การผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากรากลุ่มไวท์รอทบางชนิด

นางสาวเบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2990-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF LIGNIN PEROXIDASE ENZYME FROM SOME WHITE ROT FUNGI

Miss Benjawan Yanwisetpakdee

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2002

ISBN 974-17-2990-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากรากลุ่มไวท์รอทบางชนิด
โดย	นางสาวเบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตรจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี: การผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากรากลุ่มไวท์รอทบางชนิด (PRODUCTION OF LIGNIN PEROXIDASE ENZYME FROM SOME WHITE ROT FUNGI) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.มุกดา คูหิรัญ; 94 หน้า. ISBN 974-17-2990-1

การผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) จากไวท์รอท 4 สายพันธุ์ คือ *Phanerochaete chrysosporium* *Ganoderma lucidum* *Ganoderma* sp. และ *Schizophyllum commune*. ในอาหารที่เติมเยื่อยูคาลิปตัสภายใต้สภาวะนิ่ง พบว่าไวท์รอทผลิตเอนไซม์ได้ดีที่ pH 4-6 อุณหภูมิ 30-40°เซลเซียส โดย *P. chrysosporium* สามารถผลิตเอนไซม์ LiP ได้ดีที่สุด (0.2956 U/ml.) และนอกจากนั้นยังพบแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) และ veratryl alcohol oxidase (VAO) การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (60-80 w/v) จะให้ผลดีกว่าการกรองด้วย ultra filtration ซึ่งแอคติวิตีของ LiP และ MnP จาก *P. chrysosporium* เพิ่มขึ้น 5.1 และ 4.4 เท่า โดยมีความเสถียรของ LiP ที่ pH 5-6 อุณหภูมิ 35-45°เซลเซียส และ MnP ที่ pH 5-6 อุณหภูมิ 35-40°เซลเซียส *G. lucidum* และ *Ganoderma* sp. ผลิต MnP และ แลคเคส (Lac) ได้ โดยแอคติวิตีของ MnP เพิ่มขึ้น 4.61 และ 4.5 เท่า ในขณะที่แอคติวิตีของ Lac เพิ่มขึ้น 6.2 และ 5.06 เท่า สำหรับ *G. lucidum* และ *Ganoderma* sp. ตามลำดับ MnP และ Lac จากทั้ง 2 สายพันธุ์มีความเสถียรที่ pH 4-6 อุณหภูมิ 35°เซลเซียส สำหรับ *S. commune* พบว่า ผลิต MnP ที่สามารถทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.69 เท่า และมีความเสถียรที่ pH 4-8 อุณหภูมิ 35°เซลเซียส เมื่อฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วย LiP จาก *P.chrysosporium* MnP จาก *S. commune* และ Lac จาก *G. lucidum* และ *Ganoderma* sp. (12.5 IU/gOD) พบว่า กระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย LiP จาก *P.chrysosporium* จะให้คุณภาพของกระดาษดีที่สุด โดยมี burst index เป็น 0.75 tear index เป็น 5.27 และ tensile index เป็น 17.03 ในขณะที่ MnP จาก *S. commune* ให้ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น (4.06%) และค่าคัปปานัมเบอร์ลดลง (17.46%)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา(ร่วม) .....

4272329723: MAJOR BOTANY

KEY WORDS: LIGNINPEROXIDASE, WHITE ROT

PRODUCTION OF LIGNIN PEROXIDASE ENZYME FROM SOME WHITE ROT FUNGI. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, PH.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. MUKDA KUHIRUN; 94 pp. ISBN 974-17-2990-1

Four white rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium, Ganoderma lucidum, Ganoderma* sp., and *Schizophyllum commune*, were cultivated in liquid medium containing eucalyptus paper pulp. All tested white rot fungi produced Lignin peroxidase (LiP) at pH4-6, and 30-40°C. *P. chrysosporium* gave the highest LiP activity (0.2956 U/ml.) while Manganese peroxidase (MnP) and Veratryl alcohol oxidase (VAO) were also produced. Ammonium sulfate precipitation (60-80 w/v) gave more higher purification factor than ultra filtration. Increasing in purification factor of LiP and MnP from *P. chrysosporium* were 5.1 and 4.4 while stabiliyt of LiP ans MnP were at pH 5-6, and 35-45°C and pH 5-6, and 35-40°C, respectively. *G. lucidum* and *Ganoderma* sp. produced MnP and Laccase (Lac). After ammonium sulfate precipitation (60-80 w/v), increasing in purification factor of MnP was 4.61 and 4.5 while Lac was 6.2 and 5.06 for *G. lucidum* and *Ganoderma* sp., respectively. Stability of MnP and Lac derived from both strains were at pH 4-6, and 35°C. Increasing in purification factor of MnP derived from *S. commune* after ammonium sulfate precipitation (60-80 w/v) and stability were 4.69 and pH 4-6, and 35°C, respectively. Bleaching of eucalyptus paper pulp with LiP derived from *P. chrysosporium*, MnP derived from *S. commune,* and Lac derived from *G. lucidum* and *Ganoderma* sp.(12.5IU/gOD) were determined. LiP derived from *P. chrysosporium* gave the best paper quality with the index numbers of 0.75 for burst index, 5.27 for tear index and 17.03 for tensile index, respectively while MnP derived from *S. commune* gave the best results on increasing the brightness (4.06%) and decreasing the kappa number (17.46%).

Department Botany Student's signature

Field of study Botany Advisor's signature

Academic year 2002 Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณา ให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนได้แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาแนะนำ และให้ข้อคิดเห็น ในการทำวิจัยจนงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้

ขอกราบขอบพระคุณ อ.ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์เตือนใจ โก้สกุลที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณทบวงมหาวิทยาลัยและภาควิชาพฤกษศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย

ขอขอบคุณโรงงานเยื่อกระดาษ บริษัทสยามเซลลูโลส จำกัด อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเยื่อกระดาษที่ใช้ในการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณภาสินี ปิติพรชัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย และสอนในทุกๆ เรื่องเสมอมา

ขอขอบคุณคณาจารย์ รวมถึงบุคลากรในภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่เอื้อเฟื้อและช่วยเหลือ เป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์บริการและพี่ ๆ ที่หน่วยทุกท่าน ที่กรุณาสอนและอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ ตลอดจนให้คำแนะนำในการทำวิจัยนี้

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา คุณยาย ขอบคุณพี่ชาย พี่สาว และน้องชาย สำหรับความรัก ความอบอุ่น และคอยช่วยเหลือ เป็นกำลังใจให้เสมอมา จนสำเร็จการศึกษาและตลอดไป

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……..……..ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..จ
กิตติกรรมประกาศ……..ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง……..ซ
สารบัญภาพ.....ญ
บทที่
1. บทนำ……1
2. บทตรวจเอกสาร……..……..4
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการทดลอง.....15
4. ผลการทดลอง.....24
5. จารณ์ผลการทดลอง.....55
6. รุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....61
รายการอ้างอิง……64
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก……..72
ภาคผนวก ข……74
ภาคผนวก ค……85
ภาคผนวก ง……91
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……94

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ประเภทของลิกนินแบ่งตามคุณสมบัติการละลาย.....8
2 ตัวอย่างสายพันธุ์ไวท์รอทที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส.....10
3 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO จาก *P. chrysosporium* ณ pH ต่างๆ.....28
4 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP ที่แท้จริงจาก *P. chrysosporium* ณ pH ต่างๆ.....29
5 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO จาก *G. lucidum* ณ pH ต่างๆ.....30
6 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO จาก *Ganoderma* sp.ณ pH ต่างๆ.....31
7 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO จาก *S commune* ณ pH ต่างๆ.....32
8 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO จาก *P. chrysosporium* ณ อุณหภูมิต่างๆ.....34
9 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP ที่แท้จริงจาก*P. chrysosporium* ณ อุณหภูมิต่างๆ.....34
10 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO จาก *G. lucidum* ณ อุณหภูมิ ต่างๆ.....35
11 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO จาก *Ganoderma* sp.ณ อุณหภูมิ ต่างๆ.....36
12 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO จาก *S. commune* ณ อุณหภูมิ ต่างๆ.....37
13 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *P. chrysosporium* 40
14 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *G. lucidum* 41
15 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Ganoderma* sp.....42
16 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *S commune*.....43
17 คุณสมบัติของเยื่อและกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากไวท์รอท.....54
18 ค่าแฟคเตอร์สำหรับแปลงผลของคัปปานัมเบอร์.....77
19 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าหน่วยเอนไซม์ของ LiP ที่แท้จริงจาก *P. chrysosporium* ที่เลี้ยงในอาหาร pHต่าง ๆ.....91
20 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าหน่วยเอนไซม์ของ LiP ที่แท้จริงจาก *P. chrysosporium* ที่เลี้ยงในอาหาร pH ต่าง ๆ.....91
21 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความขาวสว่างของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา.....92
22 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าแรงฉีกขาดของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา.....92

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

23 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าแรงดันทะลุของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วย

เอนไซม์จากเชื้อรา.....92
24 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าการต้านทานแรงดึงของกระดาษที่ผ่านการฟอก
ด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา.....93

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 แบบจำลองโมเลกุลลิกนินของไม้เนื้ออ่อน.....5
2 โครงสร้างของ phenyl propanoid precursors องลิกนิน.....6
3 ครงสร้างของเนื้อไม้.....7
4 วัฏจักรการย่อยสลายลิกนินด้วยลิกนินเปอร์ออกซิเดส.....11
5 เชื้อราไวท์รอท *P. chrysosporium* (A) *G. lucidum* (B) *Ganoderma* (C) และ *S. commune* (D) 25
6 การเจริญเติบโตของ *P. chrysosporium* *G. lucidum* *Ganoderma* sp. และ *S. commune* 26
7 เสถียรภาพของเอนไซม์ที่ผลิตได้ จากไวท์รอท *P. chrysosporium* *G. lucidum* *Ganoderma* sp. และ *S. commune*ในช่วง pH 4-8..... 45-46
8 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์จาก *P. chrysosporium*... 48
9 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์จาก *G. lucidum* 49
10 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์จาก *Ganoderma* sp. 50
11 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์จาก *S. commune*.....51
12 แผ่นกระดาษทดสอบที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากไวท์รอท.....53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ไม้ประกอบด้วยสารอินทรีย์ประเภท เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) จับกันแน่นในรูปของโครงสร้างผลึกที่ซับซ้อนและแข็งแรงเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ (Ericksson, Blanchette, and Ander, 1990) โดยมีลิกนินทำหน้าที่เสมือนกาวช่วยยึดจับและทำให้เนื้อไม้คงรูปอยู่ได้ ลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลิฟีนอลิก (polyphenolic) ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลเป็นวงแหวน โดยทั่วไปพบว่าในเนื้อไม้ของพืชมีท่อลำเลียงมีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 20-35% (Buswell, 1991) พบได้มากในผนังเซลล์ (cell wall) และส่วนมิดเดิลลาเมลลา (middle lamella)

ปรากฏการณ์ของการย่อยสลายเนื้อไม้ในธรรมชาติเกิดจากบทบาทของจุลินทรีย์หลายชนิดที่สำคัญได้แก่ เห็ดรา ซึ่งสามารถจำแนกตามลักษณะการย่อยสลายได้เป็น 3 ประเภท คือ ซอฟท์รอท (soft rot) บราวน์รอท (brown rot) และไวท์รอท (white rot) โดยเฉพาะคุณลักษณะพิเศษของไวท์รอทที่ย่อยสลายเนื้อไม้แล้วทำให้มีสีขาวขึ้น เนื่องมาจากการลดลงของลิกนินอันเป็นหลักการสำคัญของการฟอกเยื่อกระดาษด้วยวิธีทางชีวภาพ (หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, 2539) จึงเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมและกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ซึ่งกระบวนการย่อยสลายเนื้อไม้เป็นการเปลี่ยนแปลงทาง สรีรวิทยาและคุณสมบัติทางเคมี อันเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์

ฟีนอลออกซิเดส (phenol oxidase) คือ กลุ่มเอนไซม์ที่ผลิตโดยไวท์รอท ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันในการย่อยสลายลิกนิน ประกอบด้วยเอนไซม์สำคัญ 3 ชนิด คือ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase; LiP; EC 1.11.1.14) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase; MnP; EC.1.11.1.13) และแลคเคส (laccase; LAC; EC.1.10.3.2) (Leonowicz et al.,1999) โดยเฉพาะลิกนินเปอร์ออกซิเดส ซึ่งไวท์รอทสร้างและขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ในช่วงทุติยภูมิ (secondary phase) ของการเจริญเติบโตมีส่วนร่วมต่อการย่อยลิกนินได้โดยตรง โดยสามารถย่อยองค์ประกอบของลิกนินทั้งส่วนที่เป็นหมู่ ฟีนอลและไม่ใช่หมู่ฟีนอล (Kirk and Jeffries, 1996) ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่สำคัญหลายชนิด

ลิกนินเปอร์ออกซิเดส พบเป็นครั้งแรกในไวท์รอท *Phanerochaete chrysosporium* (Tien and Kirk, 1983) จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ในไวท์รอทหลายชนิด เช่น *Phlebia radiata* (Vares, Kalsi, and Hatakka, 1995) *Trametes versicolor* (Nishida et al.,1996) *Bjerkandera* sp. (Hare et al., 1998) โดยมีผลพลอยได้ที่สำคัญในการลดต้นทุนการผลิตในอุตสาหกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงประสิทธิภาพของกระบวนการและผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพได้

อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษนับว่ามีความสำคัญมากในปัจจุบัน เพราะมนุษย์มีความจำเป็นต้องใช้กระดาษเป็นปัจจัยพื้นฐานในชีวิตประจำวัน จึงทำให้มีปริมาณการใช้งานเพิ่มมากขึ้นทุกปี กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษส่วนใหญ่ใช้วิธีฟอกทางเคมีด้วยการใช้คลอรีนเข้าทำปฏิกิริยากับลิกนินในเยื่อ ก่อให้เกิดสารพิษคือ คลอโรลิกนิน (chlorolignin) หรือ คลอโรฟีนอลิก (chlorophenolic) ซึ่งอาจเป็นสารก่อมะเร็ง(Leatham,1992) ดังนั้นเพื่อลดปัญหาที่เกิดขึ้น ในหลายประเทศจึงได้มีการค้นคว้าวิจัยหาวิธีการลดปริมาณการใช้สารเคมีในการฟอกเยื่อกระดาษให้น้อยลง

แม้ว่าการนำเอนไซม์จากเชื้อรามาใช้มีข้อเสียคือ มีต้นทุนสูง เนื่องจากเอนไซม์และเทคโนโลยีในการผลิตล้วนแล้วแต่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศแทบทั้งสิ้น แต่การใช้เอนไซม์จากเชื้อราในกระบวนการฟอกหรือก่อนกระบวนการฟอกก็ยังเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เพราะนอกจากจะช่วยลดพลังงานที่ใช้ในการผลิต (Akhtar, Kirk, and Blanchette, 1996) ช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีแล้วยังช่วยส่งเสริมการรักษาสภาพแวดล้อมได้อีกด้วย (Garg and Modi, 1999) ซึ่งงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิต ลิกนินเปอร์ออกซิเดส จากรากลุ่มไวท์รอทที่คัดแยกได้ในธรรมชาติ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคโนโลยีด้านเอนไซม์ในประเทศไทย ซึ่งผลิตขึ้นเองมาใช้ประโยชน์อีกทั้งยังเป็นทางเลือกหนึ่งของการฟอกเยื่อด้วยวิธีทางชีวภาพเพื่อลดการใช้สารเคมีในการฟอกเยื่อกระดาษ จึงทำให้ลดมลภาวะในสิ่งแวดล้อมได้

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ของ *Phanerchaete chrysosporium Ganoderma lucidum Ganoderma* sp. และ *Schizophyllum commune* เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้ฟอกเยื่อกระดาษ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการนำเชื้อราหรือเอนไซม์จากเชื้อราไปใช้ในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษ ซึ่งถือเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคโนโลยีการฟอกเยื่อโดยวิธีทางชีวภาพในประเทศไทย และช่วยให้เข้าใจในกระบวนการย่อยสลายลิกนินด้วยเอนไซม์หรือเอนไซม์จากเชื้อรามากขึ้น

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส จากเห็ดราจำพวกไวท์รอท 4 สายพันธุ์ คือ *Phanerchaete chrysosporium Ganoderma lucidum Ganoderma* sp. และ *Schizophyllum commune* โดยทดสอบหาภาวะความเป็นกรด-ด่าง(pH) และอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพด้วยการหาความเสถียร (stability) ของเอนไซม์ในภาวะ pH และอุณหภูมิต่างๆ จากนั้นนำไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการกรองด้วย ultra filtration นอกจากนี้ยังทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ได้ด้วยการฟอกเยื่อกระดาษ จากนั้นทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของเยื่อและกระดาษที่ผ่านการฟอก ด้วยการตรวจวัดค่าความขาวสว่าง (brightness) ค่าคัปปานัมเบอร์ (kappa number) วัดค่าแรงดันทะลุ (burst index) ค่าแรงฉีกขาด (tear index) รวมถึงค่าความต้านทานแรงดึง (tensile index) ของเยื่อและกระดาษที่ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

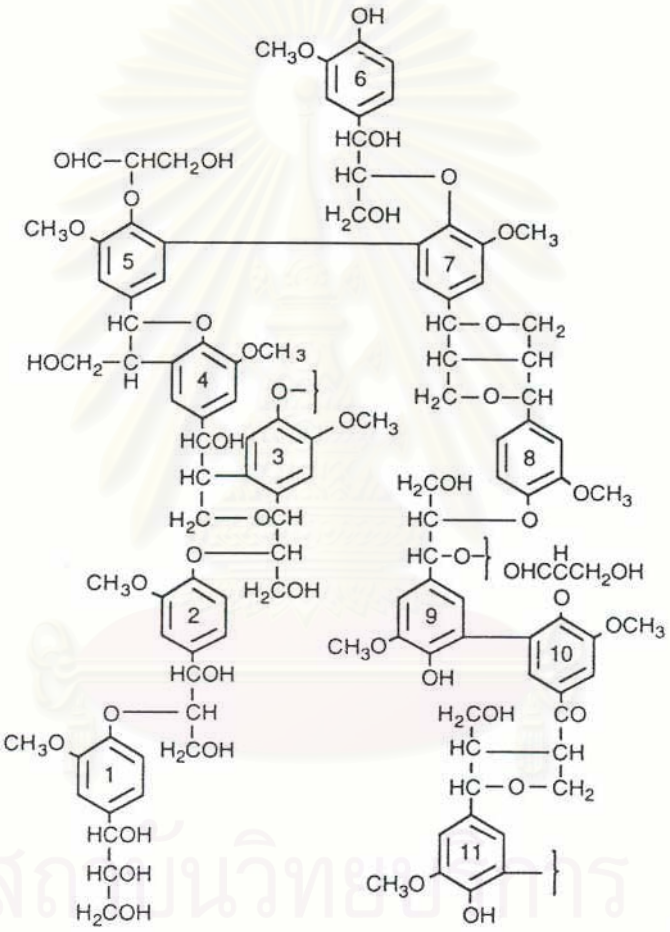
ตรวจเอกสาร

ผนังเซลล์พืชประกอบด้วยสารจำพวกลิกโนเซลลูโลสซึ่งจับกันแน่นด้วยโครงสร้างผลึกที่ซับซ้อนและแข็งแรงขององค์ประกอบหลัก 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน โดยมีลิกนินทำหน้าที่เป็นกาวเชื่อมต่อ ช่วยให้โครงสร้างคงรูปอยู่ได้และป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ ซึ่งเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่พบมากที่สุดในเซลล์พืช ประมาณ 40–45% ของน้ำหนักแห้ง มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4 ไกลโคซิดิก มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและมักพบรวมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตสหรือเฮกโซส ประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์หลายชนิดมาเชื่อมต่อกัน เช่น เพนโตแซน เฮกโซแซน และโพลียูโรไนด์

ลิกนิน

ลิกนินเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากเป็นอันดับ 2 รองจากเซลลูโลส และเป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ที่มีมากที่สุด สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้โดยเป็นตัวกลางสำคัญของวัฏจักรคาร์บอน (Griffin, 1994) ลิกนินมาจากคำว่า lignum ซึ่งเป็นคำในภาษาละติน แปลว่า ไม้ โครงสร้างของลิกนินประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ phenyl propane ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ C-O-C หรือ C-C ซึ่งจะจับประสานกันเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ ในลักษณะ 3 มิติ ที่มีกิ่งก้านจำนวนมาก (ภาพที่ 1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



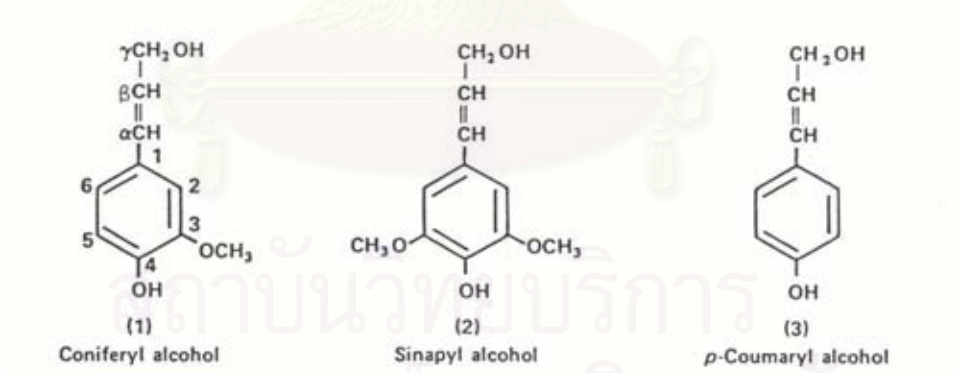
ภาพที่ 1 แบบจำลองโมเลกุลลิกนินของไม้เนื้ออ่อน (Griffin, 1994)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระบวนการสังเคราะห์ลิกนิน

