฟลาส์กที่แช่อยู่ในน้ำแข็งในภาชนะปิด ที่กวนด้วยแท่งแม่เหล็กตลอดเวลา โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตจนมีความเข้มข้น 20% 40% 60% และ 80% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 – 10 ชั่วโมง เก็บตะกอนที่ได้ในแต่ละความเข้มข้น ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง

นำตะกอนมาละลายใน 20 mM Sodium acetate buffer pH 5.0 แล้วใส่ในถุงไดอะไลซิส ที่ผ่านการเตรียมถุงเรียบร้อยแล้ว (ภาคผนวก ง) เพื่อทำการแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากสารละลายเอนไซม์ โดยใช้ 20 mM Sodium acetate buffer pH 5.0 เป็นบัฟเฟอร์ในภาชนะปิดที่มีอุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซลเซียส และกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก ทำการเปลี่ยน 20 mM Sodium

acetate buffer ทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเอนไซม์ที่อยู่ในถุงไดอะไลซิส สำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ต่อไป

<u>การทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์</u>

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิต่างๆ

ทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ ณ อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) จากเห็ดราที่คัดเลือกโดยกระบวนการขั้นต้น นำมาทดสอบความเสถียรของเอนไซม์โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 30 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชั่วโมง นำมาตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ตามวิธีการวิเคราะห์เอนไซม์ข้างต้นในข้อ 8 เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการนำเอนไซม์ไปใช้ในการฟอกเยื่อกระดาษต่อไป

10. การฟอกเยื่อกระดาษและการทดสอบสมบัติของเยื่อกระดาษ

10.1 การฟอกเยื่อกระดาษ

ทำการทดลอง 3 ชุด คือชุดควบคุมที่เป็นเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสที่ผ่านกระบวนการต้มด้วยด่าง (brown stock) ชุดที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากเห็ดราที่คัดแยกได้ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.2 – 0.4 IU ต่อกรัมแห้งของเยื่อกระดาษ และชุดสุดท้ายเป็นเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสที่ผ่านขั้นตอนการฟอกด้วยออกซิเจน โดยชุดการทดลองที่ฟอกด้วยเอนไซม์นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำเยื่อกระดาษมากรองแล้วล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง และแช่ในน้ำกลั่นอย่างน้อย 4 ชั่วโมง บีบเยื่อให้หมาด เก็บไว้ในตู้เย็นสำหรับการทดสอบสมบัติของเยื่อกระดาษต่อไป

10.2 การทดสอบสมบัติของเยื่อกระดาษ

10.2.1 การทดสอบน้ำไหลผ่านเยื่อ (Freeness) ทำการ calibrate เครื่องทดสอบด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ปริมาตรน้ำที่ไหลผ่านตะแกรงเครื่อง ควรอยู่ในช่วง 880 – 890 มิลลิลิตร นำเยื่อกระดาษยูคาลิปตัส (เยื่อใยสั้น) 30 กรัมแห้ง มากระจายในเครื่องตีเยื่อในน้ำกลั่น 2 ลิตร ที่ 1 สเกลเครื่องเท่ากับ 25 รอบต่อวินาที โดยตีที่รอบ 2000 สเกล เยื่อที่กระจายแล้วนำมาปรับให้ได้ปริมาตร 10 ลิตร ปรับอุณหภูมิให้ได้ 20 องศาเซลเซียส (ค่า consistency 0.3 %) ตวงเยื่อมาปริมาตร 1 ลิตร เทลงในเครื่องทดสอบ (standard freeness) ผ่านตะแกรง วัดปริมาตรน้ำที่ไหลออกมาจากเครื่อง นำค่าที่ได้มาคำนวณความสามารถในการอุ้มน้ำ

10.2.2 การขึ้นแผ่น (Hand sheet) เมื่อทดสอบค่า freeness แล้ว นำเยื่อที่เหลือมาปรับค่าการกระจายตัวของเยื่อ (consistency) ให้ได้ 0.15% ตวงน้ำเยื่อให้มีปริมาตร 800 –

1000 มิลลิลิตร นำมาขึ้นแผ่นด้วยเครื่อง pulp evaluation apparatus เพื่อคำนวณน้ำหนักแห้งของแผ่นกระดาษประมาณ 1.2 กรัม จึงทำการขึ้นแผ่นต่อไป แผ่นกระดาษที่ขึ้นแล้วนำมาวางซ้อนกันในกระดาษซับ และนำมาอัดแผ่นเพื่อดูดซับความชื้นที่ความดัน 3.25 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 5 นาทีและ 2 นาทีครึ่ง นำมาตากลมให้แห้ง

10.2.3 การวัดค่าความขาวสว่าง (Brightness) นำเยื่อกระดาษที่ผ่านการขึ้นแผ่น (ไม่เกิน 24 ชั่วโมง) มาวัดค่าความขาวสว่างด้วยเครื่อง Elrepho 2000 ทำการ calibrate เครื่องด้วยกระดาษขาวมาตรฐาน และกล่องผ้ากำมะหยี่สีดำ ค่าความขาวสว่างของแผ่นกระดาษที่อ่านได้จะเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่า R_{457} เทียบกับค่าความขาวสว่างมาตรฐาน และค่า yellowness

10.2.4 การทดสอบแรงต้านการฉีกขาด (Tearing strength) ทำการ calibrate เครื่องก่อนการใช้งาน และเลือกขนาด pendulum ให้เหมาะสมกับความแข็งแรงของเยื่อ นำกระดาษมาตัดเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 4 X 6 เซนติเมตร วางในช่องทดสอบจำนวน 4 ชิ้น ตัดให้กระดาษขาดด้วยใบมีดของเครื่อง 2 เซนติเมตร ปล่อย pendulum ให้กระดาษฉีกออกจากกัน ค่าที่ได้จากสเกลจะบอกความแข็งแรงของกระดาษ

10.2.5 การทดสอบความต้านแรงดันทะลุ (Bursting strength) แผ่นขอบกระดาษที่เหลือจากการตัดความยาวจากขอบประมาณ 6 เซนติเมตร นำมาทดสอบค่าแรงดันทะลุเพื่อบอกถึงความแข็งแรงของกระดาษ โดยมีหน่วยเป็น กิโลกรัม ปาสคาล

10.2.6 การทดสอบการต้านแรงดึง (Tensile strength) ตัดกระดาษขนาด 1 X 14 เซนติเมตร ใส่ในเครื่องทดสอบที่ความยาวของช่วงทดสอบของกระดาษ 10 เซนติเมตร จับเวลาเมื่อเครื่องทำงานดึงกระดาษให้ขาดออกจากกัน ค่ามาตรฐานของเวลาอยู่ที่ 15 $\pm$ 5 วินาที บันทึกค่าของแรงดึงที่กระดาษขาดออกจากกัน

10.2.7 การวัดค่าคัปปา (Kappa number) ทำตามวิธีในเอกสาร TAPPI (T236 cm-85) และการ standardize สารเคมีที่ใช้ตามเอกสาร TAPPI (T610 sp-97) (ภาคผนวก ค)

11. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

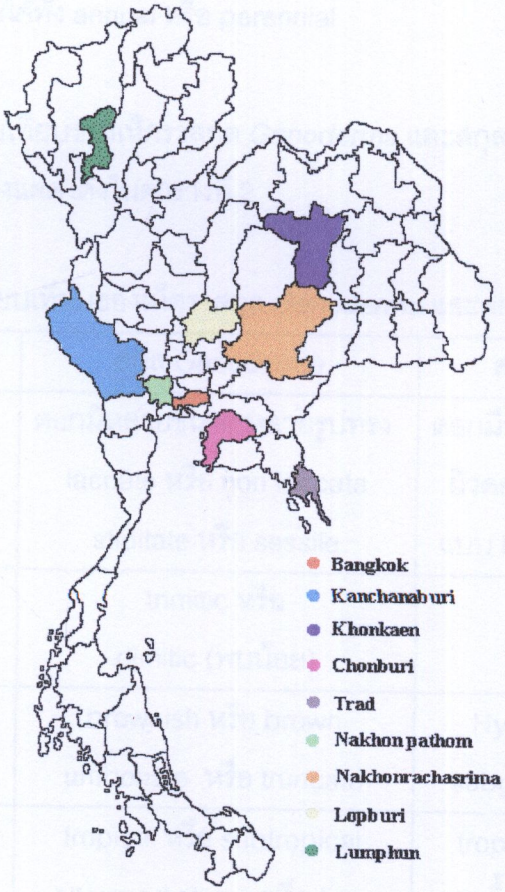
ทุกการทดลองมีการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) นำข้อมูลที่ได้จากทุกการทดลองซึ่งทำ 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลความเชื่อมั่นที่ระดับ 0.05 พร้อมทั้งเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยค่า LSD (Least Significant Difference) และ Homogeneous subsets (Duncan)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การสำรวจ การเก็บตัวอย่าง และการตรวจชื่อวิทยาศาสตร์เห็ดราในกลุ่มไวท์รอท

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดราในกลุ่มไวท์รอท (ช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2544 – ธันวาคม พ.ศ. 2546) ในพื้นที่ 9 จังหวัด คือ จังหวัดกรุงเทพฯ กาญจนบุรี ขอนแก่น ชลบุรี ตราด นครปฐม นครราชสีมา ลพบุรี และลำพูน (ภาพที่8) สามารถเก็บตัวอย่าง เห็ดรากลุ่มไวท์รอทในวงศ์ Ganodermataceae รวม 2 สกุล ได้แก่ สกุล *Ganoderma* 23 ตัวอย่าง และสกุล *Amauroderma* 1 ตัวอย่าง (ภาพที่ 9 ถึง 31) ในการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ในระดับสกุลและชนิด (species) พบ *Ganoderma lucidum* จำนวน 7 ตัวอย่าง *Ganoderma* sp. จำนวน 5 ตัวอย่าง *G. applanatum* 2 ตัวอย่าง *G. fulvellum* 2 ตัวอย่าง *G. brownii* 2 ตัวอย่าง *G. hainanense G. kunmingense G. multiplicatum G. shandongense G. gibbosum* และ *Amauroderma rugosum* ชนิดละ 1 ตัวอย่าง



ภาพที่ 8 พื้นที่เก็บตัวอย่างเห็ดรา

ลักษณะทางสันฐานวิทยาของเห็ดราวงศ์ Ganodermataceae ที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิด (species) ได้แก่

1. ดอก (Pileus) อาจมีลักษณะดังนี้ orbicular dimidiate ungulate infundibuliform
2. เนื้อเยื่อ (Texture) เป็นแบบ subcoriacious, corky to woody
3. ก้านดอก (Stalk) ไม่มี (sessile) หรือ มีก้าน (stipitate)
4. ผิวดอกด้านบน (Upper surface) เป็นแบบผิวมันวาว (laccate) หรือผิวไม่มัน (non laccate)
5. ชั้นของเนื้อเยื่อ (Context) มีลักษณะเป็นชั้น (stratified) หรือไม่มี
6. สีของเนื้อเยื่อ (Context color) อาจมีสีดังนี้ whitish wood – color brown หรือ cinnamon
7. รูใต้ดอก (Pore) เป็นแบบ suborbicular angular หรือรูปทรงอื่น
8. ระบบเส้นใย (Hyphal system) มี 2 ระบบ ได้แก่

   trimitic: ประกอบด้วย generative, skelatal and binding

   dimitic: ประกอบด้วย generative and skeletal (พบจำนวนชนิดน้อย)
9. สปอร์ (Basidiospores) มีรูปทรงแบบ ovoid ellipsoid subglobose หรือ globose
10. สีสปอร์ (Spore colour) ไม่มีสี (hyaline) หรือมีสี brownish หรือ brown
11. วงชีวิต (Life cycle) พบได้ทั้ง annual หรือ perennial

สันฐานวิทยาเปรียบเทียบของเห็ดราสกุล *Ganoderma* และสกุล *Amauroderma* มีความเหมือน และความแตกต่างซึ่งแสดงดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สันฐานวิทยาเปรียบเทียบของเห็ดราสกุล *Ganoderma* และสกุล *Amauroderma*

สันฐานวิทยา	สกุล *Ganoderma*	สกุล *Amauroderma*
1. ลักษณะโครงสร้างดอก	ดอกมีหลายขนาด หลายรูปทรง laccate หรือ non laccate stipitate หรือ sessile	ดอกมีหลายขนาด หลายรูปทรง ผิวดอกด้านบนมีหลายสี พบแบบ laccate น้อย มีก้านดอก
2. ระบบเส้นใย	trimitic หรือ dimitic (พบน้อย)	trimitic
3. สปอร์	brownish หรือ brown umbonate หรือ truncate	Hyaline หรือ brownish subglobose หรือ globose
4. ถิ่นอาศัย	tropical หรือ subtropical บน wood stump หรือ tree	tropical หรือ subtropical บนพื้นดิน หรือ dead wood
5. วงชีวิต	annual หรือ perennial	annual

ถิ่นอาศัยของเห็ดราที่สำรวจพบนั้นมักจะมีสภาพร่มและชื้น มีทั้งที่เป็นตอไม้ โคนไม้ที่ยังมีชีวิต รากไม้ที่ยังมีชีวิต รากไม้ที่ไม่มีชีวิต และบนพื้นดินที่มีเศษไม้และใบไม้หนาแน่น ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เห็ดรากลุ่มไวท์รอทที่สำรวจพบในจังหวัดต่างๆ และถิ่นอาศัย

จังหวัดและสถานที่เก็บตัวอย่าง	สกุลหรือชนิด (species)	ถิ่นอาศัย	วันที่เก็บตัวอย่าง
1. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	*Ganoderma lucidum* BK1	สภาพร่ม ชื้น เจริญบนรากตอต้นไทร	20 มี.ค. 2544
ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	*G. lucidum* BK2	สภาพร่ม ชื้น เจริญอยู่ที่โคนต้นนนทรี	10 ก.ค. 2545
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	*G. lucidum* BK3	สภาพร่ม ชื้น เจริญอยู่ที่โคนต้นนนทรี	10 ก.ค. 2545
ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	*Ganoderma* sp. BK4	สภาพร่ม ชื้น เจริญอยู่ที่ใต้ต้นหูกระจง	15 ส.ค. 2545
คณะศิลปกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	*G. fulvellum* BK5	สภาพร่ม ชื้น เจริญอยู่ที่โคนต้นนนทรี	6 ต.ค. 2545
2. กาญจนบุรี : กองพันทหารราบที่ 29 ต. ท่าเสา อ. เมือง	*G. lucidum* KC1	สภาพร่ม ชื้น เจริญอยู่บนรากต้นหางนกยูงฝรั่ง	12 เม.ย. 2546
เขื่อนวชิราลงกรณ์ (เขื่อนท่าทุ่งนา) อ. ศรีสวัสดิ์	*Ganoderma* sp. KC2	สภาพร่ม ชื้น เจริญอยู่ที่โคนต้นหางนกยูงฝรั่ง	12 เม.ย. 2546
โรงเรียนท่าพระเนียดกุญชร อ. เมือง	*G. lucidum* KC3	สภาพร่ม ชื้น เจริญอยู่บนรากต้นหางนกยูงฝรั่ง	13 เม.ย. 2546
3. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง	*G. lucidum* KH1	สภาพร่ม ชื้น เจริญอยู่บนรากต้นหางนกยูงฝรั่ง	20 มิ.ย 2546
มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง	*G. brownii* KH2	สภาพร่ม เจริญอยู่ที่โคนต้นนนทรี	20 มิ.ย 2546
4. ชลบุรี : ค่ายลูกเสือวชิราวุธ ต. ศรีราชา อ. ศรีราชา	*G. fulvellum* CB	สภาพแดดรำไร เจริญอยู่ที่โคนต้นหางนกยูงฝรั่ง	8 ก.ค. 2545
5. ตราด : น้ำตกคลองแก้ว ต. บ่อพลอย อ. บ่อไร่	*Ganoderma* sp. TD1	สภาพร่ม ชื้น เจริญอยู่บนตอต้นยาง	6 ธ.ค. 2546
น้ำตกคลองแก้ว ต. บ่อพลอย อ. บ่อไร่	*G. applanatum* TD2	สภาพร่ม ชื้น เจริญอยู่บนท่อนซุงจากต้นยาง	6 ธ.ค. 2546

ตารางที่ 1 เห็ดรากลุ่มไวท์รอทที่สำรวจพบในจังหวัดต่างๆ และถิ่นอาศัย (ต่อ)

จังหวัดและสถานที่เก็บตัวอย่าง	สกุลหรือชนิด (species)	ถิ่นอาศัย	วันที่เก็บตัวอย่าง
6. นครปฐม : ต. สามพราน อ. สามพราน	*G. kunmingense* NP1	สภาพร่ม ขึ้น เจริญอยู่บนตอต้นมะขาม	10 มี.ค. 2546
ต. สามพราน อ. สามพราน	*G. applanatum* NP2	สภาพร่ม ขึ้น เจริญอยู่บนตอต้นมะขาม	10 มี.ค. 2546
ต. สามพราน อ. สามพราน	*G. multiplicatum* NP3	สภาพร่ม ขึ้น เจริญอยู่บนตอต้นมะขาม	10 มี.ค. 2546
ต. สามพราน อ. สามพราน	*G. hainanense* NP4	สภาพร่ม ขึ้น เจริญอยู่บนรากตอต้นมะขาม	10 มี.ค. 2546
ต. สามพราน อ. สามพราน	*G. lucidum* NP5	สภาพร่ม ขึ้น เจริญอยู่บนรากตอต้นมะขาม	10 มี.ค. 2546
7. นครราชสีมา : ปราสาทหินพิมาย อ. พิมาย	*G. brownii* NRM1	สภาพร่ม เจริญอยู่บนตอต้นหูกวาง	23 มิ.ย. 2546
มหาวิทยาลัยราชมงคล อ. เมือง	*Ganoderma* sp. NRM2	สภาพร่ม ขึ้น เจริญอยู่ที่โคนต้นนนทรี	23 มิ.ย. 2546
8. ลพบุรี : วัดเวฬุวัน(วัดเขาจีนแล) ต.นิคมสร้างตนเอง อ.เมือง	*Ganoderma* sp. LB	สภาพร่ม เจริญอยู่บนตอต้นมะขาม	12 พ.ย. 2546
9. ลำพูน : หมู่บ้านหลวงใหม่ ต. ทาแม่ลอย อ. แม่ทา	*G. shandongense* LP1	มีแดดรำไร ค่อนข้างแห้งแล้ง เจริญอยู่บนตอต้นพลวง	14 ก.ค. 2546
หมู่บ้านหลวงใหม่ ต. ทาแม่ลอย อ. แม่ทา	*G. gibbosum* LP2	มีแดดรำไร ค่อนข้างแห้งแล้ง เจริญอยู่บนตอไม้	14 ก.ค. 2546
หมู่บ้านหลวงใหม่ ต. ทาแม่ลอย อ. แม่ทา	*Amauroderma rugosum* LP3	มีแดดรำไร ค่อนข้างแห้งแล้ง เจริญอยู่บนดินที่มีเศษใบไม้และกิ่งไม้ใต้ต้นพลวง	14 ก.ค. 2546

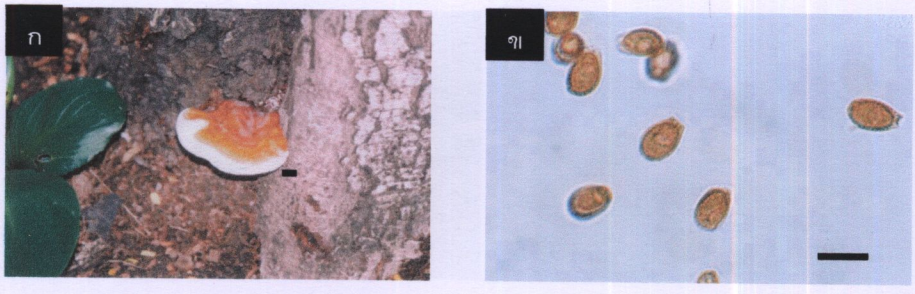
ภาพที่ 9 (ก) ลักษณะดอก *G. lucidum* BK1 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

<u>โครงสร้างดอก</u> (Basidiocarps) ดอกมีความแข็ง รูปทรงคล้ายไต หรือค่อนข้างเป็นวงกลม ขนาด 8 X 12 X 2 เซนติเมตร สีผิวด้านบนเหลืองอ่อน น้ำตาล หรือน้ำตาลแดง บางครั้งขอบมีสีเหลืองถึงน้ำตาล เป็นแนววงกลม (zonate) ผิวบนเป็นมันวาว (laccate) เนื้อเยื่อดอกแบ่งเป็น 2 ชั้น มีความหนา1–1.5 เซนติเมตร ชั้นบนสีน้ำตาลหรือสีขาว ชั้นล่างสีน้ำตาล โครงสร้างชั้นของการสร้าง สปอร์ ยาว 1 เซนติเมตร รู (pore) ใต้ดอกตอนดอกอ่อน สีขาว และจะเป็นสีน้ำตาลอ่อน หรือเหลืองอมน้ำตาล รูใต้ดอกค่อนข้างกลม เฉลี่ย 4 – 5 รูต่อมิลลิเมตร ก้านดอกทรงกระบอกออกในแนวด้านข้าง ความยาว 2 เซนติเมตร หนา 4 เซนติเมตร มีสีเดียวกับดอกหรือสีน้ำตาล อมม่วง มันวาว

<u>ระบบเส้นใย</u> (Hyphal system) แบบ trimitic

<u>สปอร์</u> (Basidiospores) 9 –11 X 6 – 7 ไมครอน แบบ truncate หรือ bitunicate สปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม



ภาพที่ 10 (ก) ลักษณะดอก *G. lucidum* BK2 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

<u>โครงสร้างดอก</u> (Basidiocarps) ดอกมีความแข็ง ค่อนข้างเป็นวงกลม ขนาด 10 X 13 X 2 เซนติเมตร สีผิวด้านบนเหลืองอ่อน น้ำตาล หรือน้ำตาลแดง เป็นแนววงกลม (zonate) ผิวบนเป็นมันวาว (laccate) ขอบมน เนื้อเยื่อดอกแบ่งเป็น 2 ชั้น มีความหนา 1 – 1.5 เซนติเมตร ชั้นบนสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่างสีน้ำตาล ชั้นของการสร้างสปอร์ยาว1 เซนติเมตร รู (pore) ใต้ดอกตอนดอกอ่อน สีขาว และจะเป็นสีน้ำตาลหรือเหลืองอมน้ำตาล รูใต้ดอกค่อนข้างกลม เฉลี่ย 4 – 5 รูต่อมิลลิเมตร ก้านดอกทรงกระบอกออกในแนวด้านข้าง ยาว 1 เซนติเมตร และหนา 4-5 เซนติเมตร มีสีเดียวกับดอกหรือสีน้ำตาลอมม่วง

<u>ระบบเส้นใย</u> (Hyphal system) แบบ trimitic

<u>สปอร์</u> (Basidiospores) 9 –11 X 6 – 7 ไมครอน แบบ truncate หรือ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม

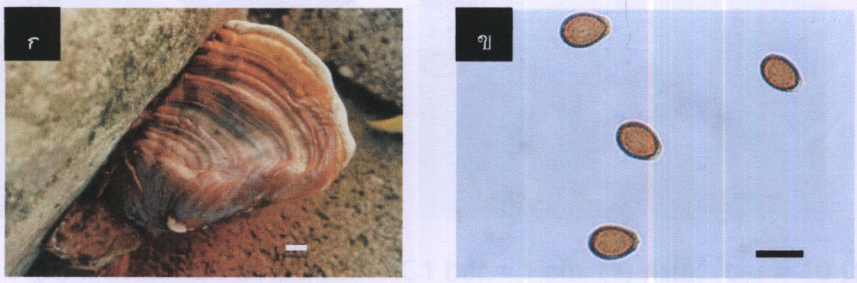
ภาพที่ 11 (ก) ลักษณะดอก *G. lucidum* BK3 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกมีความแข็ง รูปทรงครึ่งวงกลม หรือค่อนข้างเป็นวงกลม ขนาด 13 X 16 X 2.5 เซนติเมตร สีผิวด้านบนเหลืองอ่อน น้ำตาล หรือน้ำตาลแดง เป็นแนววงกลม (zonate) ผิวบนเป็นมันวาว (laccate) ขอบดอกมน เนื้อเยื่อดอกแบ่งเป็น 2 ชั้น มีความหนา 1 – 1.5 เซนติเมตร ชั้นบนสีน้ำตาลชั้นล่างสีน้ำตาลเข้ม ชั้นของการสร้างสปอร์ ยาว 1 เซนติเมตร รู (pore) ใต้ดอกตอนดอกอ่อน สีขาว และจะเป็นสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาล หรือเหลืองอมน้ำตาล รูใต้ดอกค่อนข้างกลม เฉลี่ย 4 – 5 รูต่อมิลลิเมตร ก้านดอกทรงกระบอกออกในแนวด้านข้างหรือตรงกลาง ความยาวอาจมากถึง 19 เซนติเมตร และอาจหนาถึง 4 เซนติเมตร มีสีเดียวกับดอกหรือสีน้ำตาลอมม่วง มันวาว

