บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาการเจริญของเชื้อรา *P.chrysosporium* และเชื้อรา *G.lucidum* เมื่อเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose broth (PDB)

ทำการศึกษาการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด โดยทำการเก็บผลผลิตของเชื้อราเป็นน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใย เชื้อรา *P.chrysosporium* มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ย เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 โดยเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 น้ำหนักของเส้นใยจะเริ่มคงที่ จนกระทั่งถึงวันที่ 9 ดังนั้นวันที่ 7 จึงเป็นวันที่เชื้อรา *P.chrysosporium* มีการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ส่วนเชื้อรา *G.lucidum* มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary phaseในวันที่ 10 เชื้อรา *P.chrysosporium* และเชื้อรา *G.lucidum* เป็นเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มรา white rot fungi ซึ่งรากลุ่มนี้สามารถสร้างเอนไซม์ extracellular peroxidase เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายโครงสร้างของลิกนิน เอนไซม์กลุ่มนี้ประกอบด้วย lignin peroxidase manganese peroxidase และ laccase ซึ่งเชื้อราจะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ออกมา ดังนั้นการย่อยสลายลิกนินเป็นกระบวนการเมทาบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolism) ที่จะเกิดขึ้นได้เมื่อเชื้อรามีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary phase โดยที่เมทาบอลิซึมของการย่อยสลายลิกนินจะเกิดขึ้นเพียงในช่วงนี้เท่านั้น (Keyser และคณะ,1978 Kirk และคณะ,1978) ดังนั้นระยะ stationary phase จึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่เชื้อราจะถูกกระตุ้นให้สร้าง extracellular peroxidase เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการย่อยสลายลิกนินออกจากเยื่อกระดาษ ในกระบวนการฟอกเยื่อต่อไป

2. การศึกษาภาวะการเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคสและสูตร Production

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *P.chrysosporium* สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ให้ค่าแอคติวิตี้ที่สูงกว่าเชื้อรา *G.lucidum* สำหรับภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับเชื้อรา *P.chrysosporium*_ เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส คือที่ pH 4.0 ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.072 U/ml ที่ pH 3.0 และ 5.0 ให้แอคติวิตี้สูงรองลงมา โดยให้ค่าที่เท่ากันเท่ากับ 0.044 U/ml ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์มีค่าลดต่ำลง เมื่อระดับ pH สูงขึ้น ดังจะเห็นว่าที่ pH 6.0 และ 7.0 มีค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์เท่ากับ 0.029 U/ml และ 0.027 U/ml ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pellinen และคณะ (1989) รายงานว่าที่ pH 4.0-4.5 เหมาะสมกับการย่อยสลายลิกนินโดยเชื้อรา *P.chrysosporium* และงานวิจัยของ Kirk และคณะ(1978a) รายงานว่าเชื้อรา *P.chrysosporium* สามารถย่อยสลายลิกนินได้ดีที่ pH 4.0-4.5 ระดับ pH ที่สูงกว่า 5.0 จะยับยั้งการย่อยสลายลิกนิน นอกจากนี้งานวิจัยของ Polvneni และคณะ(1991) รายงานว่าระดับ pH 4.0-5.0 เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อรา *P.chrysosporium* และยังเป็นภาวะที่เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีความเสถียรมากที่สุด ส่วนเชื้อรา *G.lucidum* ให้ค่าแอคติวิตี้สูงสุดที่ระดับ pH 3.0 และ 4.0 เท่ากับ 0.022 U/ml รองลงมาคือ pH 5.0 ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.019 U/ml และเมื่อระดับ pH สูงขึ้น ค่าแอคติวิตี้มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกับเชื้อรา *P.chrysosporium*

การสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารสูตร production ที่ระดับ pH ต่างๆ โดยเชื้อรา *P.chrysosporium* และ *G.lucidum* พบว่าเชื้อรา *P.chrysosporium* มีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่าแอคติวิตี้สูงกว่าเชื้อรา *G.lucidum* ที่ทุกระดับ pH โดยเชื้อรา *P.chrysosporium* มีการสร้างเอนไซม์ที่ให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์สูงที่สุดที่ pH 5.0 ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.176 U/ml ส่วนเชื้อรา *G.lucidum* ภาวะที่เหมาะสมที่ให้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่ pH เท่ากับ 3.0 และ 4.0 ให้ค่าแอคติวิตี้ที่เท่ากันเท่ากับ 0.028 U/ml เมื่อดูแนวโน้มการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อรา ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าที่ pH สูงขึ้น ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์จะน้อยลงซึ่งจากงานวิจัยของ Polvinen และคณะ (1991) รายงานว่า เมื่อเอนไซม์อยู่ในภาวะที่มีความเป็นเบสมากขึ้น จะทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี้ การสร้างเอนไซม์ของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร production นอกจากจะทำให้ ได้แอคติวิตี้ที่สูงขึ้นแล้ว ยังจะทำให้ช่วงของความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กว้างขึ้นอีกด้วย เช่น กรณีเมื่อฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *P.chrysosporium* ในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 4.0 ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์เท่ากับ 0.072 U/ml แต่เมื่อเปลี่ยนมาฟอกเยื่อในอาหารสูตร production

