สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์และการจัดจำแนกเห็ดกลุ่มฟอกขาวจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย

5.1.1 การเก็บตัวอย่างเห็ด

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดในพื้นที่จังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย สามารถเก็บตัวอย่างและแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 35 สายพันธุ์ จาก 13 จังหวัด บริเวณพื้นที่ที่พบตัวอย่างราฟอกขาวนั้นส่วนใหญ่จะเป็นบริเวณพื้นที่ที่มีความชื้นสูง และราฟอกขาวจะเจริญอยู่บนตอไม้ ท่อนไม้ที่ตายแล้วหรือพุพัง ซึ่งเห็ดที่ทำการเก็บตัวอย่างได้มีหลายสกุล เช่น *Ganoderma Pycnoporus Trametes Schizophyllum Phellenus* เป็นต้น มีตัวอย่างเห็ดหลายสายพันธุ์ที่ไม่สามารถแยกเส้นใยได้ เนื่องจากตัวอย่างที่เก็บมามีการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่นหรืออยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์ เช่น ตัวอย่างแห้งเกินไป เกิดการกัดกินของแมลง เป็นต้น

จากรายงานการสำรวจเก็บตัวอย่างเห็ดในประเทศไทยพบว่าเห็ดที่แยกเส้นใยได้ทุกสกุล มีรายงานการสำรวจในประเทศไทยแล้วทั้งสิ้น (มรกต ตันติเจริญ, 2544; เกษม สร้อยทอง, 2537; ราชบัณฑิตยสถาน, 2550)

5.1.2 การจัดจำแนกเห็ดโดยอาศัยวิธีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

จากการจัดจำแนกเห็ดในกลุ่มราฟอกขาว พบว่าราฟอกขาวที่มีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลเป็นสายพันธุ์เดียวกันคือ *Pycnoporus sanguineus* และจากการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของราฟอกขาวทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ตรงกับคำบรรยายในหนังสือที่ใช้ในการจัดจำแนก แต่บางครั้งไม่สามารถจัดจำแนกได้อย่างถูกต้องแน่นอนจนถึงในระดับชนิด เนื่องจากเห็ดบางสายพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก ในบางครั้งจึงต้องอาศัยวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลเข้ามาช่วย เช่น การใช้วิธีการตรวจสอบลำดับเบสบริเวณ 18S Ribosomal DNA หรือ ITS เพื่อจัดจำแนกชนิด ซึ่งจะเป็นแนวทางหนึ่งในการตรวจสอบชนิดที่ถูกต้องมากขึ้น (Buchanan, 2001)

5.2 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตแลคเคส

5.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตแลคเคสบนอาหารแข็ง

จากผลการทดสอบความสามารถในการผลิตแลคเคสของราฟอกขาว 35 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งที่มีการเติม ABTS เป็นสับเสตรต พบว่าราฟอกขาว 33 สายพันธุ์สามารถให้วงสีเขียวบนอาหารทดสอบซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของแลคเคส โดย *P. sanguineus* CM1 ให้วงสีเขียวกว้างที่สุดบนอาหารทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chairattanamanokorn et al. (2004) ที่ทำการทดสอบการผลิตแลคเคสของราฟอกขาว 38 สายพันธุ์ บนอาหาร PDA ที่มี ABTS เป็นส่วนผสม พบว่าสายพันธุ์ *P. coccineus* 4 สายพันธุ์ สามารถสร้างวงสีเขียวบนอาหารได้และงานวิจัยของ Prasongsuk et al. (2009) ที่ทำการคัดแยกราฟอกขาวสายพันธุ์ทนร้อน โดยนำราฟอกขาวที่คัดแยกได้ทดสอบกับอาหาร PDA ที่มี ABTS เป็นส่วนผสม พบว่า มี 3 สายพันธุ์ คือ *Daedaleopsis* sp. *Schizophyllum commune* PT และ *S. commune* SL สามารถสร้างวงสีเขียวบนอาหารที่มี ABTS เป็นส่วนผสมได้

เนื่องจากแลคเคสมีความสามารถในการออกซิไดซ์ ABTS ให้เป็นอนุมูลอิสระของ ABTS (ABTS radical) จึงทำให้เกิดวงสีเขียวบริเวณรอบเส้นใยบนอาหาร ซึ่งจะเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการผลิตแลคเคสได้ (Chairattanamanokorn et at., 2004)

5.2.2 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตแลคเคสในอาหารเหลว

ผลการทดลองเลี้ยงราฟอกขาวทั้ง 35 สายพันธุ์ในอาหารสูตร production พบว่า *P. sanguineus* CM1 ให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงที่สุดเท่ากับ 0.498 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบบนอาหารแข็ง และจากการทดลองของ Herpoel et al. (2000) ที่ทำการเลี้ยงเชื้อรา *P. cinnabarinus* พบว่าให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงถึง 9000 ยูนิตต่อลิตร และมีรายงานการวิจัยอื่นๆ ในการผลิตแลคเคสที่ใช้เชื้อรา *P. sanguineus* เช่น Machado et al. (2005) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อรา *P. sanguineus* พบว่าให้ค่ากิจกรรมแลคเคสเท่ากับ 4.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร งานวิจัยของ Vikineswary et al. (2006) ทำการผลิตแลคเคสในอาหารที่ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยเชื้อรา *P. sanguineus* พบว่าให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสสูงสุด 46.5 ยูนิตต่อกรัม

5.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแลคเคส ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา คือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งอาหารเสริม และตัวชักนำ เมื่อทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ พบว่า *P. sanguineus* CM1 ให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงที่สุดในอาหารที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ แหล่งของไนโตรเจนคือ เปปโตนเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ แหล่งของอาหารเสริมคือ ยีสต์สกัดเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ และตัวชักนำที่เหมาะสมคือ คอปเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ โดยให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงที่สุดเท่ากับ 1.66 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ผลจากการทดลองหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมพบว่ากลูโคสที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Galhaup and Haltrich (2001) ที่รายงานว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตร basal ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยเชื้อรา *Trametes pubescens* ให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และในปีต่อมามีรายงานการวิจัยของ Jang et al. (2002) ได้ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส กลีเซอรอล ไซโลส และ เดกแทรน ที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเลี้ยงเชื้อรา *Trametes* sp. พบว่าน้ำตาลกลูโคสให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงสุด 2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองเมื่อเลี้ยงเชื้อรา *P. sanguineus* ใช้แหล่งของคาร์บอนที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 4 ชนิดพบว่าแหล่งของคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสสูงสุดคือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตสซึ่งเป็นโมเลกุลเดี่ยวเชื้อราสามารถนำไปใช้ได้เลยเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งของคาร์บอนอื่นๆ ที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่น้ำตาลซูโครส และพอลิเซคคาร์ไรด์ (แป้ง) (Eugenio et al., 2009)

จากการทดลองใช้แหล่งของไนโตรเจนที่ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้นเปปโตน 0.25 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของงานวิจัยของ Hou et al. (2004) ที่ทำการเพิ่มปริมาณแลคเคสด้วยเชื้อรา *Pleurotus ostreatus* เมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงที่สุด 400 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้แล้วงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นที่เป็นอนินทรีย์คาร์บอน เช่น ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมทาร์เทรต พบว่าให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสในปริมาณที่ต่ำ เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ไม่สามารถนำมาทดแทนแหล่งของอินทรีย์ไนโตรเจนได้ (Hes et al., 2002)

การใช้แหล่งอาหารเสริมในการผลิตแลคเคสจากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัด 0.25 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงที่สุดและได้มีรายงานการวิจัยการใช้ยีสต์สกัดในการผลิตแลคเคส จากรายงานของ Kahraman and Gurdal (2002) เมื่อใช้ยีสต์สกัด 0.025 กรัมต่อลิตร ในการผลิตแลคเคสจากเชื้อรา *Coliolus versicolor* ให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสเท่ากับ 0.012 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ *Funalia trogii* ให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสเท่ากับ 0.051 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และต่อมา Silva et al. (2005) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโนไลติก โดยเชื้อรา *Ganoderma* spp. 4 สายพันธุ์ พบว่า *Ganoderma* sp. สายพันธุ์ CCB209 ให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงที่สุดเท่ากับ 49.51 ยูนิตต่อลิตร เมื่อใช้ยีสต์สกัดเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตรร่วมกับการใช้รำข้าว

จากการทดลองเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *P. sanguineus* CM1 ในอาหารสูตร GYP โดยมีการเติมคอปเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวชักนำในการผลิตแลคเคส พบว่าเมื่อใช้คอปเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสสูงที่สุด นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานการวิจัยอื่นๆ พบว่าความเข้มข้นของคอปเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-2.0 มิลลิโมลาร์ เป็นช่วงที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส (Galhaup and Haltrich, 2001 ; Madhadvi and Lele 2005) แต่อย่างไรก็ตามการเติมคอปเปอร์ซัลเฟตในอาหารที่ใช้ในการผลิตแลคเคส จะต้องมีปริมาณที่เหมาะสมเนื่องจากถ้ามีการใช้ในปริมาณมากเกินไป คอปเปอร์ซัลเฟตจะมีผลต่อการผลิตแลคเคส โดยจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Yahaya et al., 2009) นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานการใช้ตัวชักนำชนิดอื่นๆ ในการผลิตแลคเคส เช่น ไซลีดีน (xylidine) ฟีนอลิก (phenolic) โพรพานิล (propanil) ที่มีรายงานว่าสามารถใช้เป็นตัวชักนำที่เหมาะสมได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามการคัดเลือกตัวชักนำในการผลิตแลคเคสนั้นจะต้องคำนึงถึงความเป็นพิษ การระเหย ราคา และความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ด้วย (Lui et al., 2009)

จากการทดลองการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคสจากเชื้อรา *P. sanguineus* CM1 นั้น พบว่าแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมคือ 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลกลูโคส แหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เปปโตน แหล่งของอาหารเสริมที่เหมาะสมคือ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด และความเข้มข้นของที่เหมาะสมของคอปเปอร์ซัลเฟตคือ 0.6 มิลลิโมลาร์ และเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองอื่นๆ พบว่าภาวะการผลิตแลคเคสจะมีความแตกต่างกันของแหล่งอาหารต่างๆ เนื่องจากภาวะการผลิต จะมีความแตกต่างกันทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา วิธีการเลี้ยงเชื้อรา และปัจจัยทางด้านอื่นๆ เช่น ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อรา และสภาวะแวดล้อมเป็นต้น ดังนั้นจึงส่งผลให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสจากเชื้อราสายพันธุ์เดียวกันหรือต่างสายพันธุ์กันมีความแตกต่างกัน

5.4 การทำแลคเคสให้บริสุทธิ์บางส่วน

เมื่อทราบผลของภาวะการผลิตแลคเคสที่เหมาะสมแล้ว นำภาวะดังกล่าวมาทำการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณแลคเคส หลังจากนั้นนำแลคเคสที่ได้มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการอัลตราฟิวเตรชัน และนำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นเกลือ 60-80 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงที่สุด ซึ่งการทดลองนี้จะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Trovaslet et al. (2007) ได้ทำการตกตะกอนแลคเคสจากราฟอกขาว *P. sanguineus* พบว่าแลคเคสสามารถตกตะกอนได้ที่ความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 85 เปอร์เซ็นต์ และในปีเดียวกันมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตของ Litthauer et al. (2007) จากเชื้อรา *P. sanguineus* SCC108 พบว่าโปรตีนสามารถตกตะกอนได้ที่ความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 75 เปอร์เซ็นต์

5.5 การลดสีน้ำเสียจากโรงงานเยื่อและกระดาษด้วยเชื้อรา *P. sanguineus* CM1

5.5.1 การทดสอบประสิทธิภาพการลดลงของสีน้ำเสียโดยรา *P. sanguineus* CM1 อิสระในระดับขวดเขย่า

จากผลการทดลองลดสีน้ำเสียจากโรงงานเยื่อและกระดาษ โดยใช้เชื้อราอิสระ *P. sanguineus* CM1 ในการลดสีน้ำเสียสามารถลดสีน้ำเสียได้ 76 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 21 ชั่วโมง และสามารถลดค่าบีโอดีและซีโอดีได้ 13 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Luciana et al. (2003) รายงานว่า เชื้อรา *Ceriopsis subvermispora* สามารถลดสีจากกระบวนการผลิตแบบคราฟท์ พบว่าลดสีได้ 90 เปอร์เซ็นต์ และลดค่าซีโอดีได้ 45 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นแล้วงานวิจัยของ Wu et al. (2005) รายงานถึงการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียของกระบวนการผลิตกระดาษด้วยราฟอกขาว พบว่าสามารย่อยสลายลิกนินได้ 71 เปอร์เซ็นต์ และลดค่าซีโอดีได้ 48 เปอร์เซ็นต์ และรายงานล่าสุด Prasongsuk et al. (2009) สามารถใช้ราฟอกขาว *Daedaleopsis* sp. และ *Phanerochaete chrysosporium* ในการลดสีน้ำเสียจากโรงงานเยื่อและกระดาษ พบว่าเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถลดสีน้ำเสียได้ 52 และ 86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้แล้วยังสามารถลดค่าซีโอดีได้ 59-71 เปอร์เซ็นต์ และ 66-83เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 4 วัน

5.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพการลดลงของสีน้ำเสียโดยรา *P. sanguineus* CM1 ตรึงรูปในระดับขวดเขย่า

จากการใช้เชื้อรา *P. sanguineus* CM1 ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ในการลดสีน้ำเสียพบว่าสามารถนำเซลล์ตรึงรูปมาทำการใช้ซ้ำได้ 2 ครั้ง และหลังจากนั้นความเข้มของสีน้ำเสียจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อาจเนื่องมาจากเชื้อรามีการเติบโตและผลิตสีออกมาเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงจึงทำให้มีค่าที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการใช้ราฟอกขาวตรึงรูปในการลดสีน้ำเสียนั้นมีรายงานไว้ได้แก่ Schliephake and Lonergan (1996) ที่ศึกษาการลดสีสังเคราะห์ในกลุ่ม Remazol Brillaint Blue R (RBBR) โดยการตรึงราฟอกขาว *P. cinnabarinus* ด้วยด้ายไนลอนที่สานกันเป็นสี่เหลี่ยมในถังหมัก พบว่าสี RBBR ลดลงได้อย่างรวดเร็วเนื่องจากเชื้อราสามารถผลิตแลคเคสได้ดี และต่อมา Zhang et al. (1999) ได้ศึกษาการลดสีในกลุ่ม azo dye Orange II ด้วยราฟอกขาวโดยการใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในถังปฏิกรณ์ พบว่าเชื้อราที่ตรึงรูปสามารถลดสี azo dye Orange II ได้ 74 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการทดลองไปแล้ว 24 ชั่วโมง และสามารถนำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำได้ และประสิทธิภาพการใช้ตรึงรูปดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ Raghukumar et al. (2004) ได้ทำการแยกราฟอกขาว *Flavodon flavus* มาทำการลดสีน้ำเสียจากกระบวนการล้างกากน้ำตาล โดยการตรึงเชื้อราด้วยโพลียูรีเทนโฟม พบว่าสามารถลดสีน้ำเสียได้ 60 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Park et al. (2006) ทำการลดสี Acid Black 52 ด้วยเชื้อราฟอกขาว *F. trogii* ด้วยอัลจิเนต พบว่าสามารถทำการใช้เซลล์ตรึงรูปได้ซ้ำ 2 ครั้ง โดยประสิทธิภาพการลดลงของสีเท่ากับ 93.8 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

5.5.3 การทดสอบประสิทธิภาพการลดลงของสีน้ำเสียโดยแลคเคสตรึงรูปในระดับขวดเขย่า

การทดสอบประสิทธิภาพการลดลงของสีน้ำเสียโดยแลคเคสตรึงรูป จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้แลคเคส 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตรึงรูป ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าสามารถนำแลคเคสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำได้ 6 ครั้ง เมื่อทำการทดลองในระดับฟลาสก์ พบว่าสามารถลดสีน้ำเสียและสามารถลดค่าบีโอดีและซีโอดีได้อีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Teerapatsakul et al. (2008) ได้ทำการตรึงแลคเคสด้วยอัลจิเนตในการลดสีพบว่าสามารถลดสีได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในการนำกลับมาใช้ซ้ำ 6 รอบ และจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อนำแลคเคสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำอีก

การใช้เอนไซม์หรือราตรึงรูปในการลดสีน้ำเสียจากกระบวนต่างๆ นั้น สามารถนำราหรือเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำได้ ซึ่งช่วยให้อุตสาหกรรมสามารถประหยัดต้นทุนในการบำบัดสีของน้ำเสียได้ (Couto, 2009)