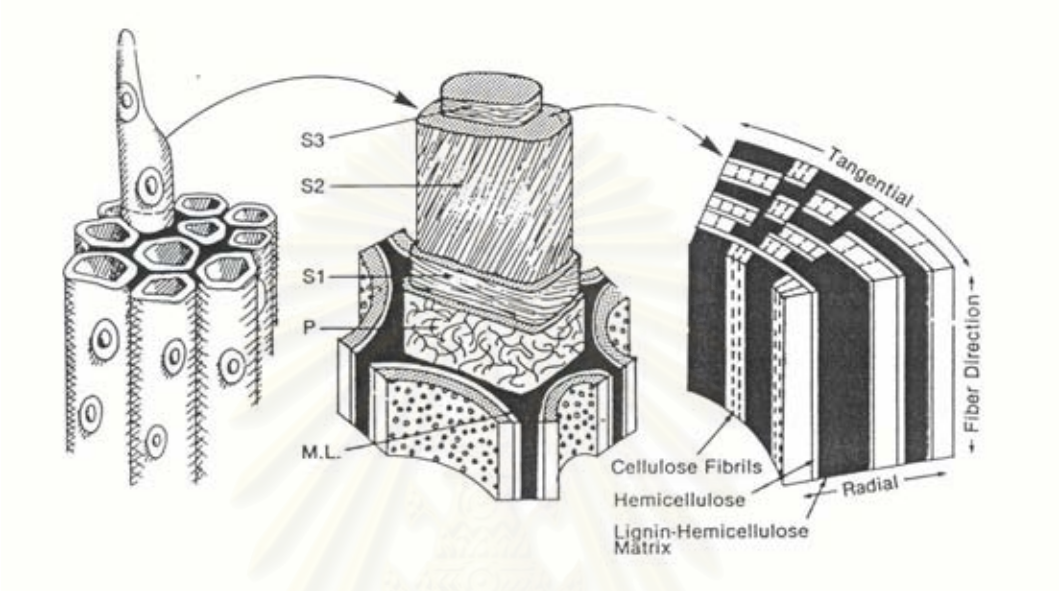
การสังเคราะห์ลิกนินในธรรมชาติเกิดจากการจับกันแบบสุ่มของ phenyl propanoid precursors 3 ชนิด (ภาพที่ 2) ซึ่งแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันตรงจำนวนของ methoxyl groups ในวงแหวนอะโรมาติก จึงทำให้เนื้อไม้ของพืชแต่ละชนิดมีองค์ประกอบของลิกนินที่ต่างกัน (Reid, 1995) คือ

1. softwood lignin ประกอบด้วย guaiacyl (monomethoxyl) units เป็นส่วนใหญ่
2. hardwood lignin ประกอบด้วย guaiacyl และ syringyl (dimethoxyl) units ในอัตราส่วนใกล้เคียงกัน
3. grass lignin ประกอบด้วย p-hydroxyphenyl (no methoxyl) units ในอัตราส่วนเท่าๆ กันกับ guaiacyl และ syringyl



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ phenyl propanoid precursors ของลิกนิน (Buswell, 1991)

ลิกนินที่พบในเนื้อไม้ประมาณ 70-90% เกิดขึ้นในส่วนผนังเซลล์ปฐมภูมิและทุติยภูมิ และพบในมิดเดิลลาเมลลาประมาณ 10-30% (Boominathan and Reddy, 1991) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของเนื้อไม้ (Buswell, 1991)

ลิกนินจะทำหน้าที่เชื่อมต่อกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะโควาเลนต์ เกิดเป็นสารประกอบลิกโนเซลลูโลสที่มีกิ่งก้านสาขามากมาย มีโมเลกุลขนาดใหญ่ตั้งแต่ 600,000-1,000,000 ดาลตัน (Kirk and Farrell, 1987) นอกจากนี้ลิกนินยังเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำจึงทำให้กระบวนการย่อยสลายลิกนินเกิดขึ้นได้ช้า ด้วยเหตุนี้เองการศึกษาเพื่อหาวิธีในการย่อยสลายลิกนินออกจากวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลสจึงเป็นประโยชน์ต่อการนำเอาเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสไปใช้ในทางอุตสาหกรรมได้

การย่อยสลายลิกนินด้วยกระบวนการทางกายภาพ

การย่อยสลายลิกนินออกจากวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส เช่น ไม้ ฟางข้าว และชานอ้อย อาจทำได้โดยการใช้อุณหภูมิสูง หรือการใช้สารเคมีจำพวกกรดและด่าง แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะมีความรุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง และจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กซึ่งเกิดจากการแตกตัวของลิกนินเท่านั้น ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะเริ่มต้นด้วยการให้อุณหภูมิและความดันสูงในช่วงต้น โดยอุณหภูมิที่ใช้ควรอยู่ระหว่าง 185-240°เซลเซียส ซึ่งจะทำให้วัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลสอ่อนตัวลง จากนั้นลดความดันลงให้เหลือเท่าความดันบรรยากาศ จะทำให้ mechanical forces ต่ำลง ซึ่งจะเป็นการเพิ่ม degree of polymerization

ของลิกนิน ไซแลน และเซลลูโลส จากนั้นจึงสกัดเอา ลิกนินออกด้วยไอน้ำและตัวทำละลาย เช่น น้ำ แอลกอฮอล์ และ strong solvent อื่นๆ ซึ่งลิกนินที่สกัดได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น thermoplastic ลิกนินและอนุพันธ์ของลิกนินสามารถแบ่งออกตามคุณสมบัติการละลายได้เป็น 3 กลุ่ม ดังตาราง

ตารางที่ 1 ประเภทของลิกนินแบ่งตามคุณสมบัติการละลาย

กลุ่ม	ชนิดตัวทำละลาย		
	น้ำ	alkaline solution	organic solvents
I	+	+	+
II	-	+	+
III	-	-	-

ลิกนินส่วนใหญ่สามารถละลายน้ำได้ ยกเว้นพวก lignosulfonic acids ซึ่งมีความเป็นกรดและมี hydrophilic functional groups สูง (กลุ่ม I) ลิกนินบางประเภทไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ใน water alkaline solution (กลุ่ม II) เรียกว่า alkali lignins ซึ่งแยกได้จากไม้ด้วยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ นอกจากนี้สามารถใช้กระบวนการ oxidation nitration หรือ halogenation เพื่อสกัดลิกนินออกมาได้ ซึ่งการสกัดแยกลิกนินด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ สามารถแยกได้เฉพาะส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ เท่านั้น

ลิกนินบางชนิดไม่มีคุณสมบัติในการละลายในสารใดๆ เลย (กลุ่ม III) จึงต้องใช้กระบวนการ hydrolysis แยกออกจากพืช ด้วยการใช้กรด เรียกลิกนินเหล่านี้ว่า Klason lignin หรือ Hydrolysis lignins เป็นต้น ซึ่งลิกนินชนิดนี้จะมีรูปร่าง 3 มิติ มีพอลิเมอร์ที่จับกันอย่างเหนียวแน่น จึงทำให้มีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง

การสกัดลิกนินด้วยกระบวนการทางกายภาพทำให้เกิดการสูญเสียของวัสดุจำพวก ลิกโนเซลลูโลสขึ้นเมื่อวัสดุแห้งภายหลังจากกระบวนการเสร็จสิ้น เนื่องจากในกระบวนการต้องบดวัตถุดิบให้มีความละเอียดในระดับหนึ่งเพื่อให้สารเคมีเข้าทำปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้น เมื่อผ่านกระบวนการหลายๆ ขั้นตอน โอกาสในการสูญเสียไปตามขั้นตอนต่างๆ จึงเกิดได้ง่าย นอกจากนี้การละลายเอาลิกนินออกจำเป็นต้องใช้สารเคมีและพื้นที่ในการทำปฏิกิริยามาก โดยใช้อัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อสารเคมีประมาณ 1 ต่อ 10 เพราะโมเลกุลของ ลิกนินมีความซับซ้อนจึงทำให้มีพื้นที่ภายในโครงสร้างมาก เป็นผลให้คุณสมบัติในการดูดซับอากาศและของเหลวสูง ดังนั้นเมื่อทำการสกัดลิกนินออกจึงต้องใช้ระบบปรับความดัน

และใช้ปริมาณของสารเคมีมากเพื่อให้เข้าทำปฏิกิริยาได้อย่างทั่วถึง เป็นเหตุให้การสกัดลิกนินด้วยวิธีทางกายภาพจึงเป็นการสิ้นเปลืองทั้งพลังงาน ค่าใช้จ่ายและกระบวนการก็ยุ่งยากด้วย (Zakis, 1994)

การย่อยสลายลิกนินด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

เห็ดราที่ย่อยสลายเนื้อไม้ได้ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes และมีบางส่วนอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes สามารถจำแนกชนิดของเห็ดราตามลักษณะการย่อยสลายได้เป็น 3 ชนิด (Buswell, 1991) คือ

1. soft rot fungi ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเนื้อไม้ในส่วนที่เป็นพอลิแซคคาไรด์ มักพบในบริเวณชื้นแฉะ
2. brown rot fungi ทำหน้าที่ย่อยสลายพอลิแซคคาไรด์ทั้งที่เป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ภายหลังจากการย่อยสลายจะทำให้เนื้อไม้มีสีเข้มขึ้น
3. white rot fungi ทำหน้าที่ในการย่อยสลายองค์ประกอบหลักของเนื้อไม้ทั้งหมด และภายหลังจากการย่อยสลายแล้วจะทำให้เนื้อไม้มีสีขาวขึ้น ซึ่งไวท์รอทแต่ละชนิดเลือกที่จะย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชต่างๆ กัน บางชนิดเลือกย่อยเฉพาะเซลลูโลสและ เฮมิเซลลูโลสก่อนแล้วย่อยลิกนินเป็นลำดับสุดท้าย แต่บางชนิดเลือกที่จะย่อยสลายส่วนต่างๆ ไปพร้อมๆ กัน การเลือกที่จะย่อยสลายลิกนินของไวท์รอทจึงเป็นแนวทางการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ (Boominathan and Reddy, 1991)

การย่อยสลายลิกนินด้วยเอนไซม์

กระบวนการย่อยสลายลิกนินของไวท์รอทเกิดจากการทำงานของเอนไซม์พวกฟีนอลออกซิเดส เช่น ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แลคเคส และ veratryl alcohol oxidase ที่ไวท์รอทสร้างขึ้นในช่วงทุติยภูมิของช่วงชีวิต ปัจจุบันพบว่าไวท์รอทหลายชนิดผลิตเอนไซม์จำพวก ฟีนอลออกซิเดสได้ (ตารางที่ 2) การย่อยสลายลิกนินด้วยเอนไซม์มีข้อดีหลายประการ (พัชรา วีระกะลัส, 2543) คือ แม้ปริมาณของเอนไซม์จะน้อยแต่ก็สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเอนไซม์จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเมื่อทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาแล้ว นอกจากนี้เอนไซม์ยังเป็นตัวเร่งที่มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพ และท้ายสุดเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสายพันธุ์ไวท์รอทที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Eggert et al., 1996)

ชนิดไวท์รอท	Lip	MnP	Lac
Bjerkandera sp.	-	+	+
Bjerkandera adusta (Poluporus adustus)	+	-	-
Ceriporiopsis subvermispora	-	+	+
Cyathus stercoreus	-	+	+
Ganoderma colossum	-	+	+
Ganoderma lucidum	-	+	+
Ganoderma voleciocum	-	+	+
Lentinus (Lentinula) edodes	-	+	+
Perenniporia medulla-panis	-	+	-
Phlebia brevispora	+	+	+
Phlebia radiata	+	+	+
Phanerochaete chrysosporium	+	+	+
Phanerochaete sordida	-	+	-
Pleurotus ostreatus	+	+	+
Pleurotus sapidus	+	+	+
Pycnoporus cinnabarinus	-	-	+
Trametes cingulata	+	+	+
Trametes giggosa	+	+	+
Trametes hirsutua	+	+	+
Trametes versicolor	+	+	+
Trametes villosa	-	+	+

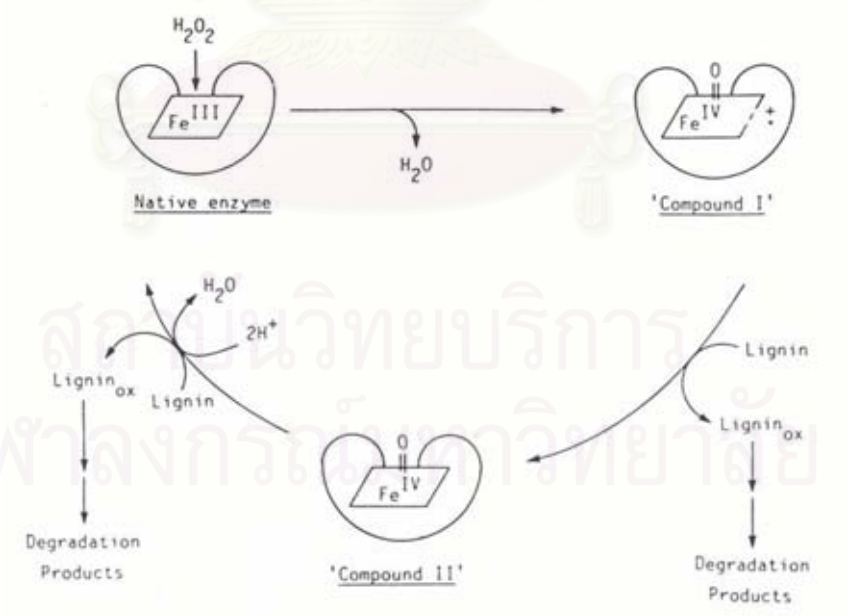
หมายเหตุ + พบเอนไซม์

- ไม่พบเอนไซม์

คุณสมบัติของลิกนินเปอร์ออกซิเดส

ลิกนินเปอร์ออกซิเดส คือเอนไซม์ชนิดออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductase) ซึ่งเร่ง ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นหรือรีดักชั่น ไวท์รอทสร้างและขับลิกนินเปอร์ออกซิเดสออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) พบครั้งแรกใน *Phanerchaete chrysosporium* (Glenn et al., 1983; Tien and Kirk, 1983) ลิกนินเปอร์ออกซิเดส มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 41,000 - 42,000 ดาลตัน ต้องการไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อเริ่มต้นในปฏิกิริยาการย่อยสลายลิกนิน (Buswell, 1991) ลิกนินเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสูง (Cai and Tien, 1993) โดยสามารถย่อยสลายได้ทั้งสารที่เป็นหมู่ฟีนอลและไม่ใช่หมู่ฟีนอล รวมถึงสารประกอบอะโรมาติกอื่นๆ ซึ่งเป็นหน่วยพื้นฐานของลิกนินได้ (Hammel, 1997)

กลไกการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นเมื่อลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเปลี่ยนรูปไปเป็นสารตัวกลาง compound I (two-electron oxidized form) ซึ่งเป็นสารที่ไม่คงตัว แล้วเปลี่ยนรูปไปเป็น compound II (one-electron oxidized form) และท้ายที่สุด compound II ก็จะกลับสู่ภาวะปกติ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 วัฏจักรการย่อยสลายลิกนินด้วยลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Buswell, 1991)

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดส

Faison และ Kirk (1985) ผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสจาก *Phanerochaete chrysosporium* ในอาหารสูตรจำกัดไนโตรเจนและคาร์โบไฮเดรต พบว่าช่วยกระตุ้นให้เกิดการสร้างลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้มากกว่าในสูตรที่มีแหล่งอาหารมากเกินพอ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นตัวชักนำให้มีการสร้างลิกนินเปอร์ออกซิเดส ซึ่ง Tien Kersten และ Kirk (1987) พบว่า ไวท์รอทจะใช้ไนโตรเจนเพื่อสร้างกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและผลิต compound I ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 0.5 กรัมต่อลิตร แอคติวิตีของเอนไซม์กลับลดต่ำลง (Fiechter, 1993) Hammel และคณะ (1993) พบว่าการย่อยสลายลิกนินของ *P. chrysosporium* จะเริ่มต้นเมื่อมีการผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดส โดยในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจะเข้าไปสลายพันธะ Cα และ Cβ ของสาย propyl ทำให้ได้ benzylic aldehydes ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและไม่ละลายน้ำเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งสอดคล้องกันกับการทดลองของ Higuchi (1993) ที่กล่าวว่า การสลายลิกนิน ของฟีนอลออกซิเดสที่ได้จาก *P. chrysosporium* และ *Coriolus versicolor* จะมี 3,4-dimethoxy benzyl alcohol ทำหน้าที่เป็นตัวกลางช่วยให้เกิดปฏิกิริยาและป้องกันกลไกให้ดำเนินต่อไปได้ ซึ่งการศึกษาจลนศาสตร์ของการย่อยสลาย 3,4-dimethoxy benzyl alcohol โดยลิกนินเปอร์ออกซิเดส ที่ได้จาก *P. chrysosporium* พบว่า pKa ประมาณ 3.1 เป็น ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่ pH 2 แม้ว่าจะให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดแต่เอนไซม์ที่ได้กลับมีความเสถียรต่ำ และแอคติวิตีจะลดลงและมีค่าใกล้ศูนย์เมื่อ pH เพิ่มขึ้นเป็น 5 (Tien et al., 1986) เช่นเดียวกับผลการทดลองที่ได้จาก Hare และคณะ (1997) ซึ่งพบว่า *Bjerkandera* sp. สายพันธุ์ BOS55 ผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์อย่างน้อย 7 ชนิดที่สามารถทำงานได้ดีที่pH 3 ซึ่งแอคติวิตีจะลดลงเมื่อ pH สูงขึ้น แม้ว่าในภาวะปกติเชื้อราจะเจริญได้ดีที่ pH 5.0 – 6.5 จึงทำให้ทราบว่าลิกนินเปอร์ออกซิเดสสามารถทำงานได้ดีในช่วง pH กว้าง Rodrigues และคณะ (1999) ได้ศึกษาภาวะการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินของ *P. chrysosporium* BKM-F-1767 (ATCC 24725) ในอาหารที่เติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ฟองน้ำและโฟมเป็นตัวยึดเกาะ พบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสได้

มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนิน โดยใช้วัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส Vares Kalsi และ Hatakka (1995) ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจาก *Phleabia radiata* ในภาวะ solid state โดยใช้เศษวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส คือ ฟางข้าวสาลี เปรียบเทียบกับอาหารเหลวที่เติมกลูโคสและจำกัดปริมาณไนโตรเจน พบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์

ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แลคเคส และ glyoxal oxidase ได้ ในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง แต่มีการแสดงออกต่างกันเมื่อตรวจสอบด้วยการวัดแอคติวิตี โดยในอาหารที่ใช้ฟางข้าวสาลี พบเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ต่างกัน 3 ชนิด แต่พบลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ต่างไอโซไซม์กันในอาหารเหลวที่เติมกลูโคสและมีปริมาณไนโตรเจนจำกัด 4 ชนิด แม้ว่าปริมาณที่พบจะน้อยกว่าก็ตาม Zacchi และคณะ (2000) ศึกษาและทดสอบการผลิตเอนไซม์ของไวท์รอท *P. chrysosporium* โดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลวที่เขย่าอย่างต่อเนื่องในภาวะ submerged โดยไม่มีการจำกัดสับสเตรตหรือจำกัดการเติมออกซิเจนหรือ surfactant ซึ่งเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้โดยมีแอคติวิตี 0.2–0.4 Uต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของเส้นใยที่อยู่ในอาหารซึ่งมีเซลลูโลสกับในอาหารที่ไม่มีกลูโคส ซึ่งเชื้อรายังได้สร้างสารจำพวกพอลิแซคคาไรด์ออกมา เพื่อตอบสนองต่อภาวะความเครียด (stress) ในอาหารที่ไม่มีกลูโคส ซึ่งสารพอลิแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นทำให้การไหลเวียนของออกซิเจนอยู่ในสภาพจำกัด ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการชักนำให้ผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

การประยุกต์ใช้เอนไซม์ในทางอุตสาหกรรม

อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษได้ให้ความสนใจและสนับสนุนการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการกำจัดลิกนินเป็นอย่างมาก เนื่องจากการผลิตกระดาษจำเป็นต้องใช้สารเคมีและพลังงานซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองและทำให้ต้นทุนการผลิตสูง การฟอกเยื่อกระดาษด้วยวิธีการทางชีวภาพจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจ เนื่องจากการฟอกเยื่อกระดาษด้วยวิธีการทางชีวภาพช่วยให้ปริมาณลิกนินในเยื่อลดลงได้ (Nishida et al., 1993) จึงทำให้ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นกว่า 80% ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลง (Kondo et al., 1996) ช่วยลดปริมาณการใช้พลังงานไฟฟ้าได้มากถึง 30% และยังทำให้เยื่อที่ได้มีคุณภาพดีขึ้น (Akhtar, Kirk, and Blanchette, 1996)

Shan และ Nerud (2002) รายงานว่า สารก่อมะเร็ง เช่น benzidine และสารประกอบ อะโรมาติก ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการ bio-physico-chemical transformation ในโรงงานอุตสาหกรรมจะทำให้น้ำที่ผ่านกระบวนการออกมามีสีเข้มและมีคุณภาพต่ำ การลดสีและบำบัดน้ำเสียด้วยเอนไซม์ เป็น secondary metabolic activity ของเห็ดราที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ ซึ่งในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ ใช้การฟอกเยื่อกระดาษด้วยสารเคมีจะทำให้ลิกนินที่หลุดออกจับตัวกันกับคลอรีนที่ใช้เกิดเป็นสารพิษจำพวกคลอโรลิกนินและคลอโรฟีนอลิคขึ้น ซึ่งเอนไซม์จากไวท์รอท สามารถลดสีและบำบัดน้ำเสียให้มีคุณภาพดีขึ้น (Presnell et al., 1995)

Wang Woodward และ Kaufman (1998) ได้ทำการศึกษาและรายงานว่า เมื่อใช้เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตจาก *P. chrysosporium* ที่กระตุ้นการทำงานด้วย acetonitrile พบว่า ลิกนินเปอร์ออกซิเดส สามารถย่อยสลาย pentachlorophenol (PCP) ซึ่งเป็นสารปนเปื้อนในแหล่งน้ำ โดยสามารถทำงานได้ 100% และสามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ได้

แม้ว่ากระบวนการกำจัดลิกนินทั้งในขั้นตอนการฟอกเยื่อและการบำบัดน้ำเสียด้วยการใช้เอนไซม์จากไวท์รอทได้มีการริเริ่มและใช้งานแล้วในสหรัฐอเมริกาและแคนาดา แต่ก็ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก นอกจากนี้ยังมีอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการนำวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลสไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ซึ่งต้องการกำจัดลิกนินออกจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเพื่อนำเอาวัสดุได้ไปใช้ในกระบวนการหมัก เป็นต้น

การศึกษาถึงความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการย่อยสลายลิกนินในสภาพธรรมชาติ กล่าวคือ ลิกนินในเนื้อไม้หายไปจะทำให้เนื้อไม้มีสีขาวขึ้น ประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงจึงน่าจะได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ของเห็ดราไวท์รอทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินได้เพื่อพัฒนาสายพันธุ์เห็ดราและใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการใช้วัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส จึงน่าจะเป็นแนวทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและควรให้การสนับสนุนและทำการวิจัยต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ larminar flow
2. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น U4600P (Sartorius, Germany)
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC205 (Denver Instrument Company, USA.)
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical, Sartorius, Germany)
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น 8453 (Hewlett Packard)
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น NovaSpec 4049 (LKB Biochrom, England)
7. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น G25 (Grant Instrument Ltd., Cambridge, England)
8. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) (Lab-Line)
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Universal 16 (Hettich, Germany)
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น E5EA (OMROM)
11. เครื่องกรอง Ultrafiltration ชนิด 10,000 NMWL (Millipore Corporation, Bedford, USA.)
12. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Steam Sterilizer/Autoclave) (Ta Chang Medical Instrument Factory, Taiching, Taiwan)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Servall refrigerated-automatic) (Ivan Servall, INC., Norwalk, Connecticut, U.S.A.)
14. ตู้อบความร้อนสูง (hot air oven) รุ่น U50 790,387 (Memmert)
15. ตู้อบ (oven) (Clayson, New Zealand)
16. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ion analyzer 255 (Corning, USA.)
17. เครื่องทำอุณหภูมิสูง (heating block) รุ่น DB101 (HL Instrument, Thailand)
18. เครื่องกระจายเยื่อ (Mavis engineering Ltd., London, England)
19. เครื่องวัดค่าความขาวสว่าง Elrepho 2000 (Datacolor Ltd., Switzerland)
20. เครื่องวัดแรงฉีกขาด (Appita Elmendorf, Amityville, Newyork, USA.)
21. เครื่องวัดแรงดันทะลุ (Testing machine Inc., Amityville, Newyork, USA.)
22. เครื่องวัดความต้านทานแรงดึงแบบ pendulum (Toyoseiki Tyoseisaka-SHO.Ltd., Tokyo, Japan)

เคมีภัณฑ์สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. วุ้นผง ตรานางเงือก (พัฒนสินเอนเตอร์ไพรส์, กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย)
2. ดี-กลูโคส (D-glucose) (Sigma Chemical, St. Louis, MO. USA.)
3. แอสพาราจีน (L-Asparagine Monohydrate) (Sigma Chemical, St. Louis, MO. USA.)
4. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) (Merck, Darmstadt)
5. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Scharlau Chemic, Barcelona, Spain)
6. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSo_4$) (Carlo Erba, Milan, Italy)
7. กรดฟูมาริค (Fumaric acid) (MAY & BAKER LTD. Ltd., Dagenham, England)
8. เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) (MAY & BAKER LTD. Ltd., Dagenham, England)
9. ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) (MAY & BAKER LTD. Ltd., Dagenham, England)
10. แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) (Merck, Darmstadt)
11. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Carlo Erba, Milan, Italy)
12. Guaiacol (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA.)
13. เยื่อกระดาษยูคาลิปตัสจากบริษัทสยามเซลลูโลส จำกัด ตำบลวังศาลา อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี

เคมีภัณฑ์สำหรับวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Merck, Darmstadt)

โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต ($COOK(CHOH)_2CooNa.4H_2O$)

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) (Carlo Erba, Milan, Italy)

Veratryl alcohol (3,4-dimethoxy benzyl alcohol) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA.)

2,6-Dimethoxyphenol (MAY & BAKER LTD. Ltd., Dagenham, England)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) (MAY & BAKER LTD. Ltd., Dagenham, England)

เคมีภัณฑ์สำหรับการเตรียมบัฟเฟอร์

1. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.2H_2O$) (Fluka)
2. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (Carlo Erba, Milan, Italy)
3 โซเดียมทาร์เทรต (Sodium tatrate) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA.)

4. กรดทาร์ทาริค (Tartaric acid) (MAY & BAKER LTD. Ltd., Dagenham, England)

เคมีภัณฑ์สำหรับการวัดคัปปานัมเบอร์

1. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) (Carlo Erba, Milan, Italy)
2. โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) (Carlo Erba, Milan, Italy)
3. โปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต ($KMnO_4$) (Carlo Erba, Milan, Italy)
4. กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) (Carlo Erba, Milan, Italy)

เชื้อที่ใช้ในการวิจัย

Phanerchaete chrysosporium Ganoderma sp. และ *Schizophyllum commune* จากห้องปฏิบัติการพฤกษศาสตร์เชิงอุตสาหกรรม ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ganoderma lucidum จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเจริญของเชื้อราไวท์รอท

ทำการเลี้ยงเชื้อราไวท์รอททั้ง 4 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) เป็นระยะเวลานาน 1 สัปดาห์ ตัดชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของเส้นใยบริเวณรอบนอกของโคโลนีที่มีการเจริญดี มีลักษณะเส้นใยแผ่สม่ำเสมอ ด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้กล้าเชื้อมาตรฐาน แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักชิ้นวุ้นจำนวน 2 ชิ้น ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เริ่มต้น เท่ากับ 5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°เซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 30°เซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราได้มีการติดตามการเจริญของเชื้อโดยการเก็บตัวอย่างเชื้อนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยของเส้นใยทุกวันเว้นวัน เป็นเวลา 15 วัน โดยการกรองเส้น

ใยผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ด้วยเครื่องกรองระบบสุญญากาศ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้อบ จนน้ำหนักแห้งของเส้นใยคงที่ ชั่งน้ำหนักแล้วหักลบน้ำหนักกระดาษกรองออก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยมานำเสนอผลในรูปของกราฟเพื่อวิเคราะห์หาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิด จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งและจำนวนวันในการเจริญที่ได้จะนำไปคำนวณหา specific growth rate (ภาคผนวก ข) ซึ่งจะทำให้ได้ช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อราเพื่อนำไปใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป

2. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

2.1 การทดสอบ pH ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

2.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ทำการเลี้ยงเชื้อราไวท์รอททั้ง 4 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยบริเวณรอบนอกของโคโลนีที่มีการเจริญดีและลักษณะเส้นใยแผ่สม่ำเสมอด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตรเพื่อให้ได้กล้าเชื้อมาตรฐาน แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักชิ้นวุ้นจำนวน 5 ชิ้น ย้ายลงเลี้ยงในอาหาร PDB มี pH เริ่มต้น 5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตรโดยผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นทำการบ่มเชื้อไว้ ณ อุณหภูมิ 30°เซลเซียส ในภาวะและระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมต่อการเจริญของแต่ละเชื้อที่ได้ผลมาจากการศึกษาในข้อ 1.

2.1.2 การทดสอบ pH ที่เหมาะสม

เตรียมอาหารสูตร Production ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการฟอก (ภาคผนวก ก) จำนวน 6.25 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ลงไป จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นดังนี้คือ pH 4 pH 5 pH 6 pH 7 และ pH 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 121°เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วจึงใส่หัวเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงไป แล้วบ่มเชื้อในภาวะนิ่ง ณ อุณหภูมิ 30°เซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ทำการเขย่าเชื้อให้กระจายทุกๆ 3 วัน

ในระหว่างการทดสอบ ได้มีการติดตามการผลิตเอนไซม์ของเชื้อโดยการเก็บตัวอย่างของเหลวในวันที่ 3 6 9 12 และ 15 โดยการบีบคั้นเส้นใยและเยื่อกระดาษ

ผ่านผ้าขาวบาง แล้วนำของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงโดยนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4°เซลเซียส เพื่อกำจัดกากตะกอนที่ไม่ต้องการทิ้งไป เก็บส่วนที่เป็นสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ณ ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วนำผลไปคำนวณค่า Unit of enzyme ตามวิธีดัดแปลงของ Tien และ Kirk (1988) (ภาคผนวก ข) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยของหน่วยเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เพื่อหา pH ที่เหมาะสมและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT)

2.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสม

2.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ทำการเลี้ยงเชื้อราไวท์รอท ทั้ง 4 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยบริเวณรอบนอกของโคโลนีที่มีการเจริญดีและลักษณะเส้นใยแผ่สม่ำเสมอด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตรเพื่อให้ได้กล้าเชื้อมาตรฐาน แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักชิ้นวุ้นจำนวน 5 ชิ้น ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสม มี pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ได้จากการศึกษาไว้ในข้อ 2.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร โดยผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทำการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 30°เซลเซียส เป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของแต่ละเชื้อที่ได้ผลมาจากการศึกษาในข้อ 1.

2.2.2 การผลิตเอนไซม์

เตรียมอาหารสูตร Production ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการฟอก (ภาคผนวก ก) จำนวน 6.25 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ลงไป จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 2. ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 121°เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้องแล้วจึงใส่หัวเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อในภาวะนิ่ง ณ อุณหภูมิต่างๆกัน คือ 35 40 และ 45°เซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ทำการเขย่าเชื้อให้กระจายทุกๆ 3 วัน

ในระหว่างการทดสอบได้มีการติดตามการผลิตเอนไซม์ของเชื้อโดยการเก็บตัวอย่างของเหลวในวันที่ 3 6 9 12 และ 15 โดยการบีบคั้นเส้นใยและเยื่อกระดาษผ่านผ้าขาวบาง แล้วนำของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงโดยนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4°เซลเซียส เพื่อกำจัดกากตะกอนที่ไม่ต้องการทิ้งไป เก็บส่วนที่เป็นสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ณ ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วนำผลไปคำนวณค่า Unit of enzyme ตามวิธีดัดแปลงของ Tien และ Kirk (1988) (ภาคผนวก ข) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยของหน่วยเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ซึ่งวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT)

3. การผลิตเอ็นไซม์จากเชื้อรา

ทำการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราไวท์รอท ในภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 2 มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

3.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ทำการเลี้ยงเชื้อราไวท์รอทแต่ละชนิดบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยบริเวณรอบนอกของโคโลนีที่มีการเจริญดีและลักษณะเส้นใยแผ่สม่ำเสมอ ด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้กล้าเชื้อมาตรฐาน แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักชิ้นวุ้นจำนวน 5 ชิ้น ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB มี pH เริ่มต้น 5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทำการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 30°เซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของแต่ละเชื้อซึ่งได้ผลมาจากการศึกษาในข้อ1.

3.2 การผลิตเอนไซม์

เตรียมอาหารสูตร Production ปริมาตร 200 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการฟอก จำนวน 30 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิดที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.1 เขย่าให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 121°เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง

นำหัวเชื้อรา ไวท์รอทแต่ละชนิดที่ได้เตรียมไว้จากข้อ 1 มากรอง ตักเชื้อใส่ลงเยื่อกระดาษที่มีอาหารสูตร Production ซึ่งมี pH ที่เหมาะสมที่เตรียมไว้ข้างต้น ทำในภาวะปลอดเชื้อ เขย่าให้เชื้อกระจายเข้ากันดีกับเยื่อกระดาษ นำไปบ่มไว้ในภาวะนิ่ง ณ อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 2.2 โดยทำการเขย่าเชื้อทุก 3 วัน

เมื่อครบกำหนดการบ่มเชื้อ บีบคั้นเยื่อกระดาษให้ส่วนของเหลวที่อยู่ในเยื่อกระดาษออกมามากที่สุดโดยกรองผ่านผ้าขาวบาง รวบรวมส่วนของเหลวที่ได้ไว้ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°เซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อกำจัดกากตะกอนที่ไม่ต้องการทิ้งไป เก็บส่วนสารละลายใสของเอนไซม์ รวบรวมไว้

4. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

4.1 การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ที่บดละเอียดลงในสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้จากข้อ 3. ซึ่งแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง โดยค่อยๆ เติมพร้อมทั้งคนสารละลายเอนไซม์อย่างช้าๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กจนสารละลายมีความอิ่มตัวที่ 20% 40% 60% และ 80% เมื่ออิ่มตัวแล้วให้คนต่อไปเบาๆ อีก 30 นาที ทิ้งให้สารละลายตกตะกอนในตู้เย็น 1 คืน

เก็บตะกอนที่ได้ในแต่ละครั้งโดยนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4°เซลเซียส นำตะกอนที่ได้ไปละลายในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer) ความเข้มข้น 20 mM pH 5 แล้วเก็บแช่เย็นไว้

นำตะกอนเอนไซม์ที่ได้ไปทำไดอะไลซีส (dialysis) โดยนำถุงไดอะไลซิส (ภาคผนวก ข) มาใส่สารละลายของเอนไซม์ที่ได้ในข้อ 3.2 เพื่อทำการแยกเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากสารละลายเอนไซม์ โดยแช่ถุงที่มีเอนไซม์ไว้ในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 20 mM pH 5 ในบีกเกอร์ซึ่งแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็งและคนด้วยแท่งแม่เหล็กตลอดเวลา ทำการเปลี่ยนสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ทุก 4 ชม. เป็นเวลา 10 ชม. เก็บเอนไซม์ที่ได้ในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ไว้ในตู้เย็น

4.2 การกรองด้วย Ultrafiltration ชนิด 10,000 NMWL

นำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากข้อ 3.2 ใส่ลงในเครื่องกรอง Ultrafiltration (Millipore Corporation, USA.) ที่มี molecular weight cut off 10 kDa จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 4°เซลเซียส 1,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนของตะกอนไว้ เพื่อนำไปตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

5. การทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์

5.1 ทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ในช่วง pH 4-8

นำเอนไซม์ที่ผลิตได้บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่างกันความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้ ทาเทรตบัฟเฟอร์ pH 4 อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0 และ pH 6.0 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 และ pH 8.0 ตรวจสอบความเสถียรของเอนไซม์ที่ได้ด้วยการนำไปตรวจวัดแอคติวิตีที่เหลือ แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) เทียบกับแอคติวิตีที่ให้ค่า แอคติวิตีสูงสุด (relative activity)

5.2 ทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิ 35-45°เซลเซียส

นำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากข้อ 3. มาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ที่เหมาะสมในอุณหภูมิ 35 40 และ 45°เซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วตรวจสอบความเสถียรของเอนไซม์ที่ได้ด้วยการนำไปตรวจวัดแอคติวิตีที่เหลือ แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) เทียบกับ แอคติวิตีที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด (relative activity)

6. การวิเคราะห์เอนไซม์

วิเคราะห์เอนไซม์โดยทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ 4 ชนิด คือ

6.1 เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) โดยนำสารละลายของปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ณ ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วนำผลไปคำนวณค่า Unit of enzyme ตามวิธีดัดแปลงของ Tien และ Kirk (1988) (ภาคผนวก ข)

6.2 แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) โดยนำสารละลายของปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ณ ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร แล้วนำผลไปคำนวณค่า Unit of enzyme ตามวิธีของ Watanabe และคณะ (2001) (ภาคผนวก ข)

6.3 แลคเคส (Lac) โดยนำสารละลายของปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ณ ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร แล้วนำผลไปคำนวณค่า Unit of enzyme ตามวิธีของ Watanabe และคณะ (2001)

6.4 veratryl alcohol oxidase (VAO) โดยนำสารละลายของปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ณ ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วนำผลไปคำนวณค่า Unit of enzyme ตามวิธีของ Presnell และคณะ (1995) (ภาคผนวก ข)

7. การฟอกและวิเคราะห์คุณสมบัติเยื่อกระดาษ

7.1 การฟอกเยื่อกระดาษ

ทำการทดลอง 2 ชุด เพื่อเปรียบเทียบ คือ ชุดควบคุมเป็นเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสที่ไม่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์และเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสที่ฟอกด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราไวท์รอท โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 12.5 IU ต่อกรัมแห้งของเยื่อกระดาษ แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิระหว่าง 45-50°เซลเซียสนาน 90 นาที จากนั้นนำเยื่อกระดาษมากรองแล้วล้างเยื่อกระดาษด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้งและผึ่งลมให้แห้ง

7.2 ตรวจสอบคุณสมบัติของกระดาษ

นำเยื่อกระดาษในข้อ 7.1 ไปทำการขึ้นแผ่น (handsheet) ตามวิธีการของ TAPPI T205 sp-95 (TAPPI, 1995) แล้วนำไปตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ ตามวิธีการของ TAPPI

7.2.1 วัดค่าความขาวสว่าง (Brightness T452 om-92) (TAPPI, 1995) แสดงถึงความขาวของกระดาษ ซึ่งจะใช้ในการระบุคุณสมบัติของเยื่อหรือบอกผลของการฟอกเยื่อ

7.2.2 ทดสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ (Freeness T227 om-94) (TAPPI, 1995) ทำให้ทราบความแข็งแรงของเยื่อ ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของเยื่อ

7.2.3 ทดสอบคัปปานัมเบอร์ (Kappa number T236 cm-85) (TAPPI, 1995) ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ปริมาณลิกนินที่เหลือในเยื่อ

7.2.4 ทดสอบความต้านทานแรงฉีกขาดของกระดาษ (Tearing strength T414 om-88) (TAPPI, 1995) ซึ่งการฉีกขาด เริ่มจากรอยตัดนำด้วยแรงดึงที่กระทำในระนาบเดียวกับกระดาษ

7.2.5 ทดสอบความต้านทานแรงดันทะลุ (Bursting strength T403 om-91) (TAPPI, 1995) เพื่อบ่งบอกการยืดเหนี่ยวระหว่างเส้นใยและการยืดตัวของกระดาษ

7.2.6 ทดสอบความต้านทานแรงดึง (Tensile strength T404 cm-92) (TAPPI, 1995) ของแผ่นเยื่อหรือกระดาษ ซึ่งเป็นค่าความยาวของกระดาษที่ยาวมากพอจนทำให้กระดาษขาดโดยน้ำหนักของกระดาษเองเมื่อแขวนในแนวดิ่ง

โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบของเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์กับค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบของเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วจึงนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT)

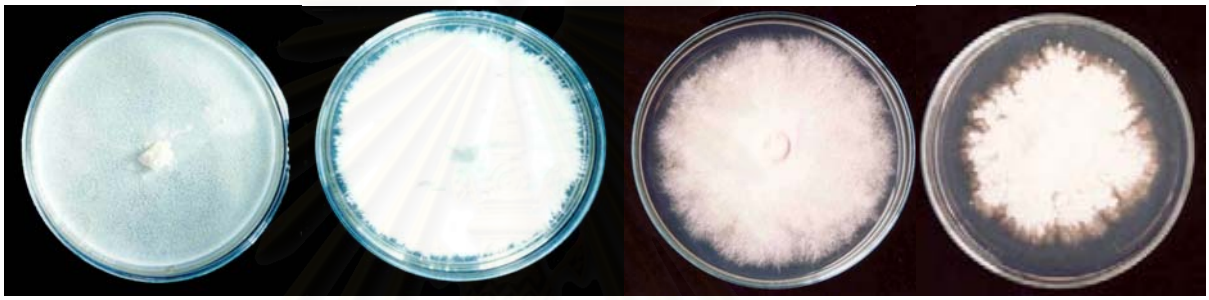
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ศึกษาการเจริญของเชื้อราไวท์รอท

เชื้อที่ใช้ในการวิจัยมี 4 สายพันธุ์ คือ *Phanerchaete chrysosporium Ganoderma lucidum Ganoderma* sp. และ *Schizophyllum commune* (ภาพที่ 5)

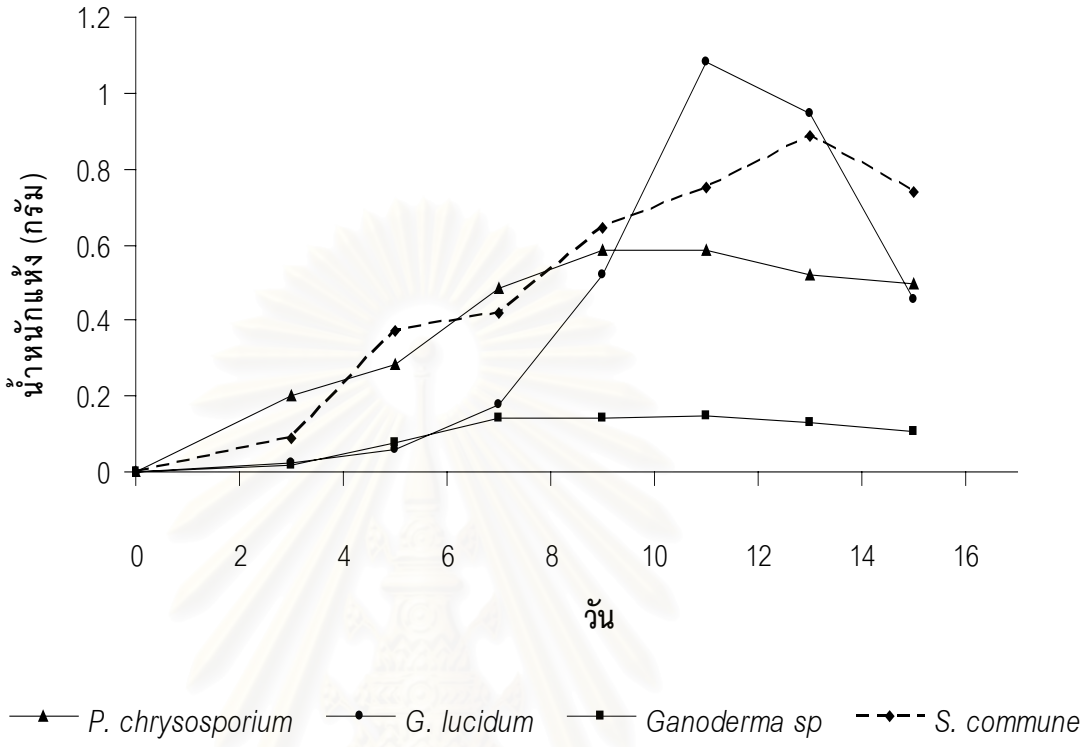


(A) (B) (C) (D)

