บทที่ 3

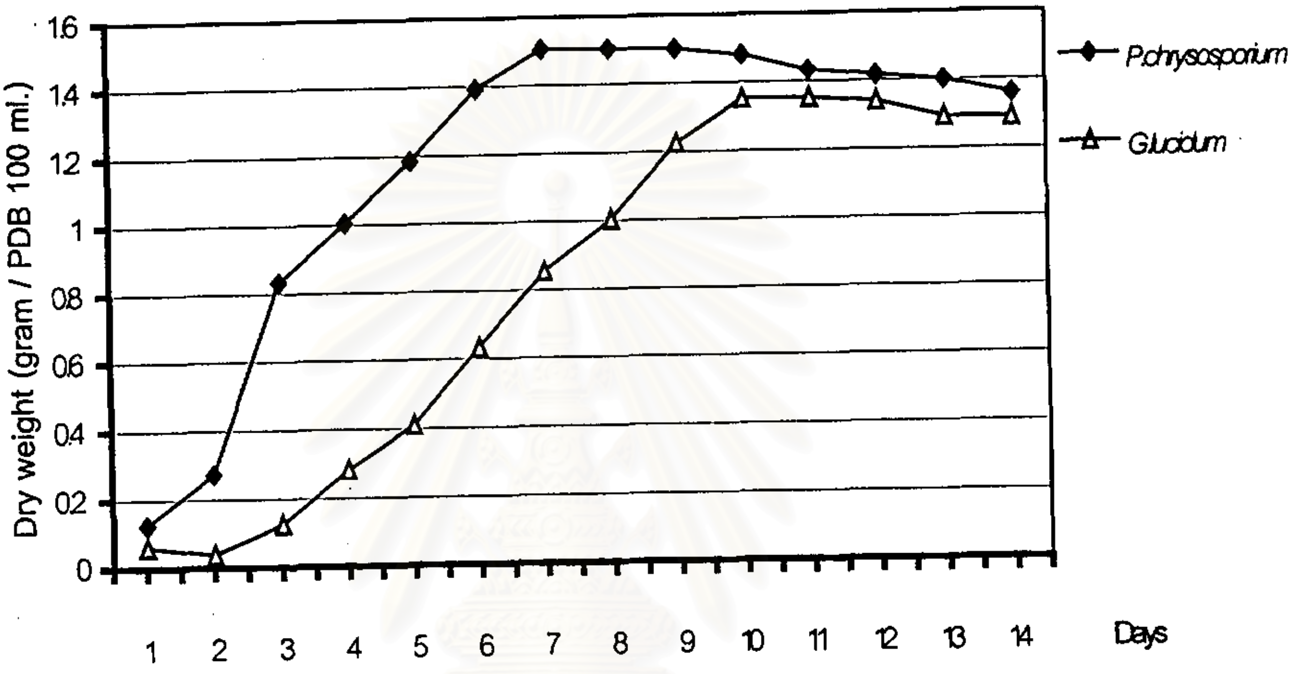
ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *P. chrysosporium* และ เชื้อรา *G. lucidum* ในอาหาร PDB

เมื่อเลี้ยงเส้นใยของเชื้อรา *P.chrysosporium* และ เชื้อรา *G.lucidum* ในอาหาร นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟ แสดงการเจริญเติบโต จากผลการทดลองพบว่าเส้นใยของเชื้อรา *P.chrysosporium* มีน้ำหนักแห้ง เพิ่มขึ้น ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 6 จนกระทั่งถึงวันที่ 7 น้ำหนักของเส้นใยเพิ่มขึ้นสูงสุด และน้ำหนักเริ่มคงที่อยู่ในช่วงวันที่ 7-9 พบว่าวันที่ 7 ของการเจริญ เป็นระยะที่เชื้อรา *P.chrysosporium* มีการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 7 และช่วงเวลาดังกล่าวยังคงดำเนินไปจนกระทั่งถึงวันที่ 9 หลังจากนั้นน้ำหนักแห้งของเส้นใยจะเริ่มลดลงในวันที่ 10 จนกระทั่งถึงวันที่ 15

ส่วนเชื้อรา *G. lucidum* น้ำหนักแห้งของเส้นใยเริ่มเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 หลังจากนั้นน้ำหนักแห้งของเส้นใยจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งวันที่ 10 น้ำหนักแห้งของเส้นใยมีค่าสูงสุด ซึ่งเป็นวันที่เชื้อรา *G. lucidum* มีการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase น้ำหนักจะคงที่จนถึงวันที่ 12 (รูปที่ 7) จากการทดลองนี้ทำให้ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมของเชื้อเริ่มต้นแต่ละชนิดที่จะนำไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. chrysosporium* และเชื้อรา *G. lucidum* เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์และการฟอกเยื่อของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด

2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

จากผลการทดลองในข้อ 1 พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อสำหรับเชื้อรา *P.chrysosporium* ต้องใช้ระยะเวลานาน 7 วัน ส่วนเชื้อรา *G. lucidum* ใช้เวลานาน 10 วัน จากนั้นจึงนำเอาหัวเชื้อราแต่ละชนิดไปทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อต่อไป

2.2 การศึกษาภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด

จากการศึกษาภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อเมื่อฟอกเยื่อกระดาษด้วยเชื้อรา *P. chrysosporium* ในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส พบว่าเชื้อรา *P. chrysosporium* จะให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ดีที่สุดที่ pH 4.0 แอคติวิตี้ของเอนไซม์วัดได้เท่ากับ 0.072 U/ml ส่วนที่ pH 3.0 และ 5.0 มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์เท่ากัน คือ 0.044 U/ml และที่ pH 6.0 และ 7.0 ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.029 U/ml และ 0.027 U/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ 5 รูปที่ 8)

เมื่อนำเยื่อที่ผ่านการฟอกมาวัดค่าคัปปานัมเบอร์พบว่าผลของความเป็นกรด-ด่างที่ทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อลดลงได้มากที่สุดอยู่ที่ pH 4.0 และ 5.0 วัดค่าคัปปานัมเบอร์ได้เท่ากับ 13.30 และ 13.49 ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงจากเยื่อเริ่มต้นประมาณ 4.08 (ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 17.47) ระดับ pH ที่ทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อลดลงให้ผลดีรองลงมาคือ pH 3.0 6.0 และ 7.0 ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อเท่ากับ 14.40 14.05 และ 14.83 ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ 6 รูปที่ 9) ส่วนผลของค่าความขาวสว่างของเยื่อที่ผ่านการฟอกก็ให้ผลสอดคล้องกับค่าคัปปานัมเบอร์ ค่าความขาวสว่างที่วัดได้พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ค่าความขาวสว่างที่ดีที่สุดเท่ากับ 43.11% เมื่อฟอกเยื่อที่ pH 4.0 ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น 6.26% จากเยื่อเริ่มต้น ที่ pH 5.0 3.0 6.0 และ 7.0 เป็นภาวะที่ให้ผลดีรองลงมา ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 42.44% 40.96% 39.85% และ 39.10% ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ 7 รูปที่ 10)

ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่เชื้อรา *G.lucidum* สามารถสร้างเอนไซม์และให้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส พบว่า ที่ pH 3.0 และ 4.0 จะให้ค่าแอคติวิตี้สูงสุดเท่ากับ 0.022 U/ml pH ที่ดีรองลงมาคือ pH 5.0 6.0 และ 7.0 ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.019 U/ml 0.016 U/ml และ 0.011 U/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และ 5 รูปที่ 8) ผลของภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เชื้อรา *G.lucidum* สามารถลดค่าคัปปานัมเบอร์ได้ดีที่ระดับ pH 3.0 และ 4.0 ให้ค่าคัมปานัมเบอร์ที่ดีพอๆ กันเท่ากับ 16.86 และ 16.99 ส่วนที่ pH 5.0 6.0 และ 7.0 ก็ให้ผลของค่าคัปปานัมเบอร์ไม่แตกต่างกันทางสถิติเท่ากับ 17.34 17.38 และ 17.42 ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และ 6 รูปที่ 9) เมื่อนำเยื่อที่ผ่านการฟอกไปวัดค่าความขาวสว่าง พบว่าค่าความขาวสว่างที่วัดได้ไม่ค่อยมีความแตกต่างกันมากนัก คือที่ pH 3.0 ค่าความขาวสว่างสูงสุด เท่ากับ 37.01% ค่าความขาวสว่างสูงขึ้น 0.16% เมื่อเทียบกับค่าความขาวสว่างเริ่มต้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 36.85% pH ที่ให้ผลดีรองลงมาคือ pH 4.0 และ 5.0 ซึ่งผลของค่าความขาวสว่างอยู่ในช่วงที่ค่อนข้างคาบเกี่ยวกัน มีค่าเท่ากับ 36.83% และ 36.62% ส่วนที่ pH 6.0 และ 7.0 ค่าความขาวสว่างไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เท่ากับ 36.54% และ 36.54% (ตารางที่ 2 และ 7 รูปที่ 10)

ตารางที่ 1 ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ค่าคัปปานัมเปอร์และค่าความขาวสว่างของเยื่อเมื่อฟอกด้วยเชื้อรา *P. chrysosporium* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร 0.5% กลูโคส ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆ

เชื้อรา	***Phanerocheate chrysosporium***		
ระดับ pH	**ค่าแอคติวิตี้ (U/ml)**	**ค่าคัปปานัมเบอร์**	**ค่าความขาวสว่าง (%)**
3.0	0.044	14.05	40.96
4.0	0.072	13.30	43.11
5.0	0.044	13.49	42.44
6.0	0.029	14.40	39.85
7.0	0.027	14.83	39.10

ตารางที่ 2 ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ค่าคัปปานัมเปอร์และค่าความขาวสว่างของเยื่อเมื่อฟอกด้วยเชื้อรา *Ganoderma lucidum* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร 0.5% กลูโคส ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆ

เชื้อรา	*Phanerocheate chrysosporium*		
ระดับ pH	**ค่าแอคติวิตี้ (U/ml)**	**ค่าคัปปานัมเบอร์**	**ค่าความขาวสว่าง (%)**
3.0	0.022	16.86	37.01
4.0	0.022	16.99	36.83
5.0	0.019	17.34	36.62
6.0	0.016	17.38	36.54
7.0	0.011	17.42	36.53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การศึกษาภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดในอาหารสูตร production

จากการศึกษาภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการฟอกเยื่อโดยเชื้อรา *P.chrysosporium* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร production พบว่าที่ pH 5.0 ค่าแอคติวิตี้ สูงสุดเท่ากับ 0.176 U/ml pH ที่ให้ผลแอคติวิตี้ดีรองลงมาคือที่ pH 4.0 และ 3.0 ซึ่งค่าของแอคติวิตี้ มีค่าเท่ากับ 0.081 U/ml และ 0.076 U/ml ส่วนที่ pH 6.0 และ 7.0 ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.050 U/ml และ 0.048 U/ml ตามลำดับ ซึ่งให้ค่าที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3 และ 5 รูปที่ 8) เมื่อนำเยื่อที่ผ่านกระบวนการฟอกมาวัดค่าคัปปานัมเบอร์พบว่าภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ให้ค่าคัปปานัมเบอร์ดีที่สุด คือ ที่ pH 5.0 ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 10.72 ที่ pH 5.0 นี้ ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อลดลงเท่ากับ 6.75 pH ที่ให้ผลดีรองลงมาคือ 4.0 3.0 6.0 และ 7.0 ให้ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อเท่ากับ 12.50 12.86 13.54 และ 15.96 ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ 6 รูปที่ 9) ส่วนผลของค่าความขาวสว่างของเยื่อก็สอดคล้องสัมพันธ์กับค่าคัปปานัมเบอร์ คือที่ ระดับ pH 5.0 ค่าความขาวสว่างสูงที่สุดเท่ากับ 50.31% รองลงมาคือ pH 4.0 และ 3.0 ค่าความขาวสว่างได้เท่ากับ 46.63% และ 44.09% ที่ระดับ pH 6.0 และ 7.0 วัดค่าความขาวสว่าง ได้เท่ากับ 43.19% และ 38.63% ตามลำดับ ค่าความขาวสว่างที่ pH 7.0 คิดเป็นร้อยละ 76.78 เมื่อเทียบกับที่ pH 5.0 (ตารางที่ 3 และ 6 รูปที่ 10)