แล้วช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์จะกว้างขึ้นคือ pH 3.0 – 5.0 คือที่ pH 3.0 ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์เท่ากับ 0.076 U/ml ซึ่งผลของค่าแอคติวิตี้ผลที่ได้มีค่าสูงกว่าที่ pH 3.0 เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส ซึ่งผลการทดลองที่ได้ใกล้เคียงกับงานของ Polvinen และคณะ (1991) รายงานว่า pH ที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เท่ากับ 4.0-5.0

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของอาหารทั้ง 2 สูตร คือ PDB 0.5% กลูโคสและอาหารสูตร production เปรียบเทียบกันแล้ว จะเห็นว่าองค์ประกอบของกลูโคสในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส จะมีอยู่อย่างจำกัด คือ 0.5 กรัม ต่อ PDB 100 มล. ในขณะที่อาหารสูตร production ปริมาณของกลูโคสคิดเป็น 10 กรัม ต่อ 100 มล. ซึ่งเป็นปริมาณกลูโคสที่มากเกินพอ (Tien และ Kirk, 1988) และจากงานวิจัยของ Jeffries และคณะ (1981) พบว่าในภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอในเชื้อรา *P.chrysosporium* สามารถสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสลายลิกนินได้มากยิ่งขึ้น สาเหตุที่เชื้อรากลุ่ม white rot fungi ต้องการแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอมาใช้ในกระบวนการย่อยสลายสารลิกนินนั้น เพราะว่าเชื้อรากลุ่มดังกล่าวไม่ได้ใช้ลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการเจริญเติบโต แต่จะใช้เป็นแหล่งพลังงานหรือแหล่งคาร์บอนเสริมอีกทางหนึ่งเท่านั้น (Buswell and Odier,1987 Buswell,1991 Kirk และ Farrell,1987) หรือเป็นเพียง โคเมทาบอลิซึม (co - metabolism) ซึ่งเกิดขึ้นร่วมกับการใช้แหล่งพลังงานหรือแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ซึ่งง่ายต่อการที่เซลล์จะนำไปใช้ เช่นกลูโคส ทั้งนี้เพราะการย่อยสลายลิกนินโดยเชื้อรากลุ่ม white rot fungi ไม่สามารถให้พลังงานได้เพียงพอ สำหรับการเจริญเติบโต (Crowford , 1981 Kirk Higuchi และ Chang ,1978 Buswell,1991 และ Kuwahara และ Asada ,1987) จากผลการทดลองจะเห็นว่าเชื้อราทั้ง 2 ชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส ได้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ต่ำกว่าในอาหารสูตร production ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส มีส่วนประกอบของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการที่เชื้อราจะนำไปใช้ในการเจริญมากกว่าการสร้างเอนไซม์ ดังจะเห็นได้ว่าได้มีการนำอาหาร PDB มาใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ เมื่อเชื้อรามีการเจริญและพัฒนาของเส้นใยในระยะ vegetative growth ได้สิ้นสุดลงหลังจากนั้นเชื้อราจึงเข้าสู่ระยะ stationary phase และมีการสร้างเอนไซม์ออกมา (Leatham, 1986) ดังนั้นการสร้างเอนไซม์ในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส จึงให้ค่าแอคติวิตี้ที่ต่ำกว่าอาหารสูตร production นอกจากนี้แล้วความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารสูตร production ซึ่งมีความเข้มข้นมากกว่าจะมีผลทำให้เซลล์เกิดแรงดัน osmosis ส่งผลให้เซลล์สามารถนำเอาออกซิเจนไปใช้ได้มากยิ่งขึ้น การสร้างเอนไซม์ก็จะมากตามขึ้นด้วย การฟอกเยื่อในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส จึงเท่ากับว่าเป็นการทำให้ระยะ vegetative growth ยาวนานมากยิ่งขึ้นซึ่งจะส่งผลให้ระยะ stationary phase เกิดช้า องค์ประกอบในอาหารสูตร