ภาพที่ 5 เชื้อราไวท์รอท *P. Chrysosporium* (A) *G. Lucidum* (B) *Ganoderma* sp. (C) และ *S. commune* (D)

เมื่อนำข้อมูลจากผลการเจริญเติบโตของไวท์รอททั้ง 4 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร PDB มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเส้นใย ณ วันต่างๆ พบว่า

P. chrysosporium มีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นจนคงที่ในวันที่ 9 - 11 ซึ่งเป็นระยะการเจริญเติบโตช่วงทุติยภูมิ จากนั้นการเจริญเติบโตก็จะลดลง โดยมี specific growth rate เป็น 1.96 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน เช่นเดียวกันกับใน *G. lucidum Ganoderma* sp. และ *S. commune* ที่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นจนกระทั่งคงที่และลดลงในช่วงวันที่ 11-13 7-11 และ 13-15 โดยมี specific growth rate เป็น 0.48 5.17 และ 1.33 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตของไวท์รอท *P. chrysosporium* *G. lucidum* *Ganoderma* sp. และ *S. commune* เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

2.1 การหา pH ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

การเลี้ยงไวท์รอททั้ง 4 สายพันธุ์ ในสูตรอาหาร production ที่มี guaiacol เป็นองค์ประกอบ(ภาคผนวก ก) เพื่อหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ตรวจสอบความสามารถในการผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของการออกซิไดซ์ veratryl alcohol ให้เป็น veratraldehyde แล้วนำไปคำนวณเพื่อหาค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และหน่วยของเอนไซม์ VAO ในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารต่างกัน 5 ระดับคือ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ซึ่งค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP ที่แท้จริง คือ ผลต่างระหว่าง ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP กับ หน่วยของเอนไซม์ VAO ให้ผลการทดลองดังนี้

P. chrysosporium มี pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส คือ pH 4.0 รองลงมาคือ 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ โดยให้ค่าหน่วยของเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 9 เท่ากับ 0.1690 U/ml และให้ค่าหน่วยของเอนไซม์ VAO มากที่สุด คือ 0.0420 U/ml ดังตารางที่ 3 และ 4

G. lucidum เมื่อทำการหักลบค่าหน่วยของเอนไซม์ระหว่าง LiP และ VAO แล้ว ไม่พบหน่วยของ LiP ซึ่งในการทดลองนี้แอคติวิตีที่วัดได้จึงเป็นค่าหน่วยของเอนไซม์ VAO ซึ่งให้ค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดคือ pH 5.0 รองลงมาคือ 6.0 4.0 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ โดยให้ค่าหน่วยของเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 9 เท่ากับ 0.0744 U/ml ดังตารางที่ 5

Ganoderma sp. เมื่อทำการหักลบค่าหน่วยของเอนไซม์ระหว่าง LiP และ VAO แล้ว ไม่พบหน่วยของ LiP ซึ่งในการทดลองนี้แอคติวิตีที่วัดได้จึงเป็นค่าหน่วยของเอนไซม์ VAO ซึ่งให้ค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดคือ pH 4.0 รองลงมาคือ 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ โดยให้ค่าหน่วยของเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 15 เท่ากับ 0.0670 U/ml ดังตารางที่ 6

และ *S. commune* เมื่อทำการหักลบค่าหน่วยของเอนไซม์ระหว่าง LiP และ VAO แล้ว ไม่พบหน่วยของ LiP ซึ่งในการทดลองนี้แอคติวิตีที่วัดได้จึงเป็นค่าหน่วยของเอนไซม์ VAO ให้ค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดคือ pH 6.0 รองลงมาคือ 4.0 7.0 5.0 และ 8.0 ตามลำดับ โดยให้ค่าหน่วยของเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 12 เท่ากับ 0.0570 U/ml ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 3 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO ที่ผลิตจาก *P. chrysosporium* ณ pH ต่างๆ กัน

pH	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml.)									
	วันที่ 3		วันที่ 6		วันที่ 9		วันที่ 12		วันที่ 15	
	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO
4	0.0701	0.0141	0.1630	0.0300	0.2110	0.0420	0.1210	0.0240	0.1367	0.0273
5	0.0402	0.0080	0.1060	0.0210	0.1833	0.0361	0.1601	0.0321	0.1401	0.0281
6	0.0330	0.0070	0.1560	0.0311	0.1767	0.0350	0.1301	0.0260	0.0533	0.0101
7	0.03001	0.0060	0.0661	0.0130	0.0933	0.01861	0.1233	0.0241	0.0533	0.0101
8	0.0071	0.0010	0.0100	0.0020	0.0183	0.0036	0.0201	0.0040	0.0107	0.0021

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ค่าหน่วยของเอนไซม์ ที่แท้จริงจาก *P. chrysosporium* ณ pH ต่างๆ กัน

pH	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml.)				
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15
4	0.0560m	0.1330c	0.1690a	0.097j	0.1094g
5	0.0322q	0.0850k	0.1472b	0.128d	0.112f
6	0.026r	0.1249e	0.0164t	0.1041h	0.0432o
7	0.0240s	0.0539n	0.0740l	0.0942i	0.0432o
8	0.0061y	0.008x	0.0147v	0.0161u	0.0086w

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันหมายถึง ค่าเฉลี่ยของหน่วยเอนไซม์ที่ผลิตได้ในอาหารที่มี pH ต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO ที่ผลิตจาก *G. lucidum* ณ pH ต่างๆ กัน

pH	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml.)									
	วันที่ 3		วันที่ 6		วันที่ 9		วันที่ 12		วันที่ 15	
	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO
4	0.0101	0.0121	0.0267	0.0272	0.0567	0.0587	0.0434	0.0439	0.0127	0.0130
5	0.0201	0.0211	0.0370	0.0374	0.0733	0.0744	0.0697	0.0675	0.0679	0.0672
6	0.0071	0.0080	0.0091	0.0091	0.0117	0.0120	0.0067	0.0075	0.0053	0.0062
7	0.0043	0.0041	0.0043	0.0051	0.0080	0.0091	0.0097	0.0098	0.0057	0.0054
8	0.0023	0.0027	0.0027	0.0030	0.0040	0.0091	0.0013	0.0014	0.002	0.0025

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO ที่ผลิตจาก *Ganoderma* sp. ณ pH ต่างๆ กัน

pH	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml.)									
	วันที่ 3		วันที่ 6		วันที่ 9		วันที่ 12		วันที่ 15	
	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO
4	0.0257	0.0260	0.0387	0.0384	0.0420	0.0470	0.0457	0.0460	0.0630	0.0670
5	0.0133	0.0134	0.0303	0.0306	0.0323	0.0319	0.0500	0.0510	0.0547	0.0550
6	0.0140	0.0150	0.0243	0.0246	0.04	0.0540	0.0447	0.0452	0.0433	0.0480
7	0.01270	0.0128	0.0143	0.0144	0.038	0.0391	0.0460	0.0510	0.0390	0.0410
8	0.0087	0.0088	0.0263	0.0260	0.0163	0.0165	0.0123	0.0124	0.0097	0.0099

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO ที่ผลิตจาก S. *commune* ณ pH ต่างๆ กัน

pH	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml.)									
	วันที่ 3		วันที่ 6		วันที่ 9		วันที่ 12		วันที่ 15	
	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO
4	0.0110	0.0120	0.0140	0.0150	0.0093	0.0094	0.0011	0.0012	0.0053	0.0057
5	0.0043	0.0048	0.0071	0.0078	0.0071	0.0078	0.0103	0.0104	0.0043	0.0049
6	0.0017	0.0019	0.0237	0.0240	0.0390	0.0403	0.0563	0.0570	0.0020	0.0022
7	0.0057	0.0064	0.0087	0.0088	0.0090	0.0110	0.0130	0.0140	0.0063	0.0007
8	0.0087	0.0090	0.0080	0.0090	0.0043	0.0047	0.0030	0.0033	0.0020	0.0022

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการทดลองในข้อ 2.1 ทำให้ทราบค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จึงนำมาทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ในไวท์รอททั้ง 4 ชนิด โดยบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับ คือ 35 40 และ 45°เซลเซียส แล้วตรวจสอบผลการทดลองที่ได้ด้วยการวัดหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO ให้ผลการทดลองดังนี้

P. chrysosporium สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและ VAO ได้ในอุณหภูมิสูงโดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ของ *P. chrysosporium* คือ 40°เซลเซียส รองลงมาคือ 35 และ 45°เซลเซียสตามลำดับ โดยให้ค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและ VAO สูงที่สุดในวันที่ 9 เท่ากับ 0.2956 U/ml และ 0.0990 U/ml ตามลำดับ ดังตารางที่ 6

G. lucidum เมื่อทำการหักลบค่าหน่วยของเอนไซม์ระหว่าง LiP และ VAO แล้ว ไม่พบหน่วยของเอนไซม์ LiP ซึ่งในการทดลองนี้แอคติวิตีที่วัดได้จึงเป็นค่าหน่วยของเอนไซม์ VAO ซึ่งสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ในอุณหภูมิ 35 องซาเซลเซียส เท่านั้น โดยให้ค่าหน่วยของเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 9 เท่ากับ 0.180 U/ml ดังตารางที่ 7 สำหรับในอุณหภูมิ 40 และ 45°เซลเซียส จากการสังเกตด้วยตาเปล่า แม้ว่า *G. lucidum* จะเจริญได้แต่ไม่ดีนัก และจะตายภายใน 3–6 วัน ของการทดลอง นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ ในช่วงดังกล่าว

Ganoderma sp. เมื่อทำการหักลบค่าหน่วยของเอนไซม์ระหว่าง LiP และ VAO แล้ว ไม่พบหน่วยของเอนไซม์ LiP ซึ่งในการทดลองนี้แอคติวิตีที่วัดได้จึงเป็นค่าหน่วยของเอนไซม์ VAO ซึ่ง *Ganoderma* sp. สามารถเจริญได้เล็กน้อยในอุณหภูมิ 35°เซลเซียส เท่านั้น แต่ ไม่ดีนัก โดยให้ค่าหน่วยของเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 6 เท่ากับ 0.080 U/ml สำหรับในอุณหภูมิ 40 และ 45°เซลเซียส เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า พบว่า เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ ดังตารางที่ 8

S. commune เมื่อทำการหักลบค่าหน่วยของเอนไซม์ระหว่าง LiP และ VAO แล้ว ไม่พบหน่วยของเอนไซม์ LiP ในการทดลองนี้แอคติวิตีที่วัดได้จึงเป็นค่าหน่วยของเอนไซม์ VAO ซึ่งสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ในที่อุณหภูมิสูงโดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ คือ 35° เซลเซียส รองลงมาคือ 40 และ 45 องซาเซลเซียสตามลำดับ โดยให้ค่าหน่วยของเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 12 เท่ากับ 0.0210 U/ml 0.012 U/ml และ 0.0012 U/ml. ตามลำดับ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 8 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO ที่ผลิตจาก *P. chrysosporium* ณ อุณหภูมิ ต่างๆ กัน

T	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml.)									
	วันที่ 3		วันที่ 6		วันที่ 9		วันที่ 12		วันที่ 15	
	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO
35	0.1100	0.0220	0.1700	0.0340	0.3010	0.0670	0.2706	0.0553	0.2600	0.0520
40	0.1385	0.0277	0.2400	0.0480	0.3950	0.0990	0.3801	0.0910	0.3410	0.0810
45	0.1150	0.0230	0.2400	0.0480	0.2810	0.0580	0.2250	0.0456	0.1960	0.0401

ตารางที่ 9 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP ที่แท้จริงจาก *P. chrysosporium* ณ อุณหภูมิ ต่างๆ กัน

T	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml.)				
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15
35	0.088o	0.136l	0.234d	0.2147f	0.208g
40	0.1108m	0.192h	0.296a	0.2891b	0.26c
45	0.042n	0.192h	0.223e	0.1794j	0.1559k

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันหมายถึง ค่าเฉลี่ยของหน่วยเอนไซม์ที่ผลิตได้ในอาหารที่บ่ม ณ อุณหภูมิต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 10 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO ที่ผลิตจาก *G. lucidum* ณ อุณหภูมิต่าง ๆ

T	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml.)									
	วันที่ 3		วันที่ 6		วันที่ 9		วันที่ 12		วันที่ 15	
	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO
35	0.037	0.04	0.097	0.11	0.176	0.18	0.149	0.15	0.11	0.11
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO ที่ผลิตจาก *Ganoderma* sp. ณ อุณหภูมิต่าง ๆ

T	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml.)									
	วันที่ 3		วันที่ 6		วันที่ 9		วันที่ 12		วันที่ 15	
	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO
35	0.041	0.04	0.082	0.08	0.038	0.04	0.011	0.010	0.003	0.003
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ค่าหน่วยของเอนไซม์ LiP และ VAO ที่ผลิตจาก *S. commune* ณ อุณหภูมิต่างๆ กัน

T	ค่าหน่วยของเอนไซม์ (U/ml.)									
	วันที่ 3		วันที่ 6		วันที่ 9		วันที่ 12		วันที่ 15	
	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO	LiP	VAO
35	0.0051	0.005	0.0062	0.006	0.0145	0.0140	0.0200	0.0210	0.0180	0.0180
40	0.0032	0.0030	0.0041	0.0040	0.0099	0.0100	0.0110	0.0120	0.0059	0.0060
45	0.0007	0.0007	0.0009	0.0010	0.0011	0.0012	0.0006	0.0006	0.00048	0.0005

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

จากการทดสอบหาความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสของไวท์รอท 4 ชนิด คือ *P. chrysosporium* *G. lucidum* *Ganoderma* sp. และ *S. commune* จึงทำให้ทราบภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส จึงผลิตในปริมาณมากขึ้นเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟต และการกรองด้วย ultra filtration จะทำให้เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งจะสังเกตได้จากค่าหน่วยของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินชนิดอื่นๆ นอกจากลิกนินเปอร์ออกซิเดส คือ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส

3.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 20% 40% 60% และ 80% เพื่อตกตะกอนโปรตีน พบว่า

P. chrysosporium สามารถให้หน่วยของเอนไซม์ได้สูงที่สุดเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 60% ตรวจพบเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยมีค่าหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 5.24 เป็น 26.72 U/mg สูงขึ้น 5.1 เท่า และ 4.78 เป็น 21.04 U/mg เพิ่มขึ้น 4.4 เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 13

G. lucidum พบเอนไซม์ 2 ชนิด คือเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส โดยมีค่าหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 5.04 เป็น 23.24 U/mg สูงขึ้น 4.61 เท่า และ12.74 เป็น 78.96 U/mg เพิ่มขึ้น 6.2 เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 14

Ganoderma sp. ตรวจสอบเอนไซม์ 2 ชนิด คือเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส โดยมีค่าหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 4.21 เป็น 18.97 U/mg. สูงขึ้น 4.5 เท่า และ 9.54 เป็น 48.23 U/mg เพิ่มขึ้น 5.06 เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 15

S. commune ตรวจสอบเอนไซม์เพียงชนิดเดียว คือ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยมีค่าหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 3.86 เป็น 18.12 U/mg. สูงขึ้น 4.69 เท่า ดังตารางที่ 16

3.2 การกรองด้วย ultra filtration

P. chrysosporium ตรวจพบเอนไซม์ 2 ชนิด คือเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยมีค่าหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 5.24 เป็น 20.03 U/mg สูงขึ้น 3.82 เท่า และ 4.78 เป็น 13.47 U/ml เพิ่มขึ้น 2.82 เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 13

G. lucidum ตรวจพบเอนไซม์ 2 ชนิด คือเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส โดยมีค่าหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 5.04 เป็น 18.56 U/mg สูงขึ้น 3.68 เท่า และ 12.74 เป็น 56.92 U/mg เพิ่มขึ้น 4.47 เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 14

Ganoderma sp. ตรวจพบเอนไซม์ 2 ชนิด คือเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส โดยมีค่าหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 4.21 เป็น 12.86 U/mg สูงขึ้น 3.05 เท่า และ 9.54 เป็น 32.84 U/ml เพิ่มขึ้น 3.44 เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 15

S. commune พบเอนไซม์เพียงชนิดเดียว คือเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยมีค่าหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 3.86 เป็น 16.72 U/ml. สูงขึ้น 4.33 เท่า ดังตารางที่ 16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *P. chrysosporium* เปรียบเทียบระหว่างการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการกรองด้วย ultra filtration

ไวท์รอท	เอนไซม์	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตรรวม (มล.)	ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตี (U/มล.)	Specific activity (U/มก.)	แอคติวิตีรวม (U)	Yield (%)	Purification factor
P. chrysosporium		-เอนไซม์หยาบ	800	0.019	0.098	5.24	78	100	1
	LiP	-ตกตะกอน	10	0.24	6.5	26.72	65	83.33	5.1
		-เอนไซม์หยาบ	10	0.019	0.098	5.24	0.98	100	1
		-ผ่านเยื่อกรอง	2	0.019	0.38	20.03	0.76	77.5	3.82
		-เอนไซม์หยาบ	800	0.015	0.07	4.78	55	100	1
	MnP	-ตกตะกอน	10	0.20	4.2	21.04	42	76.36	4.4
		-เอนไซม์หยาบ	10	0.015	0.07	4.78	0.7	100	1
		-ผ่านเยื่อกรอง	2	0.021	0.29	13.47	0.57	81.43	2.82
	Lac	-เอนไซม์หยาบ	0	0	0	0	0	0	0
		-ตกตะกอน	0	0	0	0	0	0	0
		-เอนไซม์หยาบ	0	0	0	0	0	0	0
		-ผ่านเยื่อกรอง	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 14 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *G. lucidum* เปรียบเทียบระหว่างการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการกรองด้วย ultra filtration

ไวท์รอท	เอนไซม์	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตรรวม (มล.)	ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตี (U/มล.)	Specific activity (U/มก.)	แอคติวิตีรวม (U)	Yield (%)	Purification factor
G. lucidum	LiP	-เอนไซม์หยาบ	0	0	0	0	0	0	0
		-ตกตะกอน	0	0	0	0	0	0	0
		-เอนไซม์หยาบ	0	0	0	0	0	0	0
		-ผ่านเยื่อกรอง	0	0	0	0	0	0	0
	MnP	-เอนไซม์หยาบ	800	0.014	0.07	5.04	56	100	1
		-ตกตะกอน	12	0.147	3.41	23.24	41	73.21	4.61
		-เอนไซม์หยาบ	10	0.014	0.07	5.04	0.7	100	1
		-ผ่านเยื่อกรอง	3	0.01	0.18	18.56	0.54	77.14	3.68
	Lac	-เอนไซม์หยาบ	800	0.08	0.22	12.74	176	100	1
		-ตกตะกอน	12	0.16	12.25	78.96	147	81.7	6.2
		-เอนไซม์หยาบ	10	0.08	0.22	12.74	2.2	100	1
		-ผ่านเยื่อกรอง	3	0.01	0.57	56.92	1.7	77.27	4.47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *Ganoderma* sp. เปรียบเทียบระหว่างการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการกรองด้วย ultra filtration

ไวท์รอท	เอนไซม์	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตรรวม (มล.)	ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตี (U/มล.)	Specific activity (U/มก.)	แอคติวิตีรวม (U)	Yield (%)	Purification factor
Ganoderma sp	LiP	-เอนไซม์หยาบ	0	0	0	0	0	0	0
		-ตกตะกอน	0	0	0	0	0	0	0
		-เอนไซม์หยาบ	0	0	0	0	0	0	0
		-ผ่านเยื่อกรอง	0	0	0	0	0	0	0
	MnP	-เอนไซม์หยาบ	800	0.012	0.05	4.21	42	100	1
		-ตกตะกอน	10	0.15	2.8	18.97	28	66.67	4.5
		-เอนไซม์หยาบ	10	0.012	0.05	4.21	0.5	100	1
		-ผ่านเยื่อกรอง	2.5	0.01	0.12	12.86	0.29	58	3.05
	Lac	-เอนไซม์หยาบ	800	0.016	0.15	9.54	119	100	1
		-ตกตะกอน	10	0.201	9.7	48.23	97	81.51	5.06
		-เอนไซม์หยาบ	10	0.016	0.15	9.54	1.5	100	1
		-ผ่านเยื่อกรอง	2.5	0.013	0.44	32.84	1.1	73.3	3.44

ตารางที่ 16 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *S. commune* เปรียบเทียบระหว่างการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการกรองด้วย ultra filtration

ไวท์รอท	เอนไซม์	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตรรวม (มล.)	ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตี (U/มล.)	Specific activity (U/มก.)	แอคติวิตีรวม (U)	Yield (%)	Purification factor
S. commune	LiP	-เอนไซม์หยาบ	0	0	0	0	0	0	0
		-ตกตะกอน	0	0	0	0	0	0	0
		-เอนไซม์หยาบ	0	0	0	0	0	0	0
		-ผ่านเยื่อกรอง	0	0	0	0	0	0	0
	MnP	-เอนไซม์หยาบ	800	0.016	0.06	3.86	46	100	1
		-ตกตะกอน	12	0.147	2.67	18.12	32	69.56	4.69
		-เอนไซม์หยาบ	10	0.016	0.06	3.86	0.6	100	1
		-ผ่านเยื่อกรอง	1.5	0.014	0.24	16.72	0.36	60	4.33
	Lac	-เอนไซม์หยาบ	0	0	0	0	0	0	0
		-ตกตะกอน	0	0	0	0	0	0	0
		-เอนไซม์หยาบ	0	0	0	0	0	0	0
		-ผ่านเยื่อกรอง	0	0	0	0	0	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์