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) 9 –11 X 6 – 7 ไมครอน แบบ truncate และ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม



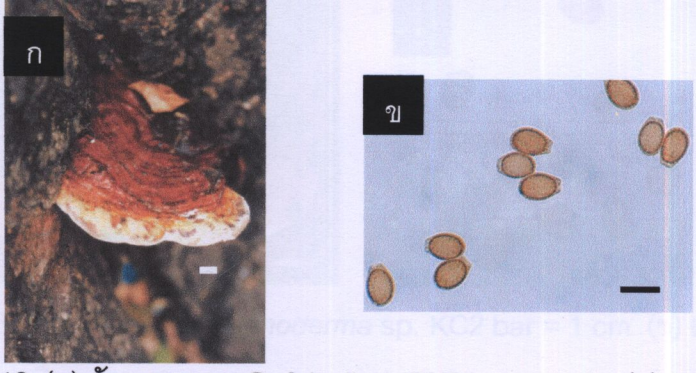
ภาพที่ 12 (ก) ลักษณะดอก *Ganoderma* sp. BK4 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกมีความแข็ง ก้านดอกสั้น 1-2 เซนติเมตร ดอกคล้ายใบพัด แบนขนานกับพื้น ตรงกลางดอกเป็นแอ่งเว้าลง ขอบมน หนา หนา 1 – 1.5 เซนติเมตร ผิวดอกเป็นคลื่นขนาดไม่เท่ากัน สีน้ำตาล เนื้อเยื่อแบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นบนมีสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างสีน้ำตาลอ่อน ชั้นของการสร้างสปอร์ยาวประมาณ 0.5 – 0.8 เซนติเมตร รูใต้ดอกสีน้ำตาลหรือสีขาว ค่อนข้างกลม (suborbicular) ก้านดอกหนา 1.5 – 2.0 เซนติเมตร สีเดียวกับดอก จำนวนรู 4 – 6 ต่อความยาว 1 มิลลิเมตร

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) ขนาด 9 – 11 X 6 – 8 ไมครอน กลม รี (ellipsoidal) แบบ truncate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม



ภาพที่ 13 (ก) ลักษณะดอก *G. fulvellum*. BK5 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกมีความแข็ง ลักษณะครึ่งวงกลมคล้ายพัด (flabelliform) หรือคล้ายฝาหอย (conchate) ขนาด 7-9 X 5.5-8 X 1-2.5 เซนติเมตร ผิวด้านบนมีสีน้ำตาลแดงจนถึงน้ำตาลคล้ำ เป็นมันวาว (laccate) ขอบมน มีสีน้ำตาล น้ำตาลซีดหรือเหลือง เนื้อเยื่อ 1 ชั้นมีสีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลเข้ม หนา 0.3-1.5 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม ชั้นของการสร้างสปอร์ยาว 0.7-1 เซนติเมตร ดอกอ่อนรูใต้ดอกมีสีเหลืองอ่อน และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม รูค่อนข้างกลม มีประมาณ 4-5 รูต่อความยาว 1 มิลลิเมตร ไม่มีก้านหรือมีก้านสั้นใต้ดอก

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) 8.7-10.4 X 5.2-6.9 ไมครอน รูปทรงมน รี แบบ truncate และ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล ไม่มีหนาม

ภาพที่ 14 (ก) ลักษณะดอก *G. lucidum* KC1 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกมีความแข็ง รูปทรงค่อนข้างเป็นวงกลม ขนาด12X 15 X 2 เซนติเมตร สีผิวด้านบนน้ำตาล หรือน้ำตาลแดง บางครั้งขอบมีสีเหลืองถึงน้ำตาล เป็นแนววงกลม (zonate) ผิวบนเป็นมันวาว (laccate) ขอบดอกมน เนื้อเยื่อดอกแบ่งเป็น 2 ชั้น มีความหนา 1 – 1.5 เซนติเมตร ชั้นบนสีน้ำตาลหรือสีขาว ชั้นล่างสีน้ำตาล โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์ ยาว 1 เซนติเมตร รู (pore) ใต้ดอกตอนดอกอ่อน สีขาว และจะเป็นสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาล หรือเหลืองอมน้ำตาล รูใต้ดอกค่อนข้างกลม เฉลี่ย 4 – 5 รูต่อมิลลิเมตร ก้านดอกทรงกระบอกออกในแนวตรงกลาง ความยาวอาจ 5-7 เซนติเมตร และหนา 2 เซนติเมตร มีสีเดียวกับดอกหรือสีน้ำตาลอมม่วง มันวาว

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) 9 –11 X 6 – 7 แบบ truncate และ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม

ภาพที่ 15 (ก) ลักษณะดอก *Ganoderma* sp. KC2 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกยึดติดกับโคนลำต้น ไม่มีก้านดอก แบนราบขนานกับพื้น ดอกมีความเหนียว สีน้ำตาล ผิวดอกไม่มันวาว (non – laccate) ขอบดอกมีสีขาว ผิวดอกไม่เรียบ เป็นสันนูนคล้ายคลื่น ขนาดดอก 17 – 20 เซนติเมตร หนา 0.5 – 1.5 เซนติเมตร เนื้อเยื่อชั้น cortex มี 1 ชั้น สีน้ำตาล tube สีน้ำตาลอ่อน ยาวประมาณ 0.3 – 0.5 เซนติเมตร รูใต้ดอกมีสีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อน จำนวน 4 – 5 รูต่อมิลลิเมตร ค่อนข้างกลม

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) ขนาด 6.5 – 7.5 X 8 – 9.5 ไมครอน ทรงรี (ellipsoid) ปลายแหลม (apex) หรือปลายมีลักษณะเว้า แบบ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม

ภาพที่ 16 (ก) ลักษณะดอก *G. lucidum* KC3 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกมีความแข็ง รูปทรงคล้ายไต หรือค่อนข้างเป็นวงกลม ขนาด12 X 20 X 2.5 เซนติเมตร สีผิวด้านบนน้ำตาล หรือน้ำตาลแดง ขอบมีสีขาว เป็นแนววงกลม (zonate) ผิวบนเป็นมันวาว (laccate) ขอบดอกมน เนื้อเยื่อดอกแบ่งเป็น 2 ชั้น มีความหนา 1 – 1.5 เซนติเมตร ชั้นบนสีน้ำตาลหรือสีขาว ชั้นล่างสีน้ำตาล โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์ ยาว 1 เซนติเมตร รู (pore) ใต้ดอกตอนดอกอ่อน สีขาว และจะเป็นสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาล หรือเหลืองอมน้ำตาล รูใต้ดอกค่อนข้างกลม เฉลี่ย 4 – 5 รูต่อมิลลิเมตร ก้านดอกทรงกระบอกออกในแนวตรงกลาง ความยาว 10 เซนติเมตร และหนา 2-3 เซนติเมตร มีสีเดียวกับดอกหรือสีน้ำตาลอมม่วง มันวาว

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) 9 –11 X 6 – 7 ไมครอน แบบ truncate และ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม

ภาพที่ 17 (ก) ลักษณะดอก *G. lucidum* KH1 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

<u>โครงสร้างดอก</u> (Basidiocarps) ดอกมีความเหนียว รูปทรงค่อนข้างเป็นวงกลม ขนาด 8 X 10 X 2-3.5 เซนติเมตร สีผิวด้านบนเหลืองอ่อน น้ำตาล หรือน้ำตาลแดง ขอบมีสีขาว และสีเหลืองถึงน้ำตาล เป็นแนววงกลม (zonate) ผิวบนเป็นมันวาว (laccate) ขอบดอกมน เนื้อเยื่อดอกแบ่งเป็น 2 ชั้น มีความหนา 1 – 1.5 เซนติเมตร ชั้นบนสีน้ำตาลหรือสีขาว ชั้นล่างสีน้ำตาล โครงสร้างชั้นของการสร้าง สปอร์ ยาว 0.5 - 1 เซนติเมตร รู (pore) ใต้ดอกตอนดอกอ่อนสีขาว ค่อนข้างกลม เฉลี่ย 4 – 5 รูต่อมิลลิเมตร ก้านดอกทรงกระบอกออกในแนวตรงกลาง ความยาว 5 เซนติเมตร และหนา 1.5 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลอมม่วง มันวาว

<u>ระบบเส้นใย</u> (Hyphal system) แบบ trimitic

<u>สปอร์</u> (Basidiospores) 9 –11 X 6 – 7 ไมครอน แบบ truncate และ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม

ภาพที่ 18 (ก) ลักษณะดอก *G. brownii* KH2 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

<u>โครงสร้างดอก</u> (Basidiocarps) ดอกมีความแข็งและเหนียว ทรงครึ่งวงกลม แบนราบ ขนาด 8 X 11 X 2-3 เซนติเมตร ผิวด้านบนไม่มัน (non laccate) ขอบมน เนื้อเยื่อชั้นเดียว มีสีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาล พบแนวเป็นรูปครึ่งวงกลมบนดอก (concentrically zonate) หนา 1-1.5 ถึง 2.8 เซนติเมตร โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์สีน้ำตาล ยาวประมาณ 1-1.2 เซนติเมตร รูใต้ดอกมีสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม ค่อนข้างกลม ประมาณ 4-5 รูต่อมิลลิเมตร

<u>ระบบเส้นใย</u> (Hyphal system) เป็นแบบ trimitic

<u>สปอร์</u> (Basidiospores) 7.5 –12 X 6 – 6.7 ไมครอน รูปทรงมน รี (ellipsoid) แบบ truncate และ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม

ภาพที่ 19 (ก) ลักษณะดอก *G. fulvellum* CB bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกมีความแข็งและเหนียว ลักษณะครึ่งวงกลมคล้ายพัด (flabelliform) หรือคล้ายฝาหอย (conchate) ขนาด 7-9 X 5.5-8 X 1-2.5 เซนติเมตร อาจเกิดดอกใหม่ขึ้นซ้อนดอกเก่าได้ ผิวด้านบนมีสีน้ำตาลแดงจนถึงน้ำตาลคล้ำ เป็นมันวาว (laccate) ขอบบาง มีสีน้ำตาล น้ำตาลซีดหรือสีเหลือง เนื้อเยื่อ 1 ชั้นมีสีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลเข้ม หนา 0.3-1.5 เซนติเมตร โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์มีสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม อาจยาวถึง 1 เซนติเมตร เมื่อดอกอ่อน รูใต้ดอกมีสีเหลืองอ่อน และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม รูค่อนข้างกลม มีประมาณ 4-5 รูต่อความยาว 1 มิลลิเมตร ไม่มีก้านหรือมีก้านสั้นใต้ดอก

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) 8.7-10.4 X 5.2-6.9 ไมครอน ทรงรี แบบ truncate และ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล ไม่มีหนาม

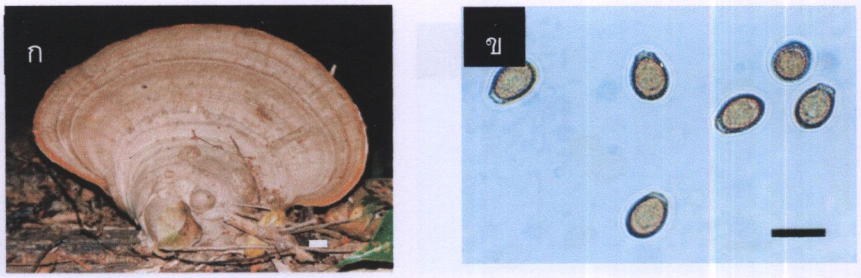
ภาพที่ 20 (ก) ลักษณะดอก *Ganoderma* sp. TD1 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) มีก้านดอกสั้น แบนราบ เป็นวงกลม ดอกมีความแข็ง สีน้ำตาลเข้ม ผิวดอกไม่มันวาว (non – laccate) ขอบดอกมีสีน้ำตาล ผิวดอกไม่เรียบ เป็นสันนูนคล้ายคลื่นโดยรอบ ขนาดดอก 13 – 16เซนติเมตร หนา 0.5 – 2.5 เซนติเมตร เนื้อเยื่อชั้น cortex มี 1 ชั้น สีน้ำตาลเข้ม tube สีน้ำตาล ยาวประมาณ 0.3 – 1.0 เซนติเมตร รูใต้ดอกมีสีน้ำตาล จำนวน 4 – 5 รูต่อมิลลิเมตร ค่อนข้างกลม

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) ขนาด 6 – 7 X 8 – 10 ไมครอน ทรงรี (ellipsoid) แบบ bitunicate และ truncate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม



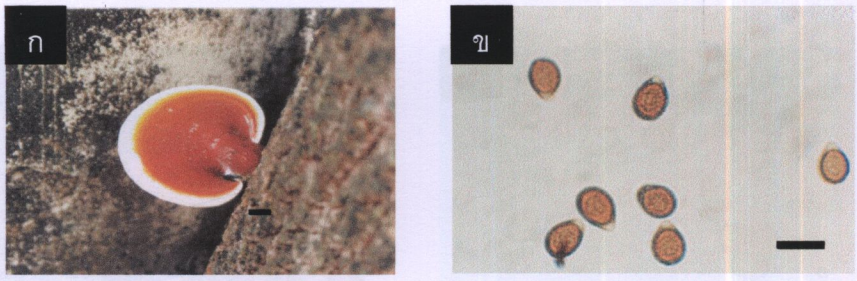
ภาพที่ 21 (ก) ลักษณะดอก *G. applanatum* TD2 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกมีความแข็งแรง รูปครึ่งวงกลม คล้ายพัด (subflabelliform) ขนาด 6 – 16 X 9 – 23 X 3 – 4 เซนติเมตร ผิวด้านบนสีเทาอ่อน ขาว และสีน้ำตาล ผิวไม่มัน (non laccate) มีแนววงโดยรอบ (zonate) ขอบดอกบาง เนื้อเยื่อมี 1 ชั้น สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม หนา 0.3–3 เซนติเมตร โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์สีน้ำตาล เรียงซ้อนกันเป็นชั้น บางครั้งมีสีขาวของเส้นใยปรากฏ มีความหนา 0.3-2.5เซนติเมตร รูใต้ดอกมีสีเทาอ่อน น้ำตาลหรือมีสีเหลืองอ่อนบางส่วน รูค่อนข้างกลม (suborbicular) ประมาณ 4-5 รูต่อมิลลิเมตร

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) 7-9 (-10.4) X 4.3-6.2 ไมครอน ทรงกลมรี แบบ truncate ปลายแหลม (apex) และแบบ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม



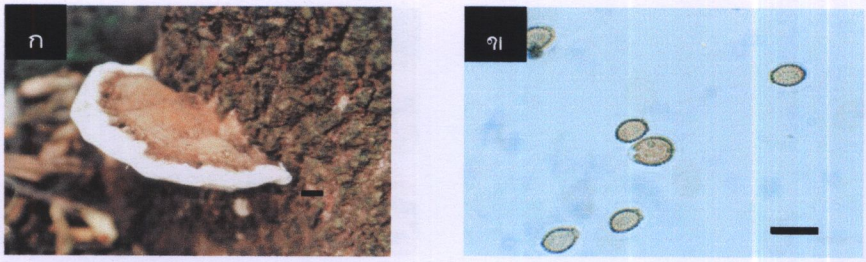
ภาพที่ 22 (ก) ลักษณะดอก *G. kunmingense* NP1 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ขอบดอกมีลักษณะม้วนเข้าหาก้าน (subcochleari form) ลักษณะครึ่งวงกลม ขนาด 2-4 X 2.8-7 X 1-3 เซนติเมตร ผิวด้านบนมีสีน้ำตาลแดงเมื่อสด และเมื่อแก่มีสีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลดำ เป็นมันวาว (laccate) ไม่พบก้านที่อยู่ตรงกลาง แต่จะเป็นสันนูนใต้ดอก มีก้านดอกแข็ง ขอบดอกมีสีขาว บาง บางครั้งม้วนเข้าด้านใน เนื้อเยื่อมีสีเหมือนไม้ (wood-color) หนา 1-2.5 เซนติเมตร โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์ยาว 0.5-1 เซนติเมตร รูด้านล่างใต้ดอกมีสีขาวหรือน้ำตาลอมเหลือง รูค่อนข้างกลม มีประมาณ 4 รูต่อมิลลิเมตร ก้านจะอยู่ด้านข้างยาว 1.5 เซนติเมตร

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) ขนาด 7.5 – 10.5 X 6 –9 ไมครอน ส่วนใหญ่รูปทรงรี (ellipsoid) กว้าง หรือค่อนข้างกลม (subglobose) ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม



ภาพที่ 23 (ก) ลักษณะดอก *G. applanatum* NP2 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

<u>โครงสร้างดอก</u> (Basidiocarps) ดอกมีความแข็งแรง รูปครึ่งวงกลม คล้ายพัด (subflabelliform) หรือหยักไม่เป็นรูปร่างแน่นอน ขนาด 6 – 16 X 9 – 23 X 3 – 4 เซนติเมตร ผิวด้านบนสีเทา เทาอ่อน ขาว หรือ น้ำตาล ผิวไม่มัน (non laccate) มีแนววงโดยรอบ (zonate) ขอบดอกบางหรือมน ไม่มีก้าน เนื้อเยื่อมี 1 ชั้น สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม หนา 0.3–3 เซนติเมตร โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์สีน้ำตาล เรียงซ้อนกันเป็นชั้น บางครั้งมีสีขาวของเส้นใยปรากฏ มีความหนา 0.3-2.5 เซนติเมตร รูใต้ดอกมีสีเทาอ่อน น้ำตาล หรือมีสีเหลืองอ่อนบางส่วน รูค่อนข้างกลม (suborbicular) ประมาณ 4-5 รูต่อมิลลิเมตร

<u>ระบบเส้นใย</u> (Hyphal system) แบบ trimitic

<u>สปอร์</u> (Basidiospores) 7-9 (-10.4) X 4.3-6.2 ไมครอน ทรงกลมรี แบบ truncate อาจมีปลายแหลม (apex) และแบบ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม

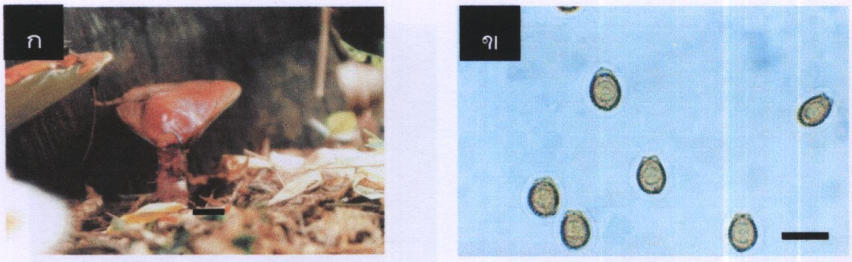
ภาพที่ 24 (ก) ลักษณะดอก *G. multiplicatum* NP3 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

<u>โครงสร้างดอก</u> (Basidiocarps) ดอกมีความแข็งแรง รูปทรงค่อนข้างเป็นวงกลม (suborbicular) ขนาด 9 X 12 X 1.5 เซนติเมตร ยึดติดแน่นกับ substratum ไม่มีก้าน ผิวดอกด้านบนมีร่องแตกเล็กๆ (rimose) มีสันนูน เรียงสลับกันเป็นแนว ผิวมันเล็กน้อย (slightly laccate) ขอบหยักหรือมน เยื่อเยื่อมีความหนา 0.5 เซนติเมตร แบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นบนมีสีน้ำตาลอ่อน ส่วนเนื้อเยื่อชั้นล่างมีสีน้ำตาลเข้ม โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์มีสีน้ำตาลยาว 0.9 เซนติเมตร รูใต้ดอกมีสีน้ำตาล เหลืองอ่อน ลักษณะค่อนข้างกลม มีประมาณ 4-5 รูต่อมิลลิเมตร

<u>ระบบเส้นใย</u> (Hyphal system) แบบ trimitic

<u>สปอร์</u> (Basidiospores) ขนาด 7-8 (-10.5) X 5.7-7 ไมครอน ทรงกลมรี กว้าง หรือค่อนข้างกลม แบบ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม



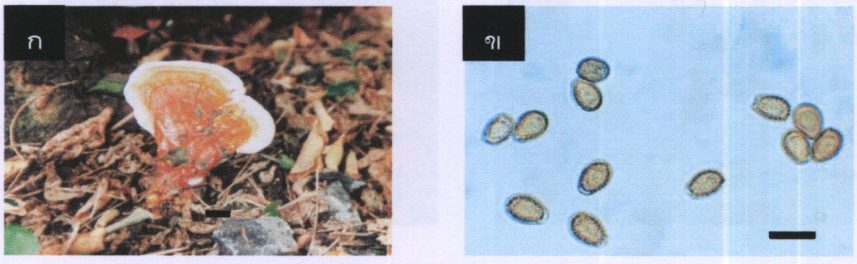
ภาพที่ 25 (ก) ลักษณะดอก *G. hainanense* NP4 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกมีความแข็ง รูปทรงค่อนข้างเป็นวงกลม (suborbicular) ขนาด 1.5-5.5 X 1.5-4.5 X 1-2.2 เซนติเมตร ผิวด้านบนสีน้ำตาลแดงถึงน้ำตาลเข้ม ผิวมัน (laccate) ขอบมน และบาง เนื้อเยื่อหนา 0.1-0.2 เซนติเมตร แยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนมีสีน้ำตาลเหลือง ชั้นล่างมีสีน้ำตาล โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์ยาว 0.3-2 เซนติเมตร แบ่งเป็นชั้น สีน้ำตาล รูใต้ดอกมีสีขาว น้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาลค่อนข้างกลม (suborbicular) หรือกลม (orbicular) มีประมาณ 4-6 รูต่อความยาว 1 มิลลิเมตร ก้านดอกอยู่ด้านข้าง ลักษณะทรงกระบอก มีก้านยาว 4 เซนติเมตร มีความหนา 0.3-1.0 เซนติเมตร มีสีเดียวกันกับสีดอก

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) ขนาด 9.7-11 X 6-6.7 ไมครอน ทรงกลมรี แบบ truncate และ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนามสีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาล



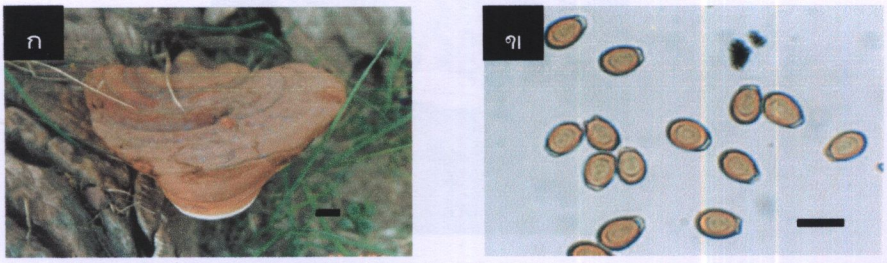
ภาพที่ 26 (ก) ลักษณะดอก *G. lucidum* NP5 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกมีความแข็งและเหนียว รูปทรงครึ่งวงกลม ขนาด 5 X 4 X 0.8-1.5 เซนติเมตร สีผิวด้านบนเหลืองอ่อน น้ำตาล ขอบมีสีขาวและสีเหลือง ผิวบนเป็นมันวาว (laccate) ขอบดอกมน เนื้อเยื่อดอกแบ่งเป็น 2 ชั้น มีความหนา 1 – 1.5 เซนติเมตร ชั้นบนสีน้ำตาลหรือสีขาว ชั้นล่างสีน้ำตาล โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์ยาว 0.5-1.0 เซนติเมตร รู (pore) ใต้ดอกตอนดอกอ่อน สีขาว รูใต้ดอกค่อนข้างกลม เฉลี่ย 4– 5 รูต่อมิลลิเมตร ก้านดอกทรงกระบอกออกในแนวด้านข้าง ความยาว 3 เซนติเมตร และหนา 2 เซนติเมตร มีสีเดียวกับดอก มันวาว