production นอกจากจะมีอัตราส่วนของไนโตรเจนและคาร์บอนที่เหมาะสมแล้ว (Tien และ Kirk,1988) ในอาหารสูตร production ยังประกอบไปด้วย veratryl alcohol ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญตามรายงานของ Faison และ Kirk (1985) ได้ศึกษาถึงกลไกการทำงานของ veratryl alcohol ร่วมกับเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส พบว่า veratryl alcohol ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น ligninolytic enzyme ในภาวะที่ไม่มีการเติม veratryl alcohol จากภายนอกลงไป ligninolytic enzyme จะเกิดขึ้นน้อยมาก นอกจากนี้ veratryl alcohol ยังทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (1–eletron transfer mmediator) อีกด้วย (Harvey และคณะ,1986) เอนไซม์จะไม่สามารถทำงานได้โดยปราศจาก veratryl alcohol ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดซ์ในปฏิกริยา ในขณะเดียวกัน veratryl alcohol ก็จะถูกออกซิไดส์โดยเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดสด้วยเช่นกัน (Leisola และคณะ,1985 Palmer และคณะ,1986) ทำให้โครงสร้างที่มีขนาดใหญ่และซับซ้อนของลิกนินเกิดการแตกหักและมีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง โดยปกติแล้วเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสามารถออกซิไดซ์ โดยตรงกับซับสเตรตหลายชนิด แต่ในปฏิกิริยาบางชนิดเอนไซม์ ไม่สามารถออกซิไดส์ได้โดยตรง จึงจำเป็นต้องมี veratryl alcohol ทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยา เช่นในกระบวนการย่อยสลายสารประกอบลิกนิน เอนไซม์จำเป็นต้องใช้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มาร่วมในปฏิกิริยา โดยที่ veratryl alcohol ทำหน้าที่เป็นตัวพาเอนไซม์ไปยังตำแหน่งบริเวณที่มีความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาก นอกจากนี้ veratryl alcohol ยังช่วยให้บริเวณ active site ของเอนไซม์จับกับโมเลกุลของลิกนินได้ดีขึ้น (Greene และคณะ, 1984)

นอกจากนี้องค์ประกอบในอาหารสูตร production ยังประกอบด้วย KH_2PO_4 Mg_2PO_4และ $CaCl_2$ ตามรายงานของ Reid (1983) พบว่า mineral supplement พวก KH_2PO_4 Mg_2PO_4 และ $CaCl_2$ จะช่วยให้อัตราการย่อยสลายลิกนินที่เกิดโดยเชื้อราเกิดได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ปริมาณของ Mg^{2+}และ Ca^{2+} ที่อยู่ในภาวะสมดุลมีความสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายลิกนินโดยเชื้อ *P.chrysosporium* ในงานวิจัยที่ทำเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส โดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นการผลิตเอนไซม์ขึ้นมาโดยตรง และจะมุ่งเน้นการหาภาวะที่สามารถผลิตเอนไซม์ให้ได้แอคติวิตี้ที่สูงขึ้น จากนั้นจึงนำเอาเอนไซม์ที่ผลิตได้มาทดลองใช้ในการฟอกเยื่อ หรือนำมาใช้ในขั้นตอนการทำ pretreatment กับเยื่อกระดาษ เอนไซม์นำมาใช้มักอยู่ในรูปของ crude เอนไซม์หรือนำเอนไซม์มาผ่านขั้นตอนต่างๆของการทำให้บริสุทธิ์ เพื่อเพิ่มแอคติวิตี้ของเอนไซม์ (Jager และคณะ,1985 Faison และ Kirk, 1985 Tian และ Kirk,1988 Venkatudri และ Irvine,1990 Yasahiko และคณะ, 1995 Masahiko และคณะ,1997) แต่ในการทดลองนี้การผลิตเอนไซม์ทำโดยการเติมเยื่อกระดาษ

ลงไปในอาหารสูตร ทั้งนี้เพื่อที่จะให้ลิกนินที่มีอยู่ในเยื่อกระดาษที่เติมลงไปนั้นทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ นอกเหนือไปจาก veratryl alcohol ที่มีในอาหาร

ประสิทธิภาพการฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *P.chrysosporium* มีความสัมพันธ์ที่สอดคล้องกับค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ ดังจะเห็นว่าที่ pH 4.0 ฟอกเยื่อในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์มีค่าสูงที่สุด ทำให้เอนไซม์สามารถที่จะย่อยลิกนินที่มีอยู่ในเยื่อได้มากขึ้น ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 13.30 ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลง 4.17 คิดเป็นร้อยละ 23.86 เมื่อเทียบกับเยื่อเริ่มต้น เมื่อปริมาณลิกนินลดน้อยลงค่าความขาวสว่างของเยื่อจึงเพิ่มสูงขึ้น ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 43.11% ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น 6.26% จากเยื่อเริ่มต้น เมื่อเปรียบเทียบค่าความขาวสว่างที่ได้จากการฟอกที่ pH ต่างๆในอาหารสูตร production ถึงแม้ว่าแต่ละระดับ pH จะให้ค่าที่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาถึงความแตกต่างกันของค่าความขาวสว่างแล้ว ค่าความขาวสว่างที่ pH 4.0 และ 5.0 มีความขาวสว่างเท่ากับ 43.11 % และ 42.44 % ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความขาวสว่างแตกต่างกันเท่ากับ เมื่อพิจารณาถึงการนำเอากระบวนการฟอกเยื่อไปประยุกต์ใช้โดยการสร้างภาวะที่ทำให้เชื้อราทำงานได้ในภาวะความเป็นกรด-ด่างที่กว้างขึ้น ย่อมมีผลดีกว่าการจำกัดการทำงานของเชื้อราในช่วงที่แคบหรือจำเพาะที่ pH ใด pH หนึ่ง การให้เชื้อราทำงานในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่กว้างย่อมง่ายสำหรับการควบคุม สามารถลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิต การฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *G.lucidum* ในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงมากที่สุดที่ pH 3.0 และ 4.0 ได้ผลดีพอๆกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เท่ากับ 16.86 และ 16.99 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 37.01% และ 36.83% แนวโน้มของการสร้างเอนไซม์และความสามารถในการฟอกเยื่อของเชื้อรา *G.lucidum* มีแนวโน้มเช่นเดียวกับเชื้อรา *P.chrysosporium* แต่เชื้อรา *G.lucidum* จะชอบภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรดมากกว่า และเมื่อ pH สูงขึ้นตั้งแต่ 5.0 ขึ้นไป ประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อจะลดลงเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เพราะว่าทั้งเชื้อรา *P.chrysosporium* และ *G.lucidum* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันความต้องการภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม จึงมีแนวโน้มใกล้เคียงกัน

จากการศึกษาการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อของเชื้อรา *P.chrysosporium* ในอาหารสูตร production พบว่าที่ pH 5.0 เชื้อรา *P.chrysosporium* สร้างเอนไซม์ให้ค่าแอคติวิตี้ 0.176 U/ml ค่าคัปปานัมเบอร์และค่าความขาวสว่างของเยื่อ ให้ผลที่สอดคล้องกับปริมาณเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้น ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 10.72 U/ml ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลง 6.75 หรือคิดเป็นร้อยละ 38.64 เมื่อเทียบกับเยื่อเริ่มต้น ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 50.31% ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น 13.46% เมื่อระดับ pH สูงขึ้น คือตั้งแต่ pH 6.0 และ 7.0 ประสิทธิภาพการฟอกเยื่อจะลดลงคือ ค่าคัปปานัมเบอร์ซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ถึงปริมาณลิกนินลดลงน้อยมาก ซึ่งทำให้ค่าความขาวสว่างของเยื่อไม่ต่างกันมากนัก ที่ pH 7.0

ค่าดัปปานัมเบอร์เท่ากับ 15.96 ค่าดัปปานัมเบอร์ลดลงคิดเป็นร้อยละ 32.83 เมื่อเทียบกับที่ pH 5.0 ส่วนค่าความขาวสว่างเท่ากับ 38.63% เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 76.78 ซึ่งถือว่าประสิทธิภาพการฟอกเยื่อที่ pH 7.0 ยังดีอยู่ หากพิจารณาถึงในแง่ของการนำเอาวิธีการฟอกเยื่อทางชีวภาพมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการผลิตแล้ว ที่ pH 7.0 ถึงแม้ว่าจะไม่ใช่ภาวะที่ให้ค่าความขาวสว่างมากที่สุด แต่อาจจะเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ เพราะในขั้นตอนของการผลิตเยื่อจะต้องมีการนำเอาเยื่อมาผ่านการต้มด้วยด่างก่อน ทำให้เยื่อมีสภาพเป็นด่าง pH ประมาณ 9-11 ซึ่งถ้าสามารถนำเอาเยื่อดังกล่าวมาฟอกต่อด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยไม่ต้องผ่านการปรับสภาพก่อนน่าจะเป็นผลดี เพราะจะสามารถลดค่าใช้จ่ายในการใช้พลังงานให้น้อยลง

การฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *G.lucidum* พบว่า ที่ pH 3.0 ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 0.028 U/ml ค่าดัปปานัมเบอร์เท่ากับ 14.59 ค่าดัปปานัมเบอร์ลดลง 2.88 หรือ 16.0% เมื่อเทียบกับเยื่อเริ่มต้น ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 39.80% หรือคิดเป็นร้อยละ 10.80 จะเห็นว่าเมื่อฟอกเยื่อในอาหารทั้ง 2 สูตร ที่ pH 6.0 และ 7.0 ค่าดัปปานัมเบอร์และค่าความขาวสว่างไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้เพราะเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตี้ ที่ pH สูงกว่า 5.0 เอนไซม์

3. การศึกษาหาภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาในการฟอกเยื่อที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อ

การฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *P. chrysosporium* ในอาหารสูตร prouction pH ของสารละลายอาหารเท่ากับ 5.0 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ค่าแอคติวิตี้สูงสุด คือ 40 °C รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 35 °C 30 °C และ 25 °C ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 7 วัน ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 °C มีค่าสูงเท่ากับ 0.274 u/ml เมื่อฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าดัปปานัมเบอร์เท่ากับ 7.29 และค่าความขาวสว่างเท่ากับ 54.37% ที่อุณหภูมิ 35 °C ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์มีค่าสูงที่สุดเมื่อฟอกเยื่อนาน 7 วัน เท่ากับ 0.184 u/ml แต่ประสิทธิภาพการฟอกเยื่อดีที่สุดเมื่อฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าดัปปานัมเบอร์เท่ากับ 10.41 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 50.57% ที่อุณหภูมิ 30 °C เมื่อฟอกเยื่อนาน 7 วัน ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.138 u/ml แต่เมื่อฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าดัปปานัมเบอร์เท่ากับ 13.26 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 43.38% ส่วนที่อุณหภูมิ 25 °C เมื่อฟอกเยื่อนาน 7 วัน ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.077 u/ml และเมื่อฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าดัปปานัมเบอร์เท่ากับ 13.47 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 42.77% จากผลการทดลองจะเห็นว่าที่ทุก ๆ อุณหภูมิค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่ใช้ระยะในการฟอกเยื่อนาน 7 วัน ค่าแอคติวิตี้จะสูงที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าที่ระยะการฟอกนาน 4 วัน เป็นช่วงที่เชื้อรากำลังเริ่มมีการสร้างเอนไซม์ จึงมีการสร้างเอนไซม์ได้

เพียงเล็กน้อย จนกระทั่งเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการฟอกเยื่อมากขึ้นจนกระทั่งวันที่ 7 เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์ออกมามากและสามารถเข้าไปจับกับเยื่อได้ดี ส่วนในวันที่ 11 และ 14 นั้น ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์จะเริ่มลดลง ทั้งที่อาจมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อเอนไซม์เข้าไปย่อยสลายลิกนินที่มีอยู่ในเยื่อ เยื่อจะดูดซับเอนไซม์ไว้ ทำให้ปริมาณเอนไซม์ที่มีอยู่ในสารละลายมีจำนวนน้อยลง ซึ่งเมื่อทำการสกัดเอาเอนไซม์ออกมานั้นทำได้ยาก ในขณะที่เอนไซม์ติดอยู่ในเยื่อนั้น เอนไซม์ก็ยังคงเกิดกิจกรรมการย่อยสลายลิกนินอยู่ดังจะเห็นว่า ถึงแม้ว่าในวันที่ 11 และ 14 ค่าแอคติวิตี้จะต่ำแต่ผลของค่าคัปปานัมเบอร์ก็ยังคงลดลง ในขณะที่ค่าความขาวสว่างก็เพิ่มขึ้น แต่อาจจะเพิ่มได้ไม่มากนัก ทั้งนี้อาจเพราะว่าเอนไซม์มีขีดความสามารถในการย่อยสลายลิกนินอย่างจำกัด คือสามารถย่อยสลายลิกนินได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น จากผลการทดลองที่ได้พบว่าที่อุณหภูมิ 40 °C เหมาะสมต่อการฟอกเยื่อมากที่สุด ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับงานของ Pellinen และคณะ (1989) ซึ่งได้ทดลองนำเชื้อรา *P.chrysosporium* สายพันธุ์ BXM F-1767 มาใช้ในการฟอกเยื่อคราฟท์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการฟอกเยื่อคือ 39 °C Tran และ Chamber (1987) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *P.chrysosporium* คือ 38 °C และเชื้อรา *P.chrysospoium* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่ง Erikson และคณะ (1990) รายงานว่าเชื้อรา *P.chrysosporium* จัดอยู่ในพวก thermotolerant เพราะสามารถทนอุณหภูมิในระดับที่ค่อนข้างสูง สำหรับการฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *G.lucidum* ต้องการความเป็นกรดด่างของสารละลายอาหารเท่ากับ 3.0 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์สูงสุดคือ 25°C เมื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 11วัน ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.080 U/ml และเมื่อฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 12.58 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 45.69% อุณหภูมิที่ให้ผลดีรองลงมาคือที่ 30°C เมื่อฟอกเยื่อนาน 11 วัน ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์เท่ากับ 0.068 U/ml เมื่อฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 13.96 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 41.73% ที่อุณหภูมิ 35°C ฟอกเยื่อนาน 11 วัน ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์เท่ากับ 0.035 U/ml เมื่อฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 15.29 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 38.95% ที่อุณหภูมิ 40 °C ฟอกเยื่อนาน 11 วัน ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.026 U/ml เมื่อฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 16.19 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 37.43% ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นภาวะที่เหมาะสมที่เชื้อรา *G.lucidum* สร้างเอนไซม์และมีประสิทธิภาพการฟอกเยื่อดีที่สุด โดยในวันที่ 11 ของการฟอกค่าความขาวสว่างของเยื่อเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 23.58 ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อลดลงคิดเป็นร้อยละ 26.45 ของเยื่อเริ่มต้น จะเห็นว่าเชื้อรา *G.lucidum* สามารถสร้างเอนไซม์และให้ประสิทธิภาพการฟอกเยื่อได้ดีที่อุณหภูมิ 25°C ทั้งนี้เพราะเชื้อรา *G.lucidum* จะเจริญได้ดีในภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ จากงานวิจัยของ Adaskaveg และคณะ (1990)

ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของ silver oak (*Quercus hypoleucoidus* A.Camus) และ White fir (*Abies concolor* Gord and Glend) ซึ่งถูกย่อยโดยเชื้อรา *G.lucidum* ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 27°C พบว่าไม้ silver oak มีการสูญเสียไปของลิกนินเท่ากับ 48.60% หลังการบ่ม 20 สัปดาห์ ส่วนในไม้ white fir พบว่ามีการสูญหายไปของลิกนินเท่ากับ 69.8% และจากงานวิจัยของ Adaskaveg และคณะ (1995) ก็ให้ผลใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 25°C เชื้อรา *G.lucidum* สามารถย่อยสลายลิกนินในไม้ silver oak ทำให้ลิกนินลดลง 23% ใช้ระยะในการบ่ม 12 สัปดาห์

4. การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์

จากผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์ที่ทุกระดับอุณหภูมิต้องการความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมเรียงจากมากไปหาน้อยคือ pH 5.0 4.0 3.0 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดคือ 40 °C รองลงมาคือ 35°C 30°C และ 25°C ตามลำดับ โดยที่ pH 5.0 ซึ่งเป็นระดับความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และให้ผลต่อคุณภาพของเยื่อกระดาษมากที่สุด ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อเท่ากับ 12.06 12.40 13.05 และ 13.88 ค่าความขาวสว่างของเยื่อเท่ากับ 46.17% 45.92% 43.31% และ 40.93% ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานของ Polvinen และคณะ (1991) รายงานว่าระดับ pH 4.5-5.0 เอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส จะมีความเสถียรที่สุดและสามารถย่อยสลายลิกนินได้ดี Aitken และ Irvine (1991) รายงานว่าที่ pH 4.5 กิจกรรมและแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดสจะดีที่สุด ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตามรายงานของ Polvinen และคณะรายงานว่าเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส สามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่กว้างคือ 30-60°C เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์จะสามารถจับกับซับสเตรตได้มากเพราะบริเวณ active site ของเอนไซม์จะมากขึ้น นอกจากนี้การนำเอนไซม์มาใช้ในการฟอกเยื่อมีข้อดีคือเอนไซม์จะซึมผ่านเข้าไปในโครงสร้างของผนังเซลล์ได้รวดเร็วและเอนไซม์มีบริเวณการทำงานที่ค่อนข้างจำเพาะเจาะจงกว่า จึงทำให้การฟอกเยื่อด้วยเอนไซม์ใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อสั้นกว่าการฟอกด้วยเชื้อราโดยตรงดังจะเห็นได้จากผลการฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *P.chrysosporium* ในอาหาร production ที่ภาวะ pH 5.0 อุณหภูมิ 40°C ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 12.78 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 45.69% โดยต้องใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 4 วัน แต่เมื่อฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์ ที่อุณหภูมิและ pH เดียวกัน ใช้

ระยะเวลาในการฟอกเยื่อเพียง 6 ชั่วโมง ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อเท่ากับ 12.06 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 46.17%

5 การศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของเยื่อที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์ ที่ภาวะอุณหภูมิ 40°C พบว่าอัตราการใช้เอนไซม์ต่อเยื่อเท่ากับ 1 : 4 ทำให้ค่าความขาวสว่างของเยื่อเพิ่มขึ้นมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 50.91% ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงเหลือ 9.36 อัตราส่วน 1 : 8 จะให้ผลดีรองลงมา ส่วนที่อัตราส่วน 1 :12 และ 1 : 16 ให้ผลของค่าความขาวสว่างและค่าคัปปานัมเบอร์ไม่แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าอัตราส่วนเอนไซม์ต่อเยื่อ 1 :4 นั้น สามารถทำให้ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นมากที่สุด เมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ เพราะว่าเอนไซม์สามารถสัมผัสกับเยื่อได้อย่างทั่วถึง จึงเกิดกระบวนการย่อยสลายลิกนินได้ดีกว่า ส่วนที่อัตราส่วน 1:8 นั้น ถึงแม้ว่าผลทางสถิติจะมีความแตกต่างกัน จะเห็นว่าที่อัตราส่วน 1 : 8 นั้น ค่าความขาวสว่างของเยื่อน้อยกว่าที่อัตรา 1 :4 เพียง 4.53% ค่าคัปปานัมเบอร์แตกต่างกันเท่ากับ 1.30 หากพิจารณาในแง่ของการนำไปใช้แล้วอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเยื่อ 1 : 8 น่าจะมีความเหมาะสมมากกว่า 1 :4 ส่วนที่อัตราส่วน 1 : 12 และ 1 : 16 นั้นค่าความขาวสว่างของเยื่อจะน้อยลง เพราะในขณะที่มีการใช้เอนไซม์ปริมาณเท่าเดิมแต่มีเยื่อเพิ่มมากขึ้น โอกาสที่เอนไซม์จะสัมผัสกับเยื่อจึงมีน้อยลง อาจมีเยื่อบางส่วนที่ไม่ได้ถูกฟอกด้วยเอนไซม์ และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนการใช้เอนไซม์ต่อเยื่อเป็น 1 : 12 ค่าความขาวสว่างของเยื่อไม่แตกต่างจากอัตราส่วน 1 : 16 เพราะว่าปริมาณของเอนไซม์มีค่อนข้างจำกัดในขณะที่เยื่อเพิ่มมากขึ้นจึงไม่มีผลต่อค่าความขาวสว่างและค่าคัมปานัมเบอร์ อย่างไรก็ตามในกระบวนการผลิตสามารถที่จะเลือกใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเยื่อให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตเยื่อในแต่ละประเภทได้ เพราะว่ามาตราฐานในการผลิตกระดาษแต่ละประเภทจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับประเภทของผลิตภัณฑ์ที่จะนำเยื่อกระดาษแต่ละชนิดไปใช้ นอกจากนี้แล้วยังต้องคำนึงความเหมาะสมทางเศรษฐศาสตร์อีกด้วย

กระบวนการฟอกเยื่อกระดาษโดยวิธีการทางชีวภาพ น่าจะถือได้ว่าเป็นทางเลือกหนึ่งในปัจจุบัน ในขณะที่เราเริ่มตระหนักถึงปัญหาทางสิ่งแวดล้อมมากขึ้น การนำเอาเชื้อรากลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินมาใช้ในการฟอกเยื่อโดยตรง หรืออาจจะนำเอนไซม์ที่เชื้อราสร้างขึ้นมาใช้ในการฟอกก็นับได้ว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามการยอมรับเทคโนโลยีใหม่ เพื่อนำไปใช้แทนการผลิตแบบดั้งเดิม ยังต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมในด้านเศรษฐศาสตร์ ดังนั้นการที่จะนำเอากระบวนการฟอกเยื่อโดยวิธีการทางชีวภาพมาปรับในระยะแรกนั้น อาจจะนำมาใช้แทรกในบางขั้นตอนของระบบเดิมก่อน เช่น นำมาใช้ในการ pretreatment ก่อนการฟอกด้วยสารเคมี ทั้งนี้

