# บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### วัสดุและอุปกรณ์

1.เชื้อเห็ด *Schizophyllum commune* Fr. สายพันธุ์ กาญจนบุรี กรุงเทพฯ เชียงราย ปัตตานี พังงา ระยอง และลพบุรี ได้มาจากการเก็บรวมรวมของกมลชัย ชะเอม (2540)

2. ไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่

มะขาม (*Tamarindus indica* Linn)

มะม่วง ( *Mangifera indica* Linn)

สะเดา ( *Azadirachta indica* A. Juss. Var Siamensis Valeton)

และหางนกยูงฝรั่ง (*Delonix regia* (Boj. ex Hook) Raf )

3. วัสดุสำหรับทำหัวเชื้อและเพาะเห็ด ได้แก่ เมล็ดข้าว ฟางขี้เลื่อย กรดอะซิติก yeast extract ปูนขาว คอขวดพลาสติก ถุงพลาสติก

4. เยื่อยูคาลิปตัสที่ยังไม่ผ่านการฟอกด้วยออกซิเจน จากบริษัทสยามเซลลูโลส จำกัด (มหาชน) อำเภอท่ามะกา จ. กาญจนบุรี

5. เครื่องแก้วที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราได้แก่ flask beaker petridish cylinder pasture pipette แท่งแก้วคน

6. Micro pipett ของบริษัท Transferpette

7. อุปกรณ์ ได้แก่ เตาไฟฟ้า หม้อสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ มีด หนัก ปากคีบ (forcep) ตะเกียงแอลกอฮอล์ เข็มเขี่ย cork borer กล้องถ่ายรูป

8.วัสดุ ได้แก่ กระดาษกรอง สำลี อลูมิเนียมฟอยด์ พาราฟิล์ม ผ้าขาวบาง น้ำกลั่น อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA (Potato Dextrose Agar)

9. สารเคมี

9.1 สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และทำความสะอาดพื้นผิว ได้แก่ แอลกอฮอล์ คลอรอกซ์

9.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร สูตร production (สูตรอาหารได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก )

9.3 สารเคมีสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส แมงกานีส เปอร์ออกซิเดส และแลคเคส แสดงไว้ในภาคผนวก ข)

9.4 สารเคมีสำหรับการวัดปริมาณโปรตีน

9.4.1 Sodium hydroxide anhydrous pellets บริษัท Calro Erba reagent

9.4.2 Citric acid บริษัท Univar reagent

9.4.3 Ammonium sulphate บริษัท Carlo erba reagent

9.5 สารเคมีสำหรับวัดค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อ

9.5.1 โปแตสเซียมเปอร์มังกาเนต ($KMnO_4$) บริษัท Merk

9.5.2 โซเดียมไธโอซัลเฟต ( $Na_2S_2O_3$) บริษัท Merk

9.5.3 โปแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) บริษัท Merk

9.5.4 กรดซัลฟูริค ($H_2SO_4$) บริษัท Carlo Erba Reagent

9.5.5 น้ำแป้ง ( Starch)

10. ครุภัณฑ์

10.1 pH meter model 250 pH ISE conductivity meter บริษัท Denver Instrument

10.2 เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง บริษัท Denver Instrument

10.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น G-25 บริษัท New Brunswic Scientific Co., INC

10.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ บริษัท Ta Chang Medical Instrument Factory Taiching Taiwan R. O. C

10.5 Shaking incubator model-010945 Scientific Instrument Development and Service Center Faculty of science Chulalongorn University

10.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น Helttich Universal 32R บริษัท Hettich Zentrifugen Tuttingen CE Germany

10.7 ตู้ถ่ายเชื้อ

10.8 Spectrophotometer model (uv visible online programe )

10.9 เครื่องกระจายเยื่อ Mavis Engineering Co. Ltd.