เมื่อศึกษาการฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *G. lucidum* ในอาหารสูตร production พบว่า ที่ pH 3.0 4.0 ให้ค่าที่ดีที่สุดแอคติวิตี้เท่ากับ 0.028 U/ml โดยให้ค่าแอคติวิตี้เท่ากัน ส่วนที่ pH 5 .0 6.0 7.0 เป็นภาวะที่ให้ค่าแอคติวิตี้ดีรองลงมา ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ เท่ากับ 0.024 U/ml 0.020 U/ml และ 0.015 U/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4 และ 5 รูปที่ 8) ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงมากที่สุดคือที่ pH 3.0 ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 14.59 ทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลง 2.88 เมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อเริ่มต้น ที่ pH 4.0 5.0 เท่ากับ 16.51 และ 16.54 ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติ ที่ pH 6.0 และ 7.0 เป็นภาวะที่เกิดการย่อยสลายของลิกนินภายในเยื่อเกิดน้อยที่สุด โดยให้ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 17.22 และ 17.38 ตามลำดับ (ตารางที่ 4 และ 6 รูปที่ 9) ผลของค่าความขาวสว่างในแต่ละระดับ pH มีความแตกต่างกันเห็นชัดเจนขึ้น ที่ pH 3.0 ค่าความขาวสว่างสูงสุดเท่ากับ 39.80% และที่ pH 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 ให้ผลดีรองลงมา ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 38.21% 37.24% 36.85% และ 36.54% ตามลำดับ ค่าความขาวสว่างที่ pH 7.0 คิดเป็นร้อยละ 91.81 เมื่อเทียบกับที่ pH 3.0 (ตารางที่ 4 และ 7 รูปที่ 10)

ตารางที่ 3 ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ค่าคัปปานัมเปอร์และค่าความขาวสว่างของเยื่อเมื่อฟอกด้วยเชื้อรา *Phanerocheate chrysosporium* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร production ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆ

เชื้อรา	*Phanerocheate chrysosporium*		
ระดับ pH	**ค่าแอคติวิตี้ (U/ml)**	**ค่าคัปปานัมเบอร์**	**ค่าความขาวสว่าง (%)**
3.0	0.076	12.86	44.09
4.0	0.081	12.50	46.63
5.0	0.176	10.72	50.31
6.0	0.050	13.54	43.19
7.0	0.048	15.96	38.63

ตารางที่ 4 ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ค่าคัปปานัมเปอร์และค่าความขาวสว่างของเยื่อเมื่อฟอกด้วยเชื้อรา *Ganoderma lucidum* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร production ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆ

เชื้อรา	*Phanerocheate chrysosporium*		
ระดับ pH	**ค่าแอคติวิตี้ (U/ml)**	**ค่าคัปปานัมเบอร์**	**ค่าความขาวสว่าง (%)**
3.0	0.028	14.59	39.80
4.0	0.028	16.51	38.21
5.0	0.024	16.54	37.24
6.0	0.020	17.22	36.85
7.0	0.015	17.38	36.54

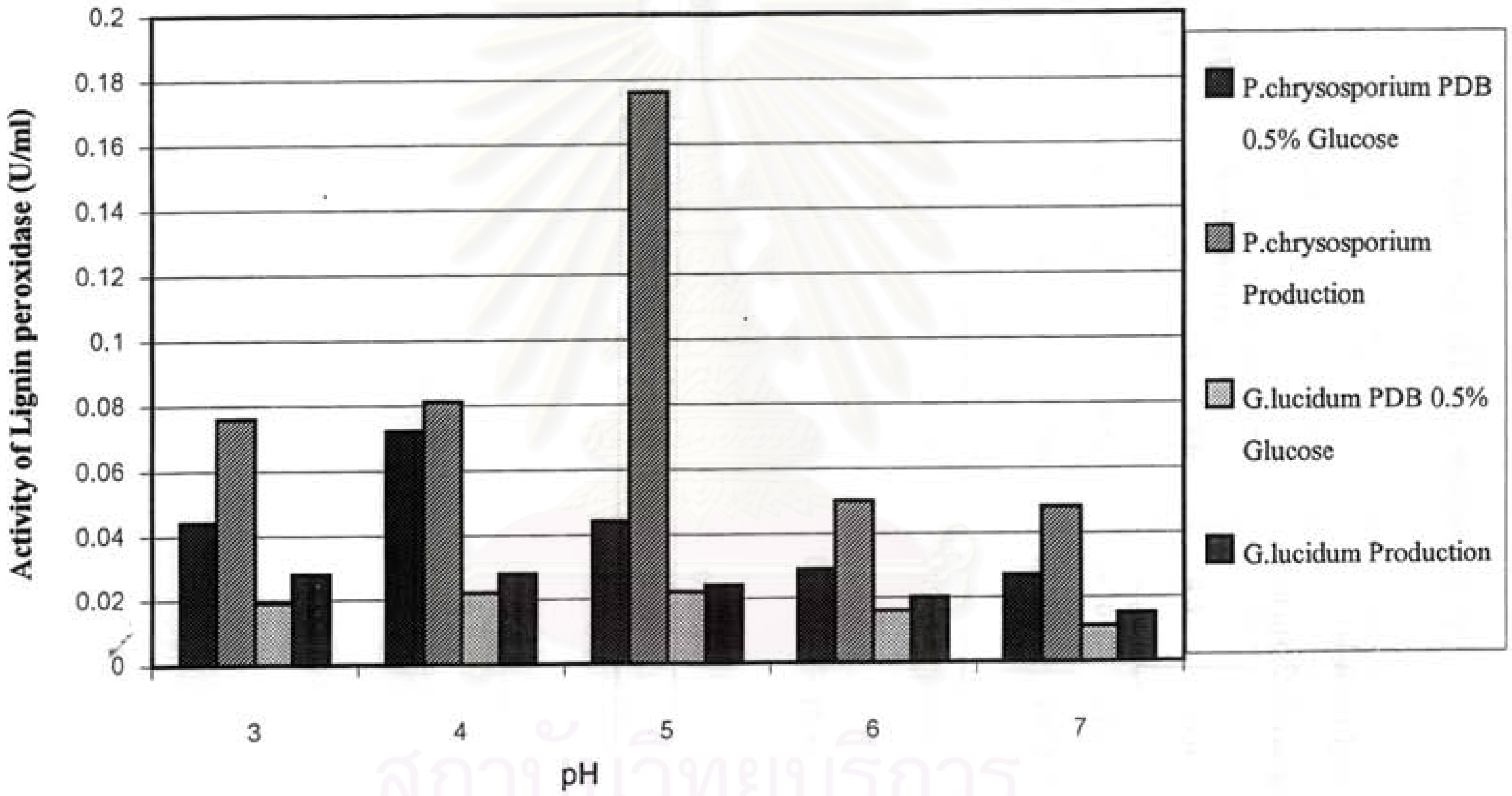
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองข้อ 2.2 และ 2.3 พบว่าเชื้อรา *P.chrysosporium* สามารถผลิตเอนไซม์ให้ค่าแอคติวิตี้สูงมากกว่าเชื้อรา *G.lucidum* ในอาหารทั้ง 2 สูตร เมื่อเปรียบเทียบผลของสูตรอาหารพบว่าเชื้อราทั้ง 2 ชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ในอาหารสูตร production ให้ค่าแอคติวิ้สูงมากกว่าในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส โดยที่เชื้อรา *P.chrysosporium* ให้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์สูงที่สุดที่ pH 5.0 เท่ากับ 0.176 U/ml ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อเท่ากับ 10.72 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 50.31% ส่วนเชื้อรา *G.lucidum* จะสร้างเอนไซม์ให้ค่าแอคติวิตี้สูงเมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร production ที่ pH 3.0 และ 4.0 ค่าแอคติวิตี้เท่ากันเท่ากับ 0.028 U/ml ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 14.59 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 39.80%

เมื่อนำผลการทดลองในข้อ 2.2 และ 2.3 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติหาค่าความแปรปรวนโดยมีตัวแปรเป็นชนิดของเชื้อรา (A) ชนิดอาหาร (B) และระดับความเป็นกรด-ด่าง (C) พบว่าทุกตัวแปรและอิทธิพลร่วมของตัวแปรเหล่านี้มีผลต่อปริมาณเอนไซม์ ค่าคัปปานัมเบอร์และค่าความขาวสว่างของเยื่ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตาราง ANOVA ที่ 18 19 และ 20)

ตารางที่ 5 ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ในภาวะต่างๆ

Treatment		แอคติวิตี้ของเอนไซม์ ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส (U/ml)				
		ระดับ pH เริ่มต้นของอาหาร (^{o}C)				
สายพันธุ์ (A)	**ชนิดของอาหาร (B)**	**3.0**	**4.0**	**5.0**	**6.0**	**7.0**
Phanerocheate chrysosporium	PDB 0.5%กลูโคส	0.044 b	0.072 a	0.044 b	0.029 c	0.027 c
	Production	0.076 c	0.081 b	0.176 a	0.050 d	0.048 d
Ganoderma lucidum	PDB 0.5%กลูโคส	0.022 a	0.022 a	0.019 b	0.016 b	0.011 c
	production	0.028 a	0.028 a	0.024 b	0.020 c	0.015 c
CV (%)	11.88%					
$LSD_{0.05}$	8.33×10^{-3}					



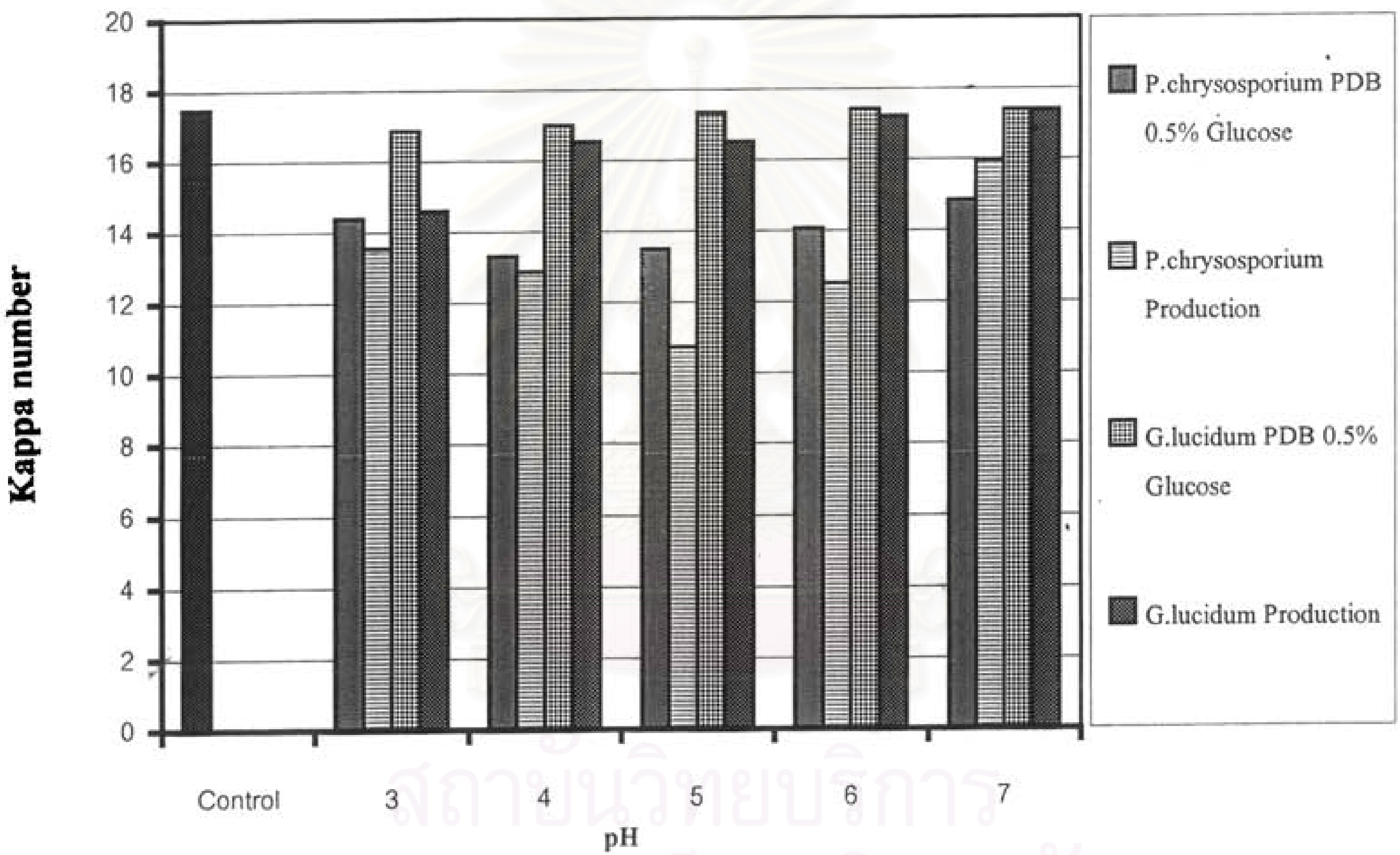
รูปที่ 8 ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ที่สร้างโดยเชื้อรา *P. chrysosporium* และ *G. lucidum* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร PDB 0.5% และสูตร production ที่ภาวะความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อที่ผ่านการฟอกในภาวะต่างๆ