เพื่อช่วยลดต้นทุนของสารเคมีและพลังงาน นอกจากนี้แล้วในส่วนของงานวิจัยยังต้องมีการพัฒนาในการที่จะมีการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราให้มีความเหมาะสมกับชนิดของวัตถุดิบที่นำมาผลิตกระดาษในประเทศ ตลอดจนการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้มีความเหมาะสมและสะดวกต่อการนำไปใช้จริงในระดับอุตสาหกรรม

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. chrysosporium* และเชื้อรา *G. lucidum* ในอาหาร potato dextrose broth

การศึกษาหาระยะของการเจริญของเชื้อรา *P. chrysosporium* และเชื้อรา *G. lucidum* เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB โดยทำการบันทึกน้ำหนักแห้งของเส้นใยของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด พบว่าเชื้อรา *P. chrysosporium* มีการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 7 ส่วนเชื้อรา *G. lucidum* เข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 10

2. ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์และการฟอกเยื่อของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส และสูตร production

เชื้อรา *P. chrysosporium* สร้างเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส และมีประสิทธิภาพการฟอกเยื่อได้ดีกว่าเชื้อรา *G. lucidum* ในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส และสูตร production และเมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์และประสิทธิภาพการฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *P. chrysosporium* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส พบว่า ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ pH 4.0 ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.072 U/ml. ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 13.30 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 43.11% แต่เมื่อเปลี่ยนมาฟอกเยื่อในอาหารสูตร production พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมคือ 5.0 ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.176 U/ml. ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 10.72 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 50.31% (ค่าคัปปานัมเบอร์และค่าความขาวสว่างของเยื่อเริ่มต้นเท่ากับ 36.85% และ 17.47 ตามลำดับ)

เชื้อรา *G. lucidum* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส พบว่าภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ pH 3.0 และ 4.0 ค่าแอคติวิตี้สูงสุดเท่ากับ 0.022 U/ml. ที่ภาวะความเป็นกรด-ด่าง 3.0 ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 16.86 ค่าความขาวสว่างของเยื่อเท่ากับ 37.01% เมื่อฟอกเยื่อ

ในอาหารสูตร production ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ pH 3.0 และ 4.0 ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.028 U/ml. และที่ pH 3.0 ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 14.59 และค่าความขาวสว่างของเยื่อเท่ากับ 39.80%

3. ภาวะของอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด

การฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *P. chrysosporium* ในอาหารสูตร production ที่ pH 5.0 เมื่อทำการผันแปรหาภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อพบว่า ที่อุณหภูมิ 40 °C เชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ได้ค่าแอคติวิตี้สูงสุดเท่ากับ 0.274 U/ml. โดยใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 7 วัน คุณภาพของเยื่อกระดาษดีที่สุดเมื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อเท่ากับ 7.29 ค่าความขาวสว่างของเยื่อเท่ากับ 54.37% ส่วนเชื้อรา *G. lucidum* พบว่าที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เท่ากับ 25 องศาเซลเซียล ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์เท่ากับ 0.08 U/ml. เมื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 11 วัน เมื่อใช้ระยะเวลาฟอกเยื่อนาน 14 วันค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อเท่ากับ 12.58 ค่าความขาวสว่างของเยื่อเท่ากับ 45.69%

4. ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์

การฟอกเยื่อด้วย crude ของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส พบว่าการฟอกเยื่อเกิดได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 °C ที่ระดับ pH เท่ากับ 5.0 ซึ่งให้ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 46.17% ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 12.06 อุณหภูมิที่ให้ประสิทธิภาพต่อการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อดีรองลงมาคือที่อุณหภูมิ 35 °C 30 °C และ 25 °C ตามลำดับ

5. เปอร์เซ็นต์ความข้นของเยื่อที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการทดลองการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์ โดยได้ทำการผันแปรอัตราส่วนการใช้เอนไซม์ต่อเยื่อ พบว่าอัตราส่วนการใช้เอนไซม์ต่อเยื่อเท่ากับ 1 : 4 ให้ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 50.91% ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 9.36 อัตราส่วนการใช้เอนไซม์ต่อเยื่อ 1 : 8 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 46.38% ค่าคัปปานัมนัมเบอร์เท่ากับ 46.38% ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 10.66 และที่อัตราส่วน 1 : 12 และ 1 : 16 ค่าความขาวสว่างของเยื่อเท่ากับ 43.89% และ 43.26% ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 13.22 และ 13.21 ซึ่งค่าความขาวสว่างและค่าคัปปานัมเบอร์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