4.1 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ในช่วง pH 4-8

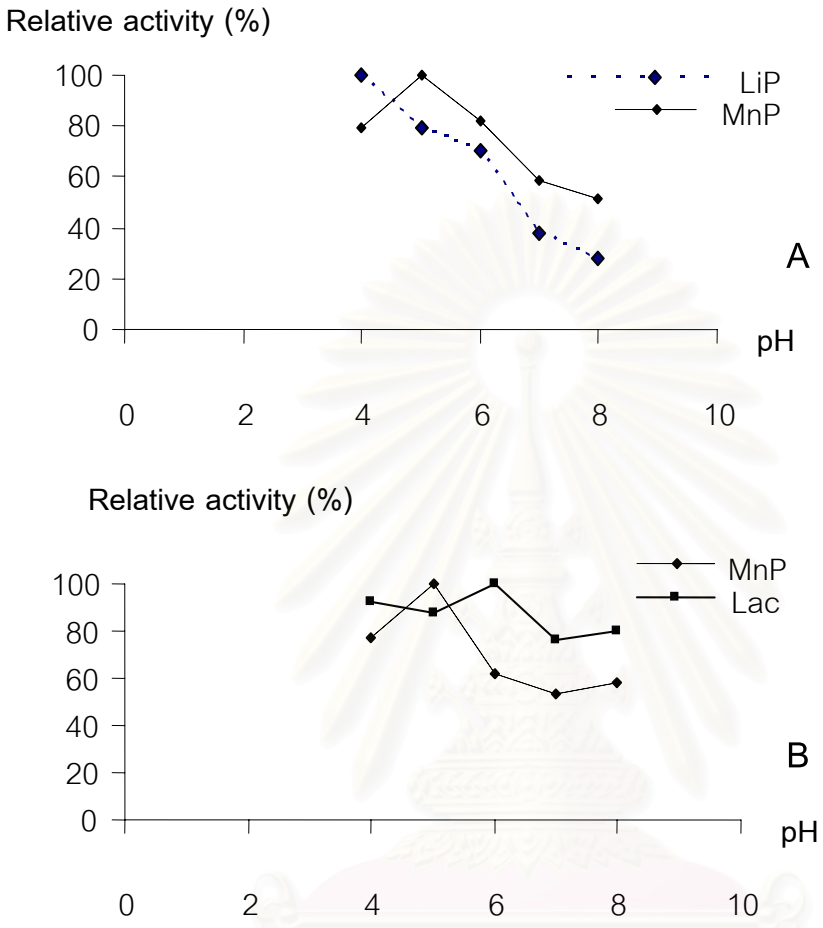
เมื่อบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่างๆ กัน เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส ที่ผลิตได้จาก *P. chrysosporium* โดยลิกนินเปอร์ออกซิเดส มีความเสถียรใน pH ช่วง 5 – 6 โดยมี relative activity 70.41% – 79.59% โดย pH 4 เป็นค่าความกรด-ด่างที่ให้แอคติวิตีสูงสุด จากนั้นค่าหน่วยของเอนไซม์จะลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ในขณะที่ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีความเสถียรใน pH ช่วง 4 – 6 โดยมี relative activity 79.17% – 81.94% และมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม คือ pH 5 จากนั้นค่าหน่วยของเอนไซม์จะลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้นเช่นกัน ดังภาพที่ 7(A)

G. lucidum ผลิตเอนไซม์ได้ 2 ชนิด คือ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส ซึ่งแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม คือ pH 5 และมีความเสถียรอยู่ที่ pH 6 – 8 ในขณะที่แลคเคสมีความเสถียรในช่วง pH ที่กว้างกว่า คือ pH 4-8 ดังภาพที่ 7(B)

ในทำนองเดียวกัน *Ganoderma* sp. ผลิตเอนไซม์ได้ 2 ชนิด คือ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีความเสถียรอยู่ที่ pH ช่วง 4 – 6 โดยมี relative activity 98.0% – 100% และ 80 – 100 % ตามลำดับ ดังภาพที่ 7(C)

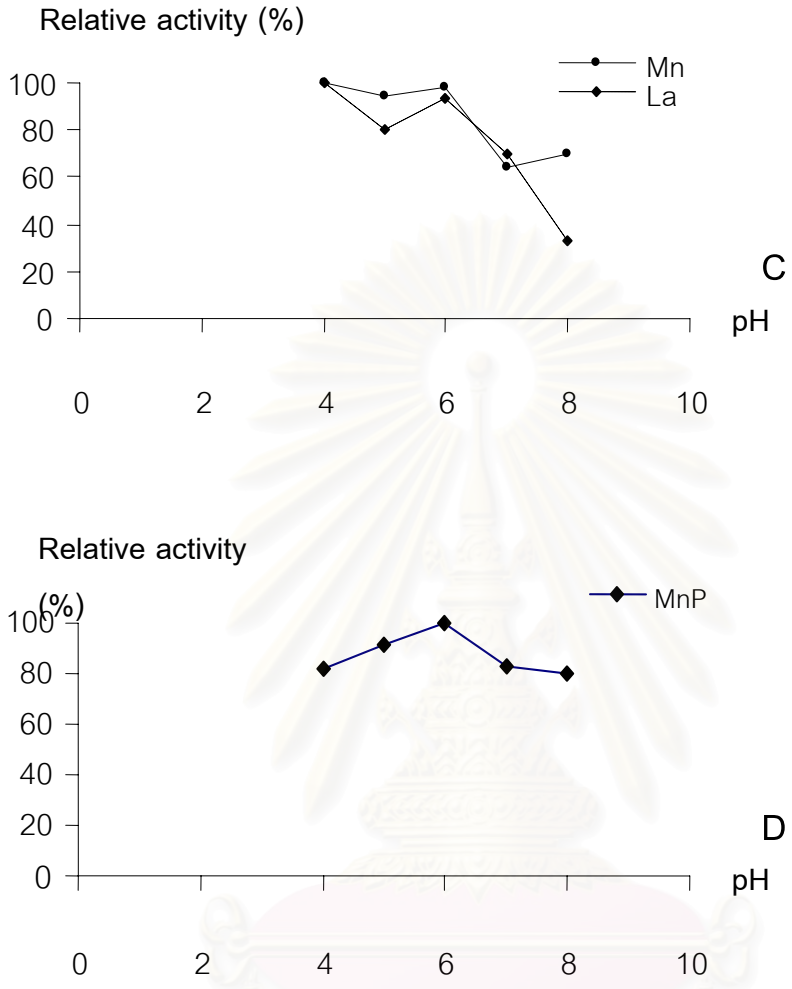
S. commune ตรวจพบเพียงแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ซึ่งมีความเสถียรในช่วง pH กว้าง โดยมีค่าหน่วยเอนไซม์ลดลงเพียง 20% ดังแสดงในภาพที่ 7(D)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 7 ความเสถียรของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) ที่ผลิตได้จาก *P. chrysosporium* (A) และความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) และแลคเคส(Lac) ที่ผลิตได้จาก *G. lucidum* (B) ในช่วง pH 4 – 8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 7 (ต่อ) ความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) และแลคเคส(Lac) ที่ผลิตได้จาก *Ganoderma* sp.(C) และ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) ที่ผลิตได้จาก *S. commune* (D) ในช่วง pH 4 – 8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิ 35-45°เซลเซียส

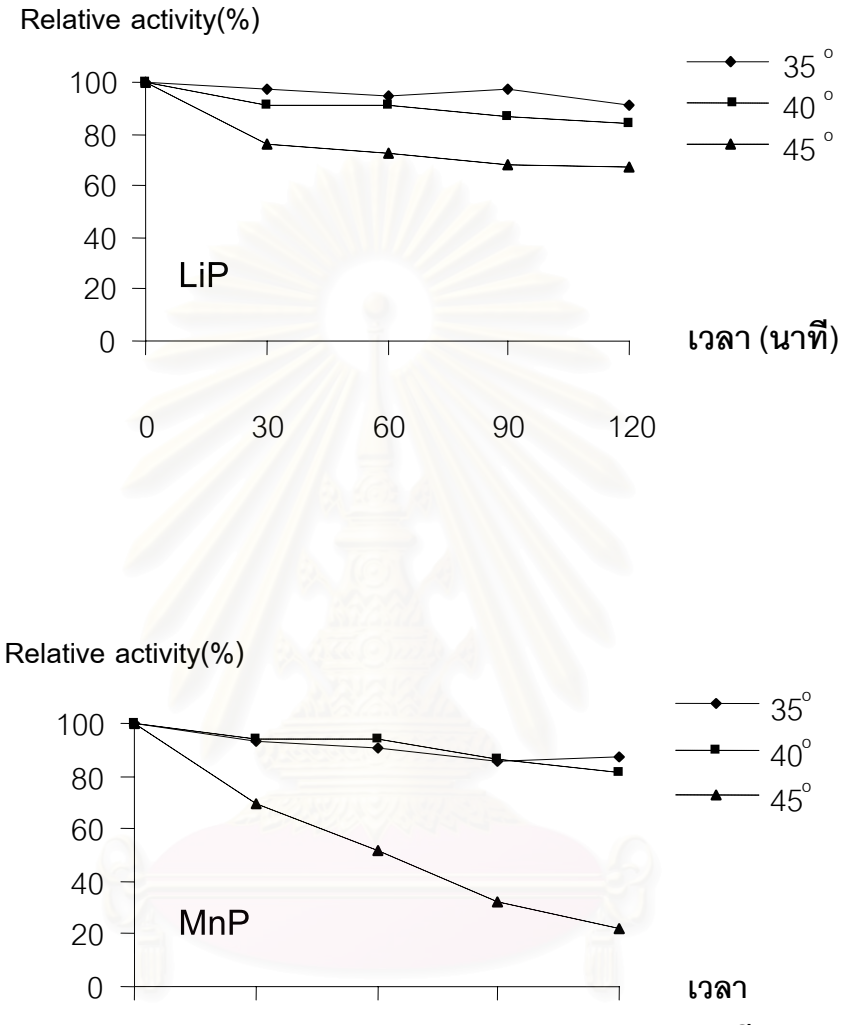
ผลจากการนำเอนไซม์มาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ในอุณหภูมิ 35 40 และ 45° เซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที พบว่า

P. chrysosporium ซึ่งบ่มในสารละลายทาร์เทรตบัฟเฟอร์ pH 3 ผลิตเอนไซม์ 2 ชนิด มีความเสถียรของลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตได้อยู่ในช่วง อุณหภูมิ 35-45° เซลเซียส โดยมี relative activity ต่ำสุด คือ 91.03 84.31 และ 70.23 % ตามลำดับ ในขณะที่ค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ 45°เซลเซียสจะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 8

G. lucidum บ่มในทาร์เทรตบัฟเฟอร์ pH 5 ผลิตเอนไซม์ 2 ชนิด มีความเสถียรของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสที่ผลิตได้อยู่ในช่วง อุณหภูมิ 35-40°เซลเซียส โดยแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมี relative activity ต่ำสุด คือ 81.34 และ 72.19 ตามลำดับ ความเสถียรของแลคเคสที่ผลิตได้อยู่ในช่วง อุณหภูมิ 35 – 40°เซลเซียส โดยมี relative activity ต่ำสุด คือ 70.11 และ 69.87 ตามลำดับ แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ในอุณหภูมิ 45°เซลเซียส เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะให้ผลการทดลองเหมือนกัน คือ relative activity ลดลงอย่างมากภายใน 30 นาทีดังภาพที่ 9

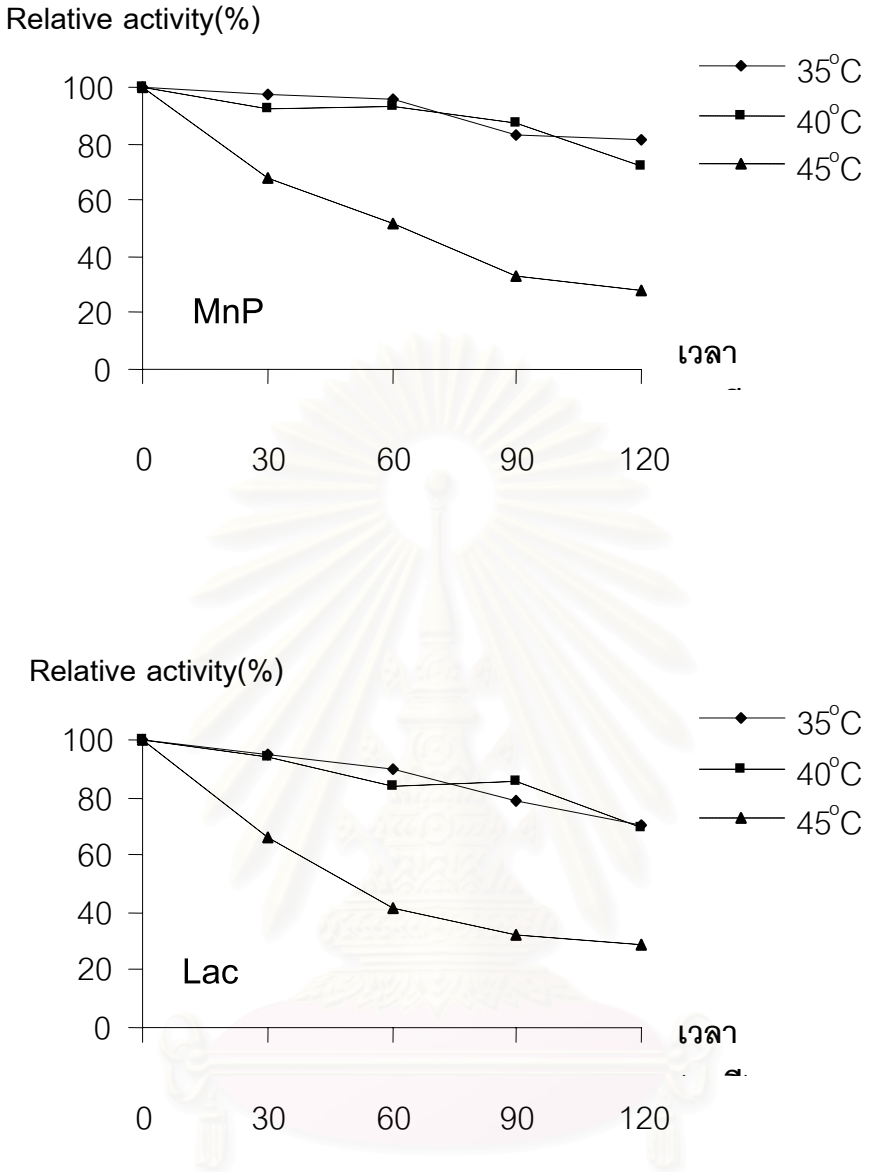
Ganoderma sp. บ่มในทาร์เทรตบัฟเฟอร์ pH 5 ให้ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสที่ผลิตได้อยู่ในช่วง อุณหภูมิ 35-40°เซลเซียส คล้ายคลึงกับใน *G. lucidum* โดยแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมี relative activity ต่ำสุด คือ 71.02 และ 67.48 ตามลำดับ ความเสถียรของแลคเคสที่ผลิตได้อยู่ในช่วง อุณหภูมิ 35-40°เซลเซียส โดยมี relative activity ต่ำสุด คือ 68.21 และ 67.10 ตามลำดับ แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ในอุณหภูมิ 45°เซลเซียส เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะให้ผลการทดลองเหมือนกัน คือ relative activity ลดลงอย่างมากภายใน 30 นาที ดังภาพที่10

S. commune บ่มในทาร์เทรตบัฟเฟอร์ pH 5 ผลิตเอนไซม์ชนิดเดียว จะมีความเสถียรของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ที่ผลิตได้อยู่ในช่วง อุณหภูมิ 35-40°เซลเซียส โดยมี relative activity ต่ำสุด คือ 80.2 และ 63.31 ตามลำดับ แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ในอุณหภูมิ 45°เซลเซียส เอนไซม์จะมี relative activity ลดลงอย่างมากภายใน 30 นาทีดังภาพที่ 11



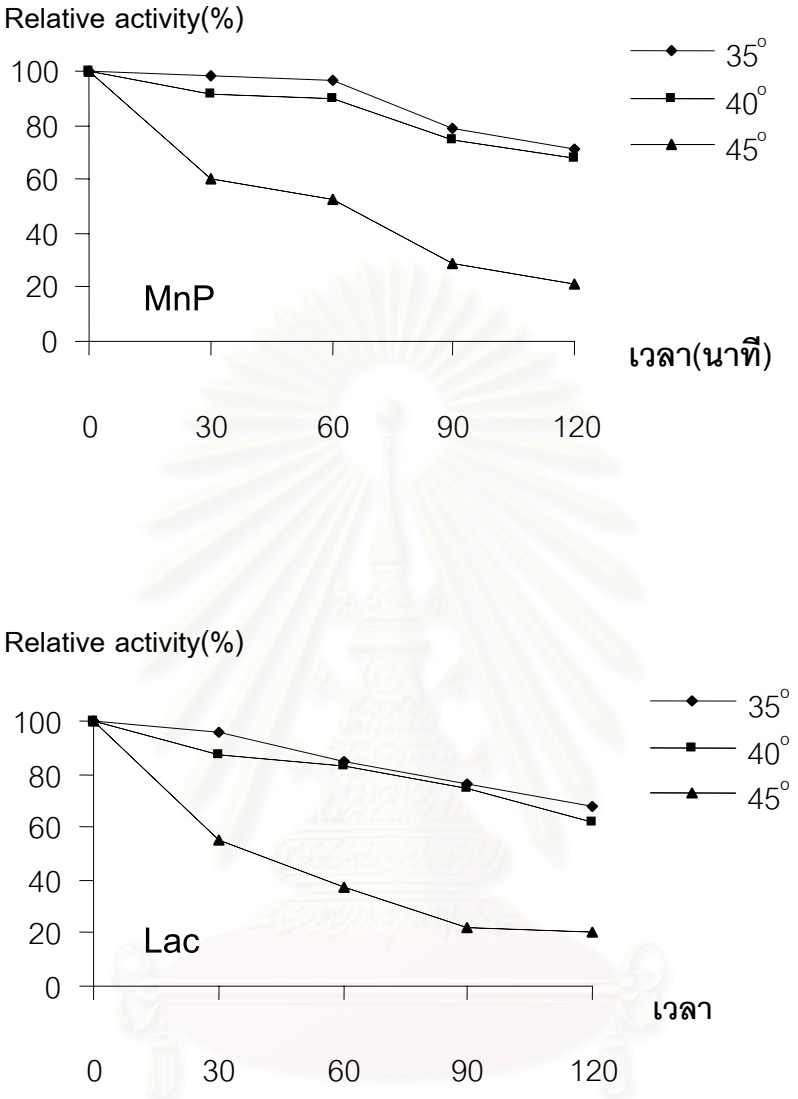
ภาพที่ 8 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) ที่ผลิตได้จาก *P. chrysosporium*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



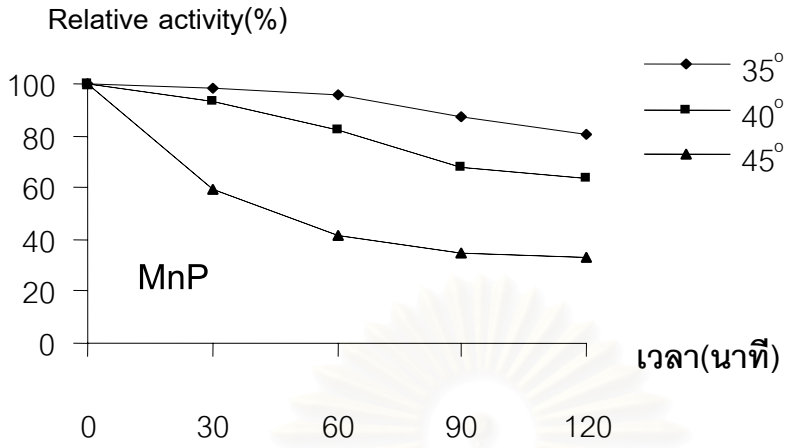
ภาพที่ 9 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) และแลคเคส (Lac) ที่ผลิตได้จาก *G. lucidum*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 10 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) และแลคเคส (Lac) ที่ผลิตได้จาก *Ganoderma* sp.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 11 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) ที่ผลิตได้จาก *S. commune*

5. การฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์

เมื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัส โดยใช้ความเข้มข้น 12.5 IU ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเยื่อกระดาษ โดยใช้ชนิดของเอนไซม์ที่แตกต่างกันในการฟอก แบ่งเยื่อกระดาษที่ได้ไปตรวจสอบการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ (freeness) และ ค่าคัปปานัมเบอร์ (kappa number) แล้วนำเยื่อที่เหลือไปทำการขึ้นแผ่นเพื่อตรวจสอบค่าความขาวสว่าง (brightness) ค่าแรงฉีกขาด (tearing strength) ค่าแรงดันทะลุ (bursting strength) และค่าการต้านทานแรงดึง (tensile strength) พบว่าเอนไซม์ที่ได้สามารถฟอกเยื่อกระดาษให้ขาวขึ้นต่างจากชุดควบคุม โดยทำให้ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นโดยแตกต่างจากเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์ซึ่งเป็นชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ คือ 49.074 ซึ่งแผ่นกระดาษทดสอบที่ได้จะมีสีน้ำตาลอ่อน ดังภาพที่ 12 แต่มีความแตกต่างกันในด้านคุณสมบัติของกระดาษที่ได้

ค่าการให้น้ำไหลผ่านเยื่อจะบ่งบอกถึงคุณสมบัติของเส้นใยที่เกิดจากการตัดและบดในขั้นตอนของการทำเยื่อกระดาษจากไม้ซึ่งเป็นวัตถุดิบ จากการทดลองค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือ 600-800 ml. ซึ่งบอกได้ว่าเยื่อที่นำมาใช้นี้มีลักษณะและคุณภาพของเส้นใยอยู่ในเกณฑ์ เมื่อฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ได้จาก *P. chrysosporium* จะให้ค่าความขาวสว่างของกระดาษเพิ่มขึ้นเป็น 51.067 เพิ่มขึ้น 4.06% จากชุดควบคุมที่มีค่าเป็น 49.074 ทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงเป็น 5.4124 จาก ชุดควบคุม ที่มีค่าเท่ากับ 6.1805 คิดเป็น 13.24% ซึ่งกระดาษที่ได้เมื่อนำไปทดสอบแรงกระทำ พบว่า ค่าดัชนีแรงดันทะลุ ค่าดัชนีแรงฉีกขาด และดัชนีการต้านทานแรงดึง เพิ่มขึ้นเป็น 0.75 KPa 5.27 mN และ 17.03 K/15mm จากชุดควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.62 KPa 4.47mN และ 14.5 K/15mm ตามลำดับ ดังตารางที่ 11