10.10 เครื่อง pressure รุ่น model-73 03-01

10.11 เครื่องวัดความขาวสว่างของเยื่อ Elrepho2000 บริษัท Datacolor Ltd. Switzerland

10.12 กล้องจุลทรรศน์ ชนิด compound microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**วิธีการทดลอง**

**1. ศึกษาการเจริญของเห็ดแครงทั้ง 7 สายพันธุ์ในอาหารแข็งและอาหารเหลว**

1.1 ศึกษาการเจริญของเห็ดทั้ง 7 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง PDA ที่ระดับ pH ต่างๆ

โดยนำเชื้อเห็ดแครงทั้ง 7 สายพันธุ์ ซึ่งเลี้ยงไว้ใน agar slant มาเลี้ยงบน Potato Dextrose Agar (PDA) (การเตรียมดูในภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30°C±2) ที่มืดเป็นเวลา 7-10 วัน แล้วใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะตรงบริเวณขอบรอบนอกโคโลนีนำเส้นใยที่เจริญบนชิ้นวุ้น 1 ชิ้นย้ายมาเลี้ยงในอาหาร PDA ที่มี pH 6.0 (ไม่ได้ปรับ pH), 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 ที่มีปริมาตร 15 มิลลิลิตรโดยวางตรงกลาง 1 ชิ้นต่อ 1 จานแก้วขนาด 90 มิลลิเมตร บ่มเก็บไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง วัดการเจริญ ของเส้นใยทุกๆ 2 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

1.2 ศึกษาการเจริญของเห็ดแครงทั้ง 7 สายพันธุ์ในอาหารเหลว PDB

นำเชื้อเห็ด *S. commune* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีอายุประมาณ 7-10 วันมาเจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะตรงขอบรอบนอกโคโลนี จำนวน 2 ชิ้นย้ายมาเลี้ยงในอาหาร PDB (Potato Dextrose Broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ทำการจดบันทึกน้ำหนักแห้งที่คงที่ของเส้นใยเฉลี่ยทุก ๆ 2 วันเป็นเวลา 22 วัน โดยนำเส้นใยของเชื้อเห็ดมากรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้นนำเส้นใยไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°C นาน 24 ชั่วโมง ในตู้อบ นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟ เพื่อหาระยะของการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ด *S. commune* ทั้ง 7 สายพันธุ์

**2. ศึกษาการเจริญของเห็ดแครงบนกิ่งไม้ชนิดต่าง ๆ**

2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

หัวเชื้อประกอบด้วย ข้าวฟ่าง 900 กรัม ขี้เลื่อย 100 กรัม กรดอะซิตริก 3 มิลลิลิตร. yeast extract 10 กรัม นำมาผสมกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C แล้วนำเชื้อเห็ดสายพันธุ์ลพบุรี (ซึ่งเจริญเร็วที่สุด) ที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบรอบโคโลนีของเส้นใย ใส่ในหัวเชื้อบ่มในที่มืด จนเส้นใยเจริญเต็มหัวเชื้อข้าวฟ่าง (ประมาณ 7 วัน)

2.2 การเตรียมกิ่งไม้สำหรับเพาะ

กิ่งไม้ที่ใช้เป็นวัสดุเพาะได้แก่ มะขาม มะม่วง สะเดา หางนกยูง นำกิ่งไม้แต่ละชนิดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-20 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 250 มิลลิเมตร ผึ่งแดดให้แห้ง 2-3 วัน แล้วมัดเป็นกำ กำละประมาณ 200 กรัม นำไปแช่น้ำ 1 คืน นำมาใส่ถุงพลาสติกขนาด 6.5 นิ้ว X 16 นิ้ว ใส่คอขวดและอุดจุกสำลี ปิดกระดาษทับรัดยาง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 60 นาที เมื่อเย็นลงจึงใส่หัวเชื้อข้าวฟ่าง 5 กรัม ลงในถุงกิ่งไม้แต่ละชนิด อุดจุกสำลีและปิดกระดาษทับรัดยางอย่างเดิม เขย่าถุงไปมาให้หัวเชื้อข้าวฟ่างกระจายตัวทั่วกิ่งไม้ นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้องประมาณ 10 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มบนกิ่งไม้ วางแผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomize Design ) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

2.3 การเปิดดอก

เมื่อเส้นใยเห็ดเจริญบนกิ่งไม้จนเต็มนำกิ่งไม้ออกจากถุงนำมาวางบนชั้นไม้ในโรงเปิดดอก (อ่างปูน) มีแสงสลัว อุณหภูมิ 25-30°C ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 90% แล้วรดน้ำเช้า-เย็น เก็บดอกที่บาน นำไปชั่งน้ำหนักเห็ดสด ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 20 วัน