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) 9 –11 X 6 – 7 ไมครอน แบบ truncate และ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม



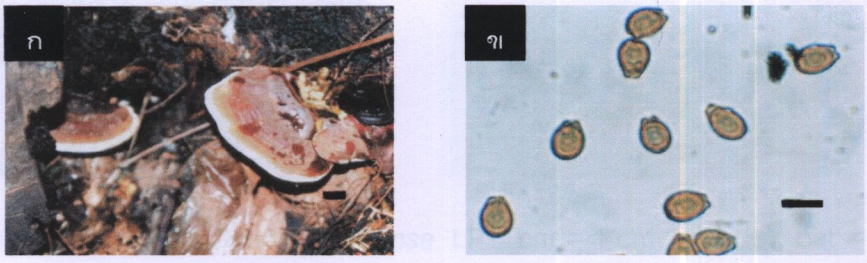
ภาพที่ 27 (ก) ลักษณะดอก *G.brownii* NRM1 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกมีความแข็ง ทรงครึ่งวงกลม แบนราบ ขนาด 8 X 11 X 1.5 – 2.0 เซนติเมตร ผิวด้านบนไม่มัน (non laccate) ขอบบาง มน เนื้อเยื่อชั้นเดียว มีสีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาล พบแนวเป็นรูปครึ่งวงกลมบนดอก (concentrically zonate) หนา 1-1.5 ถึง 2.0 เซนติเมตร มีก้านสั้น โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์สีน้ำตาล ยาวประมาณ 0.7-1.2 เซนติเมตร รูใต้ดอกมีสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม ค่อนข้างกลม ประมาณ 4-5 รูต่อมิลลิเมตร

ระบบเส้นใย (Hyphal system) เป็นแบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) 7.5 –12 X 6 – 6.7 ไมครอน รูปทรงมน รี (ellipsoid) แบบ truncate และ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม



ภาพที่ 28 (ก) ลักษณะดอก *Ganoderma* sp. NRM2 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกขึ้นเป็นกลุ่มแยกจากกัน ลักษณะดอกด่อนข้างกลม รี คล้ายรูปไต ดอกแบนราบ กว้าง 6 – 10 เซนติเมตร หนา 0.5 – 0.8 เซนติเมตร ดอกด้านบนสีดำ ขอบสีเหลือง และปลายขอบสีขาว ปลายขอบของดอกบาง ด้านบนไม่มีความมันวาว (non laccate) เนื้อเยื่อดอกมี 2 สี ชั้นบนมีสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างสีน้ำตาลอ่อน โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์มีสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม ยาวประมาณ 0.3 – 0.5 เซนติเมตร รูใต้ดอกมีสีขาวหรือเหลืองอ่อน เมื่อแก่มีสีน้ำตาลอ่อน จำนวนรู 4 -5 รูต่อความยาว 1 มิลลิเมตร

ระบบเส้นใย (Hyphal system) เป็นแบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) 8.5 –10 X 6.5 – 8 ไมครอน รูปทรงมน รี (ellipsoid) แบบ truncate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม

ภาพที่ 29 (ก) ลักษณะดอก *Ganoderma* sp. LB bar = 1 cm

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

<u>โครงสร้างดอก</u> (Basidiocarps) ดอกขึ้นเป็นดอกเดี่ยว ลักษณะดอกค่อนข้างกลม ดอกโค้งนูนขึ้นด้านบน ใต้ดอกแบนราบ กว้าง 6.5 – 9 เซนติเมตร หนา 1.5 – 2.0 เซนติเมตร ดอกด้านบนสีดำและสีน้ำตาลเข้ม ปลายขอบสีน้ำตาล ปลายขอบของดอกเป็นสันค่อนข้างตรง โค้งด้านบน ดอกไม่มีความมันวาว (non laccate) เนื้อเยื่อดอก 1 ชั้น สีน้ำตาลเข้ม โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์มีสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม ยาวประมาณ 0.3 – 0.4 เซนติเมตร รูใต้ดอกมีสีน้ำตาลอ่อน และสีขาวเป็นบางจุด จำนวนรู 4 -5 รูต่อความยาว 1 มิลลิเมตร

<u>ระบบเส้นใย</u> (Hyphal system) เป็นแบบ trimitic

<u>สปอร์</u> (Basidiospores) ไม่สามารถเก็บได้

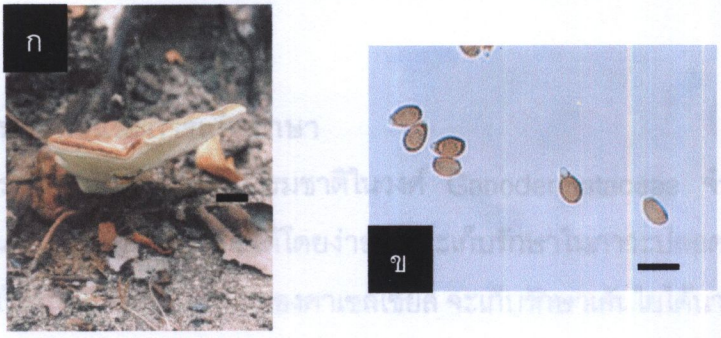
ภาพที่ 30 (ก) ลักษณะดอก *G. shandongense* LP1 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

<u>โครงสร้างดอก</u> (Basidiocarps) ดอกมีความแข็ง รูปทรงคล้ายเกือกม้า (ungulate) ขนาด 5.5 X 4.8 X 1.0 เซนติเมตร ผิวด้านบนมีสีน้ำตาลแดงหรือน้ำตาลอมเหลือง มีแนวเป็นวงอยู่ตรงกลางดอก ขอบบางลักษณะม้วนเข้า เนื้อเยื่อสีขาว สีน้ำตาลอ่อนยาวประมาณ 3 เซนติเมตร รูใต้ดอกสีขาวหรือสีเหลือง ค่อนข้างกลม ประมาณ 4-5 รูต่อความยาว 1 มิลลิเมตร ก้านดอกอยู่ด้านข้าง มีสีน้ำตาลแดง ยาว 8 เซนติเมตร ก้านดอกกว้าง 0.7-1.0 เซนติเมตร บางส่วนของก้านอาจแบนเรียบ มีสีเดียวกันกับสีดอก และก้านมีความมันวาว (laccate) มากกว่า

<u>ระบบเส้นใย</u> (Hyphal system) แบบ trimitic

<u>สปอร์</u> (Basidiospores) ขนาด 12-13.5 (-15) X 6.5-9 ไมครอน ลักษณะรี แบบ truncate มีปลายแหลม (apex) สีน้ำตาลอ่อน และแบบ bitunicate ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม



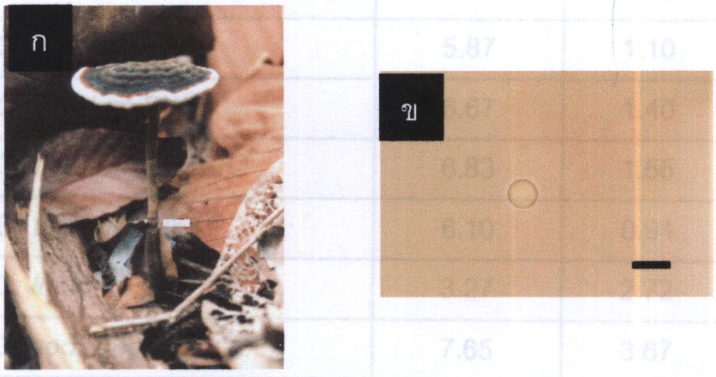
ภาพที่ 31 (ก) ลักษณะดอก *G. gibbosum* LP2 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) ดอกมีความแข็ง กดแล้วดอกยุบลงได้ ลักษณะครึ่งวงกลมหรือคล้ายพัด (subflabelliform) ขนาด 4-10 X 5-9 X 2 เซนติเมตร ด้านบนสีน้ำตาลอมเหลืองอ่อน หรือเป็นสีขาว มีรอยแตกบนดอก ไม่เป็นมันวาว (non laccate) ขอบมนหรือเรียบ เนื้อเยื่อมีสีน้ำตาลเข้ม มีความหนา 0.5-1.0 เซนติเมตร โครงสร้างชั้นของการสร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้ม ยาว 0.5-1.0 เซนติเมตร ใต้ดอกเป็นสันนูนมีสีขาวและน้ำตาล รู (pore) ค่อนข้างกลม ประมาณ 4-5 รูต่อความยาว 1 มิลลิเมตร ก้านสั้นและแข็งอยู่ด้านข้างของดอก ยาว 4 เซนติเมตร หนา 1 เซนติเมตร บริเวณโคนมีสีเดียวกันกับดอก

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) ขนาด 6.9-8.7 X 5-5.2 ไมครอน กลมรี แบบ truncate ที่ปลายแหลม (apex) ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกใสไม่มีสี ผนังเรียบ ชั้นในสีน้ำตาล มีหนาม



ภาพที่ 32 (ก) ลักษณะดอก *Amauroderma rugosum* LP3 bar = 1 cm (ข) สปอร์ bar = 10 μ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างดอก (Basidiocarps) วงชีวิต 1 ปี ดอกมีความแข็งและเหนียว ขึ้นเป็นดอกเดี่ยว ก้านดอกอยู่ทางด้านข้างหรืออยู่ค่อนมาตรงกลาง เนื่องจากขอบดอกม้วนกลับมาด้านหลังเข้าหากัน ดอกโค้งลงหรือแบนราบ เส้นผ่าศูนย์กลางดอกประมาณ 7 – 10 เซนติเมตร หนา 1 เซนติเมตร ดอกแข็งเมื่อแห้งและเป็นรอยย่น ผิวดอกด้านบนสีน้ำตาลเข้มหรือดำ ขอบดอกด้านบนมีวงแหวนสีแดงหรือส้มบริเวณขอบดอก ขอบดอกมีสีขาว เนื้อเยื่อส่วนใน (cortex) มี 1 ชั้น สีดำ หนา 0.1 – 0.3 เซนติเมตร ก้านดอกยาว 12 เซนติเมตร หนา 0.3 – 0.8 เซนติเมตร สีน้ำตาลเข้ม จนถึงสีดำ ทรงกระบอก ผิวดอกไม่มัน (non laccate)

ระบบเส้นใย (Hyphal system) แบบ trimitic

สปอร์ (Basidiospores) ขนาด 9 - 11 X 7.5 – 10 ไมครอน ทรงกลม ผนังสปอร์ 2 ชั้น ชั้นนอกไม่มีสี เรียบ ผนังชั้นใน สีน้ำตาลอ่อนหรือเหลือง

2. **การแยกเส้นใยบริสุทธิ์และการเก็บรักษา**

ตัวอย่างเห็ดราที่เก็บได้จากสภาพธรรมชาติในวงศ์ Ganodermataceae จำนวน 24 สายพันธุ์ สามารถแยกเส้นใยให้มีความบริสุทธิ์ได้โดยง่าย และเก็บรักษาในภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิห้องได้นาน 2-3 เดือน หรือในที่อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส จะเก็บรักษาเส้นใยได้นาน 4 เดือน

3. **การเจริญของเห็ดราในอาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ**

การเจริญของเส้นใยเห็ดราที่คัดแยกได้ในอาหารสูตร PDA ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เส้นใยเห็ดราเจริญได้ดี รวดเร็วกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียสในช่วงเวลาเท่ากัน และพบว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เส้นใยของเห็ดราไม่สามารถเจริญได้ในทุกสายพันธุ์ที่คัดแยก ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 3 การเจริญของเส้นใยของเห็ดราที่คัดแยกได้บนอาหารสูตร PDA ค่า pH 5.5 ในวันที่ 7

จังหวัด	สกุลหรือชนิด (species)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)		
		30 °C	35 °C	40 °C
กรุงเทพมหานคร	*Ganoderma lucidum* BK1	5.45	1.30	0
	G. lucidum BK2	5.87	1.10	0
	G. lucidum BK3	6.67	1.40	0
	Ganoderma sp. BK4	6.83	1.55	0
	G. fulvellum BK5	6.10	0.94	0
กาญจนบุรี	*G. lucidum* KC1	3.27	2.72	0
	Ganoderma sp. KC2	7.65	3.67	0
	G. lucidum KC3	8.78	4.81	0
ขอนแก่น	*G. lucidum* KH1	7.84	2.74	0
	G. brownii KH2	6.28	2.74	0
ชลบุรี	*G. fulvellum* CB	3.96	3.37	0
นครปฐม	*G. kunmingense* NP1	3.52	1.75	0
	G. applanatum NP2	4.14	1.80	0
	G. multiplicatum NP3	3.95	1.55	0
	G. hainanense NP4	4.76	3.14	0
	G. lucidum NP5	4.14	3.14	0

ตารางที่ 3 การเจริญของเส้นใยของเห็ดราที่คัดแยกได้บนอาหารสูตร PDA ในวันที่ 7 ค่า pH เท่ากับ 5.5 (ต่อ)

จังหวัด	สกุลหรือชนิด (species)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)		
		30 °C	35 °C	40 °C
นครราชสีมา	*G. brownii* NRM1	7.32	2.90	0
	Ganoderma sp. NRM2	8.17	2.74	0
ตราด	*Ganoderma* sp. TD1	5.15	2.20	0
	G. applanatum TD2	4.30	1.75	0
ลพบุรี	*Ganoderma* sp. LB1	6.10	2.14	0
ลำพูน	*G. shandongense* LP1	4.50	1.35	0
	G. gibbosum LP2	5.30	1.67	0
	Amauroderma rugosum LP3	5.67	1.20	0

4. การตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

4.1 การตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเบื้องต้น บนอาหารกึ่งแข็งสูตร PDA โดยตรวจสอบเอนไซม์แลคเคส ไทโรซิเนส และเพอร์ออกซิเดส ที่อุณหภูมิในการบ่มเส้นใย 30 องศาเซลเซียส พบว่า 0.1% (w/v) syringaldazine ให้ผลทดสอบที่เด่นชัดต่อเอนไซม์แลคเคส โดยทำปฏิกิริยากับเส้นใยเห็ดราที่คัดแยกเป็นสีชมพู (ภาพที่ 33) สำหรับ 0.03 % hydrogen peroxide ที่หยดบนเส้นใยเห็ดราโดยตรง พบว่าเกิดฟองอากาศบริเวณเส้นใย แสดงว่าเกิดผลที่เป็นบวก (positive) ต่อเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (ภาพที่ 34) สำหรับเอนไซม์ไทโรซิ เนส เมื่อหยด 0.1 M *p* – cresol บนเส้นใยเห็ดราโดยตรง ไม่เกิดปฏิกิริยาของสีที่จะเปลี่ยนแปลงเส้นใย (ภาพที่ 35) โดยผลการทดสอบเอน ไซม์ฟีนอลออกซิเดสแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ แสดงในตารางที่ 4

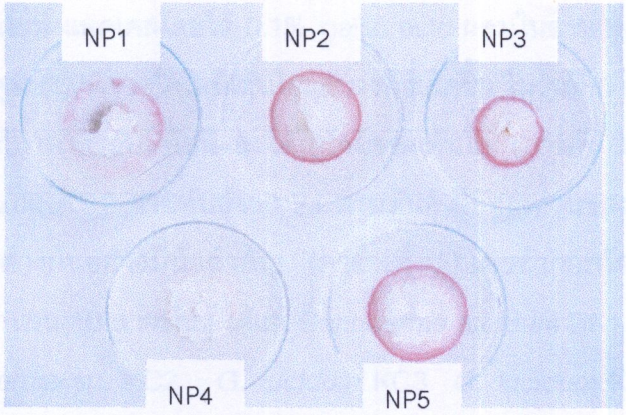
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสโดยใช้รีเอเจนท์

จังหวัด	สกุลหรือชนิด (species)	เอนไซม์		
		แลคเคส	ไทโรซิเนส	เพอร์ออกซิเดส
กรุงเทพมหานคร	*Ganoderma lucidum* BK1	++	-	++
	G. lucidum BK2	++	-	++
	G. lucidum BK3	++	-	++
	Ganoderma sp. BK4	+	-	++
	G. fulvellum BK5	+	-	++
กาญจนบุรี	*G. lucidum* KC1	++	-	++
	Ganoderma sp. KC2	++	-	++
	G. lucidum KC3	++	-	++
ขอนแก่น	*G. lucidum* KH1	++	-	++
	G. brownii KH2	++	-	++
ชลบุรี	*G. fulvellum* CB	++	-	++
นครปฐม	*G. kunmingense* NP1	+	-	++
	G. applanatum NP2	++	-	++
	G. multiplicatum NP3	++	-	++
	G. hainanense NP4	-	-	+
	G. lucidum NP5	++	-	++
นครราชสีมา	*G. brownii* NRM1	++	-	++
	Ganoderma sp. NRM2	+	-	++
ตราด	*Ganoderma* sp. TD1	+	-	+
	G. applanatum TD2	++	-	++
ลพบุรี	*Ganoderma* sp. LB1	+	-	+
ลำพูน	*G. shandongense* LP1	-	-	+
	G. gibbosum LP2	++	-	++
	Amauroderma rugosum LP3	+	-	+

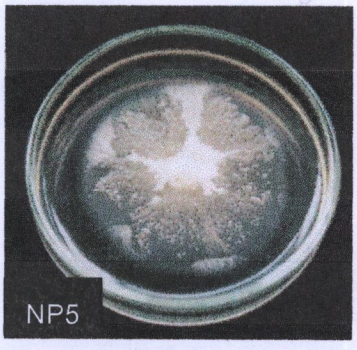
เครื่องหมาย ++ เกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ดี (แลคเคส = ชมพูเข้ม; เพอร์ออกซิเดส = เกิดฟองมาก)

\+ เกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้น้อย (แลคเคส = ชมพูอ่อน; เพอร์ออกซิเดส = เกิดฟองน้อย)

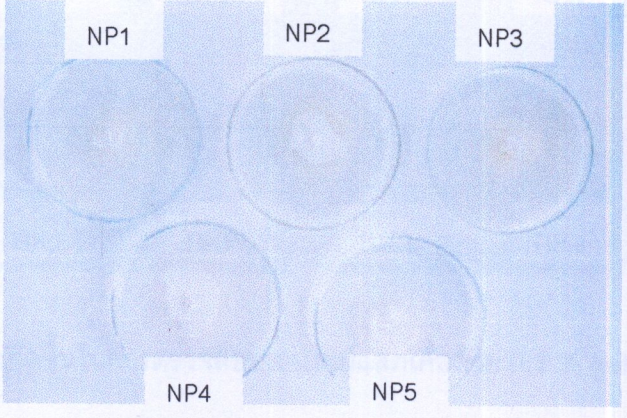
\- ไม่เกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์



ภาพที่ 33 วงสีที่เกิดขึ้นบนโคโลนีเส้นใยของเห็ดสกุล Ganoderma สายพันธุ์ NP1 – NP5 โดยใช้ 0.1% (w/v) syringaldazine ทดสอบเอนไซม์แลคเคส

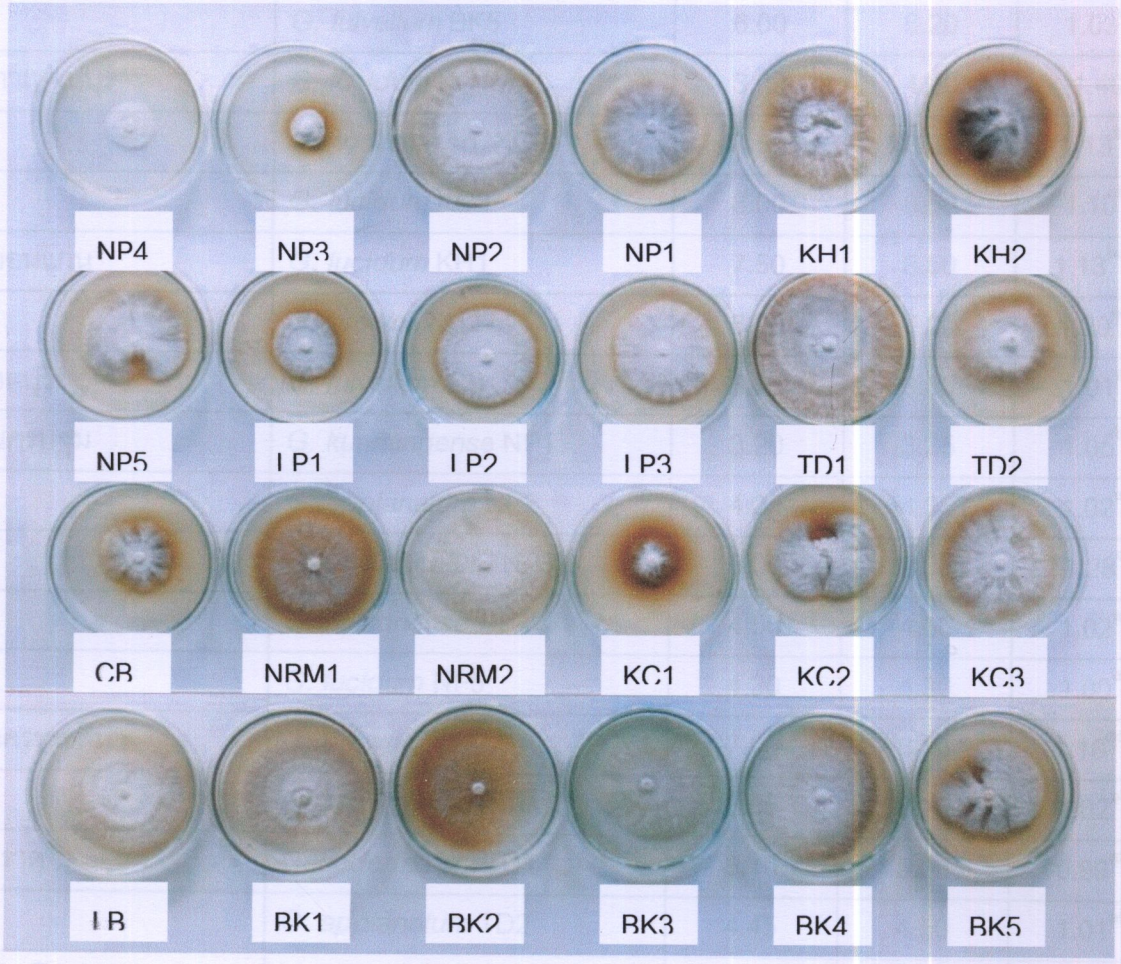


ภาพที่ 34 ฟองอากาศที่เกิดขึ้นบนโคโลนีเส้นใยโดยใช้ 0.03% hydrogen peroxide ทดสอบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส



ภาพที่ 35 วงสีที่ไม่เกิดขึ้นบนโคโลนีเส้นใยของเห็ดสกุล Ganoderma สายพันธุ์ NP1 – NP5 เมื่อใช้ 0.1 M *p*-cresol ทดสอบเอนไซม์ไทโรซิเนส

4.2 การตรวจสอบเอนไซม์ แลคเคสโดยใช้ 0.1% gallic acid ผสมในอาหารสูตร PDA ที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยและวงสีที่เกิดขึ้น ในวันที่ 5 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเกิดวงสีน้ำตาลรอบโคโลนีและใต้โคโลนีของเส้นใย (ภาพที่ 36) และเมื่อทดสอบค่าทางสถิติ พบว่าเห็ดราที่คัดแยกได้ 10 สายพันธุ์จาก 24 สายพันธุ์ มีอัตราส่วนของวงสีที่เกิดขึ้นต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5) โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดราวงศ์ Ganodermataceae จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ganoderma lucidum* BK1 *Ganoderma* sp. BK2 *G. lucidum* KC1 *Ganoderma* sp. KC2 *G. lucidum* KC3 *G. lucidum* KH1 *G. brownii* KH2 *G. multiplicatum* NP3 *Ganoderma* sp. NRM1 และ *G. gibbosum* LP2



ภาพที่ 36 วงสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบเอนไซม์แลคเคสด้วย 0.1 % gallic acid

ตารางที่ 5 เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยและวงสีที่เกิดขึ้นจากการใช้ 0.1% gallic acid ใน อาหารสูตร potato dextrose agar

จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	species	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย		
		โคโลนี (cm)	วงสี (cm)	อัตราส่วน
กรุงเทพมหานคร	*Ganoderma lucidum* BK1	5.60	6.85	1.22^{de}
	G. lucidum BK2	5.80	6.85	1.18^{ede}
	G. lucidum BK3	6.50	6.60	1.01^{ab}
	Ganoderma sp. BK4	6.75	6.85	1.01^{ab}
	G. fulvellum BK5	6.00	6.20	1.03^{ab}
กาญจนบุรี	*G. lucidum* KC1	3.00	4.20	1.40^{f}
	Ganoderma sp. KC2	7.50	8.50	1.13^{bcd}
	G. lucidum KC3	8.00	8.80	1.10^{bc}
ขอนแก่น	*G. lucidum* KH1	7.50	8.50	1.13^{bcde}
	G. brownii KH2	6.00	7.20	1.20^{ede}
ชลบุรี	*G. fulvellum* CB	3.55	3.60	1.01^{ab}
นครปฐม	*G. kunmingense* NP1	3.20	3.35	1.05^{bc}
	G. applanatum NP2	4.25	4.35	1.02^{ab}
	G. multiplicatum NP3	3.00	3.85	1.28^{df}
	G. hainanense NP4	4.50	4.60	1.02^{ab}
	G. lucidum NP5	4.30	4.30	1.00^{ab}
นครราชสีมา	*G. brownii*. NRM1	7.00	8.15	1.16^{ede}
	Ganoderma sp. NRM2	8.05	8.20	1.02^{ab}
ตราด	*Ganoderma* sp. TD1	5.10	5.05	0.99^{ab}
	G. applanatum TD2	4.45	4.50	1.01^{ab}
ลพบุรี	*Ganoderma* sp. LB1	5.50	4.80	0.87^{a}
ลำพูน	*G. shandongense* LP1	4.15	4.25	1.02^{ab}
	G. gibbosum LP2	5.10	6.30	1.24^{de}
	Amauroderma rugosum LP3	6.05	5.90	0.98^{ab}

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิกนินในขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสโดยใช้รีเอเจนท์ตรวจสอบ และการเลี้ยงเส้นใยของเห็ดราที่คัดแยกได้ในอาหารสูตร PDA ที่มี gallic acid เป็นสารชักนำให้เอนไซม์ผลิตออกมานอกเซลล์ ทำให้สามารถคัดเลือกเห็ดราในวงศ์ Ganodermataceae จาก 24 สายพันธุ์ ลดลงเหลือ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ganoderma lucidum* BK1 *G. lucidum* BK2 *G. lucidum* KC1 *Ganoderma* sp. KC2 *G. lucidum* KC3 *G. lucidum* KH1 *G. brownii* KH2 *G. multiplicatum* NP3 *Ganoderma* sp. NRM1 และ *G. gibbosum* LP2 มาทดสอบการย่อยสลายลิกนินในขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส และใช้เชื้อ *Phanerocheate chrysosporium* ร่วมทดสอบด้วย (ภาพที่ 37) พบว่าปริมาณลิกนินที่ลดลงในระยะเวลา 1 เดือนในอาหารที่มีเชื้อ *P. chrysosporium* มีค่าสูงสุด คือ 42.17 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเห็ดราสกุล Ganoderma ทั้ง 10 สายพันธุ์ พบว่า 3 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพรองลงมาในการลดปริมาณลิกนิน ได้แก่ *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 และ *G. gibbosum* LP2 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของปริมาณ ลิกนินเท่ากับ 19.49 18.82 และ 16.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 6

P. chrysosporium *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 *G. gibbosum* LP2

ภาพที่ 37 เห็ดราที่เจริญในอาหารสูตรขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส ในเวลา 1 เดือน

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ความต่างของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในการย่อยสลายขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัสจากเชื้อที่คัดแยกได้

สกุลหรือชนิด (species)	เซลลูโลส		เฮมิเซลลูโลส		ลิกนิน	
	หลังบ่มเชื้อ (กรัม)	%ความต่าง	หลังบ่มเชื้อ (กรัม)	%ความต่าง	หลังบ่มเชื้อ (กรัม)	%ความต่าง
Ganoderma lucidum BK1	0.4134	7.43	0.1362	1.66	0.2821	15.03[d]
G. lucidum BK2	0.4298	3.75	0.1315	5.07	0.2673	19.49[f]
G. lucidum KC1	0.4139	7.32	0.1168	15.67	0.2992	9.87[a]
Ganoderma sp. KC2	0.4162	6.81	0.1355	2.17	0.2871	13.52[c]
G. lucidum KC3	0.4410	1.25	0.1268	8.45	0.2939	11.47[b]
G. lucidum KH1	0.4142	7.25	0.1109	19.92	0.2955	10.99[b]
G. brownii KH2	0.4245	4.95	0.1359	1.85	0.2695	18.82[f]
G. multiplicatum NP3	0.4123	7.68	0.1179	14.87	0.2992	9.88[a]
Ganoderma sp. NRM1	0.3909	12.47	0.1155	16.61	0.2831	14.73[d]
G. gibbosum LP2	0.4357	2.43	0.1273	8.09	0.2771	16.52[e]
Phanerocheate chrysosporium	0.4242	5.02	0.1145	15.38	0.1920	42.17[g]

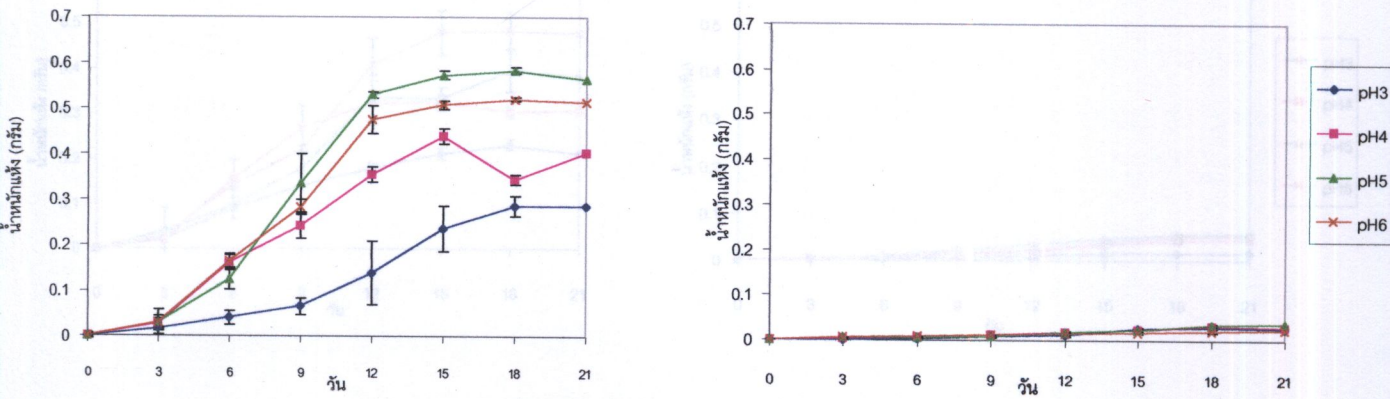
หมายเหตุ ปริมาณเซลลูโลสก่อนการบ่มเชื้อ 0.4466 กรัม เฮมิเซลลูโลส 0.1385 กรัม ลิกนิน 0.3320 กรัม เถ้า 0.0829 กรัม

6. การเจริญเติบโตของเห็ดราในอาหารสูตร PDB

เห็ดราวงศ์ Ganodermataceae 3 ชนิดที่คัดเลือกเพื่อนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ได้แก่ *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 และ *G. gibbosum* LP2 สามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตร PDB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดย *G. lucidum* BK2 ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักต่อกรัมแห้งสูงสุดในวันที่ 18 ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 (ภาพที่ 38) *G. brownii* KH2 ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักต่อกรัมแห้งสูงสุดในวันที่ 18 ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 (ภาพที่ 39) และ *G. gibbosum* LP2 ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักต่อกรัมแห้งสูงสุดในวันที่ 15 ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 (ภาพที่ 40)

30 °C

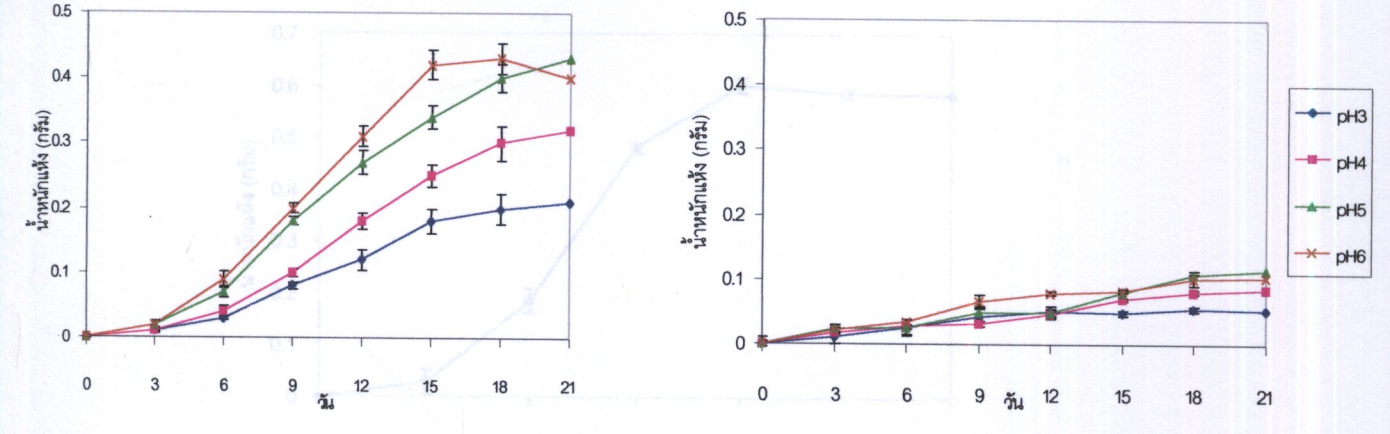
35 °C



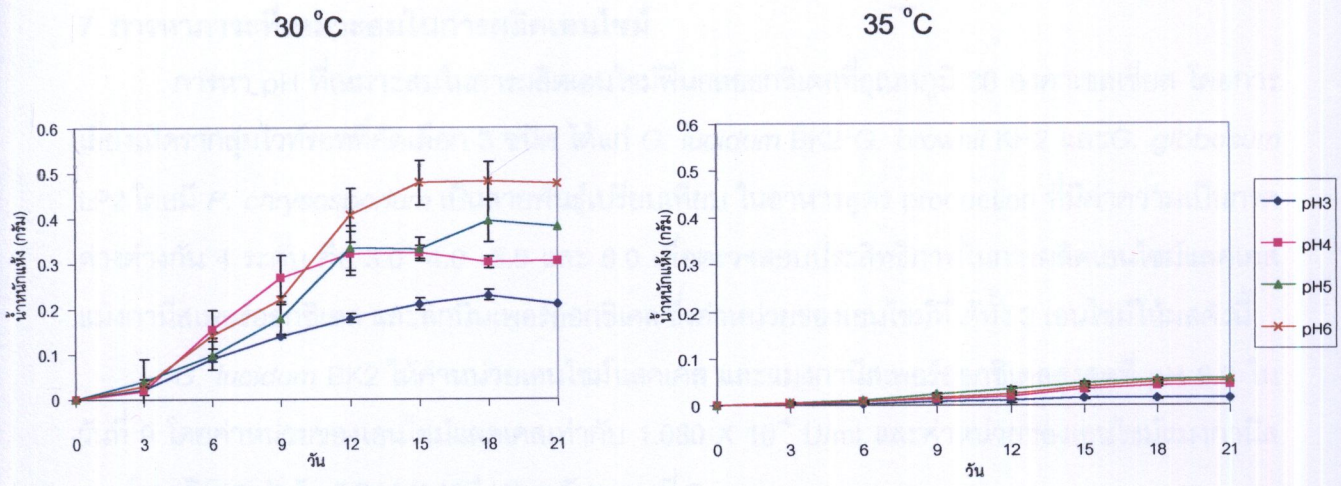
ภาพที่ 38 กราฟแสดงการเติบโตของเส้นใยในอาหารสูตร PDB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศา เซลเซียสของ *G. lucidum* BK2

30 °C

35 °C

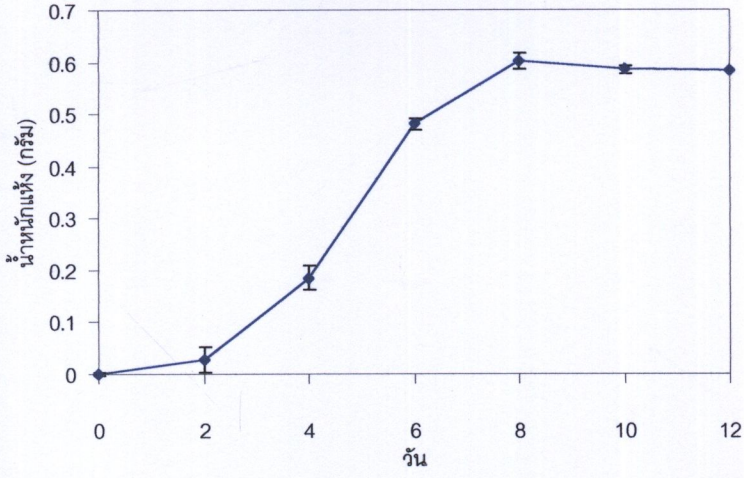


ภาพที่ 39 กราฟแสดงการเติบโตของเส้นใยในอาหารสูตร PDB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศา เซลเซียสของ *G. brownii* KH2



ภาพที่ 40 กราฟแสดงการเติบโตของเส้นใยในอาหารสูตร PDB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียสของ *G. gibbosum* LP2

สำหรับการเจริญของเชื้อ *Phanerocheate chrysosporium* ในอาหารสูตร PDB ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักต่อกรัมแห้งสูงสุดในวันที่ 8 (ภาพที่ 41)



ภาพที่ 41 กราฟแสดงการเติบโตของเชื้อ *P. chrysosporium* ในอาหารสูตร PDB

7. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

การหา pH ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการเลี้ยงเห็ดรากลุ่มไวท์รอทที่คัดเลือก 3 ชนิด ได้แก่ *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 และ*G. gibbosum* LP2 โดยมี *P. chrysosporium* เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ในอาหารสูตร production ที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่างกัน 4 ระดับ คือ 3.0 4.0 5.0 และ 6.0 เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และลิกนินเพอร์ออกซิเดส ซึ่งค่าหน่วยของเอนไซม์ที่ได้ทั้ง 3 เอนไซม์ให้ผลดังนี้

G. lucidum BK2 ให้ค่าหน่วยเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ pH 6.0 ในวันที่ 9 โดยค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 1.080 X 10^{-4} U/ml และค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 5.244 X 10^{-4} U/ml ดังตารางที่ 7

G. brownii KH2 ให้ค่าหน่วยเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ pH 5.0 ในวันที่ 6 โดยค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 1.608 X 10^{-4} U/ml และค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 2.532 X 10^{-4} U/ml ดังตารางที่ 8

G. gibbosum LP2 ให้ค่าหน่วยเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ pH 3.0 ในวันที่ 9 โดยค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 0.474 X 10^{-4} U/ml และค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 2.052 X 10^{-4} U/ml ดังตารางที่ 9

P. chrysosporium ให้ค่าหน่วยแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และลิกนินเพอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ pH 4.0 ในวันที่ 9 โดยค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส เท่ากับ 0.325 X 10^{-4} U/ml และค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 1.602 X 10^{-4} U/ml ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 7 แอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (LiP) เอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (MnP) และเอนไซม์แลคเคส (Lac) จาก *G.lucidum* BK2

pH	เอนไซม์แอคติวิตี (X 10^{-4} U/ml)											
	วันที่3			วันที่ 6			วันที่ 9			วันที่12		
	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP
3.0	0.342	0.467	0	0.264	1.089	0.018	0.098	0.358	0	0.196	0.331	0
4.0	0.071	0.079	0	0.080	0.396	0	0.212	0	0	0.067	0.496	0
5.0	0.062	0.107	0	0.151	0.153	0	0.167	0.074	0	0.055	0.274	0
6.0	0.067	0.153	0	0.070	0.241	0.017	1.080	5.244	0	0.340	4.200	0

ตารางที่ 8 แอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (LiP) เอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (MnP) และเอนไซม์แลคเคส (Lac) จาก *G. brownii* KH2

pH	เอนไซม์แอคติวิตี (X 10^{-4} U/ml)											
	วันที่3			วันที่ 6			วันที่ 9			วันที่12		
	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP
3.0	0.147	0.072	0	0.133	0.494	0	0.154	0.202	0	0.114	0.228	0
4.0	0.095	0.177	0	0.057	0.539	0	0.180	0.044	0	0.055	0.042	0
5.0	0.125	0.064	0.175	1.608	2.532	0	0.534	0.749	0	0.207	0.544	0.332
6.0	0.057	0.161	0.102	0.201	0.227	0	0.403	0.593	0	0.085	0.323	0

ตารางที่ 9 แอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (LiP) เอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (MnP) และเอนไซม์แลคเคส (Lac) จาก *G. gibbosum* LP2

pH	เอนไซม์แอคติวิตี (X 10^{-4} U/ml)											
	วันที่3			วันที่ 6			วันที่ 9			วันที่12		
	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP
3.0	0.277	0.495	0	0.159	0.716	0	0.474	2.052	0	0.145	0.613	0
4.0	0.044	0.109	0	0.063	0.071	0	0.042	0.344	0	0.072	0.364	0
5.0	0.011	0.058	0	0.033	0.093	0	0.036	0.196	0	0.099	0.489	0
6.0	0.014	0.131	0	0.033	0.084	0	0.025	0.334	0.297	0.134	0.391	0.079

ตารางที่ 10 แอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (LiP) เอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (MnP) และเอนไซม์แลคเคส (Lac) จาก *P. chrysosporium*

pH	เอนไซม์แอคติวิตี (X 10^{-4} U/ml)											
	วันที่3			วันที่ 6			วันที่ 9			วันที่12		
	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP
3.0	0	0.213	0.009	0	0.322	0.476	0	0.607	0.844	0	0.452	0.265
4.0	0	0.121	0.135	0	0.201	0.835	0	0.325	1.602	0	0.503	1.579
5.0	0	1.925	0.059	0	0.089	0.089	0	0.521	0.323	0	0.417	0.224
6.0	0	0.878	0	0	0.282	0.179	0	0.456	0.263	0	0.131	0.131

8. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

จากการทดสอบหาค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของเห็ดรากลุ่มไวท์รอทที่คัดเลือก 3 ชนิด ได้แก่ *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 และ *G. gibbosum* LP2 โดยมี *P. chrysosporium* เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ จึงเลือกวันที่เห็ดราทั้ง 4 ชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด ในภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม โดยนำเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 20% 40% 60% และ 80% อุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซลเซียส พบว่า

G. lucidum BK2 ให้ค่าหน่วยเอนไซม์ แลคเคส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 60 % โดยค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคสหลังจากการดึงเกลือออก (dialysis) มีค่าเท่ากับ 2.310 X 10^{-3} U/ml ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (specific acitivity) เท่ากับ 2.357 X 10^{-2} โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.06 เท่า และค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสหลังจากการดึงเกลือออกเท่ากับ 5.360 X 10^{-4} U/ml ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ เท่ากับ 9.613 X 10^{-3} โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.33 เท่า ดังตารางที่ 11

G. brownii KH2 ให้ค่าหน่วยเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 60 % โดยค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคสหลังจากการดึงเกลือออก (dialysis) มีค่าเท่ากับ 9.102 X 10^{-3} U/ml ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (specific acitivity) เท่ากับ 5.029 X 10^{-2} โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.38 เท่า และค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสหลังจากการดึงเกลือออกเท่ากับ 7.513 X 10^{-3} U/ml ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ เท่ากับ 8.442 X 10^{-2} โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.99 เท่า ดังตารางที่ 12

G. gibbosum LP2 ให้ค่าหน่วยเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 80 % โดยค่าหน่วยของเอนไซม์ แลคเคสหลังจากการดึงเกลือออก (dialysis) มีค่าเท่ากับ 4.906 X 10^{-4} U/ml ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (specific acitivity) เท่ากับ 4.306 X 10^{-3} โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.86 เท่า และค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสหลังจากการดึงเกลือออกเท่ากับ 1.532 X 10^{-3} U/ml ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ เท่ากับ 1.650 X 10^{-2} โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.68 เท่า ดังตารางที่ 13

P. chrysosporium ให้ค่าหน่วยเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 60 % โดยค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส หลังจากการดึงเกลือออก (dialysis) มีค่าเท่ากับ 8.912 X 10^{-3} U/ml ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (specific acitivity) เท่ากับ 4.776 X 10^{-2} โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.82 เท่า และค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสหลังจากการดึงเกลือออกเท่ากับ 5.123 X 10^{-4} U/ml ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ เท่ากับ 4.788 X 10^{-3} โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.02 เท่า ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 11 แอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ผลิตจาก *G. lucidum* BK2 ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 60%

ค่า pH	เอนไซม์	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตรรวม (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มก / มล)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	ค่ากิจกรรมรวม (U)	Yield (%)	ความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
6	Lac	เอนไซม์หยาบ	300	0.029	1.128×10^{-4}	3.890×10^{-3}	0.033	100	1
		ตกตะกอน	30	0.098	2.310×10^{-3}	2.357×10^{-2}	0.069	209.09	6.06
	MnP	เอนไซม์หยาบ	300	0.021	5.360×10^{-4}	2.552×10^{-2}	0.161	100	1
		ตกตะกอน	30	0.113	9.613×10^{-3}	8.507×10^{-2}	0.288	178.88	3.33
	LiP	เอนไซม์หยาบ	300	0.016	0	0	0	0	0
		ตกตะกอน	30	0.104	0	0	0	0	0

ตารางที่ 12 แอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ผลิตจาก *G. brownii* KH2 ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 60 %

ค่า pH	เอนไซม์	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตรรวม (ml)	ปริมาณโปรตีน (mg / ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	ค่ากิจกรรมรวม (U)	Yield (%)	ความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
5	Lac	เอนไซม์หยาบ	300	0.034	1.823×10^{-4}	5.362×10^{-3}	0.054	100	1
		ตกตะกอน	30	0.181	9.102×10^{-3}	5.029×10^{-2}	0.273	505.67	9.38
	MnP	เอนไซม์หยาบ	300	0.034	2.610×10^{-4}	7.676×10^{-3}	0.078	100	1
		ตกตะกอน	30	0.089	7.513×10^{-3}	8.442×10^{-2}	0.225	288.46	10.99
	LiP	เอนไซม์หยาบ	300	0.042	0	0	0	0	0
		ตกตะกอน	30	0.107	0	0	0	0	0

ตารางที่ 13 แอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ผลิตจาก *G. gibbosum* LP2 ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 %

ค่า pH	เอนไซม์	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตรรวม (ml)	ปริมาณโปรตีน (mg / ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	ค่ากิจกรรมรวม (U)	Yield (%)	ความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
3	Lac	เอนไซม์หยาบ	300	0.043	3.157×10^{-5}	7.342×10^{-4}	9.471×10^{-3}	100	1
		ตกตะกอน	30	0.100	4.906×10^{-4}	4.306×10^{-3}	1.472×10^{-2}	1554.22	5.86
	MnP	เอนไซม์หยาบ	300	0.047	2.104×10^{-4}	4.476×10^{-3}	6.312×10^{-2}	100	1
		ตกตะกอน	30	0.093	1.532×10^{-3}	1.650×10^{-2}	0.495	784.22	3.68
	LiP	เอนไซม์หยาบ	300	0.056	0	0	0	0	0
		ตกตะกอน	30	0.081	0	0	0	0	0

ตารางที่ 14 แอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ผลิตจาก *P. chrysosporium* ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 60 %