การฟอกเยื่อกระดาษด้วย เอนไซม์แลคเคสที่ได้จาก *G. lucidum* และ *Ganoderma* sp มีผลทำให้ความขาวสว่างเพิ่มขึ้นเป็น 51.272 และ 50.638 คิดเป็น 4.48% และ 3.19% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงจาก 5.6903 และ 5.8647 คิดเป็น 8.93% และ 5.11% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์แลคเคสมี ค่าดัชนีแรงดันทะลุ ค่าดัชนีแรงฉีกขาด และดัชนีการต้านทานแรงดึง เป็น 0.54 และ 0.58 KPa 4.06 และ 3.93 mN และ 11.63 กับ 13.39 K/15mm ซึ่งค่าที่ได้จะลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังตารางที่ 11

สำหรับแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจาก *S. commune* สามารถลดค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อจาก 6.1805 เป็น 5.1629 คิดเป็น 17.46% ทำให้ความขาวสว่างเพิ่มขึ้น 51.997 คิดเป็น 5.96 % เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติในการรับแรงกระทำ พบว่า กระดาษที่ได้มีค่า ดัชนีแรงดันทะลุ ค่าดัชนีแรงฉีกขาด และดัชนีการต้านทานแรงดึง เป็น 0.46 KPa 3.74 mN และ 9.59 K/15mm ซึ่งค่าที่ได้จะลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังตารางที่ 11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 12 แผ่นกระดาษทดสอบที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากเชื้อราไวท์รอท (12.5 IU/gOD) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45-50°เซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 คุณสมบัติของเยื่อและกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากไวท์รอท

ไวท์รอท	ค่าความขาวสว่าง (Brightness)		ค่าคัปปานัมเบอร์* (kappa number)		ค่าการให้น้ำไหลผ่าน* (freeness) (ml)	ดัชนีแรงดันทะลุ (Burst index) (Kpa)	ดัชนีแรงฉีกขาด (Tear index) (mN)	ดัชนีการต้านทานแรงดึง (Tensile index) (K/15mm)
	ดัชนี	เปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้น	ดัชนี	เปอร์เซ็นต์การลดลง				
ชุดควบคุม	49.074e	0	6.1805	0	627.58	0.62b	4.47b	14.5b
P. chrysosporium.	51.067c	4.06	5.4124	13.24	613.52	0.75a	5.27a	17.03a
G. lucidum	51.272b	4.48	5.6903	8.93	636.42	0.54d	4.06c	11.63d
Ganoderma sp.	50.638d	3.19	5.8647	5.11	630.68	0.58c	3.93d	13.39c
S. commune	51.997a	5.96	5.1629	17.46	636.54	0.46e	3.74e	9.59e

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันหมายถึง ค่าเฉลี่ยของคุณสมบัติแต่ละชนิดที่วัดได้จากเยื่อกระดาษซึ่งผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากเชื้อราไวท์รอทชนิดต่าง ๆ ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

* เนื่องจากวิธีการทดลองใช้จำนวนซ้ำในการทดสอบน้อยจึงไม่สามารถเปรียบเทียบผลในทางสถิติได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาการเจริญของเชื้อราไวท์รอท

ไวท์รอทสามารถสร้างและขับเอนไซม์เพื่อย่อยสลายลิกนินได้ในช่วงทุติยภูมิของช่วงชีวิต (secondary phase) (Kirk and Farrell, 1987) โดยเอนไซม์ที่สร้างจัดเป็น secondary metabolite ดังนั้นการผลิตเอนไซม์จากไวท์รอทจึงต้องทราบระยะเวลาที่เชื้อราเจริญเข้าสู่ secondary phase ซึ่งในการทดลองได้เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว PDB และตรวจสอบการเจริญด้วยการชั่งหาน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยแล้วนำไปคำนวณหา specific growth rate โดยพิจารณาได้จากน้ำหนักแห้งที่ได้ซึ่งมีค่าสูงสุดและคงที่ในระยะหนึ่ง นั่นก็คือระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการนำเชื้อราไปใช้เพื่อการผลิตเอนไซม์ต่อไปได้

2. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

เนื่องจากราโดยทั่วไปมักเจริญอยู่ในภาวะที่มีความเป็นกรด และไวท์รอททั้ง 4 ชนิด ที่นำมาทำการศึกษาในครั้งนี้ก็ให้ผลสอดคล้องเช่นเดียวกัน โดย *P. chrysosporium* *G. lucidum* *Ganoderma* sp. และ *S. commune* เจริญและผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายลิกนินได้ในช่วง pH 4-6 ซึ่งภาวะดังกล่าวเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายลิกนินได้ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่า *P. chrysosporium* เป็นไวท์รอทเพียงชนิดเดียวที่สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ดี ณ อุณหภูมิสูง คือ 40°เซลเซียส ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการเป็นเชื้อราทนร้อนได้ *G. lucidum* และ *Ganoderma* sp. จะเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิ 30-35°เซลเซียส แต่จากการสังเกตด้วยตาเปล่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเชื้อราทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ไม่พบการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แต่พบเอนไซม์ veratryl alcohol oxidase ในไวท์รอททั้ง 2 สายพันธุ์ *S. commune* สามารถเจริญในอุณหภูมิ 35-45°เซลเซียสได้แต่ในภาวะดังกล่าวไม่พบการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส พบเฉพาะเอนไซม์ veratryl alcohol oxidase

สารอาหารที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไวท์รอทจะนำไปใช้ในการสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต

Faison และ Kirk (1985) รายงานว่า *P. chrysosporium* ผลิตเอนไซม์ลิกนินเนสในภาวะการเพาะเลี้ยงที่จำกัดไนโตรเจน หรือคาร์โบไฮเดรต และการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อให้สารอาหารในปริมาณที่มากเกินพอ และแอคติวิตีของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นในระยะ idiophasic เมื่อให้ออกซิเจน 100% ในบางครั้งจะพบว่ามีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ veratryl alcohol หรือสารที่เกี่ยวข้องอื่นๆ หลังจากบ่ม *P. chrysosporium* กับลิกนิน หรือสารจำพวกลิกนินในระยะสั้นๆ ซึ่งทำให้ทรายว่าการย่อยสลายลิกนินให้ กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วย *P. chrysosporium* มีความสัมพันธ์กับระดับของเอนไซม์ลิกนินเนส โดยมีสับสเตรตหรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นตัวชักนำ

แมงกานีสซัลเฟตในอาหารสูตร production มีผลต่อการชักนำให้สร้างเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ (Mester et al.,1995) โดยแมงกานีสจะเป็นตัวชักนำให้มีการผลิต veratryl alcohol ซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) ที่สำคัญในการย่อยสลายลิกนิน (Kondo and Sakai, 1996) ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถตรวจพบแอคติวิตีของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ในไวท์รอททุกสายพันธุ์ Tien Kersten และ Kirk (1987) ศึกษาการย่อยสลายลิกนินของ *P. chrysosporium* Burds. พบว่า compound I ที่เกิดขึ้นในการย่อยสลายด้วยลิกนินเปอร์ออกซิเดส จะทำหน้าที่เสมือนเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยลิกนินเนสจะย่อยสลาย พันธะ C-C ของ compound I แล้วปลดปล่อย glycine formaldehyde และ veratraldehyde ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ 1 โดยที่ *P. chrysosporium* จะใช้ compound I เป็นแหล่งไนโตรเจน ในระยะ secondary metabolite ซึ่งเป็นช่วงที่เอนไซม์ทำหน้าที่ในการย่อยสลายลิกนิน Reid (1983) ได้เคยรายงานว่า veratryl alcohol จะช่วยทำให้ไวท์รอทสามารถผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้มากขึ้น เมื่ออยู่ในภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด เช่นเดียวกันกับการเติม guaiacol (Koduri and Tien, 1995)

การเพาะเลี้ยงไวท์รอทร่วมกับเยื่อกระดาษในภาวะ semi-solid ซึ่งนอกจากจะเป็นตัวช่วยพยุงให้เส้นใยราเจริญได้ดีแล้ว เยื่อกระดาษยูคาลิปตัสซึ่งเป็นสารจำพวก ลิกโนเซลลูโลส ยังเป็นสารชักนำให้ไวท์รอทสามารถผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายสารจำพวก ลิกโนเซลลูโลสได้มากขึ้น ทั้งเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนิน ซึ่ง Zacchi et al. (2000) ได้รายงานว่าการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากไวท์รอทเมื่อเลี้ยงในสับสเตรตที่เป็นวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส นอกจากไวท์รอทจะสร้างเอนไซม์แล้ว จะผลิตพอลิแซคคาไรด์ซึ่งจะทำให้การละลายของออกซิเจนในอาหารเกิดได้น้อยลง เป็นภาวะที่มีการจำกัดไนโตรเจน ซึ่งเป็นลักษณะของการตอบสนองต่อภาวะความเครียด

ในการทดลองครั้งนี้ คัดเลือกเชื้อราทั้ง 4 ชนิด ซึ่งได้เคยมีรายงานว่า สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้มาใช้ (เรือนแก้ว ประพฤติ, 2540 และ จันทรเกษม นรสิงห์, 2543) ซึ่งตรวจพบแอคติวิตีของลิกนินเปอร์ออกซิเดสใน ไวท์รอททั้ง 4 ชนิดในการทดสอบขั้นต้นของการทดลอง จึงเป็นแนวทางในการทำงานวิจัยเรื่อยมา เนื่องมาจากระบบการวัดหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีหลายระบบ และระบบที่ใช้ในการทดลองในช่วงต้นของการทดลอง เป็นการตรวจสอบแอคติวิตีของลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากการดูดกลืนแสงของ veratraldehyde ที่ช่วงความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ซึ่งveratraldehyde เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิไดซ์ของ veratryl alcohol แต่วิธีนี้มีข้อบกพร่องตรงที่การดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวจะถูกรบกวนจาก สารจำพวกอะโรมาติกบางชนิด ได้แก่ quinonic และลิกนิน (Arora and Gill, 2001) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า นอกจากลิกนินเปอร์ออกซิเดสแล้ว veratryl alcohol oxidase สามารถย่อยสลาย veratryl alcohol ซึ่งเป็นสับสเตรตของการเกิดปฏิกิริยา ได้เช่นเดียวกัน ด้วยเหตุนี้เองการนำวิธีดัดแปลงของ Tien และ Kirk (1988) มาใช้ตรวจสอบผลการทดลอง จะเป็นการยืนยันและทำให้ทราบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้นั้นเป็นแอคติวิตีของลิกนินเปอร์ออกซิเดสจริง จากการตรวจแอคติวิตีด้วยวิธีนี้จึงทำให้ทราบว่า แอคติวิตีที่ได้เป็น แอคติวิตีของ veratryl alcohol oxidase ซึ่งต่างจากผลการทดลองในช่วงต้น ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจวัดแอคติวิตีของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคสซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายลิกนินเพิ่มเติม เนื่องจากพบว่าเยื่อที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับไวท์รอทมีสีขาวขึ้น พบว่าไวท์รอททั้ง 4 ชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ จึงนำไปทำการทดลองในขั้นต่อไป

ยังเป็นที่สงสัยกันว่า *G. lucidum* *Ganoderma* sp. และ *S. commune* สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้หรือไม่ แม้ว่า Perumal และ Kalaichelvan (cited in D'souza, Merritt, and Reddy, 1999) และ Muzariri และคณะ (2001) รายงานว่า ตรวจพบแอคติวิตีของลิกนินเปอร์ออกซิเดสใน *G. lucidum* ก็ตาม นอกจากนี้ D'souza และคณะ (1999) ตรวจพบยีนที่ควบคุมการผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสจาก *G.lucidum* แต่ยีนดังกล่าวไม่แสดงออก ซึ่งอาจเกิดจากภาวะที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และสารอาหาร เป็นต้น (Regalado et al., 1999) แม้ว่าในรายงานข้างต้นจะใช้วิธีการตรวจสอบด้วยการติดตามการออกซิไดซ์ veratryl alcohol แต่ไม่ได้รายงานว่าได้ทำการตรวจสอบ veratryl alcohol oxidase หรือไม่ซึ่งแอคติวิตีที่ได้อาจไม่ใช่ แอคติวิตีของลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่แท้จริง นอกจากนี้ Presnell และคณะ(1995) Guadalix และคณะ (1996) รวมถึง Ander และคณะ (1996) ได้รายงานว่าการตรวจวัดแอคติวิตีด้วยวิธีติดตามการออกซิไดซ์ของ veratryl alcohol ถือได้ว่าเป็น ลิกนินเปอร์ออกซิเดสแอคติวิตี

เช่นเดียวกัน เนื่องจากเป็นการออกซิไดซ์สารชนิดเดียวกัน ดังนั้นการตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจึงน่าจะขึ้นอยู่กับว่าใช้วิธีการใด

3. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนรวมกับโมเลกุลของเกลือจึงทำให้มีโมเลกุลใหญ่ขึ้น เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงเอนไซม์จึงตกตะกอนลงมาได้ จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำการไดอะไลซิสซึ่งเป็นการกำจัดเกลือออก โดยอาศัยหลักการแยกโปรตีนตามขนาดโดยใช้เยื่อบางที่มีรูเล็กเพื่อบรรจุสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนแล้วแช่ในบัฟเฟอร์ สารที่มีขนาดเล็กกว่ารูของเยื่อบางก็จะแพร่ออกจากถุง ส่วนสารละลายที่มีขนาดใหญ่ก็จะถูกเก็บไว้ในถุง จึงทำให้โปรตีนส่วนเกินถูกกำจัดออกไปได้ เอนไซม์ที่ได้จึงมีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จากผลการทดลองที่เอนไซม์ซึ่งผ่านการไดอะไลซิสแล้วมีหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ก่อนการตกตะกอน ซึ่งก็เป็นไปในทำนองเดียวกันกับการใช้เยื่อเลือกผ่าน ซึ่งเอนไซม์ที่ผ่านการกรองโดยใช้เยื่อเลือกผ่านจะมีหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพราะเยื่อจะทำการคัดเลือกสารที่มีโมเลกุลตามที่ต้องการไว้ได้โดยอาศัยหลักการของการไดอะไลซีสเช่นกันโดยสารซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กกว่าที่ต้องการจะถูกคัดออกด้วยการกรองผ่านเยื่อกรอง และจะเก็บกักสารที่มีโมลกุลใหญ่กว่าเอาไว้ในเยื่อกรอง

4. การทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์

เอนไซม์เป็นพอลิเพปไทด์ของกรดอะมิโนซึ่งจะเสียสภาพในภาวะที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง หรืออุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไป หรือเนื่องจากผลของสารเคมีบางชนิดได้ ซึ่ง Ko Leem และ Choi (2001) รายงานว่า เอนไซม์แลคเคสที่ได้จาก *G. lucidum* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานใน pH 3.5 ณ อุณหภูมิ 20°เซลเซียส มีความเสถียรในช่วง pH 4-10 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40°เซลเซียส สอดคล้องกับความเสถียรของเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้

ไวท์รอททั้ง 4 ชนิดสามารถผลิตเอนไซม์จำพวกฟีนอลออกซิเดสซึ่งน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้ โดยมีการนำ *P. chrysosporium* ไปใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ ทั้งในด้านการฟอกเยื่อและการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราทนร้อน สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ลิกนิน

เปอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ในอุณหภูมิสูง คือ 40°เซลเซียส นอกจากนี้ความเสถียรของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสที่ได้จากการทดลองทำให้ทราบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดสามารถทำงานได้อยู่ในช่วงอุณหภูมิสูงระดับหนึ่ง คือ 35-40°เซลเซียส และโดยเฉพาะเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ซึ่งมีความเสถียรและสามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ดีในอุณหภูมิถึง 50°เซลเซียส ซึ่งน่าจะได้ทำการศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เพื่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

5. การฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์

เมื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากไวท์รอททั้ง 4 ชนิด คือ *P. chrysosporium* *G. lucidum* *Ganoderma* sp. และ *S. commune* ซึ่งพบการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสใน *P. chrysosporium* พบเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสใน *G. lucidum* และ *Ganoderma* sp. และพบเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสใน *S. commune* ไปใช้เพื่อฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัส ในอัตราส่วน 12.5 IUต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเยื่อกระดาษ จะให้ผลการฟอกเยื่อที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับค่าความขาวสว่าง ค่าความต้านทานแรงดึง ค่าแรงดันทะลุ และค่าแรงฉีกขาด ซึ่งผลการทดลองที่ได้ แสดงให้เห็นว่า เยื่อกระดาษที่ฟอกด้วยเอนไซม์จาก *S. commune* คือ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสให้ค่าความขาวสว่างมากที่สุดและทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อลดลงมากที่สุดเช่นกัน ซึ่ง Nishida และคณะ (1993) รายงานว่า เมื่อฟอกเยื่อกระดาษคราฟท์ด้วยเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส ซึ่งผลิตจาก *P. chrysosporium* และ *Tremetes versicolor* จะทำให้ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลง โดยเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจะมีบทบาทต่อการฟอกเยื่อมากกว่าลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Kondo et al.,1996; Gill and Arora, 2003)

ลักษณะทางกายภาพของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากไวท์รอทบางชนิด มีคุณภาพดีกว่ากระดาษที่ไม่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยเมื่อฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตได้จาก *P. chrysosporium* ทำให้ค่าการต้านทานแรงดึง ค่าแรงดันทะลุ และค่าแรงฉีกขาดของกระดาษเพิ่มขึ้นได้มากที่สุดและมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งคุณสมบัติที่ดีขึ้นของกระดาษเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์จะส่งผลต่อพันธะไฮโดรเจนของเส้นใย ทำให้การเรียงตัวของเส้นใยมีระเบียบขึ้น (Akhtar et al.,1996) นอกจากนี้ Wong และคณะ (1999) ยังรายงานไว้ว่า การฟอกเยื่อกระดาษคราฟท์ด้วยเอนไซม์จะทำให้ผลผลิตและความหนาแน่นของเยื่อเพิ่มขึ้นด้วย เพราะการทำงานของเอนไซม์จะส่งผลต่อพันธะของเส้นใย จึงทำให้ hydrophobic และ ionic strength ของเส้นใยเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของไวท์รอทและชนิดเยื่อกระดาษ

จากผลการทดลองที่ได้ในขั้นตอนนี้ ทำให้ทราบว่าการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสที่ผลิตได้จากไวท์รอทสามารถลดปริมาณลิกนินลงได้ในระดับหนึ่ง โดยทำให้กระดาษมีความขาวสว่างมากขึ้นและคัปปานัมเบอร์ลดลง นอกจากนี้เอนไซม์บางชนิดทำให้ลักษณะทางกายภาพของเยื่อกระดาษดีขึ้น เนื่องจากเอนไซม์จะเข้าทำลายพันธะ C-C และ C-O-C ของลิกนิน ซึ่งจะส่งผลต่อพันธะไฮโดรเจน ionic strength และ hydrophobic ของเส้นใย ซึ่งการทดลองในครั้งนี้มุ่งหวังที่จะนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้เพื่อการฟอกเยื่อและกระดาษ โดยต้องการลดปริมาณการใช้สารเคมี ซึ่งนอกจากจะเป็นการลดค่าใช้จ่ายแล้วยังช่วยในการรักษาสิ่งแวดล้อมจากการปนเปื้อนด้วยสารเคมีได้ การนำไปใช้อาจใช้ในขั้นตอนก่อนการฟอก (prebleaching) เพราะการทำงานของเอนไซม์จะทำให้สารเคมีในขั้นตอนการฟอกทางเคมีสามารถเข้าทำลายลิกนินได้ดีขึ้นจึงทำให้ลดปริมาณการใช้สารเคมีลงได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1.การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราไวท์รอท

เมื่อเลี้ยงไวท์รอท 4 ชนิด คือ *P. chrysosporium* *G .lucidum* *Ganoderma* sp. และ *S. commune* ในอาหารเหลว PDB พบว่าเชื้อราเจริญได้ดีและมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นจนคงที่ และเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตในช่วงทุติยภูมิของช่วงชีวิต ภายในวันที่ 9 11 7 และ 13 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและน้ำหนักแห้งของไวท์รอทแต่ละชนิด แล้วนำไปคำนวณเพื่อหาค่า specific growth rate จะทำให้ทราบอัตราการเจริญสูงสุดของเชื้อแต่ละชนิด พบว่า *G .lucidum* ให้ค่า specific growth rate สูงที่สุด คือ 5.17 กรัมต่อวัน

2.การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ เพื่อการย่อยสลายลิกนินของไวท์รอทซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญ 3 ชนิด คือ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส ในอาหารเหลวสูตร production เมื่อเพาะเลี้ยงในภาวะ semi-solid ซึ่งใช้ pH เริ่มต้นของอาหารต่างๆ กัน คือ pH 4-8 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-45°เซลเซียส พบว่าไวท์รอทบางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากกว่า 1 ชนิด คือ *P. chrysosporium* สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ดีที่สุดที่ pH 4 เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40° เซลเซียส ในขณะที่*G. lucidum* สามารถผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสได้ดีที่ pH เริ่มต้นเป็น 5 อุณหภูมิ 30°เซลเซียส ในทำนองเดียวกันกับ *Ganoderma* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 2 ชนิดเช่นกัน คือ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส โดยมี pH เริ่มต้นเป็น 4 ที่อุณหภูมิ 30°เซลเซียส สำหรับ *S. commune* ตรวจพบการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเพียงชนิดเดียว โดยผลิตได้ดีที่ pH 6.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35°เซลเซียส

3.การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

เอนไซม์ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆกัน แล้วนำไป dialysis จะมีค่าหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกันกับการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกรองผ่าน ultra filtration โดย *P. chrysosporium* ที่ผ่านการ dialysis จะให้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 4.4-5.1 เท่า ในขณะที่การกรองผ่าน ultra filtration จะให้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 2.82-3.82 เท่า สำหรับ *G .lucidum* จะให้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 4.61-6.2 เท่า และ3.68-4.47 เท่า ในขณะที่ *Ganoderma* sp. จะให้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 4.5-5.06 เท่า และ 3.05-3.44 เท่า สำหรับ *S. commune* จะให้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 4.69 เท่า และ4.33 เท่า เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแล้วทำ dialysis กับ การกรองผ่าน ultra filtration ตามลำดับ