Treatment		ค่าคัปปานัมเบอร์				
		ระดับ pH เริ่มต้นของอาหาร (^{o}C)				
สายพันธุ์ (A)	ชนิดของอาหาร (B)	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
Phanerocheate chrysosporium	PDB 0.5%กลูโคส	14.05 b	13.30 a	13.49 a	14.40 c	14.83 d
	Production	12.86 c	12.50 b	10.72 a	13.54 d	15.96 e
Ganoderma lucidum	PDB 0.5% กลูโคส	16.86 a	16.99 a	17.34 b	17.38 b	17.42 b
	production	14.59 a	16.51 b	16.54 b	17.22 c	17.38 c
CV (%)		0.87%				
$LSD_{0.05}$		0.221				

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



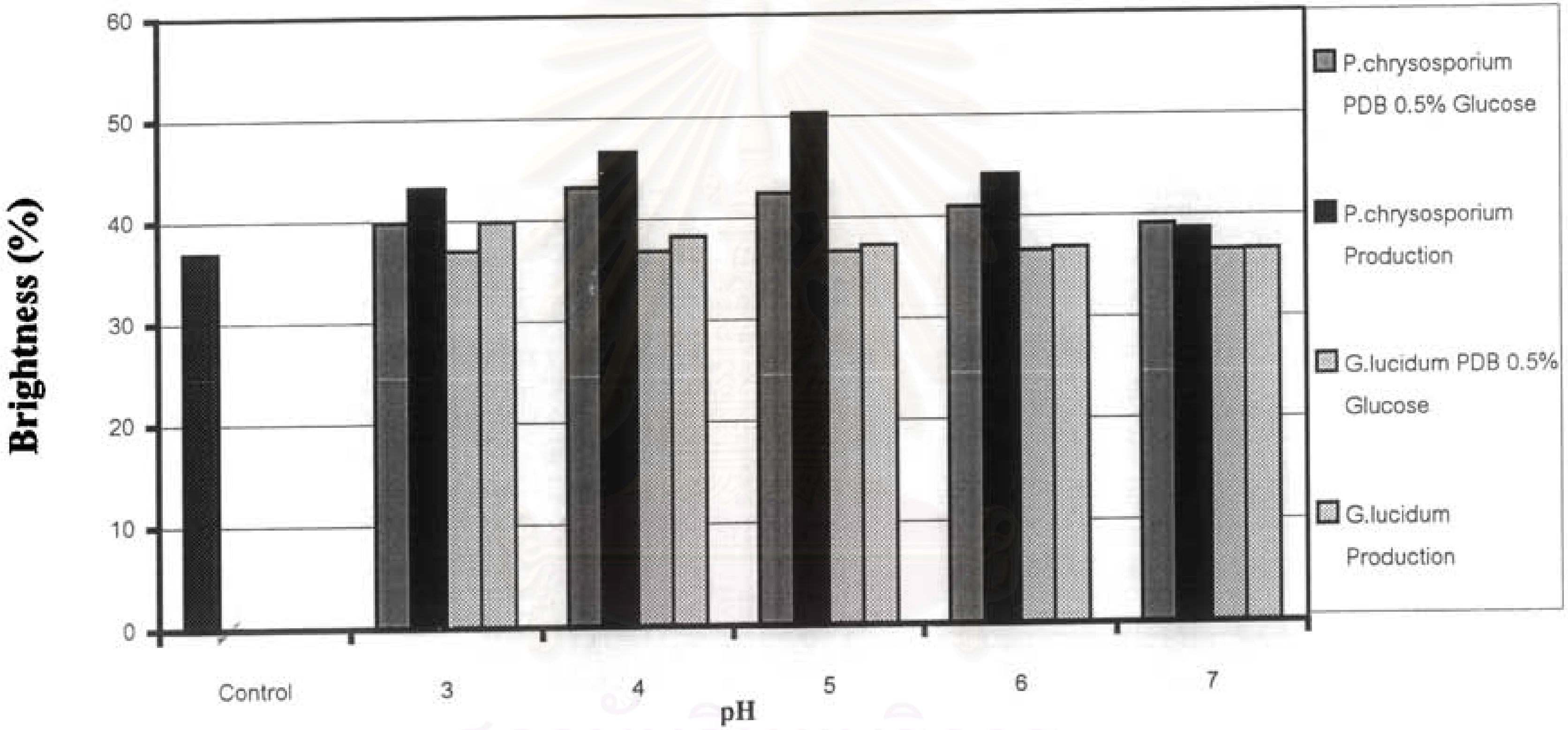
รูปที่ 9 ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อรา *P.chrysosporium* และ *G. lucidum* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส และสูตร production ที่ภาวะความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงค่าความขาวสว่างของเยื่อที่ผ่านการฟอกในภาวะต่างๆ

Treatment		**ค่าความขาวสว่าง (%)**				
		ระดับ pH เริ่มต้นของอาหาร (C)				
สายพันธุ์ (A)	**ชนิดของอาหาร (B)**	**3.0**	**4.0**	**5.0**	**6.0**	**7.0**
Phanerocheate chrysosporium	PDB 0.5%กลูโคส	40.96 c	43.11 a	42.44 b	39.85 d	39.10 e
	Production	44.09 c	46.63 b	50.31 a	43.19 d	38.63 e
Ganoderma lucidum	PDB 0.5%กลูโคส	37.01 a	36.83 ab	36.62 bc	36.54 c	36.53 c
	production	39.80 a	38.21 b	37.24 c	36.85d	36.54 e
CV (%)	0.32%					
$LSD_{0.05}$	0.208					

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 ค่าความขาวสว่างของเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อรา *P. chrysosporium* และ *G. lucidum* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคสและสูตร production ที่ภาวะความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 แผ่น hand sheet ที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อรา *P. chrysosporium* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส ที่ระดับ pH เริ่มต้นต่างๆ

รูปที่ 12 แผ่น hand sheet ที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อรา *G. lucidum* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร PDB 0.5% กลูโคส ที่ระดับ pH เริ่มต้นต่างๆ

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด

จากการศึกษาการฟอกเยื่อ โดยใช้เชื้อ *P.chrysosporium* และ *G.lucidum* ในอาหารสูตร 0.5 % กลูโคสและสูตร production ที่ระดับ pH 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 พบว่าเชื้อรา *P.chrysosporium* ผลิตเอนไซม์และให้ค่าคับปานัมเบอร์และค่าความขาวสว่างดีที่สุด ที่ระดับ pH 5.0 ในอาหารสูตร production ส่วนเชื้อรา *G. lucidum* ให้ผลิตเอนไซม์และให้ค่าความขาวสว่างและค่าความขาวสว่างได้ดีเมื่อฟอกในอาหารสูตร production เช่นเดียวกันแต่ที่ระดับ pH 3.0 (จากผลการทดลองข้อ 2) ดังนั้นจึงนำภาวะที่เหมาะสมของเชื้อราแต่ละชนิดมาทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสม 4 ระดับได้แก่ 25°C 30°C 35°C และ 40 °C และหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการฟอก คือ 4 7 11 และ 14 วัน

เมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ที่สร้างโดยเชื้อรา *P.chrysosporium* ในสารละลายอาหารสูตร production ที่ระดับ pH 5.0 โดยทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการฟอกเยื่อที่สามารถให้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ได้มากที่สุดคือระยะเวลาฟอกเยื่อนาน 7 วัน ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์มากที่สุด ที่ทุกๆ ระดับของอุณหภูมิที่ทำการศึกษา เมื่อเทียบกับระยะเวลาการฟอกอื่นๆ และเมื่อพิจารณาการสร้างเอนไซม์ในแต่ละระดับอุณหภูมิ พบว่าเชื้อรา *P.chrysosporium* จะสร้างเอนไซม์ได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 40 °C ฟอกเยื่อนาน 7 วัน วัดค่าแอคติวิตี้ได้เท่ากับ 0.274 U/ml ค่าแอคติวิตี้ที่ให้ผลดีรองลงมาใช้เวลาฟอกเยื่อนาน 11 วัน 4 วัน และ 14 วัน ค่าแอคติวิตี้ที่วัดได้เท่ากับ 0.170 U/ml 0.119 U/ml และ 0.101 U/ml ตามลำดับ แอคติวิตี้ของเอนไซม์จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่สูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 4 และสูงสุดในวันที่ 7 ของการฟอก เมื่อใช้ระยะเวลาฟอกเยื่อนาน 11 วัน ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์จะเริ่มลดลงเรื่อยๆและลดลงต่ำที่สุดเมื่อฟอกเยื่อนาน 14 วัน อุณหภูมิที่เหมาะต่อการสร้างเอนไซม์รองลงมาคือ 35 °C 30 °C และ 25 °C ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่วัดได้มากที่สุดในวันที่ 7 ของการฟอก มีค่าเท่ากับ 0.184 U/ml 0.138 U/ml และ 0.077 U/ml (ตารางที่ 8 รูปที่ 13)

ส่วนเชื้อรา *G.lucidum* สามารถสร้างเอนไซม์ได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 25°C ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมรองลงมาเรียงจากมากไปหาน้อย คือที่อุณหภูมิ 30 °C 35 °C และ 40°C โดยที่อุณหภูมิ 25°C ฟอกเยื่อนาน 11 วัน สามารถวัดค่าแอคติวิตี้ได้มากที่สุดเท่ากับ 0.080 U/ml เมื่อเพิ่มเวลาในการฟอกเป็น 14 วัน ค่าแอคติวิตี้จะลดลงเหลือ 0.069 U/ml ส่วนที่วันที่ 4 7 วัน วัดค่าแอคติวิตี้ได้เท่ากับ 0.041 U/ml และ 0.058 U/ml ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30°C การสร้างเอนไซม์มีมากที่สุดเมื่อฟอกเยื่อนาน 11 วัน วัดค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 0.068 U/ml ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่ถูกสร้างที่อุณหภูมิ 35°C และ 40°C ที่ระยะเวลาฟอกเยื่อนาน 4 7 11 และ 14 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 9 รูปที่ 13)

ตารางที่ 8 ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ที่เชื้อ *P.chrysosporium* สร้างขึ้นเมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร production ที่ pH 5.0 ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ($LSD_{0.05}$ = 0.00745)

	ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส (U/ml)			
ระยะเวลาที่ใช้	อุณหภูมิที่ใช้ในการฟอก (°C)			
ฟอกเยื่อ (วัน)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
4	$0.059^{C,b}$	$0.087^{B,b}$	$0.116^{A,c}$	$0.119^{A,c}$
7	$0.077^{D,a}$	$0.138^{C,a}$	$0.184^{B,a}$	$0.274^{A,a}$
11	$0.050^{C,c}$	$0.094^{B,b}$	$0.165^{A,b}$	$0.170^{A,b}$
14	$0.030^{D,d}$	$0.066^{C,c}$	$0.075^{B,d}$	$0.101^{A,c}$

หมายเหตุ - ตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างเมื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 4 วัน 7 วัน 11 วัน และ 14 วันในแต่ละอุณหภูมิ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นที่ภาวะ อุณหภูมิ 25°C 30°C 35°C และ 40°C โดยใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