2.4 การวิเคราะห์ผล

คำนวณหาประสิทธิภาพในการใช้วัสดุเพาะ Biological Efficiency (B. E.)

$$B.E. = \frac{\text{น้ำหนักสดของเห็ด}}{\text{น้ำหนักแห้งของวัสดุเพาะ}} \times 100$$

แล้วเปรียบเทียบวัสดุเพาะทั้ง 4 ชนิด นำผลการทดลองมาวิเคราะห์แบบ Ducan Multiple Range Test (DMT)

3. **ศึกษาประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ของเชื้อเห็ด *S. commune***

3.1 การทดสอบการมีเอนไซม์แลคเคส

เลี้ยงเชื้อ *S. commune* แต่ละสายพันธุ์บนอาหาร PDA ประมาณ 7-10 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยตรงบริเวณขอบรอบโคโลนี นำเส้นใยที่เจริญบนชิ้นวุ้น 1 ชิ้น ย้ายมาเลี้ยงตรงกลาง plate ใน PDA ที่มี 0.1% gallic acid จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่เจริญ (a) และเส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีน้ำตาลที่เกิดบนอาหาร (b) ทุกวัน จนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มจานแก้ว นำมาคำนวณอัตราการเจริญของเส้นใยต่อการเกิดวงสีน้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (a/b) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ วิเคราะห์สถิติ และเปรียบเทียบแบบ DMRT เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมไว้ศึกษาในข้อ 3.2 ต่อไป

3.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ในอาหารสูตร production

ทำการทดลองศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมทั้ง pH และ อุณหภูมิในการสร้างเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ในอาหารสูตร production ของสายพันธุ์เชื้อเห็ด *S. commune* ที่คัดเลือกจากข้อ 3.1 เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมไว้ศึกษาประสิทธิภาพในการฟอกเยื่อกระดาษในข้อที่ 4 ต่อไป

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อ *S. commune* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้อ 3.1ที่เจริญบน PDA ที่มีอายุ ประมาณ 7 วัน มาเจาะบริเวณขอบรอบนอกโคโลนี ใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อเห็ด 2 ชิ้น ไปเลี้ยงในอาหาร PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลานานตามความเหมาะสมของแต่ละสายพันธุ์ที่ได้จากการทดลอง ข้อ 1.2

3.2.2 การศึกษาภาวะ pH ที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดสของเชื้อ *S. commune* ในอาหารสูตร production

เตรียมอาหารสูตร production (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เติมเยื่อกระดาษที่ยังไม่ผ่านกระบวนการฟอก และมีค่าความขาวสว่าง

เริ่มต้นเท่ากับ 36.88 % ค่าคัปปานัมเบอร์เริ่มต้นเท่ากับ 12.15 จำนวน 6.25 กรัม (น้ำหนักแห้ง) หลังจากนั้นทำการปรับค่า pH ให้ได้ระดับ pH ตามที่ต้องการศึกษาคือ ที่ระดับ pH 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° C เวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อ *S. commune* ที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายลงในเยื่อหลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40° C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่มืด เก็บผลการทดลองทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 12 วัน นำไปทำการเตรียม crude เอนไซม์ (ภาคผนวก ข )และ ตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม DMRT

3.2.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *S. commune* ในอาหารสูตร production

เตรียมอาหารสูตร production ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เติมเยื่อกระดาษที่ยังไม่ผ่านกระบวนการฟอก และมีค่าความขาวสว่างเริ่มต้นเท่ากับ 36.88% ค่าคัปปานัมเบอร์เริ่มต้นเท่ากับ 12.15 จำนวน 6.25 กรัม (น้ำหนักแห้ง) หลังจากนั้นทำการปรับค่า pH ในแต่ละขวดทดลองให้ได้ระดับ pH ที่เหมาะสม จากผลการทดลองข้อ 3.2.2 ที่คัดเลือกจากการทดลองข้อ 3.1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อ *S. commune* สายพันธุ์ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 3.2.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายลงในเยื่อหลังจากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 4 ระดับ คือ 25°C 30°C 35°C และ 40°C ตามลำดับ เครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่มืด เก็บผลการทดลองทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 12 นำไปทำการเตรียม crude enzyme (ภาคผนวก ข) และ ตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การเปรียบเทียบแบบ DMRT