4.การวิเคราะห์ความเสถียรของเอนไซม์

ความเสถียรของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากไวท์รอททั้ง 4 ชนิดในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่มี pH 4-8 เมื่อบ่มไว้เป็นระยะเวลา 30 นาที เป็นไปในทำนองเดียวกัน โดยเอนไซม์จะมีความเสถียรและสามารถทำงานอยู่ได้ใน pH ระหว่าง 4-6 และจะลดลงเมื่อ pH สูงขึ้น จากนั้นเมื่อทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ เมื่อทำการบ่มไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ณ อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 120 นาที พบว่า ในช่วงอุณหภูมิ 35-40°เซลเซียส ค่าหน่วยของเอนไซม์ที่ได้จะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50°เซลเซียส ค่าหน่วยของเอนไซม์จะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น

5.การฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยเอนไซม์

เมื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากไวท์รอททั้ง 4 ชนิดไปฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสโดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 12.5 IU ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเยื่อ แล้วนำเยื่อกระดาษที่ได้ไปทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของเยื่อและความเป็นกระดาษด้วยการขึ้นแผ่นทดสอบ พบว่า เอนไซม์ที่ได้จากไวท์รอททั้ง 4 ชนิด สามารถลดค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อลงได้และทำให้ความขาวสว่างเพิ่มขึ้นโดย *S.commune* ให้ค่าความขาวสว่างของเยื่อมากที่สุด โดยเพิ่มขึ้น 5.96% รองลงมา คือ *G. lucidum* *P. chrysosporium* และ *Ganoderma* sp. โดยมีค่าความขาวสว่างเป็น 4.48% 4.06% และ 3.19% ตามลำดับ เช่นเดียวกับการลดลงของค่าคัปปานัมเบอร์ซึ่ง *S.commune* สามารถลดค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อลงได้มากที่สุด คือ 17.46% รองลงมา คือ *G. lucidum* *P. chrysosporium* และ *Ganoderma* sp. คือ

13.24% 8.93% และ 5.11% ตามลำดับ เมื่อนำกระดาษที่ได้ไปทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพในการต้านทานแรงดึง แรงดันทะลุและแรงฉีกขาด พบว่า *P chrysosporium* ทำให้คุณภาพของกระดาษที่ได้ดีขึ้น รองลงมาคือ *G. lucidum* และ *Ganoderma* sp. แต่ *S.commune* กลับให้ผลตรงข้าม นั่นคือทำให้คุณภาพของเยื่อกระดาษที่ได้ต่ำกว่าชุดควบคุม

6. ข้อเสนอแนะ

1. ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อราเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองครั้งนี้ ได้ใช้ช่วง stationary phase ซึ่งอาจทำให้เชื้อที่ได้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างเต็มที่ จึงควรเปลี่ยนไปใช้ช่วงระยะ log phase เป็นหัวเชื้อแทน ซึ่งจะทำให้มีการผลิตเอนไซม์ได้ดีและคงที่ขึ้น
2. การเลี้ยงเชื้อในระยะหัวเชื้อได้ใช้อาหารเหลวสูตร PDB แล้วเปลี่ยนไปเป็นอาหารเหลวสูตร Production ซึ่งอาจทำให้เชื้อราเกิดการชะงักจนไม่สามารถเจริญหรือไม่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีเท่าที่ควร จึงควรเปลี่ยนมาใช้อาหารเหลวสูตร Production ทั้งในขั้นตอนการผลิตหัวเชื้อและการผลิตเอนไซม์
3. ควรมีการทดลองเปรียบเทียบกับการฟอกเยื่อทางเคมีเพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ไปใช้ในการฟอกเยื่อและกระดาษในทางอุตสาหกรรมได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จันทร์เกษม นรสิงห์. 2544. การเติบโตและสมบัติในการฟอกสีเยื่อกระดาษของสายพันธุ์เห็ดแครง *Schizophyllum commune* Fr. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัชรา วีระกะลัส. 2543. เอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 2 . กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เรือนแก้ว ประพฤติ. 2541. การฟอกเยื่อกระดาษแบบชีวภาพโดยเชื้อรา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

หรรษา ปุณณะพยัคฆ์. 2539. การฟอกเยื่อกระดาษโดยวิธีการทางชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย: 63-69.

ภาษาอังกฤษ

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

Ander, P., Daniel, G., Pettersson, B., and Westermark, U. 1996. Possible applications of cellobiose oxidizing and other flavine adenine dinucleotide enzymes in the pulp and paper industry. In Jeffries, T. W. and L. Viikari (eds.). Enzymes for pulp and paper processing. ACS symposium series 655, Washington, DC., USA: 297-307.

Arora, D.S. and Gill, P.K. 2001. Comparison of two assay procedures for Lignin peroxidase. Enzyme and Microbial Technology. 28: 602-605.

Boominathan, K., and Reddy, C.A. 1991. Fungi degradation of lignin: Biotechnological applications. In Arora, D.K., Elander, R.P., and Mukerji, K.G. (eds). Handbook of Applied Mycology: Fungi Biotechnology. New York, USA.: Marcel Dekker. 4: 763-822.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism Quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analitical. Biochemistry. 72: 248-254.

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

Cai, D. and Tien, M. 1993. Lignin-degrading peroxidase of *Phaneraete chrysosporium* Journal of Biotechnology. 30: 79-90.

Cancel, A.M., Orth, A.B., and Tien, M.1993. Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of Phanerochaete chrysosporium. Applied Environmental Microbiology. 59: 2909-2913.

Chang, H.C. and Bumpus, J.A. 2001. Inhibition of lignin peroxidase-mediated oxidation activity by ethylenediamine tetraacetic acid and N-N-N'-N'-tetramethylenediamine. Proc. Natl. Sci. Counc. Roc. (B). 25: 26-33.

Collins, P.J., Field, J.A., Teunissen, P., and Dobson, A.D.W. 1997. Stabilization of ligninperoxidases in white-rot fungi by trytophan. Applied and Environmental Microbiology. 63: 2543-2548.

D'Souza, T.M., Boominathan, K., and Reddy, C.A. 1996. Isolation of Lac Gene-specific sequences from white rot fungi by PCR. Applied and Environmental Microbiology. 62: 3739-3744.

D'souza, T.M.m Merritt, C.S., and Reddy, C.A. 1999. Lignin-Modifying enzymes of the white rot Basidiomycetes *Ganoderma lucidum*. Applied and Environmental Microbilogy. 65: 5307-5313.

Eriksson, K.-E.L., Blanchette, R.A. and Ander, P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Germany, Ozach Gmbn and cb., Berlin: 225-332.

Faison, B.B. and Kiek, T.K. 1985. Factors Involved in the regulation of a ligninase activity in *Phaneraete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbilogy. 49: 299-304.

Fiechter, A. 1993. Function and synthesis of enzymes involved in lignin degradation. Journal of Biotechnology. 30: 49-55.

Garg ,S.K. and Modi, D.R. 1999. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. Critical Reviews in Biotechnology. 19: 85-112.

Gill, P.K., and Arora, D.S. 2003. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. Journal of Industrial Microbiology&Biotechnology. 30: 28-33.

Glenn, K., Morgan, M.A. Mayfield, M.B., Kuwahara, M. and Gold, M.H. 1983. An extracellular H_2O_2-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete PC.Biochemical and Biophysical Reserch communications, 114:1077-1083

Griffin, H. D. 1994. Fungal Physiology. 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 458 pp.

Guadalix, M.E., Almendros, G., Blanco, M.J., Camarero, S., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Vares, T., Hatakka, A., Pelayo, M., and Gago, E. 1996. Assessment of board-making parameters of pulps prepared by soda cooking, Fungal delignification, or Enzymatictreatment of wheat-straw, In Jeffries, T. W. and L. Viikari (eds.). Enzymes for pulp and paper processing. ACS symposium series 655, Washingtan, DC., USA: 241-256.

Hammel, K.E. 1996. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. New J. Chem. 20: 195-198.

Hammel, K.E. 1997. Fungi degradation of lignin. In Cadisch, G., and Giller, K.E. (eds). Driven by nature: Plant litter quality and decomposition. CAB International, United Kingdom: 33-45.

Hammel, K.E., Jensen Jr,K.A., Mozuch,A.D., Landucci, L.L., Tien, M., and Pease, E.A. 1993. Ligninolysis by a purified Lignin peroxidase. The Journal of Biochemical Chemistry. 268: 12274-12281.

Harazono, K., Kondo, R., and Sakai, K. 1996. Bleaching of hard wood krakt pulp with manganeseperoxidase from *Phanerochaete sordida*. YK-624 without addition of manganese sulfate. . Applied Environmental Microbiology. 62: 913-917.

Have, R.t., Hartmans.,S., Teunissen, P.J.M., and Field, J.A. 1998. Purification and characterization of two lignin peroxidase isozymes produced by *Bjerkander* sp.strain BOS55. FEBS letters. 422: 391-394.

Higuchi, T. 1993. Biodegradation mechanism of lignin by white-rot basidiomycetes. Journal of Biotechnology. 30: 1-8.

KOCH, A.L. 1981. Mannual of Methods for General Bacteriology. A merican Society for Microbilogy. 179-182.

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

Kirk, T. K. and Jeffries, T. W. 1996. Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. In Jeffries, T. W. and L. Viikari (eds.). Enzymes for pulp and paper processing. ACS symposium series 655, Washingtan, DC., USA: 2-14.

Kirk, T.K and Farrell, R.L. 1 987. Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation of Lignin. Annual Review of Microbiology41: 465-505.

Koduri, R.S. and Tien, M. 1994. Kinetic analysis of Lignin peroxidase: Explanation for the mediation phenomenon by veratryl alcohol. Biochemistry. 33: 4225-4230.

Koduri, R. S. and Tien, M. 1995. Oxidation of guaicol by lignin peroxidase. The Journal of Biological Chemistry. 270: 22254-22258.

Kondo, R., Korashiki, K., and Sakai, K. 1994. In vitro bleachinh of hard wood kraft pulp by extracellular enzymes excreated from white rot fungi in a cultivation system using a membrane filter. Applied Environmental Microbiology. 60: 921-926.

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

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

Lenowicz, A., Matuszewska, A., Luterck, J.,Ziegenhagen,D., Wojtas’-Wasilewska,M., Cho, N., and Hofrichter, M. 1999. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. Fungal genetics and biology. 27: 175-185.

Mester, T., de Jong, E., and Field, J.A. 1995. Manganese regulation of veratryl alcohol in white rot fungi and its indirect effect on ligninperoxidase. Environmental Microbiology. 31: 1881-1887.

Moreira, M. T., Feijoo, G., Mester, T., Mayorga, P., Sierra-Alyarez, R. and Field, J. A. 1998. Role of organic acids in the manganese-independent biobleaching system of *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. Applied Environmental Microbiology. 64: 2409-2417.

Muzariri, C.C., Mapingire, J., Mazorodzo, J., and Mandikutse, L. 2001. I solationand screening of microorganisms for potential application in remediation of effluent water from the pulp and paper industry. 2nd WARFSA Waternet Symposium. Intergrated Water Resources Management. CapeTown, South Africa.: 242-250.

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

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

Regalado, V., Prestelo, F., Rodriguez, A., Carnicero, A.Sosa, F.J., De la Fuente, G., and Falc'on, M.A. 1999. Activated oxygen species and two extracellular enzymes: laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus Fusarium proliferatum. Applied Microbiology and Biotechnology. 51: 388-390.

Reid, I.D. 1995. Biodegradation of lignin. Canadian Journal of Botany. 73: 1011-1018.

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

Shan, V. and Nnerud,F. 2002. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. Canadian Journal of Microbiology. 48: 857- 870.

Stewart, P. and Cullen, D. 1999. Organization and Differential regulation of a cluster of Lignin peroxidase Genes of *Phaneraete chrysosporium*. Journal of Bacteriology. 181: 3427-3432.

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

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

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

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

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

TAPPI. 1995. Kappa number of pulp T236 cm-91. TAPPI test methods T200-T1210 1994-1995.

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

Teunissen, P.J.M., and Field, J.A. 1998. 2-alcohol-1,4-Dimethoxybenzene as a novel catalytic cofactor for oxidation of anisyl alcohol by lignin peroxidase. Applied and Environmental Microbiology. 64: 830-835.

Tien, M. and Kirk, T.K. 1983. Lignin-Degrading Enzymes from the *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science. 221: 661-663.

Tien, M. and Kirk, T.K. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phaneraete hrysosporium* purification, and catalytic properties of a unique H_2O_2-requiring oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 2280-2284.

Tien, M. and Kirk, T. K. 1988. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium.* Methods in Enzymology. 161: 238-247.

Tien, M. and Kirk, T.K. Bull, C., and Fee, J.A. 1986. Steady-state and Transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phaneraete chrysosporium* Burds. The Journal of Biological Chemistry. 261: 1687-1693.

Tien, M., Kersten, P.J., and Kirk, T.K. 1987. Selection and improvement of lignin-degrading microoganisms: Potential strategy based on lignin Model-amino acid adducts. Applied and Environmental Microbilogy. 2: 242-245.

Vares, T.,Kalsi, M., and Hatakka, A. 1995. Lignin peroxidases, manganese peroxidase, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. Applied and Environmental Microbiology. 61: 3515-3520.

Wang, P., Woodward, C.A., and Kaufman, E.N. 1999. Polycethylene glycol)-Modified ligninase enhances pentachlorophenol biodegradation in water-solvent mixtures. Biotechnology and Bioengineering. 64: 290-297.

Watanabe, T., Shirai, N., Okada, H., Honda, Y., and Kuwaahara, 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.

Wong, K.K.Y., Anderson, K.B., and Kibblewhite, R.P. 1999. Effects of the laccase mediator system on the handsheet properties of two high kappa kraft pulps. Enzyme and Microbial Technology. 25 : 125-131.

Yang, F.C. and Liav, C.B. 1998. Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures. Bioprocess Engineering. 19: 223-236.

Zacchi, L., Buula, G., Zuolong, D., and Harvey, P.J. 2000. Metabolism of cellulose by *Phaneraete chrysosporium*. In continuously agilated culture is associated with enhances production of lignin peroxidase. Journal of Biotechnology. 78: 185-192.

Zakis, G.F. 1994. Function analysis of lignins and their derivatives. U.S.A.: TAPPI PRESS.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

Potato dextrose agar (PDA)

มีองค์ประกอบดังนี้

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเด็กโตรส	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ต้มมันฝรั่งซึ่งล้างสะอาดและหั่นเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลบ.ซม. ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนสุก แล้วกรองแยกน้ำมันฝรั่งออกมาด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาลเด็กโตรสและวุ้น ลงไป อุ่นต่อ คนจนวุ้นละลายหมด จึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°เซลเซียส ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Potato dextrose broth (PDB)

มีองค์ประกอบดังนี้

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเด็กโตรส	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ต้มมันฝรั่งซึ่งล้างสะอาดและหั่นเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลบ.ซม.ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนสุกแล้วกรองแยกน้ำมันฝรั่งออกมาด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาลเด็กโตรสลงไปอุ่นต่อ คนจนวุ้นละลายหมด จึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°เซลเซียส ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาหารสูตรเพื่อการผลิตเอนไซม์ (Production Medium)

มีองค์ประกอบดังนี้

glucose	25	กรัม
Asparagine	1	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
Fumaric acid	1.32	กรัม
Na_2CO_3	1.12	กรัม
$Fe_2(SO_4)_3$	0.2	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	0.2	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	0.2	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
guaiacol	0.4	mM

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด คนให้ละลาย แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°เซลเซียส ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

การเตรียมเยื่อกระดาษ

เยื่อกระดาษที่ใช้สำหรับการทดลองฟอกเยื่อมีการเตรียม 2 ขั้นตอนคือ

1. ล้างเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสที่ผ่านกระบวนการฟอกด้วยออกซิเจนโดยใช้น้ำสะอาด บีบน้ำออกให้มากที่สุด แล้วนำเยื่อไปตากให้แห้งหมาด คำนวณหา % consistency และ % ความชื้น เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณเยื่อแห้งที่ต้องการใช้ในการทดลอง

2. ชั่งเยื่อกระดาษแห้งที่ได้จากการเตรียมในข้อ 1. แล้วเติมน้ำกลั่นให้ท่วมแช่ไว้นาน 3- 4 ชั่วโมง จึงนำไปตีด้วยเครื่องกระจายเยื่อความเร็ว 600 รอบต่อนาที นานไม่เกิน 5 นาที จึงนำเยื่อไปใช้ในการฟอกในขั้นตอนต่อไป

ภาคผนวก ข

วิธีหาค่าความขาวสว่างของเยื่อ (Brightness T452 om-92)

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

วิธีการเตรียมเยื่อ

เยื่อกระดาษที่นำมาวัดค่าความขาวสว่างควรเก็บในที่ปราศจากแสง ความร้อน และมีความชื้นคงที่ โดยจะใช้เยื่อ 1.2 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ต่อการทำกระดาษ 1 แผ่น จากนั้นจึงนำไปขึ้นแผ่นตามวิธีการของ TAPPI T205 sp-95

1. ชั่งเยื่อ 30 กรัมแห้ง แช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 2 ลิตร จากนั้นนำไปตีในเครื่องกระจายเยื่อ 1,200 รอบ

2. นำน้ำเยื่อที่ได้มาปรับปริมาตรเป็น 16 ลิตร (1.5% consistency)

3. ทำการขึ้นแผ่นโดยตวงน้ำเยื่อที่คนตลอดเวลาปริมาตร 800 มิลลิลิตร ลงในเครื่องขึ้นแผ่น จากนั้นปล่อยน้ำออกจนเยื่อแผ่กระจายเป็นแผ่น นำแผ่นกระดาษที่ได้(test sheet) มา press ตามลำดับขั้นตอนการวางดังนี้

- แผ่น plate
- กระดาษซับ 2 แผ่น ประกบกัน
- test sheet
- กระดาษซับ 2 แผ่น
- แผ่น plate
- กระดาษซับ 2 แผ่น ป้องกันการบิดเบี้ยวของ plate

4. ทำการ press โดยใช้ pressure 350-400 kPa เป็นเวลา 5 นาที

5. นำ sheet ที่ผ่านการ press มาวางลงบนกระดาษซับแผ่นใหม่ ประกบทั้ง 2 ด้าน แล้วทำการ press โดยใช้ pressure 350-400 kPa เป็นเวลา 2 นาที

6.นำ sheet ที่ผ่านการ press มาวางลงบนกระดาษซับแผ่นใหม่ ประกบทั้ง 2 ด้าน นำไปวางไว้บน ring ซึ่งทำจากเหล็กหรือพลาสติก เพื่อป้องกันการบิดงอของแผ่น sheet ในระหว่างที่ผึ่งตากแผ่น sheet ซึ่งใช้เวลานาน 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีวัดค่าความขาวสว่าง

ก่อนการวัดค่าความขาวสว่างต้องนำตัวอย่างวางไว้ในห้องปรับสภาพ เพื่อควบคุมความชื้นไว้อย่างน้อย 4 ชั่วโมง จึงสามารถวัดค่าได้

1. อ่านค่า working standard ตรงกับ assign value + 0.3
2. กดปุ่ม (↓) (7) จะปรากฏ Measuring brightness
3. วาง test sheet ด้าน top side ลงบนเครื่อง Elrepho จากนั้นกดปุ่มบันทึกค่า brightness

การวัดค่าการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ (freeness T227 om-94)

1. ชั่งเยื่อแห้ง 30 กรัม แล้วนำไปแช่น้ำไว้อย่างน้อย 4 ชม.
2. ปรับปริมาตรของเยื่อให้เป็น 0.3 % consistency ในน้ำ 10 ลิตร
3. ตีเยื่อให้กระจายที่ 400 รอบ จากนั้นปรับอุณหภูมิให้เป็น 20 °เซลเซียส
4. ทำการ calibrate เครื่องด้วยการตวงน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร ใส่ลงในภาชนะทรงกระบอกของเครื่องวัดความอุ้มน้ำ รอจนกระทั่งน้ำไหลผ่านออกมาหมด วัดปริมาตรที่ได้ ให้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือ ปริมาตรน้ำ 880-890 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง
5. ทดสอบตัวอย่างที่เตรียมไว้ตามวิธีการข้อ 4. ทำซ้ำ 2 ครั้ง
6. นำเยื่อที่ค้างอยู่ในภาชนะทรงกระบอกของแต่ละการทดสอบไปอบแห้งที่ 105°เซลเซียส อย่างน้อย เป็นเวลา 4 ชม. เพื่อหาน้ำหนักแห้งที่แท้จริง
7. นำค่าที่ได้ไป correction เพื่อหาค่าความอุ้มน้ำที่แท้จริง

การวัดค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อ (Kappa number T236 cm-85)

ค่าคัปปาร์นัมเบอร์ (Kappa number) ของเยื่อ คือ จำนวนมิลลิลิตรของโปแตสเซียมเปอร์มังกาเนต ($KMnO_4$) ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ที่ใช้ไปต่อเยื่อ 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด โดยผลลัพธ์ที่ได้จะถูกแปลงให้สมดุลย์กับปริมาณ 50% ของ 0.1 นอร์มัล โปแตสเซียมเปอร์มังกาเนตที่ใช้ไปในการทดลอง

วิธีการวัดค่าคัปปาร์นัมเบอร์

1. ปริมาณตัวอย่างของเยื่อที่ใช้จะต้องทำการลองผิดลองถูกเพื่อให้ปริมาณลิกนินที่มีอยู่สมดุลย์กับ 0.1 N $KMnO_4$ จำนวน 50 % ของที่เติม ซึ่งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย อาทิเช่น ชนิดของเยื่อ ความชื้นของเยื่อ กระบวนการต้มเยื่อ เป็นต้น ปริมาณเยื่อตาม

standard เท่ากับ 50 / Kappa number โดยประมาณ โดยที่จะปรับปริมาณของเยื่อที่ใช้จนกระทั่งมีปริมาณ consumed สารเคมีเป็น 50 %

2. นำตัวอย่างของเยื่อที่ต้องการหาค่าคัปปาร์นัมเบอร์ มาตีกระจายในน้ำกลั่นจนกระทั่งเยื่อกระจายตัว

3. ใส่เยื่อตัวอย่างที่ผ่านการตีกระจายลงไปในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณรวม 795 มิลลิลิตร ไปวางบน magnetic stirrer เพื่อทำการกวนตลอดการทดลอง คุมอุณหภูมิให้ได้ $25^{O}C \pm 0.2\ ^{O}C$