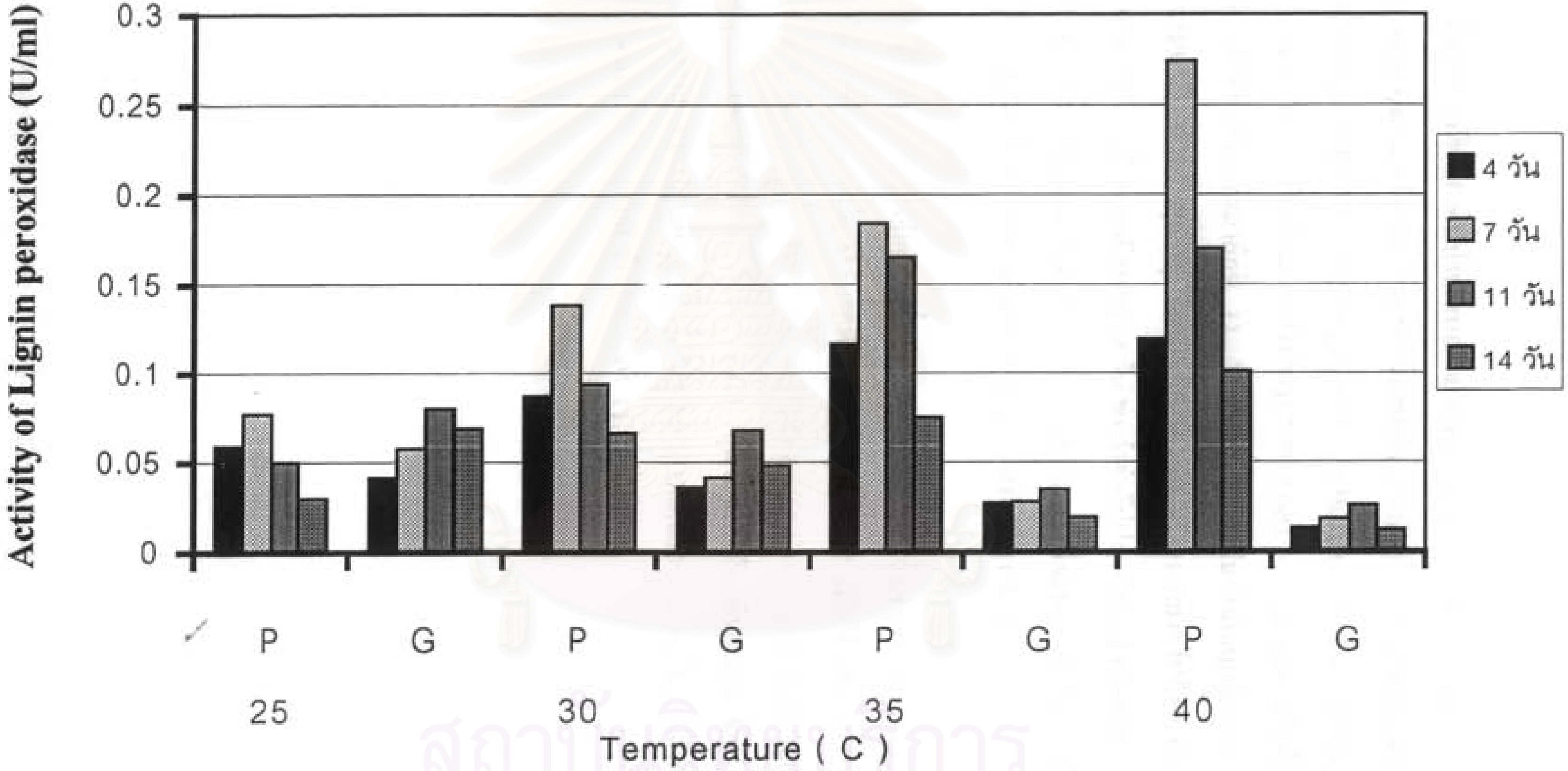
ตารางที่ 9 ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ที่เชื้อ *G.lucidum* สร้างขึ้นเมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร production ที่ pH 3.0 ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ($LSD_{0.05}$= 0.016)

	ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส (U/ml)			
ระยะเวลาที่ใช้ฟอกเยื่อ (วัน)	**อุณหภูมิที่ใช้ในการฟอก (°C)**			
	25 °C	**30°C**	**35°C**	**40°C**
4	$0.041^{A,d}$	$0.036^{A,b}$	$0.027^{AB,a}$	$0.013^{AB,a}$
7	$0.058^{A,c}$	$0.041^{B,b}$	$0.028^{B,a}$	$0.018^{C,a}$
11	$0.08^{A,a}$	$0.068^{A,a}$	$0.035^{B,a}$	$0.026^{B,a}$
14	$0.069^{A,b}$	$0.048^{B,b}$	$0.019^{C,a}$	$0.012^{C,a}$

หมายเหตุ - ตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างเมื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 4 วัน 7 วัน 11 วัน และ 14 วันในแต่ละอุณหภูมิ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นที่ภาวะ อุณหภูมิ 25°C 30°C 35°C และ 40°C โดยใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดสที่สร้างโดยเชื้อรา *P. Chrysosporium* ที่ pH 5.0 และเชื้อรา *G. Lucidum* ที่ pH 3.0เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร production ที่อุณหภูมิและระยะเวลาในการฟอกเยื่อต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อเปรียบเทียบค่าคัปปานัมเบอร์เฉลี่ยพบว่ามีความสอดคล้องกับค่าความขาวสว่าง พบว่าเชื้อรา *P.chrysosporium* มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินในเยื่อได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40°C ที่ทุกๆระยะเวลาในการฟอกเยื่อ ที่อุณหภูมิ 40°C ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงต่ำที่สุดเมื่อใช้ระยะเวลาฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 7.29 ลดลง 10.18 เมื่อเทียบกับเยื่อเริ่มต้น ระยะเวลาในการฟอกที่ให้ผลดีรองลงมาคือที่ 11 7 และ 4 วัน ค่าคัมปานัมเบอร์เท่ากับ 7.84 9.53 และ 12.78 ตามลำดับ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมรองลงมาเรียงจากมากไปน้อย คือที่อุณหภูมิ 35 °C 30 °C และ 25 °C เมื่อฟอกเยื่อนาน 14 วัน พบว่าค่าคัปปานัมเบอร์มีค่าเท่ากับ 10.41 13.26 และ 13.47 ตามลำดับ ยกเว้นที่อุณหภูมิ 25 °C และ 30 °C เมื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อฟอกนาน 4 วัน ค่าคัปปานัมเบอร์ไม่มีแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 10 รูปที่ 14)

เมื่อศึกษาการฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *G.lucidum* พบว่าเชื้อรา *G.lucidum* สามารถทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ ของเยื่อลดลงได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 25 °C เมื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 12.58 สามารถลดค่าคัปปานัมเบอร์จากเยื่อเริ่มต้นได้เท่ากับ 4.89 ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อเริ่มต้นเท่ากับ 17.47) อุณหภูมิที่ให้ผลดีรองลงมาคือที่ 30 °C 35 °C และ 40°C ตามลำดับ ที่อุณหภูมิดังกล่าวเมื่อใช้เวลาฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 13.96 15.29 และ 16.19 ตามลำดับ (ตารางที่ 11 รูปที่ 14)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ค่าคับปานัมเบอร์เฉลี่ยของเยื่อที่ฟอกโดยเชื้อ *P.chrysosporium* ในอาหารสูตร production ที่ pH 5.0 ที่ภาวะอุณหภูมิและเวลาต่างๆ (LSD $_{0.05}$= 0.067)

ค่าคัมปานัมเบอร์				
ระยะเวลาที่ใช้ฟอกเยื่อ (วัน)	อุณหภูมิที่ใช้ในการฟอก (°C)			
	25 °C	30°C	35 °C	40°C
4	14.33 ^{C,d}	14.28 ^{C,c}	13.32 ^{B,d}	12.78 ^{A,d}
7	13.81 ^{D,c}	13.41 ^{C,b}	11.20 ^{B,c}	9.53 ^{A,c}
11	13.55 ^{D,b}	13.37 ^{C,b}	10.62 ^{B,b}	7.84 ^{A,b}
14	13.47 ^{D,a}	13.26 ^{C,a}	10.41 ^{B,a}	7.29 ^{A,a}

หมายเหตุ - ตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างเมื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 4 วัน 7 วัน 11 วัน และ 14 วันในแต่ละอุณหภูมิ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นที่ภาวะ อุณหภูมิ 25°C 30°C 35°C และ 40°C โดยใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

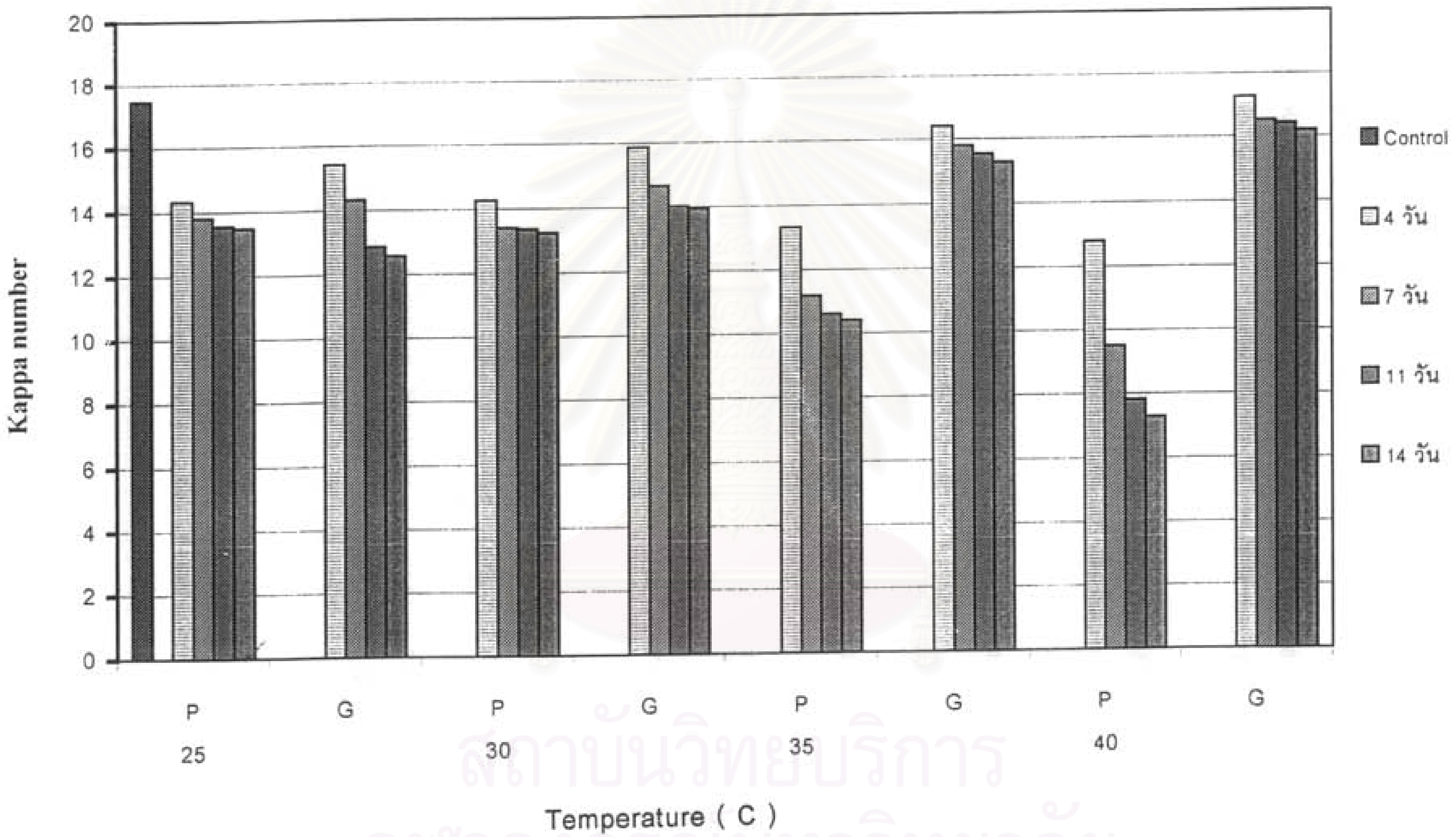
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อที่ฟอกโดยเชื้อ *G.lucidum* ในอาหารสูตร production ที่ pH 3.0 ที่ภาวะอุณหภูมิและเวลาในการฟอกเยื่อต่างๆ ($LSD_{0.05}$= 0.03)

ระยะเวลาที่ใช้ฟอกเยื่อ (วัน)	ค่าคัปปานัมเบอร์ อุณหภูมิที่ใช้ในการฟอก (°C) 25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
4	15.43 ^{A,d}	15.85 ^{B,d}	16.40 ^{C,d}	17.24 ^{D,d}
7	14.33 ^{A,c}	14.67 ^{B,c}	15.80 ^{C,c}	16.51 ^{D,c}
11	12.85 ^{A,b}	14.03 ^{B,b}	15.53 ^{C,b}	16.42 ^{D,b}
14	12.58 ^{A,a}	13.96 ^{B,a}	15.29 ^{C,a}	16.19 ^{D,a}

หมายเหตุ - ตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างเมื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 4 วัน 7 วัน 11 วัน และ 14 วันในแต่ละอุณหภูมิ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นที่ภาวะ อุณหภูมิ 25°C 30°C 35°C และ 40°C โดยใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 ค่าคัมปปานัมเบอร์ของเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อรา *P. Chrysosporium* ที่ pH 5.0 และเชื้อรา *G. Lucidum* ที่ pH 3.0 เมื่อฟอกในอาหารสูตร production ที่อุณหภูมิและระยะเวลาฟอกเยื่อต่างๆ

ค่าความขาวสว่างของเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อรา *P.chrysosporium* ก็ให้ผลที่สอดคล้องกับค่าคัปปานัมเบอร์ จากการศึกษาประสิทธิภาพการฟอกเยื่อที่แต่ละระดับอุณหภูมิพบว่า ที่อุณหภูมิ 40°C เชื้อ *P.chrysosporium* มีประสิทธิภาพการฟอกเยื่อดีที่สุด เมื่อใช้เวลาในการฟอกเยื่อนาน 14 วัน ค่าความขาวสว่างวัดได้เท่ากับ 54.37% ค่าความขาวสว่างเพิ่มจากเยื่อเริ่มต้นเท่ากับ 17.52% ระยะเวลาในการฟอกเยื่อที่ดีรองลงมาคือ 11 7 และ 4 วัน ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 54.07% 52.18% และ 45.69% ตามลำดับ และที่อุณหภูมิเดียวกันนี้ แต่ใช้ระยะเวลาฟอกเยื่อนาน 7 วัน พบว่าค่าความขาวสว่างของเยื่อคิดเป็นร้อยละ 95.97 เมื่อเทียบกับระยะเวลาที่ใช้ฟอกเยื่อ 14 วัน อุณหภูมิที่ให้ผลดีรองลงมาจากอุณหภูมิ 40°C คือที่อุณหภูมิ 35 °C 30 °C และ 25 °C ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 50.57% 43.38% และ 42.77% (ตารางที่ 12 รูปที่ 15)