**4. การศึกษาประสิทธิภาพในการฟอกเยื่อกระดาษของ *S. commune* สายพันธุ์ปัตตานี**

4.1 การเตรียมหัวเชื้อ

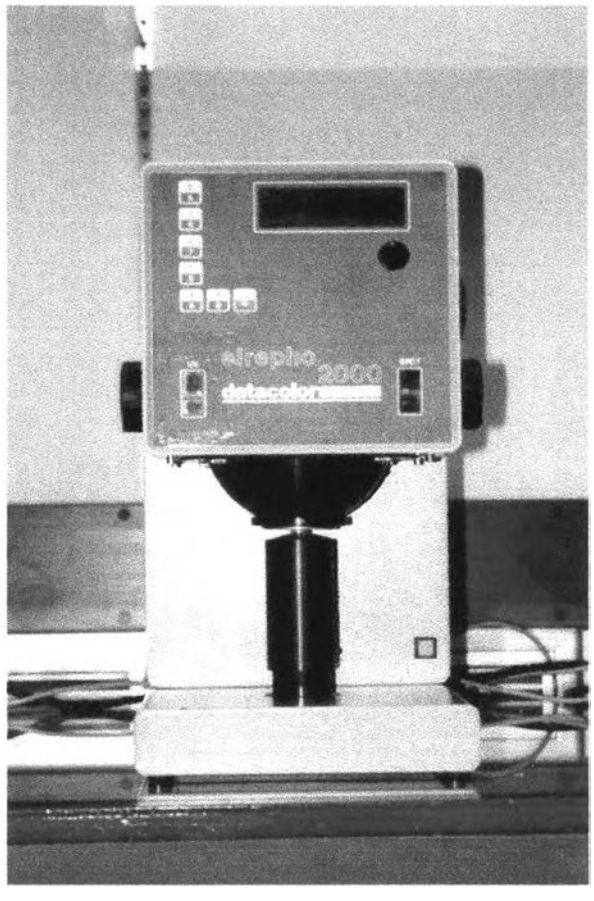
นำเชื้อ *S. commune* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้อ 3.2 ที่เจริญบน PDA ที่มีอายุประมาณ 7 วัน มาเจาะบริเวณขอบรอบนอกโคโลนี ใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อรา 2 ชิ้น ไปเลี้ยงในอาหาร PDB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

4.2 การตรวจวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส แมงกานีส เปอร์ออกซิเดส และแลคเคส

เตรียมอาหารสูตร production (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดทดลอง 500 มิลลิลิตร เติมเยื่อกระดาษที่ยังไม่ผ่านกระบวนการฟอก และมีค่าความขาวสว่างเริ่มต้นเท่ากับ 36.88% ค่าคัปปานัมเบอร์เริ่มต้นเท่ากับ 12.15 จำนวน 25 กรัม (น้ำหนักแห้ง) หลังจากนั้นทำการปรับค่า pH ในแต่ละขวดทดลองให้ได้ระดับ pH ที่เหมาะสม จากผลการทดลองข้อ 3.2.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อ *S. commune* สายพันธุ์ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 4.1 มากรองผ่านผ้าขาวบางที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วและตักเอาเฉพาะส่วนที่เป็นเส้นใย ถ่ายลงในเยื่อหลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่เหมาะสม (จากการทดลองข้อ 3.2.3) ตั้งทิ้งไว้ในสภาวะที่นิ่ง เก็บผลการทดลองทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน โดยการนำเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อราแล้วมากรองผ่านผ้าขาวบางเก็บส่วนที่เป็นเยื่อกระดาษไปใช้ในการทดสอบในข้อที่ 4.3 ส่วนที่เป็นสารละลายเอนไซม์ไปทำการตรวจวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส แมงกานีส เปอร์ออกซิเดส และแลคเคส (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การเปรียบเทียบแบบ DMRT

4.3 <u>การวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการของเยื่อที่ผ่านการฟอกสีเยื่อกระดาษ</u>

นำเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อราแล้วนำไปวัดหาค่าความขาวสว่าง เครื่องวัดความขาวสว่าง (ภาพที่ 11) และ ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อ ตามวิธี Tappi method (ภาคผนวก ค) วิเคราะห์โดยใช้การเปรียบเทียบแบบ DMRT




ภาพที่ 11 เครื่องวัดความขาวสว่าง Elrepho 2000 (ISO 2469)