ค่า pH	เอนไซม์	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตรรวม (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มก / มล)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	ค่ากิจกรรมรวม (U)	Yield (%)	ความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
4	Lac	เอนไซม์หยาบ	300	0.025	0	0	0	0	0
		ตกตะกอน	30	0.097	0	0	0	0	0
	MnP	เอนไซม์หยาบ	300	0.019	3.017×10^{-5}	1.588×10^{-3}	9.051×10^{-3}	100	1
		ตกตะกอน	30	0.107	5.123×10^{-4}	4.788×10^{-3}	1.537×10^{-2}	169.81	3.02
	LiP	เอนไซม์หยาบ	300	0.023	1.243×10^{-4}	5.040×10^{-3}	3.729×10^{-2}	100	1
		ตกตะกอน	30	0.187	8.912×10^{-3}	4.766×10^{-2}	0.267	716.01	8.82

การทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิ 30 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชั่วโมง ในสารละลายโซเดียมทาร์เทรทบัฟเฟอร์ โดยคิดคำนวณเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก่อนการบ่ม (relative activity) ให้ผลดังนี้

เอนไซม์ที่ผลิตจาก *G. lucidum* BK2 นำมาบ่มในสารละลายโซเดียมทาร์เทรทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 มีความเสถียรของเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 2 – 6 ชั่วโมง โดยมีค่า relative activity ของเอนไซม์แลคเคส ของเอนไซม์แลคเคส อยู่ในช่วง 97.28 – 78.01 เปอร์เซ็นต์ และค่า relative activity ของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส อยู่ในช่วง 95.17 – 78.67 ดังตารางที่ 15

เอนไซม์ที่ผลิตจาก *G. brownii* KH2 นำมาบ่มในสารละลายโซเดียมทาร์เทรทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 มีความเสถียรของเอนไซม์ แลคเคส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 2 – 6 ชั่วโมง โดยมีค่า relative activity ของเอนไซม์แลคเคส อยู่ในช่วง 93.01 – 72.49 เปอร์เซ็นต์ และค่า relative activity ของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส อยู่ในช่วง 98.71 – 80.14 ดังตารางที่ 15

เอนไซม์ที่ผลิตจาก *G. gibbosum* LP2 นำมาบ่มในสารละลายโซเดียมทาร์เทรทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 3.0 มีความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 2 – 6 ชั่วโมง โดยมีค่า relative activity ของเอนไซม์แลคเคส อยู่ในช่วง 90.78 – 79.13 เปอร์เซ็นต์ และค่า relative activity ของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส อยู่ในช่วง 87.56 – 63.13 ดังตารางที่ 15

เอนไซม์ที่ผลิตจาก *P. chrysosporium* นำมาบ่มในสารละลายโซเดียมทาร์เทรทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 มีความเสถียรของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 2 – 6 ชั่วโมง โดยมีค่า relative activity ของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส อยู่ในช่วง 90.17 – 80.21 เปอร์เซ็นต์ และค่า relative activity ของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส อยู่ในช่วง 96.01 – 69.03 ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลของอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

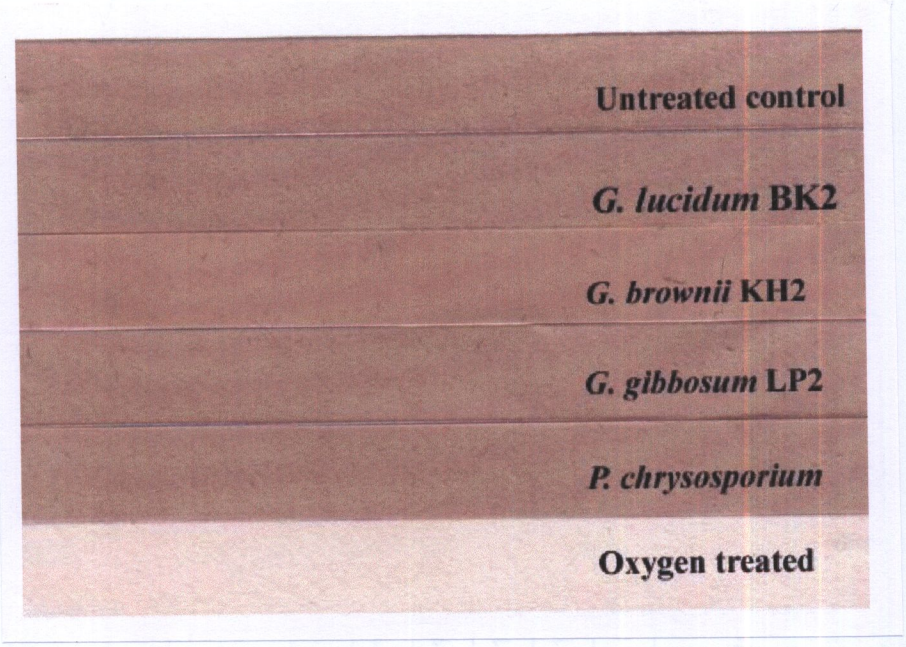
ไวท์รอท	อุณหภูมิที่บ่ม (^{o}C)	% relative activity 0 ชั่วโมง	% relative activity*								
			เอนไซม์แลคเคส			เอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส			เอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส		
			2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
G. lucidum BK2	30	100	97.28	84.72	78.01	95.17	84.13	78.67	0	0	0
	40	-	68.71	56.67	48.53	62.78	40.67	21.16	0	0	0
	50	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G. brownii KH2	30	100	92.01	81.97	72.49	98.71	82.67	80.14	0	0	0
	40	-	51.67	28.46	21.03	65.13	38.17	20.89	0	0	0
	50	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G. gibbosum LP2	30	100	90.78	80.34	79.13	87.56	85.15	63.13	0	0	0
	40	-	68.21	38.17	10.78	67.33	60.17	44.04	0	0	0
	50	-	10.67	0	0	0	0	0	0	0	0
P. chrysosporium	30	100	0	0	0	96.01	87.13	69.03	90.17	87.50	80.21
	40	-	0	0	0	75.15	53.61	31.89	75.01	62.11	50.17
	50	-	0	0	0	42.67	0	0	50.33	41.93	32.10

* หมายเหตุ : คิดเทียบโดยให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 0 ชั่วโมง เป็น 100 %

การฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์

เมื่อนำเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ที่ผลิตได้จากเห็ดรา 4 ชนิดได้แก่ *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 *G. gibbosum* LP2 และ *P. chrysosporium* มาปรับความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 0.2 – 0.4 IU/gOD โดยการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสจะบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเยื่อที่ที่ผ่านการฟอกแล้ว ให้ผลทดสอบค่าการให้น้ำไหลผ่าน ค่าความขาวสว่าง ค่าแรงดันทะลุ ค่าแรงฉีกขาด ค่าการต้านทานแรงดึง และค่าคัปปา แสดงในตารางที่ 16 และเยื่อกระดาษทดสอบที่ได้มีความขาวสว่างดังภาพที่ 42

คุณสมบัติของเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากเห็ดรากลุ่มไวท์รอท 4 ชนิด พบว่า ให้ค่าความขาวสว่างอยู่ในช่วง 26.84 ถึง 27.27 ค่าคัปปามีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง โดยชุดที่ฟอกด้วยออกซิเจนมีค่าคัปปาเท่ากับ 6.71 และชุดที่ฟอกด้วยเอนไซม์จาก *G. brownii* KH2 ให้ค่าคัปปาน้อยสุดเท่ากับ 15.63 ค่า freeness มีความแตกต่างทางสถิติสามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่มจากชุดทดลอง โดยการฟอกเยื่อด้วยเอนไซม์จาก *P. chrysosporium* ให้ค่า freenee น้อยกว่าชุดทดลองที่ฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์จากเห็ดรา 3 ชนิด และชุดทดสอบที่ผ่านการฟอกด้วยออกซิเจนมีค่า freeness น้อยที่สุด แสดงถึงประสิทธิภาพในการอุ้มน้ำที่ดี และชุดที่ผ่านการฟอกด้วยออกซิเจน มีค่าแรงดันทะลุไม่แตกต่างกัน *G. gibbosum* LP2 และทุกชุดการทดลองมีค่า Burst index ที่มากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้ฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์ โดย *G. lucidum* BK2 ให้ค่า Burst index สูงสุดที่ 0.812 Kpa x m^2/g สำหรับค่า Tear index ที่ผ่านการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์จากทุกชุดการทดลองมีค่าน้อยกว่าชุดควบคุม ยกเว้นเอนไซม์จาก *G. brownii* KH2 ที่ให้ค่า Tear index มากที่สุดที่ 5.38 mN x m^2/g และค่า Tensile index มีค่าต่างกันทุกชุดการทดสอบ แต่ค่าที่ได้ส่วนใหญ่มีค่ามากกว่าชุดควบคุม ยกเว้นเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จาก *G. gibbosum* LP2 ที่ให้ค่าต่ำกว่าชุดทดสอบ ทำให้สามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์จากเห็ดรา *G. brownii* KH2 มี ประสิทธิภาพในการลดค่าคัปปา การเพิ่มความสว่าง และการมีค่า Tear index ที่สูงกว่าชุดควบคุม จึงเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลการฟอกเยื่อกระดาษที่ดีที่สุด



ภาพที่ 42 แผ่นกระดาษทดสอบที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากเห็ดรากลุ่มไวท์รอท

ตารางที่ 16 คุณสมบัติของเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจากเห็ดรากลุ่มไวท์รอท

Samples	Brightness		Kappa number		Freeness (ml)	Burst index (Kpa x m^2/g)	Tear index (mN x m^2/g)	Tensile index (KN x m/g)
	Index	% increasing	Index	% decreasing				
ชุดควบคุม *	26.56[a]	0	18.80[f]	0	625[d]	0.445[a]	5.00[c]	15.57[b]
G. lucidum BK2	26.84[b]	1.05	18.45[e]	1.86	625[d]	0.812[e]	4.33[b]	24.91[f]
G. brownii KH2	27.27[d]	2.67	15.63[b]	16.86	620[c]	0.503[b]	5.38[d]	17.60[d]
G. gibbosum LP2	27.03[c]	1.77	17.95[d]	4.52	620[c]	0.571[c]	5.00[c]	14.64[a]
P. chrysosporium	27.13[c]	2.30	16.41[c]	12.71	615[b]	0.674[d]	2.92[a]	19.58[e]
ชุดฟอกออกซิเจน	54.68[e]	105.87	6.71[a]	64.31	580[a]	0.613[c]	3.12[a]	16.81[c]

* หมายเหตุ ชุดควบคุมคือเยื่อกระดาษที่ไม่ได้ผ่านการฟอก

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจ การเก็บตัวอย่างเห็ดราและการตรวจชื่อวิทยาศาสตร์

การสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดราที่เจริญอยู่บนเนื้อไม้ พบเห็ดราหลายชนิด ได้แก่ เห็ดรากลุ่มไวท์รอท เช่น สกุล *Pycnoporus* สกุล *Trametes* สกุล *Panus* สกุล *Ganoderma* สกุล *Amauroderma* หรือเห็ดราชนิดอื่นที่ขึ้นอยู่บนเนื้อไม้ และได้เก็บตัวอย่างมาแยกเส้นใย แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการแยกเส้นใยจากเห็ดราหลายสกุลที่พบ เนื่องจากการปนเปื้อนจากเชื้อราชนิดอื่น การไม่เจริญของเส้นใยในอาหารสูตร PDA การแยกเส้นใยจากตัวอย่างเห็ดราวงศ์ Ganodermataceae สามารถทำได้ง่ายกว่าเห็ดราชนิดอื่น เนื่องจากลักษณะดอกที่หนา แข็ง และเนื้อเยื่อชั้นในไม่ค่อยพบการปนเปื้อนจากเชื้อราอื่นหรือแมลงกัดกิน Liang และคณะ (1995) ได้เลือกใช้ PDA ในการเลี้ยงเส้นใยของ *Ganoderma tsugae* และสามารถเจริญได้ในอาหารได้ นอกจากนี้เห็ดราวงศ์นี้ พบได้เกือบทั่วไปในช่วงฤดูฝน ชอบขึ้นกับต้นไม้ที่มีความจำเพาะบางชนิด ได้แก่ ต้นหางนกยูงฝรั่ง ต้นนนทรี และโคนต้นมะขามหรือตอไม้ที่ผุตายแล้ว โดยเป็น phytopathogenic กับต้นไม้หลายชนิด (Lieng et al., 1995) ถิ่นอาศัยของเห็ดราวงศ์นี้ที่พบส่วนใหญ่ตรงกับคำบรรยายในคู่มือการตรวจสอบชื่อชนิด (species) ของ Zhao (1989) อย่างไรก็ตาม การตรวจชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ดราวงศ์ Ganodermataceae โดยใช้คู่มือทางสัณฐานวิทยา อาจมีความคลาดเคลื่อน จากรายงานของ Buchanan (2001) ได้แสดงความเห็นว่า การจัดจำแนกมีความสับสนเนื่องจากจำนวนชนิดที่คล้ายกันทางสัณฐานวิทยา และชนิด (species) ใหม่ที่มีการตีพิมพ์ทั้งหมด 148 ชนิด ในปี ค.ศ. 1983 มี 113 ชนิด ซึ่งมีอยู่ในประเทศจีน 86 ชนิด (สุรพล รักปทุม และชวลิต สันติกิจรุ่งเรือง, 2539) การใช้ 25 s Ribosomal DNA ในการทำ ITS เพื่อจัดจำแนกชนิด จะเป็นแนวทางหนึ่งในการตรวจสอบชนิดที่ถูกต้อง (Buchanan, 2001)

2. การแยกเส้นใยบริสุทธิ์และการเก็บรักษา

เส้นใยของเห็ดราวงศ์ Ganodermataceae มีความแตกต่างทางลักษณะของเส้นใย ได้แก่ ความหนาแน่นเส้นใย และอัตราการเจริญของเส้นใย แต่เส้นใยทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในวงศ์นี้มีสีขาว การเก็บรักษาเส้นใย ไม่ควรเก็บในตู้เย็นหรือในที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานาน อาจทำให้เส้นใยหยุดการเจริญได้ เนื่องจากเส้นใยไม่สามารถที่จะพัฒนาเป็นดอกหรือสร้างสปอร์เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PDA หรือ nutrient agar อื่นได้ (Seo et al., 1995)

3. การเจริญเติบโตของเห็ดราในอาหารสูตร PDA

เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยกำหนดการเจริญของเห็ดราวงศ์ Ganodermataceae ดังนั้นอุณหภูมิที่สูงถึง 40 องศาเซลเซียส จึงไม่พบการเจริญของเส้นใย ซึ่งสอดคล้องกับการกระจายพันธุ์ของเห็ดราวงศ์นี้ ที่อยู่ได้ในเขตอบอุ่น และในเขตร้อนชื้น (Zhao, 1989) โดยสภาพแวดล้อมที่ทำการเก็บตัวอย่าง ไม่พบเห็ดราขึ้นอยู่ในที่แล้ง และอากาศร้อนจัดจะทำให้เห็ดวงศ์นี้หยุดการเจริญและอาจตายได้ นอกจากนี้แสงยังเป็นปัจจัยที่สำคัญในการยั้บยั้งการสร้างดอกของ *G. lucidum* แต่รายงานของ Seo และคณะ (1995) พบว่าชนิดของแสงบางอย่าง เช่น fluorescent สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นดอกได้ จึงเป็นเหตุผลอย่างหนึ่งที่ในการบ่มเชื้อของเห็ดราวงศ์นี้ ต้องควบคุมสภาพแสงให้ใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง โดยการบ่มเส้นใยในที่มืด เป็นการควบคุมให้เส้นใยเจริญได้เท่ากัน และส่งผลให้เส้นใยเจริญได้เร็วขึ้น

4. การตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

การใช้ gallic acid ที่ความเข้มข้นเหมาะสมผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นวิธีทดสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในช่วงต้น ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1928 โดย Bavendamm และยังเป็นวิธีที่ยังใช้ทดสอบได้ในปัจจุบัน แต่การใช้ 0.1 % syringaldazine หยดบนเส้นใยโดยตรงเพื่อทดสอบเอนไซม์แลคเคส เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กัน (Harkin and Obst, 1973; Mahauti et al., 1995) และไม่ส่งผลต่อการเจริญของเส้นใยที่ยังคงจะเจริญต่อไปได้ ซึ่งแตกต่างกับ phenolic ที่ใช้เป็นสับสเตรตอื่นที่ใช้ในการทดสอบเอนไซม์ โดยมีผลหยุดการเจริญของเส้นใยได้ (Markin and Obst, 1973) และความเป็นพิษของ syringaldazine ที่ต่ำ จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่เลือกสารนี้เป็นสารตรวจสอบเอนไซม์แลคเคส syringaldazine ยังเป็นสับสเตรตในการตรวจสอบเอนไซม์กลุ่มเพอร์ออกซิเดสได้เช่นกัน โดยการผสมกับ hydrogen peroxide หรือใช้ hydrogen peroxide ชนิดเดียวทดสอบได้เช่นกัน (Harkin and Obst, 1973) แต่การตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสโดยใช้รีเอเจนท์หรือสับสเตรตเป็นวิธีที่บอกได้ว่าเห็ดราที่ทดสอบมีเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ชนิดของเห็ดราที่มียีนแสดงออกของเอนไซม์ สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ สูตรอาหารที่ชักนำให้เห็ดราผลิตเอนไซม์ออกมาในปริมาณที่สูง (Rodriguez et al., 1999)

การใช้รีเอเจนท์หรือใช้ฟีนอลิกเป็นสับสเตรทให้เห็ดรากลุ่มไวท์รอท ผลิตเอนไซม์ออกมาทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิก แล้วเกิดสีขึ้นบนอาหารซึ่งมีสีแตกต่างกันไปตามสับสเตรทที่ใช้ เช่น syringaldazine ให้สีชมพูถึงม่วงแดง gallic acid ให้สีน้ำตาล หรือฟีนอลิกชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบเอนไซม์แลคเคส คือ alpha – napthal จะเกิดสีน้ำเงินถึงม่วง เนื่องจากเอนไซม์

ฟีนอลออกซิเดสไปเปลี่ยนโครงสร้างของสารตั้งต้น เช่น tyrosine หรือสับสเตรท dopa quinone ที่อยู่ในเซลล์ ให้กลายเป็นเม็ดสี (melanin) ในขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยา ดังนั้นในเซลล์พืช เช่น ผลไม้ เห็ดรา ในเซลล์สัตว์ที่มีเม็ดสีเนื่องจากเอนไซม์เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่มีอยู่ในเซลล์ตลอดเวลา (Griffith, 1994)

แอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเส้นใยของเห็ดรา *Favolus arcularius* เมื่อบ่มในภาวะมืดเป็นเวลา 8 วัน ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ในระดับที่คงที่ และเมื่อให้แสงเพื่อชักนำให้สร้างดอก ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะเพิ่มขึ้น (Kitamota et al., 2000) ดังนั้นการบ่มเส้นใยในภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยแสงในเห็ดราชนิดอื่น อาจไม่เกิดความแปรปรวนต่อระดับการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของเห็ดราเมื่ออยู่ในระยะสร้างเส้นใย

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิกนิน

วิธีทดสอบนี้ได้ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Nishida และคณะ (1989) โดยเปลี่ยนจากการวิเคราะห์ลิกนินด้วย 72 % กรดซัลฟูริก มาเป็นการวิเคราะห์ค่าเปอร์แมงกาเนตที่ถูกใช้ไป การเลือกใช้ขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัสเพื่อให้เห็ดราย่อยสลายลิกนิน มีเหตุผล 2 ประการ ประการแรก ต้องการทราบถึงประสิทธิภาพที่แท้จริงในการย่อยสลายลิกนินของเห็ดราที่คัดแยกได้ เมื่อต้องนำเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสไปย่อยสลายลิกนินในเยื่อกระดาษยูคาลิปตัส ซึ่งผลของปริมาณลิกนินที่ถูกย่อยสลายไปสามารถนำเป็นปัจจัยกำหนดการคัดเลือกเห็ดราที่จะนำไปใช้ต่อไปได้ ประการที่สอง มีรายงานของ Machuca และ Ferraz (2001) ที่เลือกใช้รากลุ่มไวท์รอทและกลุ่มบราว์รอท ผลิต oxidative enzyme ในการย่อยสลายลิกนิน โดยใช้ *Eucalyptus gradis* เป็น solid media ให้เห็ดราย่อยเนื้อไม้โดยตรง พบว่า *Trametes versicolor* ย่อยสลายลินนินได้สูงสุด 54 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 30 วัน แต่ผลการทดสอบที่ทำในขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส โดยใช้เห็ดราสกุล Ganoderma 3 ชนิด คือ *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 และ *G. gibbosum* LP2 สามารถลดปริมาณลิกนินอยู่ในช่วง 16.65 – 19.87 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 30 วัน เช่นกัน ทำให้เชื่อได้ว่า เห็ดราสกุล Ganoderma สามารถย่อยสลายลิกนินได้ เนื่องจากเห็ดรากลุ่มไวท์รอทสามารถย่อยได้ทั้งเซลลูโลส และลิกนิน อย่างไรก็ตาม อัตราส่วนของการย่อยมีความสัมพันธ์ที่ต่างกันอาจขึ้นกับชนิดของเห็ดรา และสับสเตรทที่ใช้ในการย่อยสลาย โดยสัดส่วนของเซลลูโลสจะเหลือในปริมาณที่มากกว่าลิกนิน เนื่องจากเห็ดรากลุ่มไวท์รอทชอบที่จะย่อยลิกนิน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณที่ลดลงของลิกนิน และเซลลูโลสในการทดสอบครั้งนี้

6. การเจริญของเห็ดราในอาหารสูตร PDB

เมื่อเลี้ยงเส้นใยเห็ดราในช่วงวันที่ 15 18 และ 21 วัน จะพบปัญหาในการกรองเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการที่เชื้อผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ออกมานอกเซลล์ และสารอื่นๆ ได้แก่ sterols alkaroids และ lactones (Jong and Birmingham, 1992) ดังรายงานของ Liang และคณะ (1995) เมื่อเลี้ยงเส้นใยของ *G. tsugae* ในอาหารเหลว วันที่ 15 – 21 เป็นช่วงที่ให้ค่าเฉลี่ยเส้นใยแห้ง และพอลิแซคคาไรด์ที่ขับออกมานอกเซลล์สูงสุด ทำให้อาหารเหลวมีความหนืด การล้างเซลล์ด้วย 0.85 % โซเดียม คลอไรด์ (normal saline) หลายๆ ครั้งจะช่วยชะล้างพอลิแซคคาไรด์หลุดออกจากเซลล์หรือเส้นใยเห็ดราได้ แต่การที่พอลิแซคคาไรด์ปะปนในปริมาณที่สูง จะส่งผลในการคำนวณน้ำหนักกรัมแห้งเฉลี่ยของเส้นใยเห็ดราได้ ในการเลี้ยงเส้นใยของเห็ดราสกุล Ganoderma ในครั้งนี้ได้เลือกอุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส เนื่องจากการทดสอบการเจริญของเส้นใยในอาหารสูตร PDA พบว่าเส้นใยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิดังกล่าว และให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PDB อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้สูงกว่าการเลี้ยงเส้นใยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ko และคณะ (2001) ที่เลี้ยงเส้นใยของ *G. lucidum* อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารสูตร semi – Ganoderma complete medium (SGCM) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์แลคเคส แสดงว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญของเห็ดราวงศ์ Ganodermataceae

7. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

ในการตัดแยกเส้นใยเห็ดราบนอาหารสูตร PDA ได้เลือกค่า pH 5.5 ซึ่งเห็ดราบางสายพันธุ์อาจเจริญได้ดีกว่า ถ้าเปลี่ยนค่า pH ให้เหมาะสม ดังนั้นในขั้นตอนการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ จึงทำการผลิตเอนไซม์ในค่าความเป็นกรดด่างที่ต่างกันอีกครั้ง เพื่อตรวจสอบว่าค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของแต่ละเชื้อที่คัดแยกได้ จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีในช่วง pH ใด เนื่องจากเห็ดราที่คัดเลือกมา 3 ชนิด ได้แก่ *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 และ *G. gibbosum* LP2 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้ดีในค่า pH ที่ต่างกัน คือ 6.0 5.0 และ 3.0 ตามลำดับ สำหรับ *P. chrysosporium* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้ดีที่ pH 4.0ซึ่งยืนที่ควบคุมการผลิตเอน ไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสกุล Ganoderma ยังไม่ทราบแน่ชัด ว่าค่า pH เท่าใดที่เหมาะสมในการชักนำให้ผลิตเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง แต่สำหรับ *P. chrysosporium* ที่ผลิตเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส นั้นพบว่า isozyme ของ ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส จะมีค่า pI ตั้งแต่ 3.3 – 4.9 (Cai and Tien, 1991)

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการปรับค่า pH พบว่าในช่วงเวลาของการเลี้ยงเห็ดราสกุล Ganoderma 3 ชนิด ได้แก่ *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 และ *G. gibbosum* LP2 ในลางช่วงเวลาของการผลิตเอนไซม์ พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส โดยไม่สามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส เกิดขึ้นได้อย่างไร ซึ่งคาดว่าเห็ดราสกุล Ganoderma อาจมียีน ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส หรือยีนกลุ่มที่ใกล้เคียง เนื่องจากรายงานของ Varela และคณะ (2000) ได้ทำการตรวจสอบเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส และ aryl – alcohol oxidase โดยกระบวนการที่เรียกว่า Southern blot พบว่า *G. applanatum* และ *G. australe* มียีนที่ใกล้เคียงกับ lignin peroxidase (H-8) จากเชื้อ *Phanerocheate chrysosporium* ที่ใส่เข้าไปในเซลล์ นอกจากนี้ D'souza และคณะ (1999) ได้รายงานถึง *G. lucidum* ที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส และลิกนิน เพอร์ออกซิเดส โดยเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส สามารถตรวจวัดได้บ้างในสูตรอาหารที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และการทำ hybridization ยีน LiP จากเชื้อ *Phanerocheate chrysosporium* แสดงให้เห็นว่า *G. lucidum* มีลำดับยีน (sequence) ของ LiP คล้ายกับ *P. chrysosporium* แต่รายงานของ Ohkuma และคณะ (2001) กล่าวว่า *G. applanatum* ผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเห็ดราสกุล Ganoderma บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดสได้ ในสภาวะบางอย่างที่ต้องศึกษาต่อไป

8. การวิเคราะห์เอนไซม์และการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคส แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส และ ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส จาก *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 *G. gibbosum* LP2 และ *P. chrysosporium* มีค่าที่ต่ำ ส่วนใหญ่ค่าแอคติวิตีที่ตรวจสอบได้อยู่ที่ 10^{-4} U/ml ซึ่งความจริงแล้ว *P. chrysosporium* เป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส และ แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ได้ดี ซึ่งให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ที่ 10^{-1} – 10^{-2} U/ml ในอาหารสูตร production ที่ผลิตเอนไซม์ในภาวะนิ่ง โดยมีเยื่อกระดาษเป็นตัวชักนำในการผลิตเอนไซม์ และเป็นวัสดุยึดเกาะ (เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี, 2545) ทั้งนี้ที่ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำ เนื่องจากได้ลดปริมาณความเข้มข้นของ guaiacol จาก 0.4 มิลลิโมล เป็น 0.4 ไมโครโมล เป็นเพราะในการผลิตเอนไซม์ในครั้งแรกได้ใช้ความเข้มข้นของ guaiacol เท่ากับ 0.4 มิลลิโมล ในอาหารสูตร production เมื่อเลี้ยงเห็ดราในภาวะเขย่า เกิด melanin ในอาหารในปริมาณที่มาก ซึ่งคาดว่าปริมาณของตัวชักนำที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดสีของ melanin ที่เข้มตามสัดส่วน โดยเห็ดราจะผลิตเอนไซม์ออกมาในปริมาณที่มากพอสำหรับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับวงแหวนฟีนอลิกของ guaiacol เมื่อนำไป centrifuge พบ

ว่าสีของ melanin ยังคงอยู่ ทำให้ไม่เหมาะที่จะนำเอนไซม์มาใช้ในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษ จึงได้ลดความเข้มข้นของ inducer ลง จนไม่เกิดสีที่เข้มมากเกินไประหว่างการผลิตเอนไซม์เป็นเวลาหลายวัน และสาเหตุหนึ่งที่คาดว่าน่าจะมีผลต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ คือการเลี้ยงเห็ดราในภาวะที่เป็น liquid stage ที่มีการเขย่า อาจเป็นสภาวะที่ไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่าเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์จากเห็ดรากลุ่มนี้หรือไม่ อย่างไรก็ตาม Kahraman และ Gurdal (2000) ได้เลือกใช้สูตรอาหาร 5 ชนิดที่เป็นอาหารเหลวสำหรับการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อ *Trametes versicolor* โดยสูตรอาหารมีการเติมส่วนของลำต้นฝ้าย (cotton stalk) และไม่เติมลงในอาหาร พบว่าในอาหารทั้ง 5 ชนิดที่เติมลำต้นฝ้ายจะให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้เติม จึงเป็นไปได้ว่าลิกนินจากพืชเป็นตัวชักนำในการผลิตเอนไซม์ให้มีค่าแอคติวิตีสูงขึ้นได้แม้ในภาวะการเลี้ยงที่เป็น liquid stage fermentation

Varela และคณะ (2000) กล่าวไว้ว่า องค์ประกอบของ culture medium มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส รวมถึง Machuca และ Ferraz (2001) กล่าวไว้ว่า ในรายงานหลายเรื่องแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ผลิตจากเห็ดราในภาวะ solid substrate fermentation และภาวะที่เป็นอาหารเหลวจะให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ต่างกัน แม้ว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จะมีค่าต่ำ แต่การตกตะกอนโปรตีนเอนไซม์ และการทำไดอะไลซีส สามารถเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ อยู่ที่ระดับ $10^{-2} - 10^{-3}$ U/ml

9. การทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์

เอนไซม์แลคเคส และแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส จาก *G. lucidum* มีความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส โดย และมีค่าความเสถียรของความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 4 – 10 (Ko et al., 2001) D'souza และคณะ (1999) ได้ศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์เมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และการทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น พบว่า เอนไซม์แลคเคสจะมีความเสถียรได้ดีกว่าเอนไซม์แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ซึ่งสอดคล้องกับการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ถึงอย่างไรก็ตาม ชนิด และสภาพของเห็ดราที่แตกต่างกัน ย่อมมีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์

ส่วนเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และลิกนินเพอร์ออกซิเดส จาก *Phanerocheate chrysosporium* ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ เอนไซม์ทั้งสองชนิดสามารถทนต่ออุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสได้ดี (เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี, 2545) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความเสถียรของอุณหภูมิที่ 40 และ 50 องศาเซลเซียส

10. การฟอกเยื่อและทดสอบสมบัติของเยื่อกระดาษ

เยื่อกระดาษยูคาลิปตัส โดยคุณสมบัติของเยื่อแล้ว เป็นเยื่อที่ไม่แข็งแรง เพราะว่ามีเยื่อใยสั้น การขึ้นแผ่น และการทดสอบค่าทางกลศาสตร์ของเยื่อจึงมีค่าไม่สูงเมื่อเทียบกับเยื่อใยยาว และการฟอกเยื่อโดยใช้เอนไซม์ในแต่บางกลุ่มชุดการทดสอบให้ผลที่แตกต่างกันทางสถิติ ได้แก่ ค่าคัปปา และค่าการต้านแรงดึง ถึงแม้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากเห็ดราสกุล Ganoderma จะไม่ใช่เห็ดราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดปริมาณลิกนินในเยื่อกระดาษ แต่เอนไซม์ที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการที่จะลดลิกนินลงมาได้บ้าง ก็ยังเป็นที่น่าสนใจ (D'souza et al., 1999; Ko et al., 2001) ในรายงานของ Bermek และคณะ (2001) พบว่า การใช้เอนไซม์แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ร่วมกับ mediator หลายชนิด ได้แก่ สารกลุ่ม organic acid และ tween 80 ในการฟอกเยื่อกระดาษ ช่วยเพิ่มค่าความสว่าง (brightness) และลดค่าคัปปา (kappa number) ลงได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยใหม่ที่กล่าวว่า เอนไซม์แลคเคส แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส และ ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส ต้องการ mediator และต้องทำงานร่วมกับ lipid peroxidase เพื่อช่วยเอนไซม์ทั้งสามชนิด ในการสลายวงแหวนอะโรมาติค และอะลิฟาติคของลิกนินให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น (Watanabe et al., 2001; Gutierrez et al., 2002) ดังนั้นถ้าการฟอกเยื่อกระดาษโดยเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีค่าแอคติวิตีที่สูง และมีการใช้ mediator และ lipid (tween 80) เข้าร่วมในการฟอกเยื่อกระดาษจะทำให้ได้ค่าความสว่างที่มากขึ้น และค่าคัปปาลดลงมากว่านี้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดรา

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดราที่เจริญอยู่บนต้นไม้ที่มีชีวิตหรือที่ตายแล้วในพื้นที่ 9 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี ขอนแก่น ชลบุรี ตราด นครปฐม นครราชสีมา ลพบุรี และลำพูน พบเห็ดราในวงศ์ Ganodermataceae 2 สกุล ได้แก่ สกุล *Ganoderma* จำนวน 23 ตัวอย่าง และสกุล *Amauroderma* จำนวน 1 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2544 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2546 โดยสภาพแวดล้อมที่พบเห็ดราวงศ์ Ganodermataceae มักชอบอาศัยอยู่ในที่ร่ม ชื้น บนโคนต้นไม้ ตอไม้ ส่วนของลำต้นที่อยู่ไม่สูงจากพื้นดิน และบนดิน เนื่องจากเห็ดราวงศ์นี้ต้องอาศัยสิ่งยึดเกาะจากส่วนต่างๆ ของพืชที่ถูกอาศัย จึงไม่พบเห็ดราในวงศ์นี้ขึ้นอยู่โดยไม่มีวัสดุที่เป็นเนื้อไม้ยึดเกาะ นอกจากนี้ในสภาพแวดล้อมที่ต้นไม้มีแสงแดดส่องถึงโดยตรงตลอดวัน และมีความแห้งแล้งจะไม่พบเห็ดราวงศ์ Ganodermataceae หรือถ้าพบก็จะเป็นสภาพที่เห็ดราแห้งตายและไม่สามารถนำมาแยกเส้นใยได้

2. การแยกเส้นใยบริสุทธิ์และการเก็บรักษา

เห็ดราในวงศ์ Ganodermataceae ที่เก็บมาได้สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ทุกสายพันธุ์ โดยเนื้อเยื่อของเห็ดราจะใช้เวลาประมาณ 2 – 4 วันในการสร้างเส้นใยใหม่ออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อที่วางบนอาหารสูตร PDA อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) อาจมีเส้นใยจากเชื้อราอื่นปนเปื้อนในขั้นตอนการแยกเส้นใยได้ในวันที่ 1 หรือ 2 แต่การตัดชิ้นเนื้อเยื่อของเห็ดราที่เก็บมาให้เป็นชิ้นเล็กๆ ในปริมาณที่มากพอ และกระจายอย่างสม่ำเสมอบนอาหารที่ปราศจากการปนเปื้อนในขั้นตอน inoculation จะช่วยลดการปนเปื้อนลงได้ เมื่อบ่มชิ้นเนื้อเยื่อจนเห็นเส้นใยที่แน่ชัดว่าเป็นเส้นใยจากเนื้อเยื่อเห็ด จึงย้ายเส้นใยลงในหลอดแก้วที่มีอาหารแข็งเอียง สามารถเก็บรักษาเส้นใยได้นานหลายเดือน

3. การเจริญเติบโตของเห็ดราที่คัดแยกในสูตรอาหาร PDA

เส้นใยของเห็ดราวงศ์ Ganodermataceae เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสหรืออุณหภูมิห้อง ในอาหารสูตร PDA แต่การเจริญจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และจะหยุดการเจริญเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เห็ดราวงศ์นี้เจริญในธรรมชาติ

มักชอบขึ้นในที่ชื้น แสงแดดไม่ส่องโดนดอกเห็ดตลอดวัน จึงไม่ชอบสภาวะที่ร้อน และในแต่ละสายพันธุ์ของเห็ดราที่คัดแยกได้ ลักษณะการเป็นโคโลนีของเส้นใยมีความแตกต่างกันได้แก่ ความหนาแน่นของเส้นใย การเจริญของเส้นใยในอัตราเร็วที่ไม่เท่ากัน หรือสภาพของเส้นใยเมื่อบ่มเป็นเวลานาน ในบางสายพันธุ์จะเกิดปุ่มปมสีน้ำตาลเป็นจุดเล็กๆ กระจายบนโคโลนีในจานเพาะเชื้อ เป็นต้น นอกจากนี้ในสภาวะที่บ่มเส้นใยเป็นเวลานานบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารสูตร PDA ไม่สามารถที่จะชักนำเส้นใยของเห็ดราวงศ์ Ganodermataceae สร้างดอก (fruiting body) ได้ ดังนั้นจึงเห็นเส้นใยเป็นสีขาว (secondary stage hypha) ตลอดเวลา ที่แตกต่างกับ tertiary stage hypha ที่พบในดอกเห็ดจะมีสีน้ำตาล

4. การตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

การตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสโดยใช้รีเอเจนท์หยดบนเส้นใยเห็ดราโดยตรง ให้ผลตรวจสอบที่ไม่ต้องใช้เวลานาน โดยเอนไซม์แลคเคสใช้ 0.1 % syringaldazine ทำปฏิกิริยากับเส้นใยภายในเวลา 5 – 10 นาที จะเกิดสีชมพูถึงม่วงแดงบนโคโลนีของเห็ดรากลุ่มไวท์รอท แสดงว่าเห็ดราที่ทดสอบนั้นมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคส ซึ่งเห็ดราจำนวน 24 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ พบ 15 สายพันธุ์ที่เกิดปฏิกิริยาต่อเอนไซม์แลคเคสได้ดี 7 สายพันธุ์ที่เกิดปฏิกิริยาต่อเอนไซม์แลคเคสได้น้อย และ 2 สายพันธุ์ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อเอนไซม์แลคเคส เอนไซม์ไทโรซิเนส เมื่อทดสอบด้วย 0.1 M *p*-cresol ไม่พบการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลบนเส้นใยเห็ดราที่ใช้ในการตรวจสอบ เนื่องจากเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาในขั้นตอน juvenile stage และเอนไซม์นี้จะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเมื่อดอกเห็ดเข้าสู่ mature stage ดังนั้นจึงพบเอนไซม์นี้เมื่อเส้นใยสร้างหรือรวมตัวกันเป็นโครงสร้างดอกเห็ด สำหรับเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส พบว่าเมื่อใช้ 0.03 % hydrogen peroxide หยดบนเส้นใยจะเกิดฟองอากาศเล็กๆ ปรากฏขึ้นบนเส้นใยทั้งหมด 24 สายพันธุ์ โดย 19 สายพันธุ์เกิดปฏิกิริยาต่อเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสได้ดี และ 5 สายพันธุ์เกิดปฏิกิริยาต่อเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสได้น้อย

การทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคสโดยใช้ gallic acid ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ผสมในอาหารสูตร PDA เพื่อหาอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยที่มีค่ามากกว่า 1 และอัตราส่วนที่เกิดขึ้นสามารถนำมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติ

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิกนินในขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส

เห็ดราวงศ์ Ganodermataceae 24 สายพันธุ์ ที่ผ่านการตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยการใช้รีเอเจนท์และการเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยบนอาหารสูตร PDA ที่มี 0.1 % gallic acid พบว่ามี 10 สายพันธุ์ ที่ให้ผลตรวจสอบเด่นชัด จึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิกนินจากขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส พบว่าในระยะเวลา 1 เดือน ประสิทธิภาพของเห็ดราสกุล Ganoderma ในการลดปริมาณลิกนินมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างอยู่ในช่วง 9.88 – 19.49 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้ค่าทางสถิติที่มีความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีเห็ดรา 3 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิกนินลงได้ 16.52 – 19.49 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 และ *G. gibbosum* LP2 โดยการทดสอบนี้ ใช้เชื้อ *Phanerocheate chrysosporium* ร่วมทดสอบในการลดปริมาณลิกนินด้วย และพบว่าให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความต่างที่ 42.17 เปอร์เซ็นต์

6. การเจริญเติบโตของเห็ดราที่คัดแยกในสูตรอาหาร PDB

เมื่อทำการเลี้ยงเส้นใยของเห็ดรา 3 ชนิด ได้แก่ *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 และ *G. gibbosum* LP2 ในอาหารสูตร PDB ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 3.0 4.0 5.0 และ 6.0 อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าการเจริญของเส้นใยเห็ดราทั้ง 3 ชนิด ซึ่งคำนวณเป็นน้ำหนักกรัมแห้งเฉลี่ยจะเติบโตดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และน้ำหนักเส้นใยแห้งเฉลี่ยลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสในทุกค่าของความเป็นกรดด่าง โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *G. lucidum* BK2 (ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0) ให้ค่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยในวันที่ 15 เท่ากับ 0.545 กรัม มีค่า specific growth rate 0.0027 *G. brownii* KH2 (ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0) ให้ค่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยในวันที่ 15 เท่ากับ 0.437 กรัม มีค่า specific growth rate 0.0031 และ *G. gibbosum* LP2 (ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0) ให้ค่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยในวันที่ 15 เท่ากับ 0.462 กรัม มีค่า specific growth rate 0.0025

สำหรับ *P. chrysosporium* ได้ทำการเลี้ยงเส้นใยในอาหารสูตร PDB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 พบว่า ให้ค่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยในวันที่ 8 เท่ากับ 0.602 กรัม specific growth rate 0.0025

7. การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

เห็ดราทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 *G. gibbosum* LP2 และ *P. chrysosporium* ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในอาหารสูตร production ที่มีฟองน้ำขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรเป็นวัสดุยึดเกาะที่อุณหภูมิ30องศาเซลเซียส พบว่าเห็ดราสกุล Ganoderma ผลิตเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสได้ โดยที่ *G. lucidum* BK2 ผลิตเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 ในวันที่ 9 *G. brownii* KH2 ผลิตเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ในวันที่ 6 *G. gibbosum* LP2 ผลิตเอนไซม์แลคเคสและเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.0 ในวันที่ 9 และเชื้อ *P. chrysosporium* ผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0 ในวันที่ 9 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

8. การวิเคราะห์เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตได้เพิ่มค่าหน่วยของเอนไซม์ให้สูงขึ้น โดย *G. lucidum* BK2 ที่ตกตะกอนด้วยความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ ได้เพิ่มค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคส 6.06 เท่า เพิ่มค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส 3.34 เท่า *G. brownii* KH2 ที่ตกตะกอนด้วยความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ ได้เพิ่มค่าหน่วยของเอนไซม์ แลคเคส 9.38 เท่า เพิ่มค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส 10.99 เท่า *G. gibbosum* LP2 ที่ตกตะกอนด้วยความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ได้เพิ่มค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคส 6.68 เท่า เพิ่มค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส 3.68 เท่า และ *P. chrysosporium* ที่ตกตะกอนด้วยความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ ได้เพิ่มค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส 8.82 เท่า เพิ่มค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส 3.02 เท่า

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 40 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเห็ดสกุล Ganoderma 3 ชนิด ได้แก่ *G. lucidum* BK2 *G. brownii* KH2 และ *G. gibbosum* LP2 มีความเสถียรของเอนไซม์ แลคเคส และแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้นานกว่าอุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ในชั่งโมงที่ 2 4 และ 6 สำหรับเชื้อ *P. chrysosporium* มีความเสถียรของเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส และแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้นานกว่าอุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส เช่นกัน แต่ค่า

relative activity ของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2 4 และ6 มีค่าเท่ากับ 50.33 41.93 และ 32.10 ตามลำดับ

9. การฟอกเยื่อและการทดสอบเยื่อกระดาษ

เมื่อทำการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 0.2-0.4 IUต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเยื่อกระดาษ พบว่าค่าการให้น้ำไหลผ่านเยื่อกระดาษ (freeness) มีความแตกต่างกันทางสถิติในชุดควบคุมและชุดที่ฟอกด้วยเอนไซม์ โดยเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยออกซิเจนมีค่า freeness สูงสุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จาก *P. chrysosporium G. brownii* KH2 และ *G. gibbosum* LP2 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อฟอกเยื่อกระดาษโดยเชื้อ *G. lucidum* BK2 ค่าความขาวสว่างเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าชุดการทดสอบที่ฟอกด้วยเอนไซม์จากเห็ดราสกุล *Ganoderma* ทั้ง 3 ชนิด และ เชื้อ *P. chrysosporium* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกชุดการทดลอง ยกเว้นค่าความขาวสว่างที่ฟอกด้วยเอนไซม์จากเชื้อ *P. chrysosporium* และ *G. gibbosum* LP2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่าแรงดันทะลุ (burst index) ค่าการต้านทานแรงดึง (tensile index) และะค่าต้านแรงฉีก (tear index) ของเยื่อกระดาษที่ฟอกด้วยเอนไซม์จากทุกเชื้อ ส่วนใหญ่มีค่าทางสถิติที่ความแตกต่างจากชุดควบคุม และชุดที่ฟอกด้วยออกซิเจน โดยมีแนวโน้มที่ทำให้เยื่อกระดาษมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น และค่าคัปปาที่ลดลงจากทุกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ในการฟอกเยื่อกระดาษ สามารถสรุปได้ว่า *G. brownii* KH2 และ *P. chrysosporium* เป็นเชื้อที่เหมาะสมในการทดลอง

ข้อเสนอแนะ

1. การเก็บตัวอย่างเห็ดราในสภาพธรรมชาติ บางครั้งมักประสบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรีย เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาที่จะเกิดขึ้น ควรเลือกตัวอย่างที่สะอาด ไม่อยู่ในพื้นที่แฉะหรือโดนแมลงกัดกิน เนื่องจากเชื้ออื่นๆ อาจเข้าไปอยู่ในเส้นใยของเห็ดราชนิดนั้น

2. เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจากเห็ดราที่คัดแยกได้ น่าจะมีประสิทธิภาพของเอนไซม์ต่างกัน เนื่องจากเห็ดราที่เก็บได้นั้น บางตัวอย่างไม่ได้นำมาผลิตเอนไซม์ทั้งหมด สายพันธุ์ที่นำมาผลิตเอนไซม์นั้น คัดแยกโดยเกณฑ์การทดสอบ

3. เห็ดราที่คัดแยกทุกสายพันธุ์อยู่ในวงศ์ Ganodermataceae ซึ่งความจริงแล้ว ได้ทำการเก็บเห็ดราในกลุ่ม Polypore ชนิดอื่น แต่ประสบปัญหาการปนเปื้อน และการที่เส้นใยไม่โตในอาหารสังเคราะห์ จึงเป็นไปได้ว่าอาจมีอาหารสังเคราะห์บางชนิดที่เหมาะสมต่อเห็ดราชนิดนั้นๆ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เบญจวรรณ ยันตร์วิเศษภักดี. 2545. การผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากรากลุ่มไวท์รอท บางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. เอ็นไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สาธิต ไทยทัตกุล. 2545. การเพาะเห็ดหลินจือ. กรุงเทพฯ: บริษัท ฟ้าอภัย จำกัด.

สุรพล รักปทุม และชวลิต สันติกิจรุ่งเรือง. 2539. เห็ดหลินจือ. กรุงเทพฯ: บริษัท ที. พี. พริ้นท์ จำกัด.

อนิวรรต เฉลิมพงษ์. 2541. การจัดจำแนกชนิดพันธุ์เห็ดราขนาดใหญ่ในระบบนิเวศป่าไม้. กลุ่มวิจัยโรควิทยาและจุลชีววิทยาป่าไม้ กรมป่าไม้ กรุงเทพมหานคร. 56 หน้า

ภาษาอังกฤษ

Bergbauer, M. 1991. Degradation and oligomerization of syringic acid by distinctive ecological groups of fungi. Microbial Ecology. 21: 73-84.

Bermek, H., Li, K., and Eriksson, K – E. L. 2002. Study on mediators of manganese peroxidase for bleaching of wood pulps. Bioresource Technology. 85: 249-252.

Bollag, J. –M. and Leonowicz, A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. Applied and Environmental Microbiology. 48(4): 849-854.

Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P., and Yaguchi, M. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2´-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft lignin depolymerization. Applied and Environmental Microbiology. 61(5): 1876-1880.

Buchanan, P. K. 2001. A taxonomic overview of the genus *Ganoderma* with special reference to species of medicinal and neutriceutical importnance. Proceeding International Symposium Ganoderma Sci, Auckland, 27-29 April, 2001. pp. 1-8.

Bungay, H. R. 1981. Fractionation and Pretreatment. In Energy, The Biomass Options, pp. 185-201. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Burdsell, Jr. H. H. 1998. Taxonomy of industrially important white-rot fungi. In Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. pp. 259-272. John Wiley & Sons, Inc.

Cai, D. and Tien, M. 1988. Lignin peroxidase; Catalysis, Oxycomplex, and Heme – linked Ionization. In Methods in enzymology, vol. 161, pp. 181-187. California: Academic Press.

Criquet, S., Farnet, A. M., Tagger, S., and Le Petit, J. 2000. Annual variations of phenoloxidase activities in an evergreen oak litter: influence of certain biotic and abiotic factors. Soil Biology & Biochemistry. 32: 1505-1513.

D'Souza, T. M., Merritt, C. S., and Reddy, C. A. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Applied and Envioronmental Microbiology. 65(12): 5307-5313.

Durán, N. and Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Applied Catalysis B: Environmental. 28: 83-99.

Duran, N., Rosa, M. A., D' Annibale, A., and Gianfreda, L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme and Microbial Technology. 31: 907-931.

Edwards, W., Leukes, W. D., Bezuidenhout, J. J. Ultrafiltration of petrochemical industrial wastewater using immobilised manganese peroxidase and laccase: application in the defouling of polysulphone membranes. Desalination. 149: 275-278.

Eggert, C., Temp, U., and Eriksson, K. –E. L. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. Applied and Environmental Microbiology. 62(4): 1151-1158.

Eriksson, K. - E. L., Blanchette, R. A. and Ander, P. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Component. Germany: Springer – Verlag.

Esposito, E., Innocentini-Mei, L. H., Ferraz, A., Canhos, V. P., and Durán, N. 1993. Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (UEC-2050 strain): applications. Journal of Biotechnology. 29: 219-228.

Garzillo, A. M. V., Di Paolo, S., Burla, G., and Buonocore, V. 1992. Differently-induced extracellular phenol oxidases from *Pleurotus ostreatus*. Phytochemistry. 31(11): 3685-3690.

Gold, M. H. and Glenn, J. K. 1988. Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. In Methods in enzymology, vol. 161, pp. 258-264. California: Academic Press.

Griffith, G. W. 1994. Phenoloxidases. In S. D. Martinelli and J. R. Kinghorn (eds.), *Aspergillus nidulans*: 50 years on, pp. 763-788. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

Gutiérrez, A., del Río, J. C., Íñigo, M., Martínez, M. J., and Martínez, Á. T. 2002. Production of new unsaturated lipids during wood decay by ligninolytic basidiomycetes. Applied and Environmental Microbiology. 68(3): 1344-1350.

Hammel, K. E. 2002. Extracellular free radical biochemistry of lignolytic fungi. New Journal Chemistry. 20: 195-196.

Harkin, J. M. and Obst, J. R. 1973. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. Experimentia. 29(4): 381-387.

Have, R. T. and Franssen, M. C. R. 2001. On a revised mechanism of side product formation in the lignin peroxidase catalyzed oxidation of veratryl alcohol. FEBS Letters. 487: 313-317.

Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and Microbial Technology. 30: 454-466.

Hoshino, F., Kajino, T., Sugiyama, H., Asami, O., and Takahashi, H. 2002. Thermally stable and hydrogen peroxide tolerant manganese peroxidase (MnP) from *Lenzites betulinus*. FEBS Letters. 530: 249-252.

Hou, C. T. and Forman III, R. J. 2000. Growth inhibition of plant pathogenic fungi by hydroxy fatty acids. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 24: 275-276.

Ingebrigtsen, J., Kang, B., and Flurkey, W. H. 1989. Tyrosinase activity and isoenzymes in developing mushrooms. Journal of Food Science. 54(1): 128-131.

Johannes, C. and Majcherczyk, A. 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. Journal of Biotechnology. 78: 193-199.

Kahraman, S. S. and Gurdal, I. H. 2002. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. Bioresource Technology. 82: 215-217.

Katagiri, N., Tsutsumi, Y., and Nishida, T. 1995. Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white rot fungi in the solid-state fermentation system. Applied and Environmental Microbiology. 61(2): 617-622.

Kennes, C. and Lema, J. M. 1994. Simultaneous biodegradation of *p*-cresol and phenol by the basidiomycete *Phenerochaete chrysosporium*. Journal of Industrial Microbiology. 13: 311-314.

Kirk, T. K. and Farrell. R. L. 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. Annual Review of Microbiology. 41: 465-505.

Kitamoto, Y., Matsui, T., Ohga, S., and Mori, N. 2000. Activation of intracellular and extracellular phenol oxidases in photoinduced fruit – body formation of Favolus arcularius. Mycoscience. 41: 641-644.

Ko, E. –M., Leem, Y. –E., and Choi, H. T. 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 57: 98-102.

Lara, M. A., Rodriguez-Malaver, A. J., Rojas, O. J., Holmquist, O., Gonzalez, A. M., Bullon, J., Penaloza, N., and Araujo, E. 2003. Black liquor lignin biodegradation by *Trametes elegans*. International Biodeterioration & Biodegradation. 52: 167-173.

Lee, S. E., Kim, M. K., Lee, S. G., Ahn, Y. J., and Lee, H. S. 2000. Inhibitory effects of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials on mushroom tyrosinase. Food Science and Biotechnology. 9(5): 330-333.

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J, Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N., Hofrichter, M., and Rogalski, J. 1999. Biodegradation of Lignin by white rot fungi. Fungal Genetics and Biology. 27: 175-185.

Liang, Z. –C., Hseu, R. –S., and Wang, H. –H. 1995. Partial purification and characterization of a 1,3-β-D-glucanase from *Ganoderma tsugae*. Journal of Industrial Microbiology. 14: 5-9.

Machuca, A., Aoyama, H., and Durán, N. 1999. Isolation and partial characterization of an extracellular low-molecular mass component with high phenoloxidase activity from *Thermoascus aurantiacus*. Biochemical Biophysical Research Communications. 256: 20-26.

Marr, C. D. 1986. The taxonomic potential of laccase and tyrosinase spot tests. Mycologia. 78(2): 169-184.

Miura, M., Deguchi, T., Yanagi, C., Suzuki, J., Kitaoka, Y., and Kakezawa, M. 1997. The indicative culture parameters of manganese peroxidase production by white rot fungus IZU-154. Journal of Fermentation and Bioengineering. 84(5): 414.420.

Nishida, T., Kashino, Y., Nakayama, T., Mimura, A., and Takahara, Y. 1989. Lignin biodegradation by wood-rotting fungi. R&D Kobe Steel Engineering Report. 39 (4): 97-100

Oda, Y., Adachi, K., Aita, I., Ito, M., Aso, Y., and Igarashi, H. 1991. Purification and properties of laccase excreted by *Pycnoporus coccineus*. Agricultural of Biology and Chemistry. 55(5): 1393-1395.

Ohkuma, M., Maeda, Y., and Kudo, T. 2001. Lignin degradation and roles of white rot fungi: Study on an efficient symbiotic system in fungus – growing termites and its application to bioremediation. Riken Review. 42: 39-42.

Orth, A. B., Denny, M., and Tien, M. 1991. Overproduction of lignin-degrading enzymes by an isolate of *phanerochaete chrysosporium*. Applied Environmental Microbiology. 57(9): 2591-2596.

Paszcynski, A., Crawford, R. L., and Huynh, V. 1988. Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification. In Methods in enzymology, vol. 161, pp. 264-270. California: Academic Press.

Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology. 57: 20-33.

Presnell, T. L., Kersten, P. J., Joyce, T. W., and Chang, H. M. 1995. Oxidation of isolated lignins by lignin peroxidase. Proceedings of the 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry. 2: 71-76. Helsinki, Findland.

Rahouti, M., Benoit-Guyod, J. –L., Seigle-Murandi, F., and Guiraud, P. 1995. Sensitivity and specificity of phenoloxidase reactions of 1059 strains and species of Micromycetes cultivated on malt/agar medium. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 11: 497-501.

Reid, I. D. 1995. Biodegradation of lignin. Canadian Journal of Botany. 73 (Supplement 1): S1011-S1018.

Rodriguez, S., Longo, M. A., Cameselle, C., and Sanromán. 1999. Production of manganese peroxidase and laccase in laboratory-scale bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. Bioprocess Engineering. 20: 531-535.

Saha, B. C., and Bothast, R. J. 1997. Enzyme in lignocellulosic biomass conversion. In B. C. Saha, and J. Woodward (ed.), Fuel and Chemicals from Biomass, ACS Symposium Series 666, pp. 46-56. Washington, DC: American Chemical Society.

Schultz, A., Jonas, U., Hammer, E., and Schauer, F. 2001. Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase. Applied and Environmental Microbiology. 67(9): 4377-4381.

Score, A. J., Palfreyman, J. W., and White, N. A. 1997. Extracellular phenoloxidase and perxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. International Biodeterioration & Biodegradation. 39(2-3): 225-233.

Seo, G. S., Otani, H., and Kohmoto, K. 1995. Effect of light on the formation of atypical fruiting structures in *Ganoderma lucidum*. Mycoscience. 36: 227-233.

Sugumaran, M., Nellaiappan, K., and Valivittan, K. 2000. A new mechanism for the control of phenoloxidase activity: Inhibition and complex formation with quinone isomerase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 379(2): 252-260.

Sutherland, J. B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. Journal of Industrial Microbiology. 9: 56-62.

Tagger, S., Périssol, C., Gil, G., Vogt, G., and Le Petit, J. 1998. Phenoloxidases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). Enzyme and Microbial Technology. 23: 372-379.

Tham, L. X., Matsuhashi, S., and Kume, T. 1999. Growth and fruitbody formation of *Ganoderma lucidum* on media supplemented with vanadium, selenium and germanium. Mycoscience. 40: 87-92.

Tham, L. X., Matsuhashi, S., and Kume, T. 1999. Responses of Ganoderma lucidum to heavy metals. Mycoscience. 40: 209-213.

Tien, M. and Kirk, T. K. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In Methods in enzymology, vol. 161, pp. 238-249. California: Academic Press.

Varela, E., Martínez, A. T., and Martínez, M. J. 2000. Southern blot screening for lignin peroxidase and aryl-alcohol oxidase genes in 30 fungal species. Journal of Biotechnology. 83: 245-251.

Waldner, R., Leisola, M. S. A., and Fiechter. 1988. Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology. 29: 400-407.

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 Biochemistry. 268: 6114 – 6122.

Yee, D. C., Jahng, D., and Wood, T. K. 1996. Enhanced expression and hydrogen peroxide dependence of lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A. Biotechnology Progress. 12: 40-46.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้น	16	กรัม
น้ำกลั่น		

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร ต้มกับน้ำกลั่น เมื่อสุกแล้วกรองเอาแต่น้ำ จากนั้นเติมน้ำตาลกลูโคสแล้วปรับปริมาตรให้ใกล้ 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 5.5 เติมวุ้นแล้วต้มจนวุ้นละลายหมด สุดท้ายปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสูตร PDA แต่ไม่ใส่วุ้น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. Production medium

Glucose	25	กรัม
Asparagine	1	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
Fumaric acid	1.32	กรัม
Na_2CO_3	1.12	กรัม
$Fe_2(S0)_4$	0.2	มก.
$ZnS0_4$	0.2	มก.

$MnS0_4$	0.2	มก.
Guaiacol	4	µM

น้ำกลั่น

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ใกล้เคียง 1 ลิตร จากนั้นปรับ pH ตามต้องการที่จะทดลอง แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave

4. รีเอเจนท์สำหรับตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

เอนไซม์แลคเคส

0.1 % (W/V) syringadazine ใน 95 % เอทานอล

เอนไซม์ไทโรซิเนส

0.1 M para-cresol ใน 95 % เอทานอล

เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

0.03 % hydrogen peroxide

หมายเหตุ 95 % เอทานอลเป็นรีเอเจนท์ควบคุม

5. การเตรียมชุดทดสอบการย่อยสลายลิกนิน

5.1 บดขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัสให้มีขนาด 75-500 ไมครอน โดยการร่อนผ่านตระแกรง

5.2 นำขี้เลื่อยมาชั่งน้ำหนัก 1.000 – 1.0020 กรัม เทใส่ในหลอดแก้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร

5.3 เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ปิดฝาเกลียว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนต่อตารางนิ้ว 15 นาที

5.4 เจาะเส้นใยราด้วย cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ใส่ลงในหลอดขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 3 ชิ้น ทุกการทดลองทำ 4 ซ้ำ

5.5 บ่มเส้นใยในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส 1 เดือน

5.6 วิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลที่ลดลงและถูกใช้ไป

6. การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

6.1 สารละลาย Neutral Detergent

1.1 ชั่ง Disodium ethylene diamine tetraacetate (EDTA) 16.18 กรัม และ Sodium borate decahydrate ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) 6.81 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ นำไปต้มจนละลายหมด

1.2 ละลาย Sodium lauryl sulphate 30กรัม ในน้ำ แล้วเติม 2 -Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoethyl ether) 10 มิลลิลิตร

1.3 นำสารละลายในข้อ 1.1 มาผสมกับสารละลายในข้อ 1.2

1.4 ชั่ง Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) 4.56 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ แล้วนำไปต้มจนละลายหมด นำไปผสมกับสารละลายผสมที่ได้ในข้อ 1.3 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.9-7.1

6.2 สารละลาย Acid Detergent

ละลาย Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) 20 กรัม ในกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 N แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดนี้ให้ได้ 1 ลิตร

6.3 สารละลาย Saturated potassium permanganate

ละลาย Potassium permanganate ($KmnO_4$) 50 กรัม และ Silver sulphate (Ag_2SO_4) 0.05 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ในขวดแก้วสีชา อย่าให้โดนแสงแดด

6.4 สารละลาย Lignin buffer

ละลาย Ferric nitrate nanohydrate [$Fe(NO_3)_3.9H_2O$] 6 กรัม และ Silver nitrate ($AgNO_3$) 0.15 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม Acetic acid glacial 500 มิลลิลิตร เติม Potassium acetate 5 กรัม และเติม Tertiary butyl alcohol 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6.5 สารละลาย Combined permanganate

ผสมสารละลาย Saturated potassium permanganate กับ สารละลาย Lignin buffer ในอัตราส่วน 2:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บสารละลายผสมนี้ในขวดสีชา แช่ในตู้เย็นไม่ให้ถูกแสงแดด ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงแล้วจะไม่สามารถนำมาใช้ได้อีก

6.6 สารละลาย Demineralizing

ละลาย Oxalic acid dihydrate 50 กรัม ใน ปริมาตร 700 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และ Hydrochloric acid (HCl) 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6.7 สารละลาย 80% ethanol

ผสม 95% Ethanol 843 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 157 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

ภาคผนวก ข
การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) (วิธีดัดแปลง Tein and Kirk, 1988)

ค่าหน่วยของ MnP ที่แท้จริง = ค่าหน่วยของเอนไซม์ MnP – ค่าหน่วยของเอนไซม์ Lac + ค่าหน่วยของเอนไซม์ MiP

1. เตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

4 mM 2,6 Dimethoxyphenol	50	ไมโครลิตร
0.1 M Sodium Tartrate pH 5	650	ไมโครลิตร
5 mM $MnSO_4$	100	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 เป็นลำดับสุดท้าย
3. นำสารละลายในข้อ 2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer แบบ kinetic ที่ initial rate ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เวลาทำปฏิกิริยา 1 นาที โดยมี blank เป็นสารละลายผสมเช่นเดียวกับในข้อ 1 แต่ไม่ใส่เอนไซม์

<u>การคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP)</u>

จาก Law of Beer & Lambert

$A = \varepsilon bc$

เมื่อ A = Absorbance change (ค่าเปลี่ยนแปลง) T_0, T_1 (ค่าการดูดกลืนแสง)

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

b = cell length (cm) ความกว้างของ cevett

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 49600 $M^1\ cm^{-1}$

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

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

= 0.01 A μmol/min/ml

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

ถ้าใช้เอนไซม์ปริมาตร 1 ml จะได้ C = 0.2 A U/ml

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ Manganese independent peroxidase (MiP)

1. เตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

4 mM 2,6 Dimethoxyphenol	50	ไมโครลิตร
0.2 M Sodium Tartrate pH 5	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 เป็นลำดับสุดท้าย
3. นำสารละลายในข้อ 2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer แบบ kinetic ที่ initial rate ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เวลาทำปฏิกิริยา 1 นาที โดยมี blank เป็นสารละลายผสมเช่นเดียวกับในข้อ 1 แต่ไม่ใส่เอนไซม์

<u>การคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ Manganese independent peroxidase (MiP)</u>

ใช้หลักการเดียวกันกับการคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคส (Lac)

1. เตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

4 mM 2,6 Dimethoxyphenol	50	ไมโครลิตร
0.1 M Sodium Tartrate pH 5	850	ไมโครลิตร
Crude enzyme	100	ไมโครลิตร

2. นำ reaction mixture ในข้อ 1 มาผสมกันในคิวเวต โดยเติม 1 mM H_2O_2 เป็นลำดับสุดท้าย
3. นำสารละลายในข้อ 2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer แบบ kinetic ที่ initial rate ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เวลาทำปฏิกิริยา 1 นาที โดยมี blank เป็นสารละลายผสมเช่นเดียวกับในข้อ 1 แต่ไม่ใส่เอนไซม์

<u>การคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคส</u>

ใช้หลักการเดียวกันกับการคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (LiP) (วิธีดัดแปลง Tein and Kirk, 1988)

1. เตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

20 mM veratryl alcohol	ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
0.1 M sodium tartrate buffer pH3	ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร
2.5 mM H_2O_2	ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
crude enzyme	ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

2. นำ reaction mixture ในข้อ 1 มาผสมกันในคิวเวต โดยเติม 2.5 mM H_2O_2 เป็นลำดับสุดท้าย
3. นำสารละลายในข้อ 2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer แบบ kinetic ที่ initial rate ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร เวลาทำปฏิกิริยา 1 นาที โดยมี blank เป็นสารละลายผสมเช่นเดียวกับในข้อ 1 แต่ไม่ใส่เอนไซม์

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ Veratryl Alcohol Oxidase (VAO)

1. เตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

20 mM veratryl alcohol	ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
0.1 M sodium tartrate buffer pH3	ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร
crude enzyme	ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer แบบ kinetic ที่ initial rate ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร เวลาทำปฏิกิริยา 1 นาที โดยมี blank เป็นสารละลายผสมเช่นเดียวกับในข้อ 1 แต่ไม่ใส่เอนไซม์

การคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสที่แท้จริง

LiP ที่แท้จริง = ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP – ค่าหน่วยของเอนไซม์ VAO

การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret Method (Bradford, 1976)

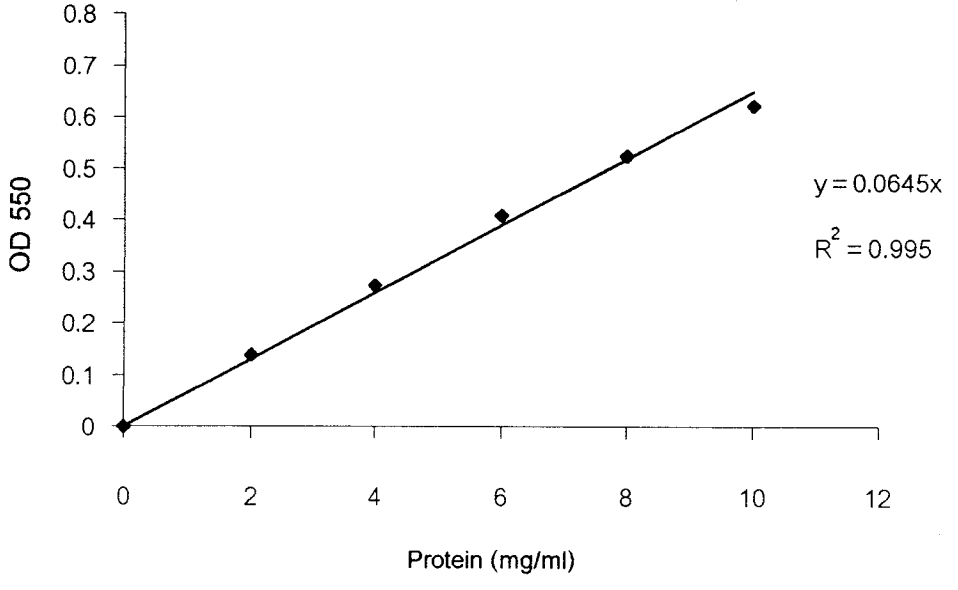
1. สารละลาย Biuret reagent

   การเตรียมสารละลาย Biuret reagent ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ให้ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 0.75 กรัม และ Rochelle salt (Potassium sodium tartrate) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10% ปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัมในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. นำโปรตีนตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Biuret reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex บ่มที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไป 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐานเพื่อคำนวณค่าปริมาณโปรตีน

หมายเหตุ blank ใช้น้ำกลั่นแทนโปรตีนตัวอย่าง



ภาพที่ 43 กราฟมาตรฐานโปรตีน เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Biuret method

ภาคผนวก ค
การทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของเยื่อกระดาษ

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

การทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อกระดาษทำให้ทราบความสามารถในการอุ้มน้ำของเยื่อกระดาษ ซึ่งใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของเยื่อกระดาษ มีขั้นตอนการทดสอบ ดังนี้

1. ทำการ calibrate เครื่อง โดยใช้น้ำกลั่นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 1 ลิตร เทลงไปในเครื่องทดสอบวัดการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ โดยปริมาตรน้ำที่ไหลออกมาต้องอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือ ระหว่าง 880-890 มิลลิลิตร ทำ 3 ครั้ง ถ้าค่าที่ได้ไม่ได้อยู่ระหว่าง 880-890 มิลลิลิตร ให้นำตะแกรงไปล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง แล้วทำการ calibrate ใหม่

2. นำเยื่อกระดาษ 30 กรัมแห้ง แช่น้ำกลั่นไว้อย่างน้อย 4 ชั่วโมง และบีบให้หมาด มากระจายที่ 2000 รอบสเกล (1 รอบสเกล เท่ากับ 25 รอบต่อวินาที) สำหรับเยื่อใยสั้น ในน้ำกลั่น 2 ลิตร ปรับปริมาตรน้ำเยื่อกระดาษเป็น 10 ลิตร อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (ค่า consistency 0.3 %) คนน้ำเยื่อให้กระจายทั่ว ตวงมา 1 ลิตร เทใส่ลงในเครื่องทดสอบวัดการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ ทำ 2 ครั้ง ค่าที่ได้ 2 ครั้ง ต้องไม่ต่างกันเกิน 10 มิลลิลิตร

3. นำเยื่อกระดาษที่ได้แต่ละครั้ง ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นำมาชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้ง แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่าการให้น้ำไหลผ่านเยื่อที่แท้จริง

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

แผ่นทดสอบมาตรฐานที่นำมาใช้ทดสอบสมบัติต่างๆ จะมีปริมาณเยื่อกระดาษ 60 กรัมต่อตารางเมตร มีขั้นตอนการในการเตรียม ดังนี้

1. นำน้ำเยื่อกระดาษปริมาตร 8 ลิตร ที่เหลือจากการทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อมาปรับปริมาตรเป็น 16 ลิตร คือ ให้มีความข้นเยื่อเป็น 0.15% consistency

2. นำเยื่อมาขึ้นแผ่นขนาด 200 ตารางเซนติเมตร ดังนั้นการขึ้นแผ่นครั้งแรกให้ตวงมา 800 มิลลิลิตร เทลงในเครื่องขึ้นแผ่น ปล่อยน้ำออกให้เยื่อกระจายเป็นแผ่น นำกระดาษ สีขาว (test sheet) ที่ได้มากด (press) ตามลำดับ ดังนี้

- แผ่น plate สแตนเลส
- กระดาษซับ 3 แผ่น
- แผ่นเยื่อกระดาษที่ขึ้นแล้ว (hand sheet)

- กระดาษซับ 2 แผ่น
- แผ่น plate สแตนเลส

3. นำไปรีดด้วยเตารีดให้แผ่นทดสอบแห้ง นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักที่ได้จริง ควรอยู่ประมาณ 1.2 กรัม นำน้ำหนักมาคำนวณกลับว่าจะต้องตวงน้ำเยื่อมาขึ้นแผ่นทดสอบมาตรฐานปริมาตรเท่าไร และระหว่างการขึ้นแผ่นให้ทำการจับเวลาการระบายน้ำด้วย (drainage time) โดยเวลามาตรฐานไม่ควรเกิน 4.5 วินาที

4. ขึ้นแผ่นทดสอบแผ่นต่อไป นำมาวางกดซ้อนทับเหมือนในข้อ 2 ทำการดูดซับน้ำออกโดยใช้กระดาษซับและใช้แรงกด 3.25 – 3.45 kPa เป็นเวลา 5 นาที และ 2 นาที 30 วินาที จากนั้นนำแผ่นทดสอบมาขึงกับตะแกรงวง (ring) ซ้อนทับกันแล้วใช้ตุ้มน้ำหนักกดทับไว้ ผึ่งแผ่นทดสอบให้แห้ง แล้วจึงนำไปใช้ต่อไป

การวัดค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษ (Brightness) (TAPPI T452 om-92) (TAPPI, 1995)

ความขาวสว่างของเยื่อกระดาษ (pulp brightness) หมายถึง ค่าแฟกเตอร์ของการสะท้อนแสงของแผ่นเยื่อกระดาษซึ่งวัดที่ช่วงความยาวคลื่นแสง 457 นาโนเมตร (R_{457}) เปรียบเทียบกับ MgO หรือ perfect reflecting diffuser โดยถือว่า MgO หรือ perfect reflecting diffuser มีค่าแฟกเตอร์ของการสะท้อนแสงเป็น 100 ค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษมีหน่วยเป็น %

<u>วิธีวัดค่าความขาวสว่าง</u>

เมื่อแผ่นทดสอบแห้งแล้วให้นำมาวัดค่าความขาวสว่างก่อน (ไม่เกิน 24 ชั่วโมงนับจากเวลาที่เริ่มในการทำแผ่นทดสอบ) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

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

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

ความต้านทานการฉีกขาดของกระดาษได้จากการวัดแรงดึงที่กระทำในระนาบเดียวกับกระดาษ ก่อนเริ่มการวัดจะต้องอัดแผ่นกระดาษทั้ง 10 แผ่น แยกไว้เป็นส่วนๆ เพื่อทดสอบสมบัติอื่น ขั้นตอนการทำมีดังนี้

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

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

เป็นค่าที่บ่งบอกการยึดเหนี่ยวระหว่างเส้นใยและการยืดตัวของกระดาษ นำแผ่นกระดาษมาทดสอบทีละแผ่นโดยวางให้ตรงกับปุ่ม เมื่อกดปุ่มกระดาษจะทะลุเป็นวงรอบ บันทึกค่าเพื่อนำไปคำนวณค่า burst index

การทดสอบความต้านทานแรงดึง (Tensile strengh T404 cm-92) (TAPPI, 1995)

ความต้านทานแรงดึงเป็นค่าความยาวของกระดาษที่มากพอจนทำให้กระดาษขาดโดยน้ำหนักของกระดาษเองเมื่อถูกแขวนในแนวดิ่ง ระยะทดสอบ 10 เซนติเมตร ช่วงกระดาษขาดอยู่ภายใน 10-20 นาที บันทึกค่าเพื่อนำไปคำนวณค่า tensile index

การวัดค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อกระดาษ

ค่าคัปปานัมเบอร์ คือ จำนวนมิลลิลิตรของโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต ความเข้มข้น 0.1 N ที่ใช้ไปต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัมแห้ง ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด โดยผลลัพธ์ที่ได้จะถูกแปลงให้สมดุลย์กับปริมาณ 50% ของ 0.1 N โปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ใช้ไปในการทดลอง

1. <u>การเตรียม 0.2 N $Na_2S_2O_3$</u>

ชั่ง $Na_2S_2O_3.5H_20$ ปริมาณ 50 กรัม ละลายน้ำกลั่น เติม Na_2CO_3 0.2 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วนำมา standardize ด้วย $K_2Cr_2O_7$

การ Standardization 0.2 N $Na_2S_2O_3$ ด้วย $K_2Cr_2O_7$

การเตรียม $K_2Cr_2O_7$

1.1 อบ $K_2Cr_2O_7$ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำมาทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งมา 0.4 $\pm$ 0.01 กรัม จดน้ำหนักไว้สำหรับคำนวณ ใส่ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร เติม KI 6 กรัม

1.2 เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร และ $HCl_{(conc)}$ 10 มิลลิลิตรในตู้ดูดอากาศ

1.3 เขย่าให้เข้ากัน ปิดจุกฟลาส์ก แล้วเก็บในที่มืด 10 นาที

1.4 ไตเตรตกับ 0.2 N $Na_2S_2O_3$ จนสีของสารละลายจางลงเล็กน้อย (อย่าไตเตรตจนสารละลายในฟลาส์กกลายเป็นสีเขียวก่อนที่จะเติมน้ำแป้ง) เติมน้ำแป้งสุกแล้วไตเตรตต่อจนได้สารสีน้ำเงินหรือเขียวซึ่งเป็น end point

การคำนวณความเข้มข้นของ $Na_2S_2O_3$ (นอร์มอล)

$$\text{ความเข้มข้นของ } Na_2S_2O_3 \text{ (นอร์มอล)} = \frac{\text{(g) } K_2Cr_2O_7}{\text{(ml) } Na_2S_2O_3 \times 0.0493}$$

2. <u>การเตรียม 0.1 N $KMnO_4$</u>

ชั่ง $KMnO_4$ 3.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรในบีกเกอร์แก้ว 2 ลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา นำไปต้มให้เดือด 1 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 1 คืน กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์1 เก็บในขวดสีชา

การ Standardize 0.1 N $KMnO_4$ ด้วย $Na_2C_2O_4$

การเตรียม $Na_2C_2O_4$

1) อบ $Na_2C_2O_4$ ที่อุณหภูมิ 105 – 110 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นใน desiccator
2) ชั่ง $Na_2C_2O_4$ 0.3 $\pm$ 0.01กรัม (จดน้ำหนักเพื่อนำมาคำนวณ) ใส่ใน ฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร
3) เติม 5% H_2SO_4 (v/v) 250 มิลลิลิตร เขย่าให้ $Na_2C_2O_4$ ละลาย
4) นำฟลาส์กไปตั้งบน hot plate ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส แล้วนำมาไตเตรตกับ $KMnO_4$ จนได้สารละลายสีชมพูอ่อนที่ไม่จางหายไปแสดงว่าถึงจุด end point

การคำนวณความเข้มข้นของ $KMnO_4$

$$\text{ความเข้มข้นของ } KMnO_4 \text{ (นอร์มอล)} = \frac{\text{(g) } Na_2C_2O_4}{\text{(ml) } KMnO_4 \times 0.067}$$

ปรับความเข้มข้นของ $Na_2S_2O_3$ และ $KMnO_4$ โดยการเติมสารหรือเติมน้ำด้วย
สมการ $N_1V_1 = N_2V_2$

<u>วิธีวัดค่าคัปปานัมเบอร์</u>

1. จากสูตร $k = \frac{Pf}{w}$ ให้สมมติค่า p = 50 f = 1 k = ค่าคัปปานัมเบอร์ที่คาดไว้

2. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นของเยื่อกระดาษ โดยที่ w เป็นน้ำหนักเยื่อที่ชั่งเมื่อคิดเป็นน้ำหนักเยื่อแห้งที่ความชื้น 0 % (g/OD)

3. ชั่งเยื่อกระดาษ บันทึกน้ำหนักที่ใกล้เคียงกับน้ำหนักเยื่อสมมติ (g/AD) นำเยื่อมากระจายในน้ำกลั่นด้วยเครื่องปั่นธรรมดาจนกระทั่งเยื่อกระจายตัวดี

4. ใส่เยื่อกระดาษตัวอย่างลงในกระบอกตวง 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นที่ปรับอุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส ให้ได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร เทลงในบีกเกอร์และวางบน magnetic stirrer ที่มีแท่งแม่เหล็กกวน ควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 25 $\pm$ 0.2 องศาเซลเซียส

5. ปิเปต 0.1 N $KMnO_4$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ 4 N H_2SO_4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เทลงในบีกเกอร์พร้อมกัน ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานาน 10 นาที

6. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 16.6% KI ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

7. ไตเตรทด้วย 0.2 N $Na_2S_2O_3$ ประมาณ 10 มิลลิลิตร จะเกิดสารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีน้ำเงินเข้มหรือสีดำ ไตเตรทต่อไปจนสีน้ำเงินจางหายไปจนไม่มีสี บันทึกปริมาตรของ 0.2 N $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไป

8. นำปริมาตรของ 0.2 N $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไป มาคำนวณกลับเพื่อหาค่า P

จากสูตร $P = \frac{(b-a)\,N}{0.1}$

โดยที่ b = ปริมาณของ 0.2 N $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไปในการทำ blank test

a = ปริมาณของ 0.2 N $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไปในการหาคัปปาตัวอย่างเยื่อ

N = จำนวนนอร์มัลของ $Na_2S_2O_3$

เมื่อได้ค่า P แล้วจึงนำไปคำนวณเพื่อหาค่า k ที่ใกล้เคียงต่อไป

9. การทำ blank test

9.1 เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ลงในบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตร

9.2 เติม 0.1 N $KMnO_4$ และ 4 N H_2SO_4 ปริมาตรอย่างละ 100 มิลลิลิตร พร้อมกัน

9.3 เติม 16.6% KI ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

9.4 ไตเตรทด้วย 0.2 N $Na_2S_2O_3$ จะเกิดสารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีน้ำเงิน ไตเตรทต่อไปจนสีน้ำเงินจางหายไปจนไม่มีสี บันทึกปริมาตรของ 0.2 N $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไป โดยควรอยู่ในช่วง 47 – 48 มิลลิลิตร

<u>การแก้ไขค่า f เพื่อหาค่าคัปปานัมเบอร์ที่แท้จริง</u>

จากสูตร kappa number $= \frac{Pf}{W[1+0.013(25-t)]}$

โดยที่

P = ปริมาณของ 0.1 N $KMnO_4$ ที่ถูกใช้ไปในตัวอย่าง (สมมติเป็น 50)

f = ค่า factor สำหรับแปลงผลลัพธ์ให้สมดุลย์กับปริมาณ 50% ของ 0.1 N $KMnO_4$ ที่เติมลงไปในการทดลอง

t = อุณหภูมิระหว่างทำการทดลอง (องศาเซลเซียส)

ตารางที่ ค่า factor สำหรับแปลงผลลัพธ์ของค่าคัปปานัมเบอร์

f	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
30	0.958	0.960	0.962	0.964	0.966	0.968	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									

ภาคผนวก ง
การหาปริมาณองค์ประกอบชีวมวลในพืช

1. การวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช (Goering and Van Soest, 1970)

1.1 การสกัดด้วยสารละลาย Neutral detergent

(1) นำ Sintered glass crucible เบอร์ 1 ขนาด 50 มิลลิลิตร ไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ใน desiccator ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

(2) ชั่งตัวอย่างที่แห้งและบดละเอียดขนาด 20-30 mesh หรือ 1 มิลลิเมตร ประมาณ 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร

(3) เติมสารละลาย Neutral detergent 100 มิลลิลิตร Sodium sulfite 0.5 กรัม และ Decahydronaphthalene 2มิลลิลิตร นำไป reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

(4) ถ่ายส่วนผสมที่ reflux เสร็จแล้วลงใน Sintered glass crucible ที่วางอยู่บนชุดกรอง ล้างตัวอย่างใน crucible ด้วยน้ำร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย Acetone 2 ครั้ง ดูดสารละลายออกด้วยเครื่อง vacuum pump จนแห้ง จากนั้นนำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

(5) นำ crucible ออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือปริมาณ Neutral detergent fiber (NDF)

วิธีคำนวณ

$$\%NDF = \frac{[(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก NDF}) - \text{น้ำหนัก crucible}] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

1.2 การสกัดด้วยสารละลาย Acid detergent

(1) นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วย Neutral detergent มาถ่ายใส่ในบีกเกอร์เพื่อทำการ Reflux ด้วย Acid detergent โดยเติม Acid detergent 100 มิลลิลิตร และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

(2) กรองตัวอย่างพืชใน crucible ใบเดิม เพื่อลดการสูญเสียตัวอย่างให้น้อยที่สุด แล้วล้างด้วยน้ำร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย 80% Ethanol 2 ครั้ง

(3) นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้คือ น้ำหนักของ Acid detergent fiber (ADF) น้ำหนักที่แตกต่างระหว่าง NDF และ ADF คือ น้ำหนักของเฮมิเซลลูโลส

วิธีคำนวณ

$$\%ADF = \frac{[(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก ADF}) - \text{น้ำหนัก crucible}] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

$$\%\ \text{Hemicellulose} = \%NDF - \%ADF$$

1.3 การวิเคราะห์หา Permanganate lignin (PML)

(1) เติมสารละลาย Combined permanganate 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible ที่มีตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดด้วย Acid detergent แล้ว แช่ crucible ลงในถาดที่มีน้ำเย็นสูงประมาณ 2 เซนติเมตร คนด้วยแท่งแก้วเพื่อไม่ให้ตัวอย่างจับเป็นก้อน ทิ้งไว้ 45 นาที โดยคนเป็นบางครั้ง จากนั้นดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้ vacuum pump

(2) เติมสารละลาย Combined permanganate 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible อีกครั้ง ทิ้งไว้อีก 45 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้ vacuum pump

(3) เติมสารละลาย Demineralizing ลงใน crucible แต่ละถ้วย แช่ไว้ 5 นาที แล้วดูดสารละลายออกโดยใช้ vacuum pumpทำซ้ำจนตัวอย่างพืชเป็นสีขาวภายในเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วย 80% Ethanol และ acetone แล้วดูดให้แห้งโดยใช้ vacuum pump

(4) นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง Acid detergent fiber (ADF) และน้ำหนักตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก คือ น้ำหนักของลิกนิน

วิธีคำนวณ

$$\%\text{Lignin} = \frac{(A - B) \times 100}{C}$$

โดยที่ A = น้ำหนัก crucible + น้ำหนัก ADF

B = น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก

C = น้ำหนักตัวอย่างพืช

1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสด้วยการเผาเถ้า

นำ crucible ที่มีตัวอย่างพืชซึ่งผ่านการสกัดลิกนินออกแล้วในข้อ 1.3 ไปเผาในเครื่องเผาเถ้า ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง น้ำหนักตัวอย่างพืชหลังการสกัดลิกนินออก และน้ำหนักหลังการเผาเถ้า คือ น้ำหนักเซลลูโลส ส่วนน้ำหนักเถ้าก็คือ ผลต่างระหว่างน้ำหนักหลังการเผาเถ้าและน้ำหนัก crucible

วิธีคำนวณ

$$\%\text{ Cellulose} = \frac{(B - D) \times 100}{C}$$

2. **การหาค่า maximum specific growth rate สำหรับเชื้อราที่เจริญเป็น pellet**

จากกราฟแสดงการเจริญเติบโตเทียบกับเวลา สามารถหาค่าคงที่ k ได้จากสมการ

$$M^{1/3} = M_0^{1/3} + kt \quad \text{.....(1)}$$

โดยที่ M = น้ำหนักแห้งของเส้นใยที่เวลา t (เวลาที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดในช่วง log phase)

M_0 = น้ำหนักแห้งของเส้นใยที่เวลาเริ่มต้นบ่มเชื้อ

เมื่อทราบค่าคงที่ k แล้ว คำนวณหาค่า w (ความกว้างของชั้นนอกของ pellet ที่เป็นชั้นของ active hyphae) จากสมการ

$$M = M_0 + (4/3\ \pi pn)^{1/3} w\mu t \quad \text{.....(2)}$$

โดยที่ p = ค่าคงที่ของความหนาแน่นของ pellet

n = จำนวน pellet

μ = specific growth rate

แทนค่าคงที่ k = $(4/3\ \pi pn)^{1/3}\ \mu t$ ลงในสมการที่ 2

เมื่อทราบค่า w แล้ว คำนวณหาค่า μ ได้จากสมการ

$$r = r_0 + w\mu t \quad \text{.....(3)}$$

โดยที่ r = รัศมีของ pellet ณ เวลา t

r_0 = รัศมีของ pellet ณ เวลาเริ่มบ่มเชื้อ

3. การเตรียมถุงไดอะไลซีส

3.1 ตัดถุงไดอะไลซีสยาวประมาณ 15 เซนติเมตร นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 - 4 ชั่วโมง

3.2 แช่ถุงใน 0.3 % sodium sulfide อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อขจัดสารประกอบซัลเฟอร์ออก

3.3 ล้างน้ำร้อน 60 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย 0.2 % sulfuric acid

3.4 ล้างน้ำร้อนอีกครั้งเพื่อขจัดกรดออก

4. การสกัด extractive ออกจากเนื้อไม้

ชั่งตัวอย่างขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส 8 กรัมแห้ง ขนาดอนุภาค 500 – 75 ไมครอนลงใน timber ประกอบชุด soxhlet โดยใช้ benzene และ 95 % ethanol ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลาย ทำการ กลั่นซ้ำเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวทำละลายในกระเปาะ soxhlet ใสไม่มีสี ล้างตัวทำละลายด้วย 95 % ethanol และ acetone หลายๆ ครั้ง สุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เก็บขี้เลื่อยไว้ใช้ทดลองต่อไป

ภาคผนวก จ

ตารางสถิติ

1. *Ganoderma lucidum* BK1 2. *G. lucidum* BK2 3. *G. lucidum* BK3 4. *Ganoderma* sp. BK4
5. *G. fulvellum* BK5 6. *G. lucidum* KC1 7. *Ganoderma* sp. KC2 8. *G. lucidum* KC3
9. *G. lucidum* KH1 10. *G. brownii* KH2 11. *G. fulvellum* CB 12. *Ganoderma* sp. TD1
13. *G. applanatum* TD2 14. *G. kunmingense* NP1 15. *G. applanatum* NP2 16. *G. multiplicatum* NP3
17. *G. hainanense* NP4 18. *G. lucidum* NP5 19. *G. brownii* NRM1 20. *Ganoderma* sp. NRM2
21. *Ganoderma* sp. LB 22. *G. shandongense* LP1 23. *G. gibbosum* LP2 24. *Amauroderma rugosum* LP3

อัตราส่วนวงสีที่เกิดบนอาหารสูตร PDA ผสม 0.1 % gallic acid

species		N	Subset of alpha = 0.01					
			a	b	c	d	e	f
Duncan[a]	21	3	.8700					
	19	3	.9900	.9900				
	24	3	.9900	.9900				
	16	3	1.0000	1.0000				
	3	3	1.0100	1.0100				
	4	3	1.0100	1.0100				
	5	3	1.0100	1.0100				
	11	3	1.0100	1.0100				
	20	3	1.0100	1.0100				
	22	3	1.0200	1.0200				
	13	3	1.0200	1.0200				
	15	3	1.0200	1.0200				
	18	3	1.0200	1.0200				
	12	3		1.0500	1.0500			
	8	3		1.1000	1.1000	1.1000		
	7	3		1.1300	1.1300	1.1300	1.1300	
	9	3		1.1300	1.1300	1.1300	1.1300	
	2	3			1.1800	1.1800	1.1800	
	10	3			1.2000	1.2000	1.2000	
	17	3			1.2000	1.2000	1.2000	
	1	3				1.2200	1.2200	
	23	3				1.2400	1.2400	
	14	3					1.2800	1.2800
	6	3						1.4000
Sig.			.014	.023	.010	.018	.011	.020

Mean for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ratio	Between Groups	1.010	23	4.393E-02	11.780	.000
	Within Groups	.179	48	3.729E-03		
	Total	1.189	71			

1. *Ganoderma lucidum* BK1 2. *G. lucidum* BK2 3. *G. lucidum* KC1 4. *Ganoderma* sp. KC2
5. *G. lucidum* KC3 6. *G. lucidum* KH1 7. *G. brownii* KH2 8. *G. multiplicatum* NP3
9. *G. brownii* NRM1 10. *G. gibbosum* LP2 11. *Phanerocheate chrysosporium*

เปอร์เซ็นต์ลดลงของลิกนินในชิ้นเลื่อยไม้ยูคาลิปตัส

	species	N	Subset for alpha = 0.05						
			a	b	c	d	e	f	g
Duncan[a]	3	3	9.9700						
	8	3	9.9800						
	6	3		11.3233					
	5	3		11.4700					
	4	3			13.5200				
	9	3				14.7300			
	1	3				15.0300			
	10	3					16.5200		
	7	3						18.8200	
	2	3						19.4900	
	11	3							42.1700
	Sig.		.986	.793	1.000	.592	1.000	.238	1.000

Mean for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
lignin	Between Groups	2473.455	10	247.346	540.621	.000
	Within Groups	10.065	22	.458		
	Total	2483.521	32			

0. Untreated control 1. *G. lucidum* BK 2 2. *G. brownii* KH2 3. *G. gibbosum* LP2 4. *P. chrysosporium* 5. Oxygen treated

Brightness

sample		N	Subset for alpha = 0.05				
			a	b	c	d	e
Duncan[a]	0	3	26.5600				
	1	3		26.8367			
	3	3			27.0300		
	4	3			27.0300		
	2	3				27.2700	
	5	3					54.6800
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
bright	Between Groups	1923.869	5	384.774	57097.527	.000
	Within Groups	8.087E-02	12	6.739E-03		
	Total	1923.950	17			

Kappa number

sample		N	Subset for alpha = 0.05					
			a	b	c	d	e	f
Duncan[a]	5	3	6.7100					
	2	3		15.6300				
	4	3			16.4100			
	3	3				17.9500		
	1	3					18.4800	
	0	3						18.8000
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
kappa	Between Groups	310.661	5	62.132	4816.450	.000
	Within Groups	.155	12	1.290E-02		
	Total	310.816	17			

Freeness

sample		N	Subset for alpha = 0.05			
			a	b	c	d
Duncan[a]	5	3	581.67			
	4	3		615.00		
	2	3			620.00	
	3	3			620.00	
	0	3				625.00
	1	3				625.00
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
freeness	Between Groups	4077.778	5	815.556	587.200	.000
	Within Groups	16.667	12	1.389		
	Total	4094.444	17			

Tear index

sample		N	Subset for alpha = 0.05			
			a	b	c	d
Duncan[a]	4	3	2.9200			
	5	3	3.1167			
	1	3		4.3333		
	0	3			5.0000	
	3	3			5.0000	
	2	3				5.6000
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
tear	Between Groups	17.913	5	3.583	135.732	.000
	Within Groups	.317	12	2.639E-02		
	Total	18.230	17			

Tensile index

sample		N	Subset for alpha = 0.05					
			a	b	c	d	e	f
Duncan[a]	5	3	6.7100					
	2	3		15.6300				
	4	3			16.4100			
	3	3				17.9500		
	1	3					18.4800	
	0	3						18.8000
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
tensile	Between Groups	209.271	5	41.854	307.815	.000
	Within Groups	1.632	12	.136		
	Total	210.903	17			

Burst index

sample		N	Subset for alpha = 0.05				
			a	b	c	d	e
Duncan[a]	0	3	.44500				
	2	3		.50333			
	3	3			.57100		
	5	3			.61300		
	4	3				.67400	
	1	3					.81233
	Sig.		1.000	1.000	.134	1.000	1.000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
burst	Between Groups	.255	5	5.093E-02	49.828	.000
	Within Groups	1.227E-02	12	1.022E-03		
	Total	.267	17			

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายกมลชัย ชะเอม เกิดเมื่อวันที่ 7 มิถุนายน 2518 ที่จังหวัดชลบุรี จบการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนดาราสมุทรในปีกาศึกษา 2530 และระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนชลบุรี "สุขบท" ปีการศึกษา 2536 จากนั้นได้ศึกษาต่อที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระดับปริญญาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2537 สำเร็จการศึกษาภาคปลายปีการศึกษา 2540 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2543 และสำเร็จการศึกษาในภาคปลาย ปีการศึกษา 2546