ค่าความขาวสว่างของเยื่อเมื่อฟอกด้วยเชื้อรา *G.lucidum* พบว่าเชื้อรา *G. lucidum* จะมีประสิทธิภาพในการฟอกเยื่อดีที่สุดต้องการภาวะอุณหภูมิในระหว่างการฟอกเยื่อเท่ากับ 25°C ใช้ระยะเวลานาน 14 วัน ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 45.69% ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น 8.84% จากเยื่อเริ่มต้น เมื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 11 7 และ 4 ค่าความขาวสว่างจะเท่ากับ 45.54% 40.63% และ 39.73% ตามลำดับ ค่าความขาวสว่างเมื่อฟอกเยื่อนาน 7 วัน เท่ากับ 40.63 หรือคิดเป็นร้อยละ 88.93 เมื่อเทียบกับการฟอกเยื่อนาน 14 วัน สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมรองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30°C 35°C และ 40°C ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 41.73% 38.95% และ 37.43% ตามลำดับ (ตารางที่ 13 รูปที่ 15)

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการฟอก โดยเชื้อรา *P. chrysosporium* และ *G.lucidum* พบว่าทุกตัวแปรและอิทธิพลร่วมของตัวแปรเหล่านี้มีผลต่อปริมาณการสร้างเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ค่าความขาวสว่าง และค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตาราง.ANOVA ที่ 24 25 26)

ตารางที่ 12 ค่าความขาวสว่างเฉลี่ยของเยื่อที่ฟอกโดยเชื้อ *P.chrysosporium* ในอาหารสูตร production ที่ pH 5.0 ที่ภาวะอุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ($LSD_{0.05}$= 0.055)

	ค่าความขาวสว่าง (%)			
ระยะเวลาที่ใช้	อุณหภูมิที่ใช้ในการฟอก (°C)			
ฟอกเยื่อ (วัน)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
4	$40.29^{C,d}$	$40.27^{C,d}$	$44.64^{B,d}$	$45.69^{A,d}$
7	$42.12^{D,c}$	$42.89^{C,c}$	$49.61^{B,c}$	$52.18^{A,c}$
11	$42.42^{D,b}$	$43.23^{C,b}$	$50.10^{B,b}$	$54.07^{A,b}$
14	$42.77^{D,a}$	$43.38^{C,a}$	$50.57^{B,a}$	$54.37^{A,a}$

หมายเหตุ - ตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้าง เมื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 4 วัน 7 วัน 11 วัน และ 14 วันในแต่ละอุณหภูมิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นที่ภาวะ อุณหภูมิ 25°C 30°C 35°C และ 40°C โดยใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

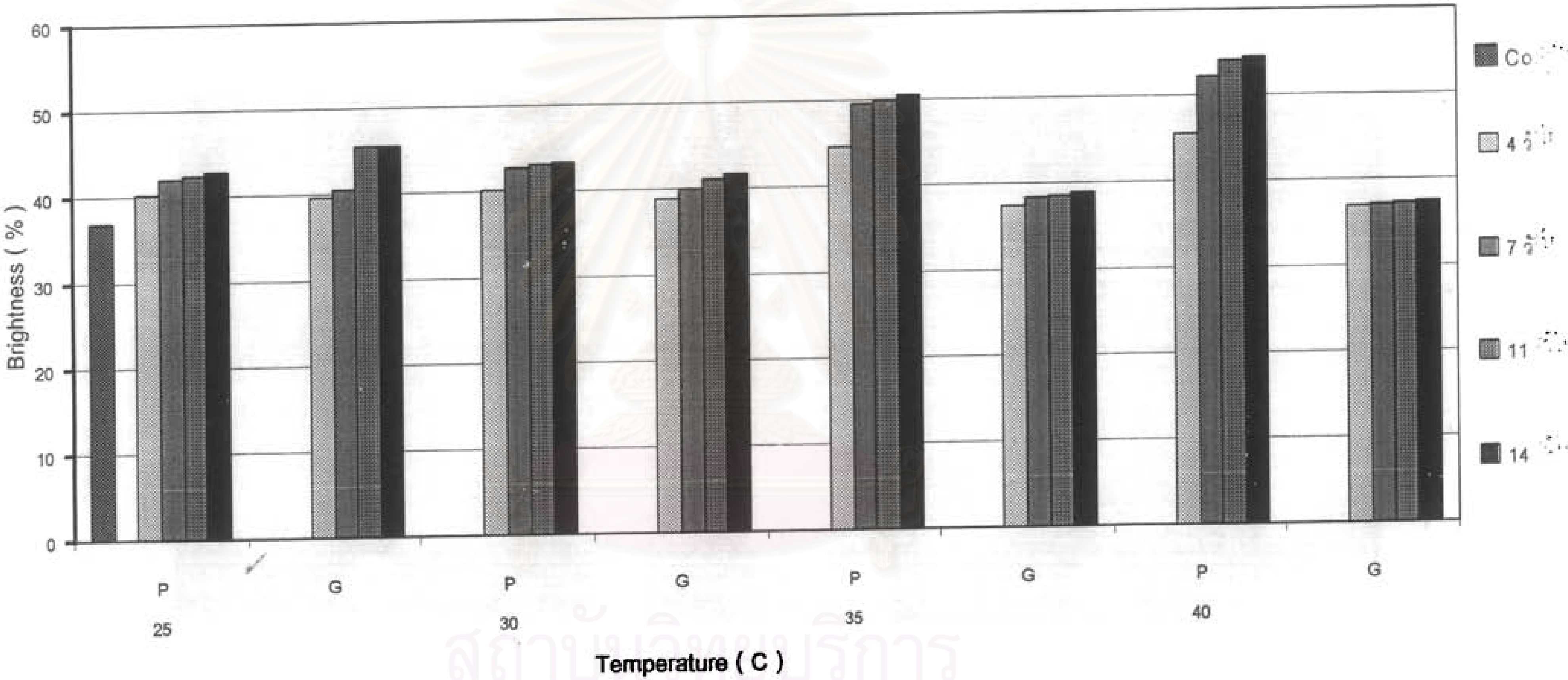
ตารางที่ 13 ค่าความขาวสว่างเฉลี่ยของเยื่อที่ฟอกโดยเชื้อ *G.lucidum* ในอาหารสูตร production ที่ pH 3.0 ที่ภาวะอุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ($LSD_{0.05} = 0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ฟอกเยื่อ (วัน)	ค่าความขาวสว่าง (%) อุณหภูมิที่ใช้ในการฟอก (°C)			
	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
4	39.73 ^{A,d}	39.02 ^{B,d}	37.49 ^{C,d}	36.87 ^{D,d}
7	40.63 ^{A,c}	40.10 ^{B,c}	38.37 ^{C,c}	37.12 ^{D,c}
11	45.54 ^{A,b}	41.26 ^{B,b}	38.59 ^{C,b}	37.34 ^{D,b}
14	45.69 ^{A,a}	41.73 ^{B,a}	38.95 ^{C,a}	37.43 ^{D,a}

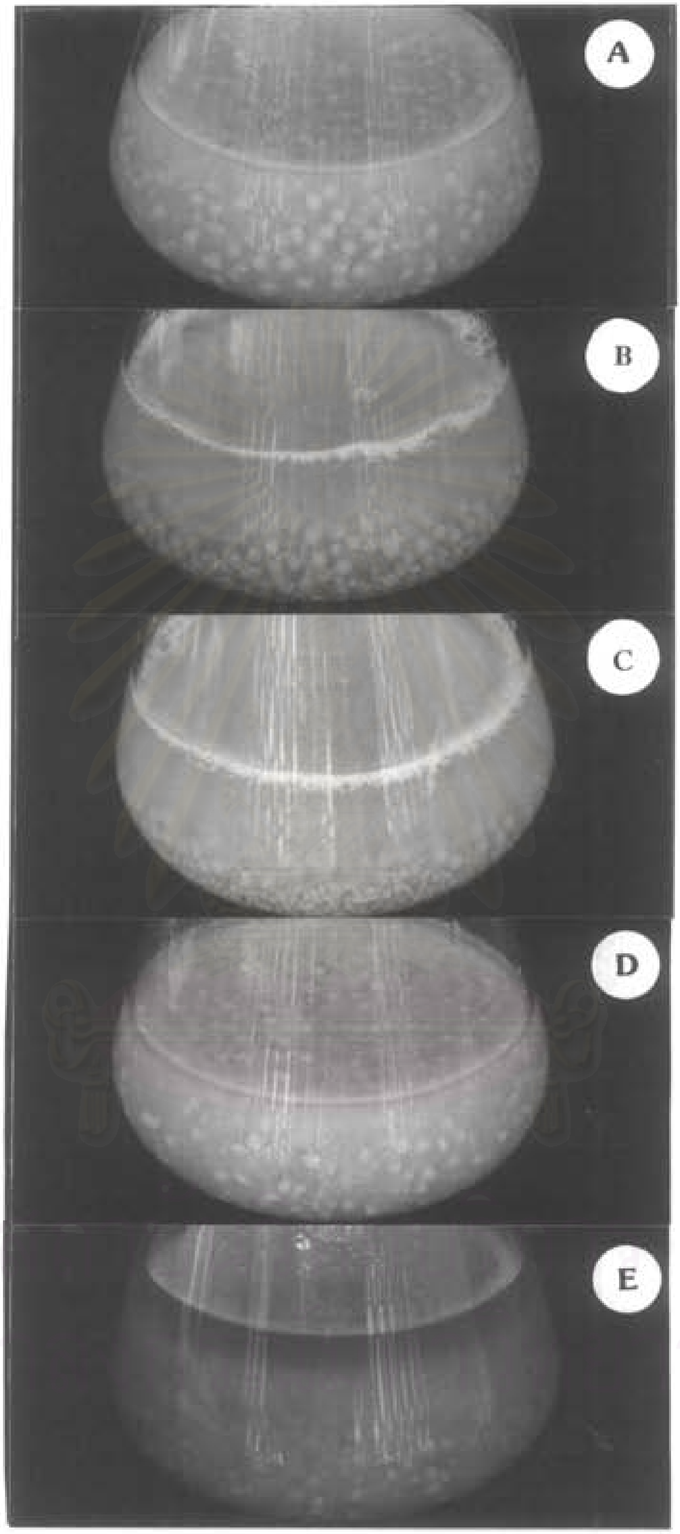
หมายเหตุ - ตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้าง เมื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 4 วัน 7 วัน 11 วัน และ 14 วันในแต่ละอุณหภูมิ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นที่ภาวะ อุณหภูมิ 25°C 30°C 35°C และ 40°C โดยใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

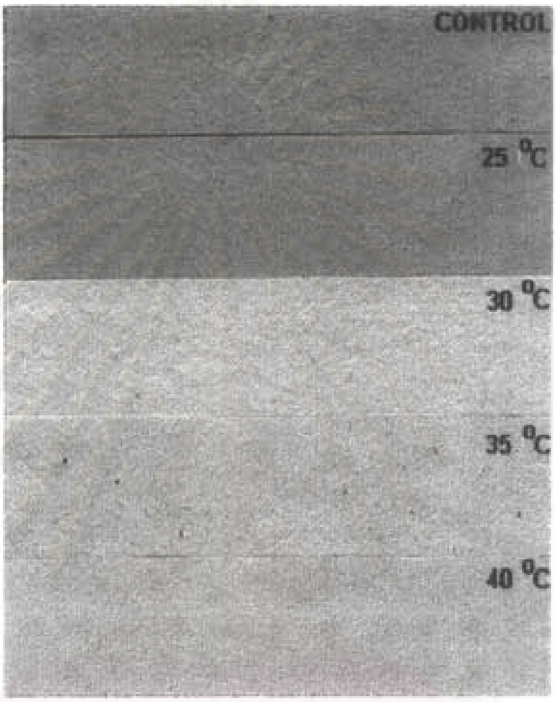
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



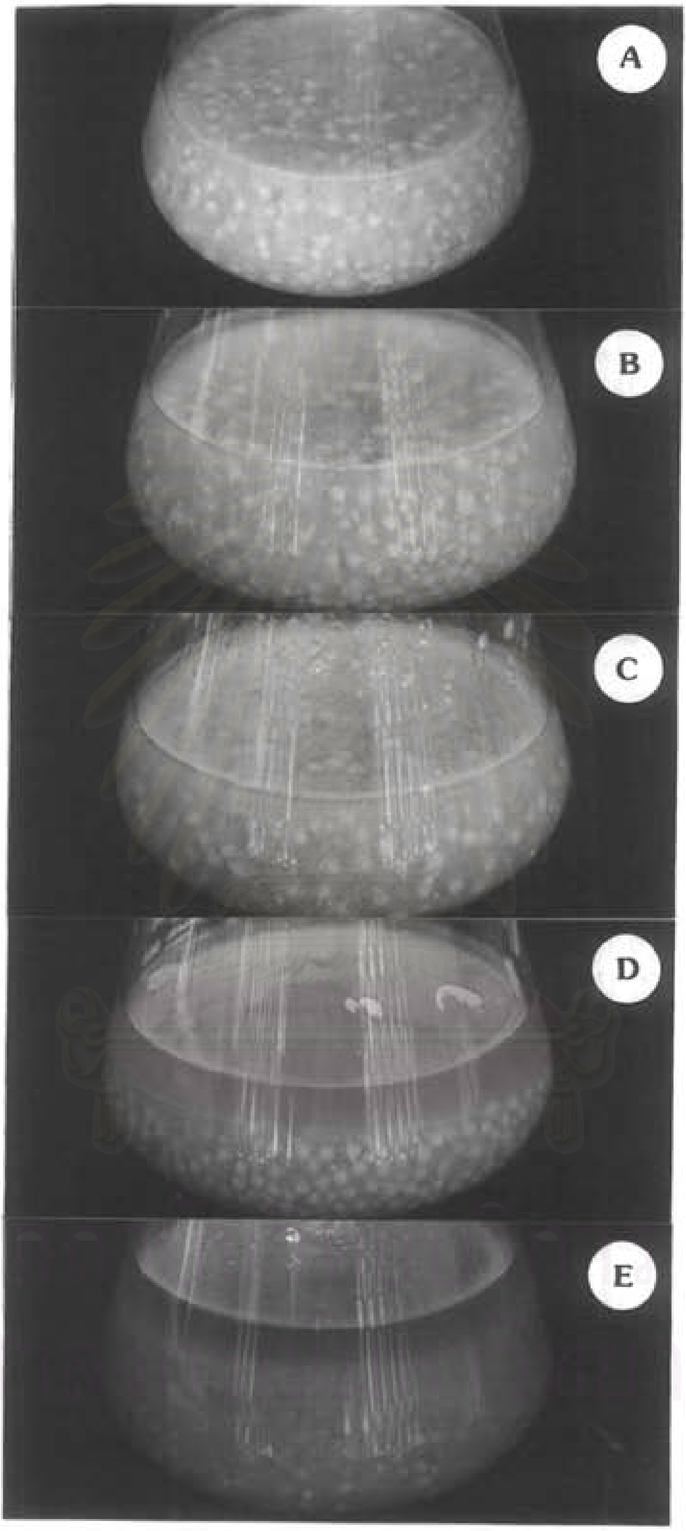
รูปที่ 15 ค่าความขาวสว่างของเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อรา *P. Chrysosporium* ที่ pH 5.0 และเชื้อรา *G. Lucidum* ที่ pH 3.0 เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร production ที่อุณหภูมิและระยะเวลาในการฟอกเยื่อต่างๆ



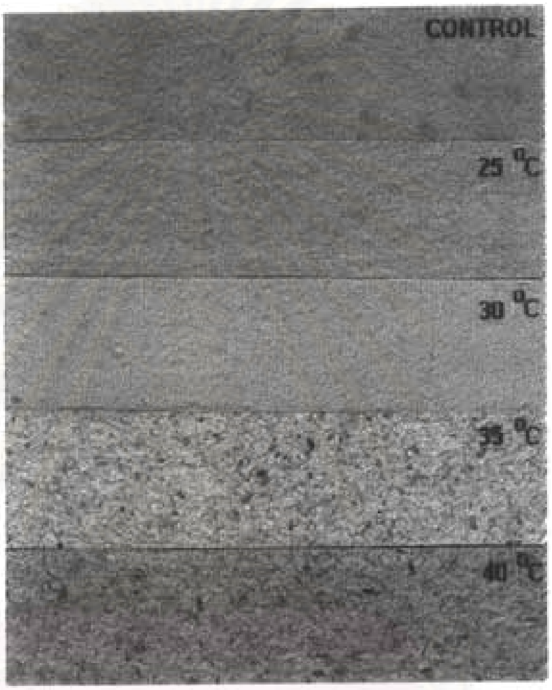
รูปที่ 16 เยื่อที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อรา *P. chrysosporium* เมื่อฟอกในอาหารสูตร production ที่ pH 5.0 อุณหภูมิต่างๆ A = 25 °C B = 30°C C = 35 °C D = 40 °C E = Control (ไม่เติมเชื้อรา)



รูปที่ 17 แผ่น hand sheet ที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อรา *P. chrysosporium* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร production ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 25°C 30°C 35°C 40°C และ Control (ไม่เติมเชื้อรา)



รูปที่ 18 เยื่อที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อรา *G. lucidum* เมื่อฟอกในอาหารสูตร production ที่ pH 3.0 อุณหภูมิต่างๆ A = 25 °C B = 30°C C = 35 °C D = 40 °C E = Control (ไม่เติมเชื้อรา)



รูปที่ 19 แผ่น hand sheet ที่ผ่านการฟอกด้วยเชื้อรา *G. lucidum* เมื่อฟอกเยื่อในอาหารสูตร production ที่ pH 3.0 อุณหภูมิ 25°C 30°C 35°C 40°C และ Control (ไม่เติมเชื้อรา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองข้อ 3 ที่ได้ดำเนินมาเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสามารถสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อของเชื้อรา *P.chrysosporium* และเชื้อรา *G.lucidum* ในสูตร production ศึกษาที่ภาวะความเป็นกรด-ด่าง 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 หลังจากนั้นจึงเลือกภาวะของ pH ที่เหมาะสมมาศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสม พบว่าเชื้อรา *P.chrysosporium* มีประสิทธิภาพดีกว่าจึงได้พิจารณาเลือกเชื้อรา *P.chrysosporium* มาเลี้ยงในอาหารสูตร production ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 40 °C เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ ทั้งนี้เพื่อจะนำเอนไซม์มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์ต่อไป

4 ผลของการศึกษาการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์

4.1 การเตรียมเอนไซม์

ได้ crude เอนไซม์ที่จะนำไปทดสอบประสิทธิภาพการฟอกเยื่อต่อไป

4.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์

ผลของการศึกษาการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์โดยการผันแปรหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม 5 ระดับคือ 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 และผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม 4 ระดับคือ 25 °C 30°C 35°C และ 40°C พบว่าผลของการฟอกเยื่อที่อุณหภูมิ 25°C พบว่า pH ที่ให้ค่าความขาวสว่างได้ดีที่สุดคือ pH 5.0 ให้ค่าคัปปานัมเบอร์ต่ำที่สุดเท่ากับ 13.88 pH 4.0 3.0 6.0 และ 7.0 ให้ผลดีรองลงมา ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 14.03 14.23 14.51 และ 17.14 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30°C ระดับ pH ที่ทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงมากที่สุดคือ pH 5.0 รองลงมาคือ 4.0 3.0 6.0 และ 7.0 ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 13.05 13.22 14.14 14.36 และ 16.16 ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 35°C ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อเมื่อฟอกที่ pH 5.0 เท่ากับ 12.40 ที่ pH 4.0 3.0 6.0 และ 7.0 ให้ผลดีรองลงมาค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 12.65 14.03 14.22 และ 16.08 ตามลำดับ เมื่อฟอกเยื่อที่อุณหภูมิ 40°C ค่าคัปปานัมเบอร์จะลดลงได้มากที่สุดที่ระดับ pH 5.0 โดยค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงเหลือ 12.06 ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงคิดเป็นร้อยละ 30.96 เมื่อเทียบกับเยื่อเริ่มต้น ที่ pH 4.0 ให้ผลที่ดีรองลงมา วัดค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อได้เท่ากับ 12.14 ที่ pH 3.0 6.0 และ 7.0 ให้ผลของค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 13.96 14.11 และ 16.07 ที่ pH 7.0 ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงคิดเป็นร้อยละ 25.87 เมื่อเทียบกับค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อที่ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ค่า

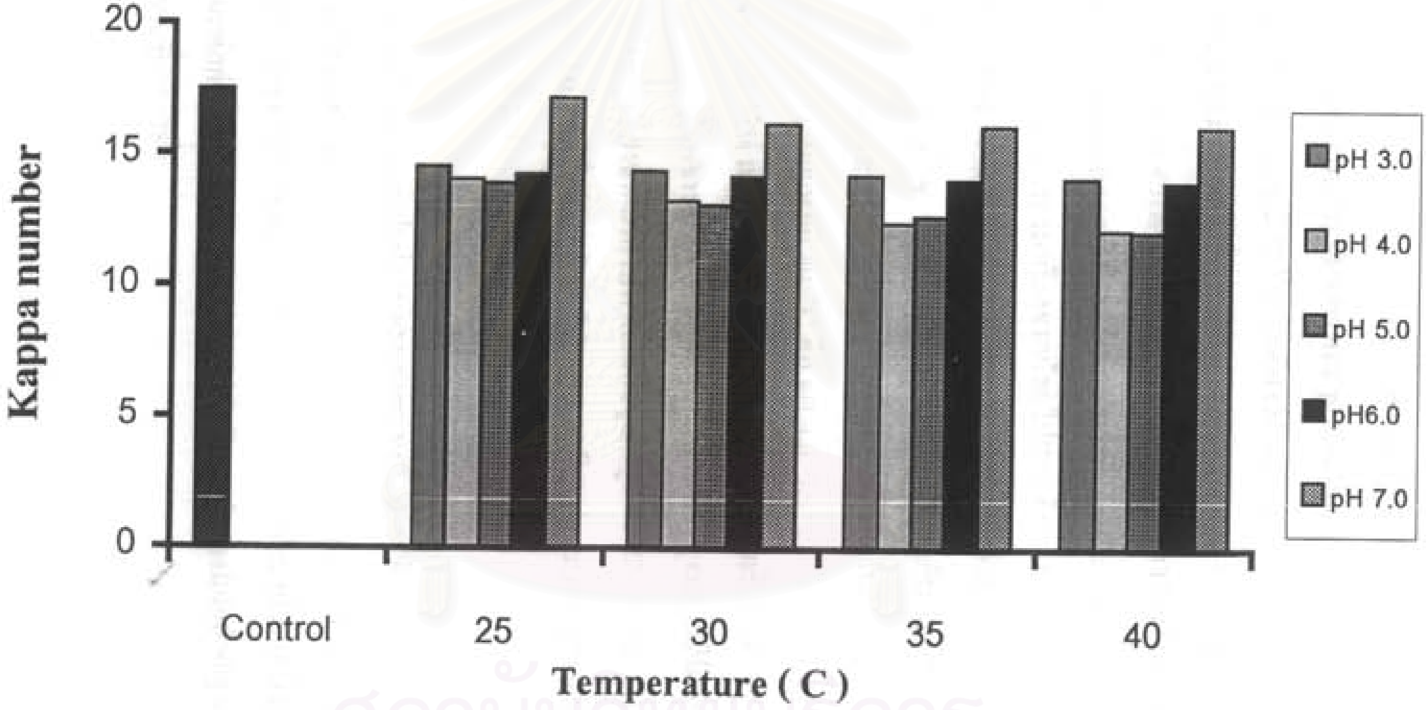
คัปปานัมเบอร์ของเยื่อลดลงมากที่สุด ที่ทุกๆ ระดับ pH โดยอุณหภูมิที่มีผลทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงมาก เรียงจากมากไปน้อยคือที่อุณหภูมิ 40 °C
35 °C 30 °C และ 25 °C ยกเว้นที่ระดับ pH 7.0 ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อเมื่อฟอกที่ อุณหภูมิ 35°C และ 40°C ค่าคัปปานัมเบอร์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 14 รูปที่ 20)

ตารางที่ 14 ค่าคัปปานัมเบอร์เฉลี่ยของเยื่อที่ได้จากการฟอกด้วยเอนไซม์ที่ภาวะอุณหภูมิ และ pH ต่าง $LSD_{0.05} = 0.083$

อุณหภูมิที่ใช้ระหว่างการฟอกเยื่อ (C°)	ค่าคัปปานัมเบอร์ ระดับของ pH				
	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
25 C°	$14.23^{C,c}$	$14.03^{B,d}$	$13.88^{A,d}$	$14.51^{D,d}$	$17.14^{E,c}$
30 C°	$14.23^{C,b}$	$13.22^{B,c}$	$13.05^{A,c}$	$14.14^{D,c}$	$16.16^{E,b}$
35 C°	$14.22^{C,b}$	$12.65^{B,b}$	$12.40^{A,b}$	$14.03^{D,b}$	$16.08^{E,a}$
40 C°	$14.11^{C,a}$	$12.14^{B,a}$	$12.06^{A,a}$	$13.96^{D,a}$	$16.07^{E,a}$

หมายเหตุ - ตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างเมื่อระดับความเป็นกรด-ด่าง 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0ในแต่ละอุณหภูมิ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นที่ภาวะ อุณหภูมิ 25°C 30°C 35°C และ 40°C โดยใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 20 ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วย crude เอนไซม์ เมื่อฟอกเยื่อที่ภาวะอุณหภูมิและ pH ต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อเปรียบเทียบค่าความขาวสว่างพบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับค่าคัปปานัมเบอร์ คือ เมื่อค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อลดลงค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น เมื่อฟอกเยื่อที่อุณหภูมิ 25°C ค่าความขาวสว่างดีที่สุดที่ pH 4.0 และ 5.0 ค่าความขาวสว่างเท่า 40.87% และ 40.93% ระดับ pH ที่ดีรองลงมาคือ pH 3.0 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 39.65% และ pH 6.0 และ 7.0 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 39.40% และ 36.93% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 °C ระดับ pH 4.0 และ 5.0 ให้ผลของค่าความขาวสว่างได้ดีเช่นเดียวกัน ค่าความขาวสว่างของเยื่อเท่ากับ 43.36% และ 43.31% ที่ pH 3.0 ให้ผลของค่าความขาวสว่างที่ดีรองลงมาเท่ากับ 40.08% ส่วน pH 6.0 และ 7.0 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 39.94% และ 37.43% เมื่อทำการฟอกเยื่อที่อุณหภูมิ 35°C พบว่าที่ pH 5.0 ค่าความขาวสว่างสูงสุดเท่ากับ 45.92% ส่วน pH ที่ให้ผลดีรองลงมาเรียงจากน้อยไปมาก คือ pH 4.0 3.0 6.0 และ 7.0 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 44.23% 40.47% 40.13% และ 37.65% ตามลำดับ ค่าความขาวสว่างจะเพิ่มสูงที่สุดเมื่อฟอกเยื่อที่อุณหภูมิ 40°ซ ที่ pH 5.0 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 46.17% เพิ่มจากเยื่อเริ่มต้นเท่ากับ 9.32% หรือคิดเป็นร้อยละ 25.29 (ความขาวสว่างของเยื่อเริ่มต้นเท่ากับ 36.85%) ระดับ pH ที่ให้ผลดีรองลงมาเมื่อฟอกเยื่อที่อุณหภูมิ 40 °C คือ pH 4.0 3.0 6.0 และ 7.0 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 44.46% 40.69% 40.38% และ 37.73% ค่าความขาวสว่างของเยื่อที่ pH 7.0 คิดเป็นร้อยละ 81.72 เมื่อเทียบกับที่ pH 5.0 เมื่อพิจารณาแต่ละระดับ pH แล้วพบว่า อุณหภูมิที่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่าความขาวสว่างได้ดีที่สุดเรียงจากมากไปหาน้อยคืออุณหภูมิ 40°C 35 °C 30 °C และ 25 °C ตามลำดับ ยกเว้นที่ pH 7.0 ฟอกที่อุณหภูมิ 35 °C และ 40 °C ค่าความขาวสว่างไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 15 รูปที่ 21)

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิ 4 ระดับ ได้แก่ 25 °C 30 °C 35 °C และ 40 °C ร่วมกับผลของ pH 5 ระดับคือ 3.0 4.0 5.0 6.0และ 7.0 ต่อค่าความขาวสว่างและค่าคัปปานัมเบอร์พบว่าทุกตัวแปรมีผลต่อค่าความขาวสว่าง ค่าคัปปานัมเบอร์และอิทธิพลร่วมของตัวแปรที่ศึกษามีผลต่อค่า ความขาวสว่าง และค่าคัปปานัมเบอร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตาราง ANOVA ที่ 27 28)

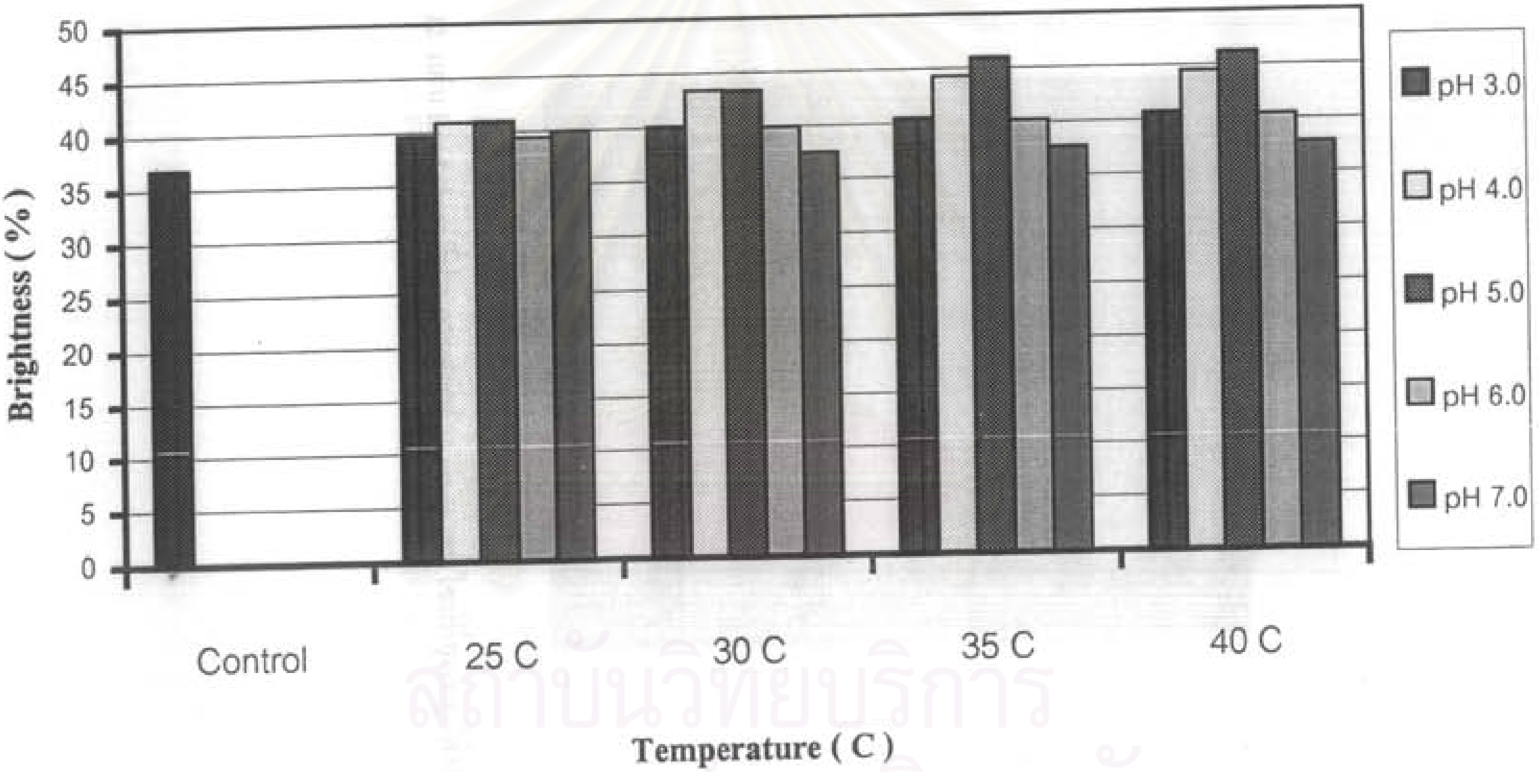
ตารางที่ 15 ค่าความขวามสว่างเฉลี่ยของเยื่อที่ได้จากการฟอกด้วยเอนไซม์ที่ภาวะอุณหภูมิและ pH ต่าง ๆ $LSD_{0.05} = 0.135$

อุณหภูมิที่ใช้ระหว่างการฟอกเยื่อ (C°)	ค่าความขาวสว่าง (%) ระดับของ pH 3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
25 C°	39.65 ^{B,d}	40.87 ^{A,d}	40.93 ^{A,d}	39.40 ^{C,d}	36.93 ^{D,c}
30 C°	40.08 ^{B,c}	43.36 ^{A,c}	43.31 ^{A,c}	39.94 ^{C,c}	37.43 ^{D,b}
35 C°	40.47 ^{C,b}	44.23 ^{B,b}	45.92 ^{A,b}	40.13 ^{D,b}	37.65 ^{E,a}
40 C°	40.69 ^{C,a}	44.46 ^{B,a}	46.17 ^{A,a}	40.38 ^{D,a}	37.73 ^{E,a}

หมายเหตุ - ตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้าง เมื่อระดับความเป็นกรด-ด่าง 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0ในแต่ละอุณหภูมิ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

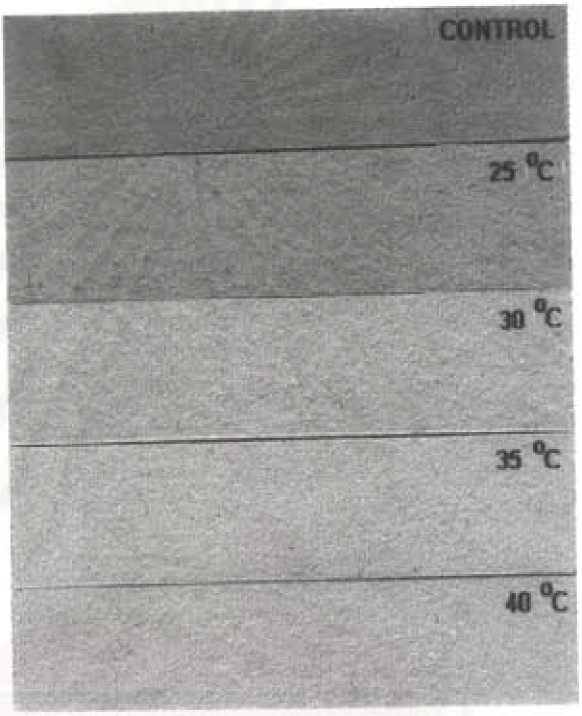
- ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึงค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นที่ภาวะ อุณหภูมิ 25°C 30°C 35°C และ 40°C โดยใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 ค่าความขาวสว่างของเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วย crude เอนไซม์ เมื่อฟอกที่ภาวะอุณหภูมิและ pH ต่าง



รูปที่ 22 แผ่น hand sheet ที่ผ่านการฟอกด้วย crude เอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ผลการศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ความข้นของเยื่อที่เหมาะสมต่อการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการฟอกเยื่อด้วยเอนไซม์ พบว่าที่อุณหภูมิ 40 °C pH 5.0 เป็นภาวะที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงเหลือ 12.06 และค่าความขาวสว่างเท่ากับ 46.17% และ (จากผลการทดลองข้อ 4.2) ใช้เวลาฟอกเยื่อนาน 6 ชั่วโมง จึงนำภาวะดังกล่าวมาศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ความข้นของเยื่อที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการศึกษาที่ความข้นของเยื่อ (consistency) 4 ระดับ คือ 2.05% 4.02% 5.90% และ 7.73% เมื่อเปรียบเทียบค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อที่อัตราส่วนเอนไซม์ต่อเยื่อ 1:4 (2.05% consistency) ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อเท่ากับ 9.36 ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงเท่ากับ 8.11 จากเยื่อเริ่มต้น อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเยื่อที่ให้ค่าคัปปานัมเบอร์ที่ลดลงรองลงมาคือ ที่มีอัตราส่วน 1:8 (4.02% consistency) ให้ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 10.66 ส่วนที่อัตราส่วน 1:12 (5.90% consistency) และ 1:16 (7.73% consistency) ให้ผลของค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 13.22 และ 13.21 ตามลำดับ ซึ่งผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 16 รูปที่ 23) ส่วนผลของค่าความขาวสว่างของเยื่อก็ให้ผลที่สอดคล้องกับค่าคัปปานัมเบอร์ พบว่าการฟอกเยื่อด้วยเอนไซม์โดยใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเยื่อ 1:4 หรือความข้นของเยื่อ (consistency) เท่ากับ 2.05% จะทำให้ความขาวสว่างของเยื่อเพิ่มขึ้นเป็น 50.91% เพิ่มขึ้นจากเยื่อเริ่มต้นเท่ากับ 14.06% รองลงมาคือ เยื่อที่ฟอกโดยมีอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเยื่อ 1:8 (4.02% consistency) ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 46.38% ส่วนที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเยื่อ 1:12 (5.90% consistency) และ 1:16 (7.73% consistency) ค่าความขาวสว่างของเยื่อที่วัดได้ มีค่าเท่ากับ 43.89% และ 43.26% ตามลำดับ ซึ่งให้ค่าที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 17 รูปที่ 24)

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของเปอร์เซ็นต์ความข้นของเยื่อ พบว่าความข้นของเยื่อมีผลต่อค่าความขาวสว่างและค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตาราง ANOVA ที่ 29 30)

ตารางที่ 16 ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อที่ฟอกด้วยเอนไซม์ ที่เปอร์เซ็นต์ความข้นของเยื่อต่างๆ

$LSD_{0.05} = 0.14$

Consistency (%)	ค่าคัปปานัมเบอร์			รวม	เฉลี่ย
2.05% (1:4)	9.29	9.45	9.33	28.07	9.36 [A]
4.02% (1:8)	10.64	10.78	10.55	31.97	10.66 [B]
5.90% (1:12)	13.25	13.13	13.30	39.68	13.22 [C]
7.73% (1:16)	13.19	13.24	13.20	39.63	13.21 [C]

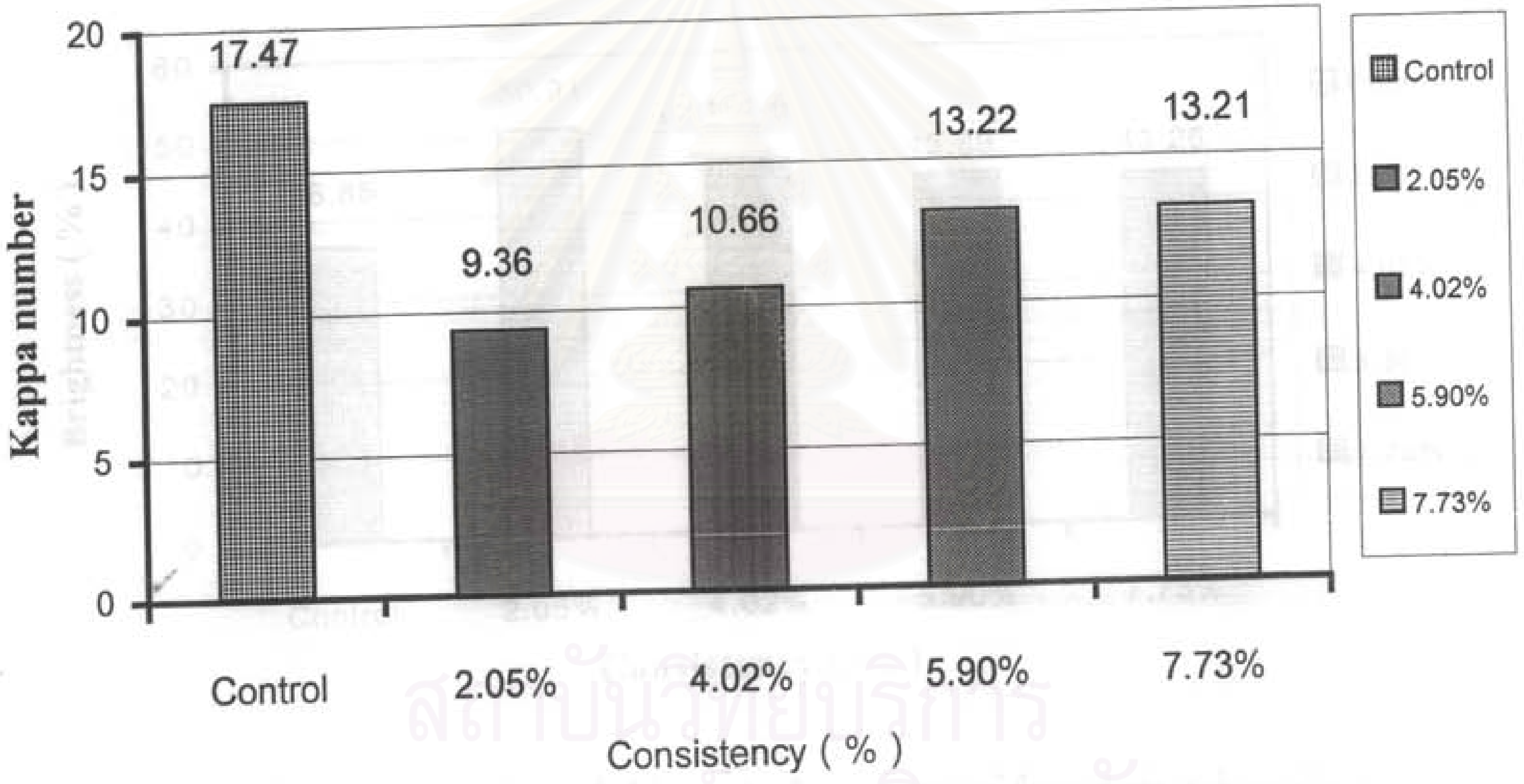
หมายเหตุ - ค่าความขาวสว่างเฉลี่ยของเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์ที่เปอร์เซ็นต์ความข้นของเยื่อ ต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 17 ค่าความขาวสว่างของเยื่อที่ฟอกด้วยเอนไซม์ ที่เปอร์เซ็นต์ความข้นของเยื่อต่างๆ

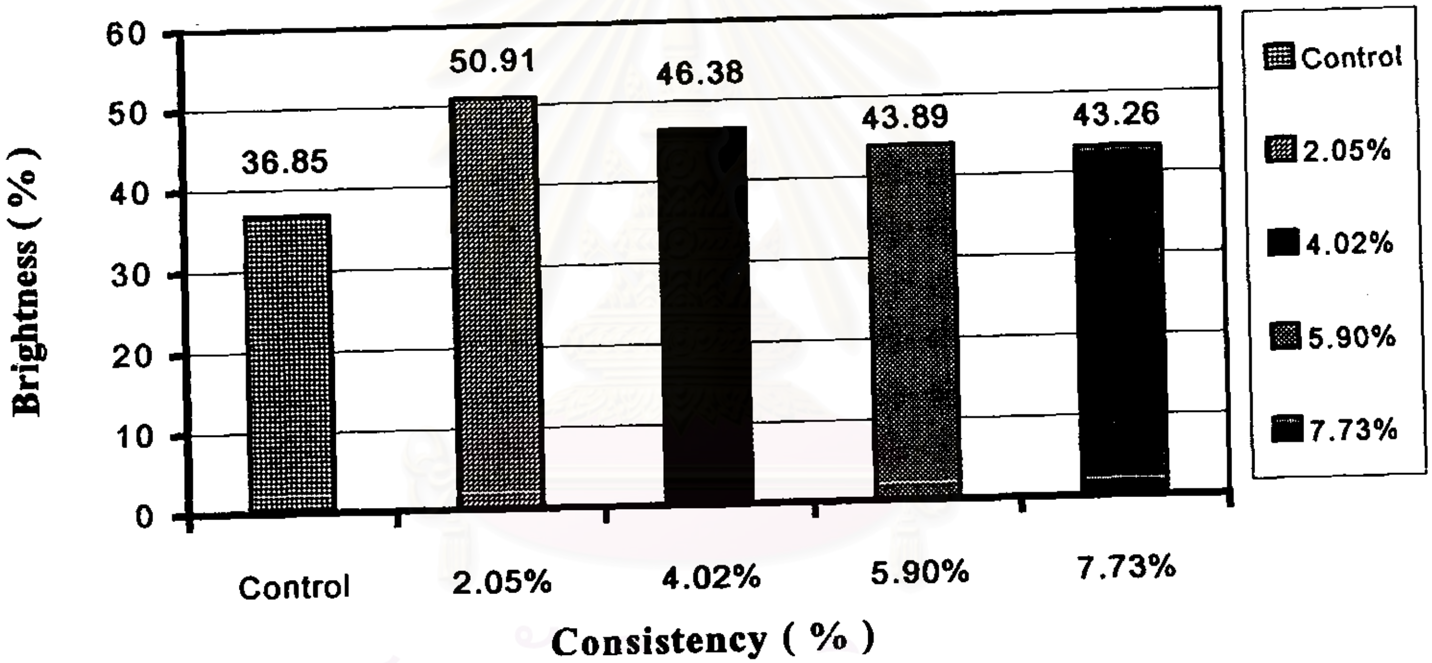
$LSD_{0.05} = 0.63$

Consistency (%)	ค่าความขาวสว่าง (%)			รวม	เฉลี่ย
2.05% (1:4)	50.77	51.12	50.83	152.72	50.91 [A]
4.02% (1:8)	46.52	45.57	47.05	139.14	46.38 [B]
5.90% (1:12)	43.78	43.89	44.00	131.67	43.89 [C]
7.73% (1:16)	43.12	43.27	43.38	129.77	43.26 [C]

หมายเหตุ - ค่าความขาวสว่างเฉลี่ยของเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์ที่เปอร์เซ็นต์ความข้นของเยื่อต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



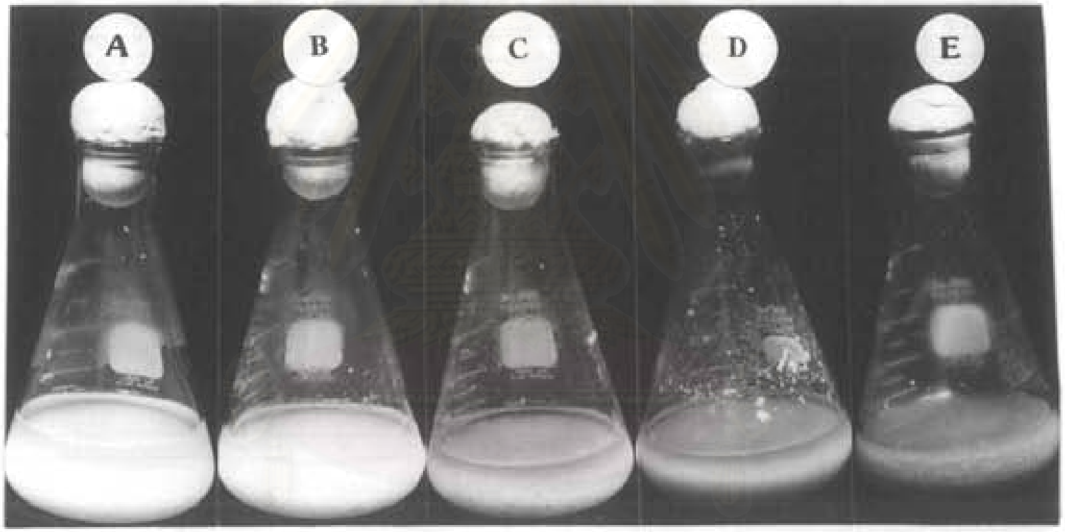
รูปที่ 23 ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วย crude เอนไซม์ ที่เปอร์เซ็นต์ความข้นของเยื่อต่างๆ



สถาบันวิทยบริการ

รูปที่ 24 ค่าความขาวสว่างของเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วย crude เอนไซม์ ที่เปอร์เซ็นต์ความข้นของเยื่อต่างๆ

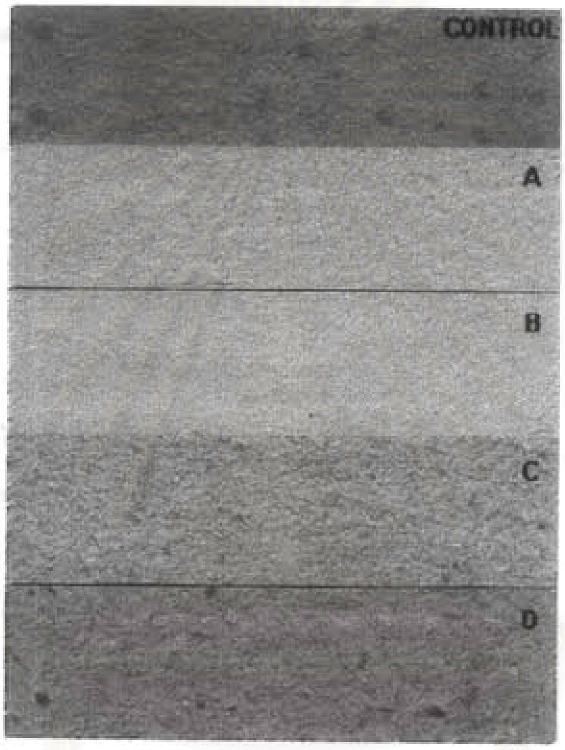
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 เยื่อที่ผ่านการฟอกด้วย crude เอนไซม์ที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเยื่อ

A = 1 : 4 B = 1: 8 C = 1 : 12 D = 1 : 16 และ E : Control (ไม่เติมเอนไซม์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 แผ่น hand sheett ของเยื่อที่ผ่านการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์ที่อัตราส่วนการใช้เอนไซม์ต่อเยื่อต่าง ๆ A = 1 : 4 B = 1 : 8 C = 1 : 12 D = 1: 16 และ E = Control (ไม่เติมเอนไซม์)