4. ปิเปต 0.1 N $KMnO_4$ จำนวน 100 มิลลิลิตร และ 4 N H_2SO_4 จำนวน 100 มิลลิลิตร เทลงในบีกเกอร์ 2,000 มิลลิลิตร พร้อมๆ กัน จากนั้นปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปเป็นเวลานาน 10 นาที

5. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม สารละลาย KI ความเข้มข้น 16.6 % ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

6. ไตเตรทหาปริมาณไอโอดีนอิสระ (I_2) ที่เกิดขึ้นด้วย สารละลาย $Na_2S_2O_3$ ความเข้มข้น 0.1 N จะเกิดสารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีน้ำเงิน ไตเตรทต่อไปจนสีน้ำเงินจางหายไปจนไม่มีสี บันทึกปริมาตร 0.1 N $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ ก็จะทราบถึง 0.1 N $KMnO_4$ ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยา

7. การทำ blank test

7.1 เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ 2,000 มิลลิลิตร

7.2 เติม 4N H_2SO_4 และ 0.1 $KMnO_4$ อย่างละ 100 มิลลิลิตร พร้อมๆ กัน

7.3 เติม 16.6 % KI จำนวน 200 มิลลิลิตร

7.4 ไตเตรทด้วย 0.1 N $Na_2S_2O_3$ จะได้สารละลายสีเหลืองอ่อนจึงเติมน้ำแป้งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นไตเตรทต่อจนได้สารละลายใสไม่มีสี บันทึกปริมาตร 0.1 N ที่ใช้ $Na_2S_2O_3$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>วิธีการคำนวณ</u>

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

โดยที่ P = (b-a) N / 0.1

P = จำนวนมิลลิลิตร 0.1 N ของ $KMnO_4$ ที่ถูกใช้ไปโดยตัวอย่าง

b = จำนวนมิลลิลิตร 0.1 N ของ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไปในการทำ blank test

a = จำนวนมิลลิลิตร 0.1 N $Na_2S_2O_3$ ของที่ใช้ไปในการทดลองโดยตัวอย่างเยื่อ

N = จำนวนนอร์มัลลิตี้ (Normality) ของ $Na_2S_2O_3$

f = factor สำหรับแปลงผลลัพธ์ให้สมดุลย์กับปริมาณ 50% ของ 0.1 N $KMnO_4$ ที่เติมลงไปในการทดลอง (ค่าตารางผนวกที่ 1)

t = อุณหภูมิระหว่างทำการทดลอง (^{o}C)

ตารางที่ 16 ค่า factor (f) สำหรับแปลงผลลัพธ์ของคัปปานัมเบอร์

f	0	1	2	3	4
30	0.958	0.960	0.962	0.964	0.966
40	0.979	0.981	0.983	0.985	0.987
50	1.000	1.002	1.004	1.006	1.009
60	1.022	1.024	1.026	1.028	1.030
70	1.044				

ขั้นตอนการเตรียม crude enzyme

1. ทำการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเชื้อราที่มีอาหารที่เหมาะสม บ่มไว้เป็นเวลานานตามกำหนด

2. แยก supernatant ออกจากเยื่อกระดาษโดยการบีบคั้นให้ได้ supernatant ให้ได้มากที่สุด กรองผ่านผ้าขาวบาง

3. ได้ส่วนของ supernatant ที่มีตะกอนของเยื่อกระดาษแขวนลอยปะปนอยู่ด้วย

4. นำ supernatant มาปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°เซลเซียส นาน 25 นาที เพื่อให้สิ่งเจือปนตกตะกอนนอนก้น

5. รินส่วนของสารละลายใสซึ่งเป็นส่วนของ crude enzyme ออก แล้วนำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

ขั้นตอนการเตรียมถุงไดอะไลซีส

1. นำถุงไดอะไลซีสของบริษัท Spectrum Medical Industries, Inc. รุ่น Spectra 1 Por molecularporous membrane tubing ต้มในสารละลายโซเดียม-ซัลไฟด์ 0.3 % ที่อุณหภูมิ 80°เซลเซียส นาน 1 นาที

2. นำถุงไดอะไลซีสไปล้างด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 °เซลเซียส นาน 2 นาที

3. นำถุงไดอะไลซีสไปแช่ในกรดซัลฟูริค ที่มีความเข้มข้น 0.2 % จากนั้นล้างออกด้วยน้ำร้อนนาน 5 นาที

4. นำถุงไดอะไลซีสที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมไว้เรียบร้อยนี้ไปบรรจุเอนไซม์ที่ต้องการทำไดอะไลซีสเพื่อแยกสารละลายเกลือออกจากเอนไซม์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส(วิธีดัดแปลง Tien and Kirk, 1988)

1. การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

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 ซึ่งประกอบด้วยสารละลายในข้อ 1. มาผสมกันในหลอดทดสอบ โดยเติม 2.5 mM H_2O_2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เป็นลำดับสุดท้าย

3. นำสารละลายจากข้อ 2.ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ณ ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที โดยมีแบลงค์เป็นสารละลายผสมดังกล่าวที่ไม่มี crude enzyme

<u>การคำนวณ ค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส</u>

จาก Law of Beer&Lambert

$A = \varepsilon bc$; A = absorbance

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

b = cell length (cm)

c = absorptivity constant

1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถ ออกซิไดซ์ veratryl alcohol 1 μmol ให้เป็น veratraldehyde ใน 1 นาที

แทนค่า เมื่อ ε ที่ 310 nm ของ veratryl alcohol เป็น 9300 $M^{-1}cm^{-1}$

$A = 9300 \times 1 \times C \ M^{-1}cm^{-1}cm\ min^{-1}$

$C = A/9.3 \times 10^{-6}$ mol/min/ml

$= 0.11A$ μmol/min/ml

แต่ปฏิกิริยาดำเนินในคิวเวตซึ่งมีเอนไซม์ 0.1 ml ให้ C = 0.11A μmol/min/ml

ถ้าใช้เอนไซม์ปริมาตร 1 ml. จะให้ C = 1.1A μmol/min/ml

= 1.1A U/ml.

<u>การคำนวณ ค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่แท้จริง</u>

LiP ที่แท้จริง = ค่าหน่วยของเอนไซม์LiP - ค่าหน่วยของเอนไซม์ VAO

การตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ Veratryl Alcohol Oxidase

มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

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. นำ reaction mixture ซึ่งประกอบด้วยสารละลายในข้อ 1. มาผสมกันในหลอดทดสอบ แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ณ ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที โดยมีแบลงค์เป็นสารละลายผสมดังกล่าวที่ไม่มี crude enzyme

<u>การคำนวณ ค่าหน่วยของเอนไซม์ veratryl alcohol oxidase</u>

ใช้หลักการเดียวกันกับการ คำนวณ ค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคส

มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

4mM 2,6 DMP	ปริมาตร 0.05	มิลลิลิตร
0.1 M sodium tartrate buffer pH5	ปริมาตร 0.85	มิลลิลิตร
crude enzyme	ปริมาตร 0.1	มิลลิลิตร

2. นำ reaction mixture ซึ่งประกอบด้วยสารละลายในข้อ 1. มาผสมกันในหลอดทดสอบ แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ณ ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที โดยมีแบลงค์เป็นสารละลายผสมดังกล่าวที่ไม่มี crude enzyme

<u>การคำนวณ ค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคส</u>

1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถ ออกซิไดซ์ 1 μmol ของ 2,6 DMP ใน 1 นาที

แทนค่า เมื่อ ε ที่ 470 nm ของ 2,6 DMP เป็น 49600 $M^{-1}cm^{-1}$

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

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

$$= 0.01A \ \mu\text{mol/min/ml}$$

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

ถ้าใช้เอนไซม์ปริมาตร 1 ml. จะให้ C = 0.2A μmol/min/ml

= 0.2A U/ml.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีส เปอร์ออกซิเดส

มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

4mM 2,6 DMP	ปริมาตร	0.05	มิลลิลิตร
0.1 M sodium tartrate buffer pH5	ปริมาตร	0.65	มิลลิลิตร
5 mM $MnSO_4$	ปริมาตร	0.1	มิลลิลิตร
1 mM H_2O_2	ปริมาตร	0.1	มิลลิลิตร
crude enzyme	ปริมาตร	0.1	มิลลิลิตร

2.นำ reaction mixture ซึ่งประกอบด้วยสารละลายในข้อ 1. มาผสมกันในหลอดทดสอบ โดยเติม 2.5 mM H_2O_2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เป็นลำดับสุดท้าย

3.นำสารละลายจากข้อ 2.ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ณ ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที โดยมีแบลงค์เป็นสารละลายผสมดังกล่าวที่ไม่มี crude enzyme

<u>การคำนวณ ค่าหน่วยของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส</u>

ใช้หลักการเดียวกันกับการ คำนวณ ค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคส

<u>การคำนวณ ค่าหน่วยของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่แท้จริง</u>

MnP ที่แท้จริง = ค่าหน่วยของเอนไซม์MnP - ค่าหน่วยของเอนไซม์ Lac + ค่าหน่วยของเอนไซม์MIP

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ manganese independent peroxidase

มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

4mM 2,6 DMP	ปริมาตร	0.05	มิลลิลิตร
0.1 M sodium tartrate buffer pH5	ปริมาตร	0.75	มิลลิลิตร
1 mM H_2O_2	ปริมาตร	0.1	มิลลิลิตร
crude enzyme	ปริมาตร	0.1	มิลลิลิตร

2.นำ reaction mixture ซึ่งประกอบด้วยสารละลายในข้อ 1. มาผสมกันในหลอดทดสอบ โดยเติม 2.5 mM H_2O_2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เป็นลำดับสุดท้าย

3.นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ณ ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที โดยมีแบลงค์เป็นสารละลายผสมดังกล่าวที่ไม่มี crude enzyme

<u>การคำนวณ ค่าหน่วยของเอนไซม์ manganese independent peroxidase</u>

ใช้หลักการเดียวกันกับการ คำนวณ ค่าหน่วยของเอนไซม์แลคเคส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจวัดปริมาณโปรตีน (Bradford, 1976)

มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม Biuret Reagent ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสารละลาย 2 ส่วน

1.1 สารละลาย A ประกอบด้วย

$CuSO_4.5H_2O$	0.75	กรัม
Rochelle salt	3.0	กรัม

ละลายสารในข้อ 1.1 ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร

1.2 สารละลาย B ประกอบด้วย 10% NaOH 150 มิลลิลิตร

ผสมสาระลายทั้งสองส่วนแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร

2. เตรียม สารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.เตรียมสารละลายเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงโดย

3.1 แบลงค์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.2 โปรตีนมารตรฐานมีความเข้มข้น 10 8 5 และ 2 มิลลิกรัมในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.3 โปรตีนตัวอย่างที่ต้องการทราบค่า

4..เติม Biuret Reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตรในแต่ละหลอดเขย่าให้เข้ากัน

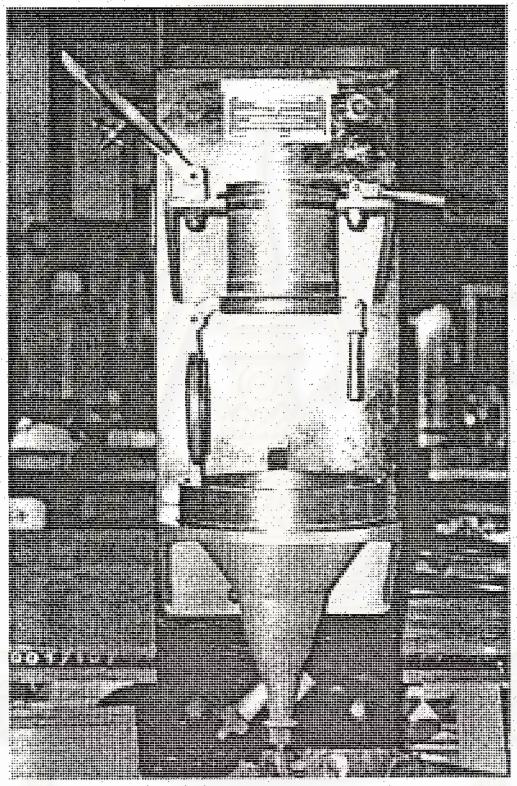
5..ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปเป็นเวลา 30 นาที ณ อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับแบลงค์

การคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (relative activity)

เป็นการเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีนของเอนไซม์ในกลุ่มที่ต้องการ โดยให้แอคติวิตีสูงสุดที่ได้มีค่าเป็น 100 จากนั้นจึงใช้การเทียบบัญญัติไตรยางศ์ ว่า ค่าแอคติวิตีอื่นๆมีค่าเป็น เท่าไร (%)

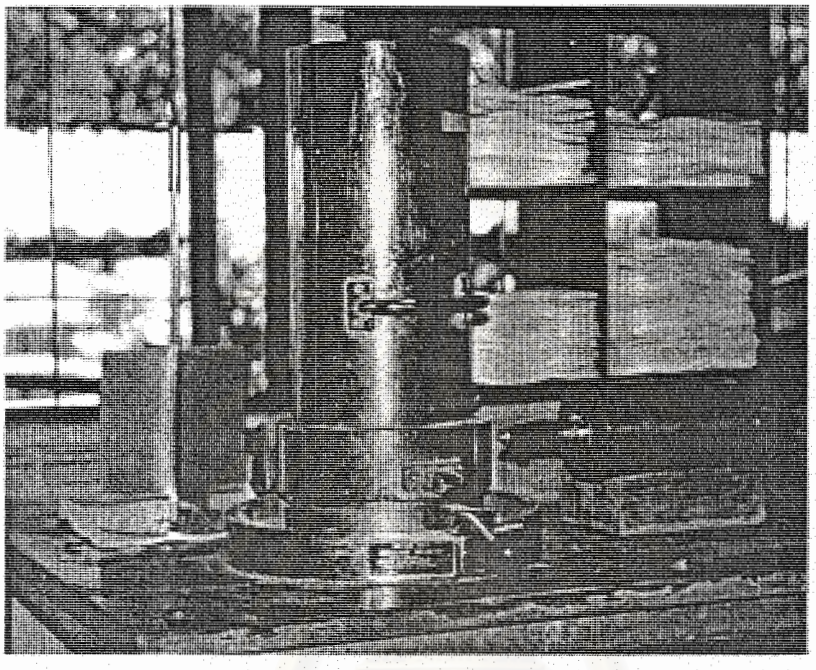
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค



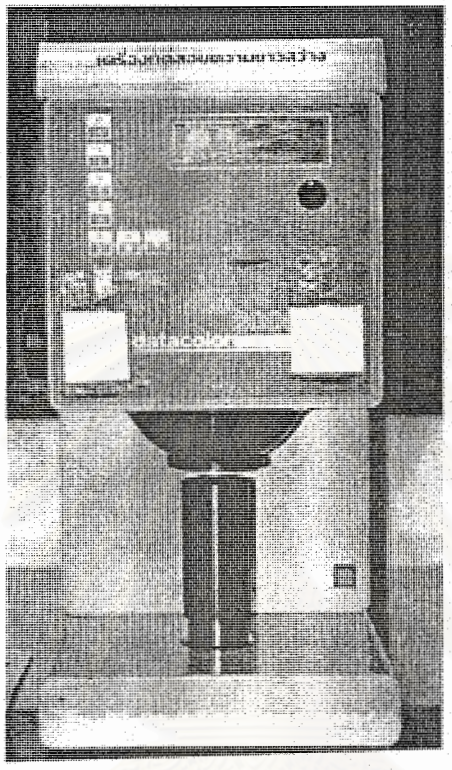
ภาพที่ 14 เครื่องวัดการให้น้ำไหลผ่านเยื่อ (freeness tester)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



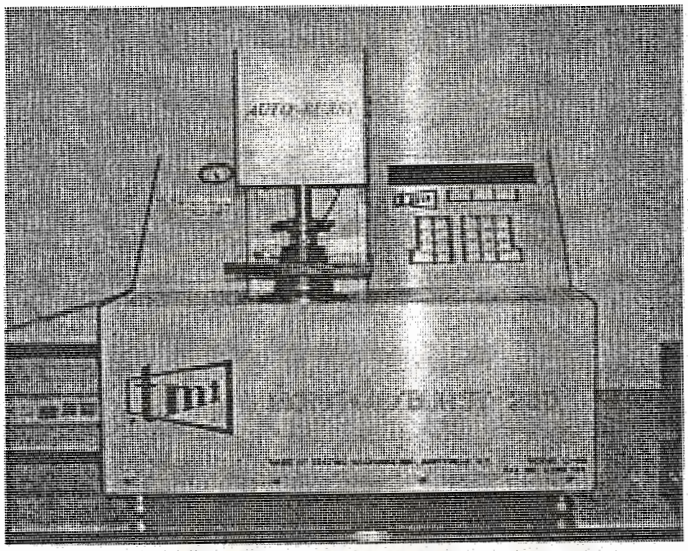
ภาพที่ 15 เครื่องกระจายเยื่อ (Mavis engineering Ltd., London, England)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



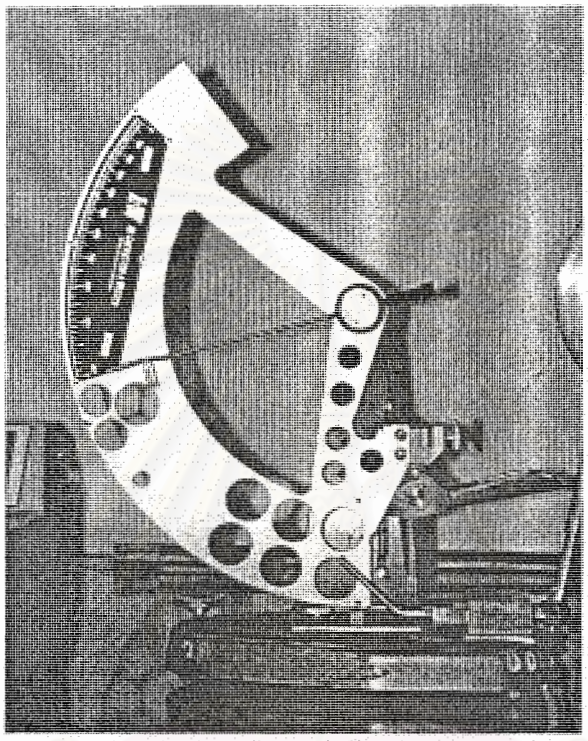
ภาพที่ 16 เครื่องวัดค่าความขาวสว่าง Elrepho 2000 (Datacolor Ltd., Switzerland)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



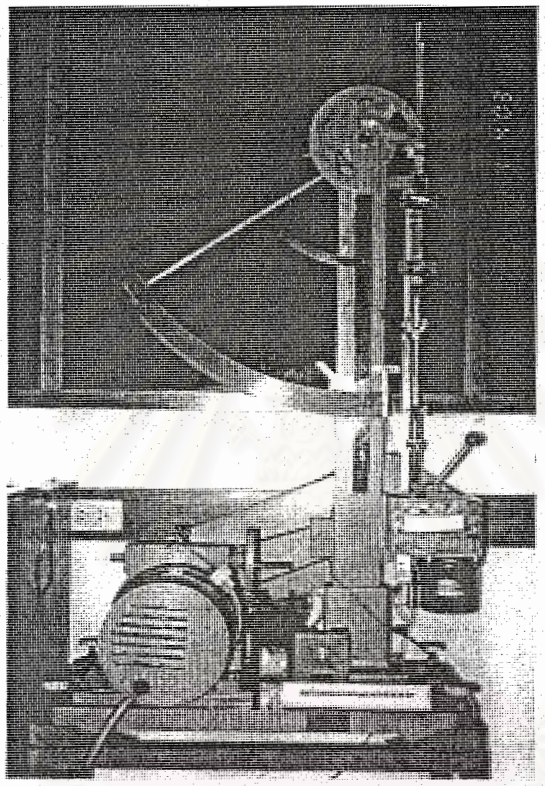
ภาพที่ 17 เครื่องวัดแรงดันทะลุ (Testingmachine Inc., Amityville, Newyork, USA.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 18 เครื่องวัดแรงฉีกขาด (Appita Elmendorf, Amityville, Newyork, USA.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 19 **เครื่องวัดความต้านทานแรงดึง** (pendulum type)

(Toyoseiki Tyoseisaka-SHO.Ltd., Tokyo, Japan)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ตาราง ANOVA

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์ของลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่แท้จริงจาก *P. chrysosporium* ที่เลี้ยงในอาหาร pH ต่าง ๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	24	0.0179	0.0007	52.9418**
ERROR	50	0.0007	0.0000	
TOTAL	74	0.0186		

CV = 11.85%

** = significant at 99% level

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์ของลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่แท้จริงจาก *P. chrysosporium* ที่เลี้ยงในอาหารที่มี pH 4 ณ อุณหภูมิต่าง ๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	14	0.0231	0.0017	53.9822**
ERROR	30	0.0009	0.0000	
TOTAL	44	0.0241		

CV = 10.47%

** = significant at 99% level

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความขาวสว่างของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากไวท์รอท 4 สายพันธุ์

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	5	1,127.6563	225.5313	1,484.6400**
ERROR	54	8.2031	0.1519	
TOTAL	59	1,135.8594		

CV = 0.80%

** = significant at 99% level

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าแรงฉีกขาดของเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากไวท์รอท 4 สายพันธุ์

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	5	2,444.9688	488.9937	21.9000**
ERROR	48	1,071.7656	22.3285	
TOTAL	53	3,516.7344		

CV = 12.99%

** = significant at 99% level

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าแรงดันทะลุของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากไวท์รอท 4 สายพันธุ์

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	5	51,946.6250	10,389.3252	10.1195**
ERROR	24	24,640.000	1,026.6666	
TOTAL	29	7,658.6250		

CV = 12.45%

** = significant at 99% level

ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าการต้านทานแรงดึงของกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์จากไวท์รอท 4 สายพันธุ์

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	5	3.3947	0.6789	29.4808**
ERROR	54	1.2436	0.0230	
TOTAL	59	4.6383		

CV = 12.20%

** = significant at 99% level

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวเบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี เกิดวันที่ 19 เมษายน 2519 สำเร็จการศึกษาจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สาขาวิชาชีววิทยา เมื่อวันที่ 5 มีนาคม 2542 เข้าศึกษาต่อ ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ เมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย