



การหาสภาวะที่เหมาะสมและคุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกจากราไวท์รอต
PSEUDOLAGAROBASIDIUM SP. PP17-33 ในกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้กากตะกอนดี
แคนเตอร์ของปาล์มน้ำมันเป็นสารตั้งต้น

OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES FROM
WHITE-ROT FUNGUS *PSEUDOLAGAROBASIDIUM* SP. PP17-33 IN SOLID STATE

ฟิลิฐุ ธรรมวิทยากร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การหาสภาวะที่เหมาะสมและคุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกจากราไวท์รอกท
PSEUDOLAGAROBASIDIUM SP. PP17-33 ในกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้กาก
ตะกอนดีแคเนเตอร์ของปาล์มน้ำมันเป็นสารตั้งต้น



พิสิฐ ธรรมวิทยากร

ปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES
FROM WHITE-ROT FUNGUS *PSEUDOLAGAROBASIDIUM* SP. PP17-33 IN
SOLID STATE FERMENTATION USING OIL PALM DECANter CAKE AS
SUBSTRATE



PISIT THAMVITHAYAKORN

A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements
for MASTER OF SCIENCE (Biotechnology)
Faculty of Science Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การหาสภาวะที่เหมาะสมและคุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติกจากราไวท์รอต
PSEUDOLAGAROBASIDIUM SP. PP17-33 ในกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้กากตะกอนดีแคเนเตอร์ของ
ปาล์มน้ำมันเป็นสารตั้งต้น

ของ

พิสิฐุ ธรรมวิทยาการ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(อาจารย์ ดร.ณัฐฐิกา สุวรรณมาศรัย) (ศาสตราจารย์ ดร.นิพนธ์ พิสุทธิไพศาล)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุขุมารณณ์ กระจ่างสังข์)

ชื่อเรื่อง	การหาสภาวะที่เหมาะสมและคุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกจากราไทร์อท <i>PSEUDOLAGAROBASIDIUM</i> SP. PP17-33 ในกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์ของปาล์มน้ำมันเป็นสารตั้งต้น
ผู้วิจัย	พิสิฐ ธรรมวิทยากร
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. ณัฐริกา สุวรรณาศรัย

ราเบสิดิโอไมซีส์จำนวน 264 ตัวอย่าง จากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก ได้แก่ แลคเคส, ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้น พบว่ามี 24 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ เมื่อจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเป็นราไทร์อทที่จัดอยู่ใน 5 วงศ์ 9 สกุล และ 15 ชนิด โดยสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกได้ทั้ง 3 ชนิด และมีปริมาณสูงสุดคือ *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 จึงนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเพื่อให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman Design พบว่าความเข้มข้นของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose ส่งผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงวิเคราะห์หาจุดที่สามารถเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดให้สูงที่สุดด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง Central Composite Design ผลการทดลองสามารถเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้เท่ากับ 5.841 และ 5.156 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงขึ้นจากเดิมเท่ากับ 2.59 และ 1.94 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดคือ กากตะกอนดีแคนเตอร์ปริมาณ 10 กรัม ที่มีส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) glucose 6.756 กรัม, yeast extract 1 กรัม, KH_2PO_4 0.1 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 กรัม, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 กรัม, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.075 กรัม, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.46 กรัม, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 กรัม และ Tween-80 0.15 กรัม เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดคือ pH 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์คือ pH 4.0-7.0 อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 72 และ 2.5 ชั่วโมง ตามลำดับ การปรับสภาพกากตะกอนดีแคนเตอร์ด้วยเอนไซม์สกัดหยาบพบว่าปริมาณลิกนินลดลงร้อยละ 16.75 ภายในระยะเวลา 12 วัน

คำสำคัญ : แลคเคส, แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส, ราไทร์อท, *Pseudolagarobasidium*, กากตะกอนดีแคนเตอร์, สภาวะที่เหมาะสม

Title	OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES FROM WHITE-ROT FUNGUS <i>PSEUDOLAGAROBASIDIUM</i> SP. PP17-33 IN SOLID STATE FERMENTATION USING OIL PALM DECANter CAKE AS SUBSTRATE
Author	PISIT THAMVITHAYAKORN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Dr. Nuttika Suwannasai

Two hundred and sixty-four samples of basidiomycetes fungi collected from northeastern Thailand were cultured and screened for ligninolytic enzyme production i.e. laccase, lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by using palm oil mill waste, oil palm decanter cake (OPDC), as a substrate. There were 24 isolates which exhibited ligninolytic enzyme activities. They were then identified based on morphological characteristics and nucleotide sequences. The results showed that these white-rot fungi belonged to 5 families, 9 genera and 15 species. *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 revealed the highest activities of all ligninolytic enzyme studies. Afterwards, it was selected for investigation of the optimal condition for laccase and MnP production. The composition of culture medium was screened for the variables effective in enzyme production by using Plackett-Burman design. The results indicated that $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and glucose concentration significantly affected the enzyme activities. Both factors were further optimized for increasing the enzyme activity by response surface methodology using central composite design. The laccase and MnP activities were increased up to 5.841 and 5.156 U/gds after optimization, which were 2.59-fold and 1.94-fold enhancement, respectively. The optimal condition for both types of enzyme production was 10 g of OPDC with 20 mL of basal medium consisting of (g/L) 6.756 g glucose, 1 g yeast extract, 0.1 g KH_2PO_4 , 0.75 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.075 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.46 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.15 g tween-80, incubated at 30 °C for 7 days. Moreover, the characterization results of crude laccase and MnP exhibited the maximum activity at pH 4.0 and temperature at 60 °C. The stability of crude enzyme in term of pH and temperature were pH 4.0 – 7.0 and 30 – 50 °C for 72 and 2.5 hours incubation, respectively. The pretreatment of OPDC by using crude enzyme showed the amount of lignin decreased by 16.75 % within 12 days.

Keyword : Laccase, Manganese peroxidase, White-rot fungi, *Pseudolagarobasidium*, Oil palm decanter cake, Optimal condition

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจากหลายๆฝ่าย ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ณีฎฐิภา สุวรรณาศรัย อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และสนับสนุนการทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชมาภรณ์ กระจ่างสังข์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำปริญญานิพนธ์ และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัย รวมถึงภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาจุลชีววิทยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.นิพนธ์ พิสุทธิไพศาล ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร อาหาร และสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุ่งเพชร แข็งแรง สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม และเจ้าหน้าที่ป่าไม้ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเก็บรวบรวมตัวอย่างราไวท์รอฟท์ที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน) (Grant no. 37/2561) ที่สนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของบริษัทสุขสมบูรณ์ กรู๊ป จำกัด จังหวัดชลบุรี ที่ให้ความช่วยเหลือห้กากตะกอนดีแคเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่มอบทุนการศึกษาสนับสนุนการเข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานของนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา (GRAD S-3-63)

ขอขอบคุณ นางสาวนิวนา หวังสวัสดิ์ นางสาวณัฐธิดา สุธะยัง และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ และเพื่อนๆทุกคน ที่ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือเสมอมา

สุดท้ายขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่สาว ที่สนับสนุน และให้กำลังใจตลอดมา ทำให้ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพประกอบ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
1. ราไวท์รอกและเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลีติก	4
1.1 เอนไซม์แลคเคส	9
1.2 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	12
1.3 เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส	13
2. บทบาทและความสำคัญของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลีติก.....	17
2.1 การผลิตเยื่อกระดาษด้วยวิธีการทางชีวภาพ.....	17
2.2 การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ	17
2.3 การปรับปรุงสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อการผลิตพลังงานชีวภาพ.....	18

3. การผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติกโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดลิกโนเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้น.....	19
4. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติกโดยการหมักแบบแห้ง และการออกแบบการทดลอง.....	23
4.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติก	23
4.2 การออกแบบการทดลองทางสถิติที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
5. คุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติก	29
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	30
อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	30
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	31
วิธีดำเนินการทดลอง	33
1. การเก็บรวบรวมและเพาะเลี้ยงราไวท์รอต	33
2. การคัดเลือกสายพันธุ์ราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติกได้บนอาหารแข็ง	34
3. การจัดจำแนกชนิดของราไวท์รอต	34
3.1 การศึกษาราวีท์รอตโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	34
3.2 การศึกษาราวีท์รอตโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS).....	35
4. การหมักแบบแห้งโดยใช้กากตะกอนดีแคเนเตอร์เป็นสารตั้งต้น.....	37
4.1 การหมักแบบแห้ง	37
4.2 การสกัดและการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์	38
5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ด้วยการออกแบบการทดลองทางสถิติ.....	39
5.1 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม.....	39
5.2 วิธี Plackett-Burman Design (PBD).....	40
5.3 วิธี Central Composite Design (CCD).....	42

6. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติก	44
6.1 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์.....	44
6.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	44
6.3 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่อค่า pH.....	44
6.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ	44
7. การปรับสภาพกากตะกอนดีแคแคโนเตอร์ด้วยเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติก	45
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	46
1. การเก็บรวบรวมและเพาะเลี้ยงราไวฑรุธ	46
2. การคัดเลือกสายพันธุ์ราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติกได้บนอาหารแข็ง	51
3. การผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติกโดยใช้กากตะกอนดีแคแคโนเตอร์เป็นสารตั้งต้นใน กระบวนการหมักแบบแห้ง	56
4. การจัดจำแนกชนิดของราไวฑรุธ	61
4.1 การศึกษาราไวฑรุธโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	61
4.2 การศึกษาราไวฑรุธโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS.....	77
4.3 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของรา <i>Pseudolagarobasidium</i> sp. PP17-33	83
5. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โดยใช้กากตะกอนดีแคแคโนเตอร์เป็นสารตั้งต้น ด้วยวิธีทางสถิติ	85
5.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์.....	85
5.2 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์	86
5.3 การคัดเลือกปัจจัยของส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี PBD.....	87
5.4 การหาพื้นที่ผิวตอบสนองที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี CCD.....	97
5.5 การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีส เปอร์ออกซิเดสสูงที่สุด	109

6. คุณสมบัติของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	111
6.1 ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์.....	111
6.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์.....	112
6.3 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อค่า pH.....	113
6.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ.....	115
7. การปรับสภาพกากตะกอนดีแคนเตอร์ด้วยเอนไซม์สกัดหยาบ	117
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	119
บรรณานุกรม	131
ภาคผนวก.....	143
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	144
ภาคผนวก ข สารเคมีและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	147
ภาคผนวก ค ข้อมูลทางสถิติ	150
ประวัติผู้เขียน.....	158

สารบัญตาราง

ตาราง 1 ตัวอย่างราไวท์รอกที่มีรายงานการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก.....	15
ตาราง 2 ตัวอย่างราไวท์รอกที่ผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกโดยใช้วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง.....	20
ตาราง 3 คุณลักษณะของกากตะกอนดีแคแเตอร์.....	22
ตาราง 4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	30
ตาราง 5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	31
ตาราง 6 ส่วนผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของราไวท์รอก.....	35
ตาราง 7 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณ ITS ของราไวท์รอก.....	36
ตาราง 8 ค่าปัจจัยของแต่ละระดับที่ใช้ในการออกแบบการทดลองตามวิธี PBD.....	40
ตาราง 9 แบบการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกโดยใช้ วิธี PBD.....	41
ตาราง 10 ค่าปัจจัยของแต่ละระดับที่ใช้ในการออกแบบการทดลองตามวิธี CCD.....	42
ตาราง 11 แบบการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกโดย ใช้วิธี CCD.....	43
ตาราง 12 ข้อมูลการเก็บรวบรวมและเพาะเลี้ยงราไวท์รอกจากพื้นที่ 4 จังหวัดในภาค ตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย.....	48
ตาราง 13 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกของรากุ่มเบสิดิโอไมซีต บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เติมอินดิเคเตอร์.....	52
ตาราง 14 องค์ประกอบของกากตะกอนดีแคแเตอร์ที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม.....	56
ตาราง 15 ระดับการเจริญของราและกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกภายใต้กระบวนการ หมักแบบแห้งในหลอดเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....	59
ตาราง 16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราไวท์รอก.....	62

ตาราง 17 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ที่ได้จากราไวท์รอกท กับฐานข้อมูล GenBank.....	79
ตาราง 18 กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) จากการศึกษาปัจจัยทั้ง 9 ปัจจัยด้วยวิธี PBD	89
ตาราง 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการถดถอยเชิงพหุคูณต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แลคเคสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี PBD	91
ตาราง 20 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แลคเคสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี PBD	93
ตาราง 21 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการถดถอยเชิงพหุคูณต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี PBD.....	94
ตาราง 22 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี PBD.....	96
ตาราง 23 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการทดลองและ การทำนายจากสมการถดถอย	98
ตาราง 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการถดถอยเชิงพหุคูณต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แลคเคสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD.....	100
ตาราง 25 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แลคเคสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD.....	100
ตาราง 26 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการถดถอยเชิงพหุคูณต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD	103
ตาราง 27 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD	103
ตาราง 28 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการทดลองและ การทำนายจากสมการถดถอย	106
ตาราง 29 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่สูงที่สุดที่ได้จากการ ทำนายและการทดลอง	110

ตาราง 30 องค์ประกอบของกากตะกอนดีแคนเตอร์ก่อนและหลังกระบวนการปรับสภาพเป็นเวลา 12 วัน.....	118
ตาราง 31 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสออกซิเดสในการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิดเป็นเวลา 13 วัน.....	151
ตาราง 32 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	152
ตาราง 33 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	153
ตาราง 34 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสที่ pH เท่ากับ 3.0 – 7.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	154
ตาราง 35 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ pH เท่ากับ 3.0 – 7.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	155
ตาราง 36 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30 – 80 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ชั่วโมง	156
ตาราง 37 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30 – 80 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ชั่วโมง.....	157

สารบัญภาพประกอบ

ภาพประกอบ 1 องค์ประกอบของผนังเซลล์พืชที่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน	4
ภาพประกอบ 2 ตัวอย่างราไทรอทที่พบในธรรมชาติ (a) <i>Trametes versicolor</i> (Polyporaceae),	6
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างมอนอเมอร์ขององค์ประกอบลิกนิน ได้แก่ sinapyl alcohol (S), coniferyl alcohol (G) และ <i>p</i> -coumaryl alcohol (H).....	8
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของลิกนินที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์เชื่อมด้วยพันธะต่าง ๆ	8
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างเอนไซม์แลคเคสของราไทรอท <i>Trametes versicolor</i> และการเร่ง ปฏิกิริยา	10
ภาพประกอบ 6 แผนภาพแสดงการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ในการย่อยสลายสารตั้งต้นของเอนไซม์ แลคเคส.....	11
ภาพประกอบ 7 วงจรการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส.....	13
ภาพประกอบ 8 วงจรการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส	14
ภาพประกอบ 9 ตัวอย่างของวัตถุตีบประเภทลิกโนเซลลูโลส	20
ภาพประกอบ 10 กากตะกอนดีแคนเตอร์	21
ภาพประกอบ 11 แผนการทดลองแบบ PBD ที่มีจำนวนการทดลองทั้งหมด (N) เท่ากับ 12, 20, 24 และ 36 ชุดการทดลอง k คือจำนวนปัจจัยที่ต้องทำการกลั่นกรอง	26
ภาพประกอบ 12 พื้นผิวตอบสนอง 3 มิติแสดงผลผลิตที่คาดการณ์ไว้ (η) เป็นฟังก์ชันของปัจจัยที่ 1 (x_1) และปัจจัยที่ 2 (x_2) และพล็อตโครงสร้างของพื้นผิวตอบสนอง.....	27
ภาพประกอบ 13 สภาพพื้นที่ป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....	47
ภาพประกอบ 14 ตัวอย่างฟรุตติงบอดีของราที่เก็บรวบรวมได้จากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย.....	49
ภาพประกอบ 15 ตัวอย่างราบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 7 วัน	50

ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงค่าร้อยละของจำนวนราและประสิทธิภาพในการย่อยอินดิเคเตอร์ 3 ชนิด 54

ภาพประกอบ 17 กราฟวงกลมแสดงค่าร้อยละของจำนวนราที่สามารถย่อยอินดิเคเตอร์ได้ 55

ภาพประกอบ 18 กากตะกอนดีแคเนเตอร์จากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม บริษัทสุขสมบุญรณ์ (a) กากตะกอนดีแคเนเตอร์จากโรงงาน (b) กากตะกอนดีแคเนเตอร์หลังการอบแห้ง และ (c) กากตะกอนดีแคเนเตอร์หลังการบด 57

ภาพประกอบ 19 การหมักแบบแห้งของราโดยใช้กากตะกอนดีแคเนเตอร์เป็นสารตั้งต้นในหลอดเพาะเชื้อที่ความชื้นเท่ากับ 65% อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 58

ภาพประกอบ 20 *Corioloopsis aspera* (NP17-02) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด, (d) ซีสทีเดีย และ (e) เบสิดิโอสปอร์ 69

ภาพประกอบ 21 *Corioloopsis retropicta* (PW17-134) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์ 70

ภาพประกอบ 22 *Ganoderma lingzhi* (PW17-43) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์ 70

ภาพประกอบ 23 *Ganoderma* sp. 1 (PW17-145) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์ 71

ภาพประกอบ 24 *Ganoderma* sp. 2 (PW17-111) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์ 71

ภาพประกอบ 25 *Microporus* sp. 1 (PW17-173) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์ 72

ภาพประกอบ 26 *Microporus* sp. 2 (PP17-17) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด และ (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด 72

ภาพประกอบ 27 *Nigroporus vinosus* (PW17-221) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด และ (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด 73

ภาพประกอบ 28 *Trametes elegans* (PP17-06) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด, (d) ซีสทีเดีย และ (e) เบสิดิโอสปอร์ 73

ภาพประกอบ 29 *Trametes hirsuta* (PW17-41) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูปร่างด้านหลังดอกเห็ด, (d) ชีสที่เคี้ยว และ (e) เบสิดิโอสปอร์..... 74

ภาพประกอบ 30 *Trametes sanguinea* (PP17-18) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูปร่างด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์..... 74

ภาพประกอบ 31 *Tyromyces xuchilensis* (PW17-171) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูปร่างด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์..... 75

ภาพประกอบ 32 *Pseudolagarobasidium* sp. (PP17-33) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b-c) ลักษณะก้านบนดอกเห็ด และ (d) เบสิดิโอสปอร์..... 75

ภาพประกอบ 33 *Dentipellis parmastoi* (PW17-136) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูปร่างด้านหลังดอกเห็ด, (d) ชีสที่เคี้ยว และ (e) เบสิดิโอสปอร์..... 76

ภาพประกอบ 34 *Aleurodiscus* sp. (PW17-219) (a-b) ด้านหน้าของดอกเห็ด และ (c-d) เบสิดิโอสปอร์..... 76

ภาพประกอบ 35 ผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของตัวอย่างราไวท์รอก ที่ได้จาก การเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR (M) DNA ladder (1) PW17-135 (2) PW17-136 (3) PW17-139 (4) PW17-143 (5) PW17-145 (6) PW17-154 (7) PW17-155 (8) PW17-171 (9) PW17-173 (10) PW17-174 (11) PW17-177 และ (12) PW17-188 78

ภาพประกอบ 36 แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการของรา *Pseudolagarobasidium* กับสายพันธุ์ใกล้เคียง โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS ด้วยวิธี maximum likelihood โปรแกรม MEGA 7 ตัวเลขบนแผนภูมิแสดงค่าร้อยละความเชื่อมั่นที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ 1,000 ครั้ง 84

ภาพประกอบ 37 กราฟแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสต่อระยะเวลาในการบ่มของรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 เมื่อใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์ เป็นสารตั้งต้น ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 86

ภาพประกอบ 38 กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ (peptone, yeast extract และ sodium nitrate) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน 87

ภาพประกอบ 39 กราฟพาเรโตแสดงปัจจัยของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ที่มีค่ามากกว่าเส้นวิกฤตซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 92

ภาพประกอบ 40 กราฟพาเรโตแสดงปัจจัยของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose ที่มีค่ามากกว่าเส้นวิกฤตซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95	95
ภาพประกอบ 41 กราฟ normal plot of residuals ของค่าความคลาดเคลื่อนจากข้อมูลในการวิเคราะห์สมการถดถอยของกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส	101
ภาพประกอบ 42 กราฟ normal plot of residuals ของค่าความคลาดเคลื่อนจากข้อมูลในการวิเคราะห์สมการถดถอยของกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	104
ภาพประกอบ 43 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (a) และแผนภาพคอนทัวร์ (b) ของผลความเข้มข้น $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตจากรา <i>Pseudolagarobasidium</i> sp. PP17-33 โดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้น	107
ภาพประกอบ 44 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (a) และแผนภาพคอนทัวร์ (b) ของผลความเข้มข้น $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตจากรา <i>Pseudolagarobasidium</i> sp. PP17-33 โดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้น	108
ภาพประกอบ 45 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	112
ภาพประกอบ 46 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	113
ภาพประกอบ 47 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสที่ pH เท่ากับ 3.0 – 7.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	114
ภาพประกอบ 48 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ pH เท่ากับ 3.0 – 7.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	115
ภาพประกอบ 49 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30 – 80 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ชั่วโมง	116
ภาพประกอบ 50 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30 – 80 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ชั่วโมง	117

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

การผลิตปาล์มน้ำมันเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมเกษตรที่สำคัญในประเทศไทย มีการส่งออกสู่ตลาดติดอันดับ 1 ใน 5 ของโลก ซึ่งการนำทะลายปาล์มดิบ (fresh fruit bunches) เข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มนั้น ทำให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม ได้แก่ น้ำทิ้ง (palm oil mills effluent) ทะลายปาล์มเปล่า (empty fruit bunch) เส้นใยปาล์ม (palm mesocarp fiber) และกากตะกอนดีแคนเตอร์ (oil palm decanter cake) ซึ่งเป็นของเสียที่ได้จากกระบวนการทำน้ำมันปาล์มดิบ (crude palm oil) ให้บริสุทธิ์ ก่อให้เกิดขยะเหลือทิ้งและมลภาวะเป็นพิษในสิ่งแวดล้อม ทำให้ต้องใช้งบประมาณในการบำบัด และกำจัดที่เพิ่มสูงขึ้น⁽¹⁾ กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic materials) ประกอบด้วยสารเชิงซ้อนของลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ที่ไม่ละลายน้ำเช่นเดียวกับฟางข้าว ชานอ้อย และกากมันสำปะหลัง สารลิกโนเซลลูโลสที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเหล่านี้มีอยู่เป็นจำนวนมากและมีราคาถูก บางชนิดไม่มีมูลค่า ที่สำคัญสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานชีวภาพและเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมได้ ในการผลิตพลังงานนั้นต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อกำจัดลิกนินซึ่งเป็นโครงสร้างที่ย่อยสลายได้ยากก่อนนำมาใช้ประโยชน์ วิธีปรับสภาพที่ได้รับความนิยม และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม คือวิธีทางชีวภาพ (biological pretreatment)⁽²⁾ โดยการใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการกำจัดลิกนินโดยเฉพาะราในกลุ่มไวท์รอต (white-rot fungi) ซึ่งเป็นราย่อยสลายไม้ (wood decay fungi) ที่สามารถเปลี่ยนรูปของลิกนินให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้โดยการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติก (ligninolytic enzymes) เช่น แลคเคส (laccase; Lac) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase; MnP) ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase; LiP) และเวอร์ซาไทล์เปอร์ออกซิเดส (versatile peroxidase; VP) ตัวอย่างราไวท์รอตที่สามารถย่อยสลายลิกนินจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispota*, *Phlebia subserialis*, *Pleurotus ostreatus* และ *Trametes versicolor*⁽³⁾ เป็นต้น นอกจากนี้เอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติกที่ผลิตจากราไวท์รอตยังถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษ (biopulping) การบำบัดสวามลพิษทางชีวภาพ

(bioremediation) การกำจัดสีในน้ำทิ้ง (decolorization) การปรับสภาพเพื่อการผลิตเอทานอล (ethanol) และการผลิตก๊าซชีวภาพ (biogas)^(2, 4) เป็นต้น

แม้ว่าในประเทศไทยมีรายงานที่กล่าวถึงและศึกษาเกี่ยวกับราไวท์รอตมาอย่างต่อเนื่อง แต่ราไวท์รอตส่วนใหญ่ที่ศึกษามักอยู่ในกลุ่มที่จำกัดเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ทั้ง ๆ ที่ในประเทศไทยมีรายงานการค้นพบเห็ดราเป็นจำนวนมากและมีความหลากหลายสูง⁽⁵⁾ ที่สำคัญยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการนำราไวท์รอตมาผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกโดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์จากอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันเป็นสารตั้งต้นมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเน้นการรวบรวมตัวอย่างราไวท์รอตจากพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพื่อจัดจำแนกชนิด และคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเจริญบนกากตะกอนดีแคนเตอร์ได้ดีและผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกได้สูง มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้น รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ดังกล่าว ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้นอกจากจะเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมที่ไม่มีมูลค่ามาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตเอนไซม์แล้ว เอนไซม์ที่ได้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกนิโนเซลลูโลสที่เหลือทิ้งชนิดอื่น ๆ เพื่อการใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมและพลังงานชีวภาพต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยก เพาะเลี้ยง และจัดจำแนกชนิดราไวท์รอตที่พบในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกได้
2. เพื่อทดสอบคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสของราไวท์รอตที่เพาะเลี้ยงได้
3. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกโดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้นด้วยวิธีการทางสถิติ
4. เพื่อศึกษาคุณสมบัติและความเสถียรของเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกที่ผลิตได้
5. เพื่อนำเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกไปปรับสภาพกากตะกอนดีแคนเตอร์เพื่อลดปริมาณลิกนิน

ขอบเขตของการวิจัย

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างราไวท์รอตในพื้นที่จังหวัดนครพนม สกลนคร อุดรธานี และชัยภูมิ โดยทำการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของราไวท์รอตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลีติก ได้แก่ แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส จากนั้นจัดจำแนกชนิดของราไวท์รอตโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) คัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เป้าหมายได้ในปริมาณสูง มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โดยการใช้กากตะกอนดีแคแคโนเตอร์ที่ได้จากอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้น รวมถึงศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์และนำเอนไซม์ที่ได้ไปใช้ปรับปรุงสภาพกากตะกอนดีแคแคโนเตอร์เพื่อลดปริมาณลิกนิน และเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

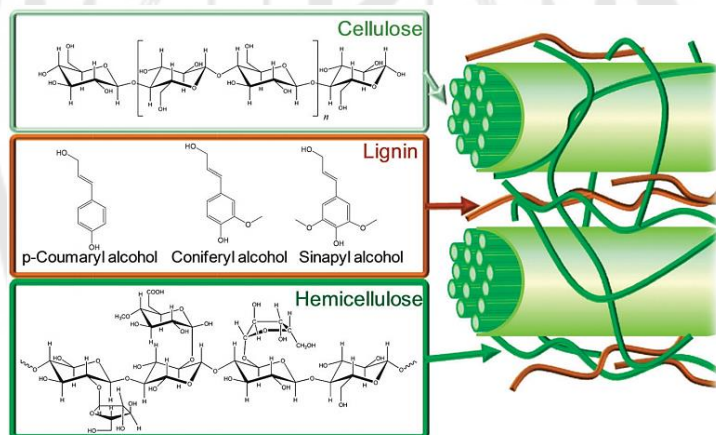
1. ได้เชื้อบริสุทธิ์ของราไวท์รอตที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลีติก (แลคเคส, แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส) ได้
2. ได้ฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ที่สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดของราไวท์รอตที่ผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลีติก
3. ได้สายพันธุ์ราไวท์รอตที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลีติกได้สูง โดยการใช้กากตะกอนดีแคแคโนเตอร์เป็นสารตั้งต้น
4. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลีติกจากราไวท์รอตที่ถูกคัดเลือกโดยใช้กากตะกอนดีแคแคโนเตอร์เป็นสารตั้งต้น
5. ได้ข้อมูลคุณสมบัติของเอนไซม์สกัดหยาบที่ผลิตจากราไวท์รอตที่ถูกคัดเลือก เพื่อเป็นข้อมูลในการใช้ประโยชน์
6. ได้ข้อมูลเบื้องต้นจากการนำเอนไซม์สกัดหยาบที่ผลิตได้จากราไวท์รอตที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในการปรับปรุงสภาพกากตะกอนดีแคแคโนเตอร์เพื่อลดปริมาณลิกนิน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ราไวท์รอตและเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลิติก

ราไวท์รอต (white-rot fungi) คือราที่ย่อยสลายไม้ที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) (ภาพประกอบ 1) ทำให้เปลี่ยนสีเนื้อไม้จากสีน้ำตาลเป็นสีขาว^(6, 7) ส่วนใหญ่จัดอยู่ในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา (Basidiomycota) รองลงมาคือไฟลัมแอสโคไมโคตา (Ascomycota)⁽⁸⁾ ราไวท์รอตพบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบนิเวศป่าไม้ ทั้งในสภาพภูมิอากาศร้อนชื้นและอบอุ่น ส่วนมากพบการเจริญบนไม้เนื้อแข็ง เช่น ท่อนไม้ และตอไม้ ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ราคู่มนี้จึงเป็นผู้ย่อยสลายในธรรมชาติที่สำคัญ นอกจากทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารต่าง ๆ แล้ว ยังก่อให้เกิดความสมดุลในระบบนิเวศอีกด้วย



ภาพประกอบ 1 องค์ประกอบของผนังเซลล์พืชที่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

ที่มา: Alonso DM, Wettstein SG, Dumesic JA. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. Chem Soc Rev. 2012; 41: 8075-98.⁽⁹⁾

ตัวอย่างราไวท์รอตในฟิล์มเบสิดิโอไมโคตาที่มีรายงานส่วนใหญ่จัดอยู่ในวงศ์ Phanerochaetaceae (*Phanerochaete chrysosporium*), Polyporaceae (*Trametes versicolor* และ *Pycnoporus sanguineus*), Marasmiaceae (*Lentinula edodes*), Pleurotaceae (*Pleurotus ostreatus* และ *P. pulmonarius*), Hymenochaetaceae (*Inonotus hispidus* และ *Phellinus igniarius*), Ganodermataceae (*Ganoderma lucidum* และ *G. applanatum*) และ Meruliaceae (*Bjerkandera adusta* และ *Irpex lacteus*)⁽⁶⁾ ทั้งนี้ราไวท์รอต สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ตามความสามารถในการย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช ได้แก่ กลุ่มที่ย่อยได้เฉพาะลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส เช่น *Ceriporiopsis subvermispora*, *Dichomitus squalens* และ *Phlebia radiata*⁽¹⁰⁾ และกลุ่มที่ย่อยได้ทั้งลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส เช่น *P. chrysosporium*, *T. versicolor* และ *Fomes fomentarius*⁽¹¹⁾

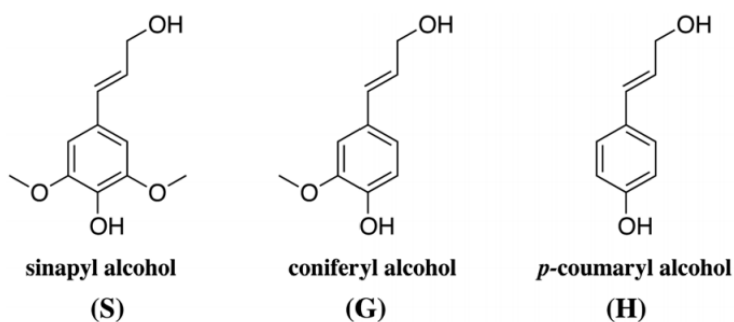
เซลลูโลสเป็นโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาล กลูโคสที่ต่อกันเป็นสายยาว เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายได้ เช่น เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (endoglucanases) (EC 3.2.14), เอ็กโซกลูคาเนส (exoglucanases) (EC 3.2.1.91) และ เบตา-กลูโคซิเดส (β -glucosidases) (EC 3.2.1.21)⁽¹²⁾ ในขณะที่เฮมิเซลลูโลสซึ่งมีโครงสร้างหลากหลาย ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดโดยเฉพาะน้ำตาลไซโลส (xylose) ตัวอย่างเช่น ไซแลน (xylan), กลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan), อะราบิโนไซแลน (arabinoxylan), กลูโคแมนแนน (glucomannan) และไซโลกลูแคน (xyloglucan) เอนไซม์ที่สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้ คือ เอนโดไซลาเนส (endoxylanases) (EC 3.2.1.8), เอนโดแมนแนนเนส (endomannanases) (EC 3.2.1.78) และ แอลฟา-กลูคูโรนิเดส (α -glucuronidase) (EC 3.2.1.131) เป็นต้น



ภาพประกอบ 2 ตัวอย่างราไม้ที่พบในธรรมชาติ (a) *Trametes versicolor* (Polyporaceae), (b) *Microporus xanthopus* (Polyporaceae), (c) *Ganoderma applanatum* (Ganodermataceae), (d) *Phlebia tremellosa* (Meruliaceae), (e) *Pycnoporus cinnabarinus* (Polyporaceae) และ (f) *Stereum ostrea* (Stereaceae)

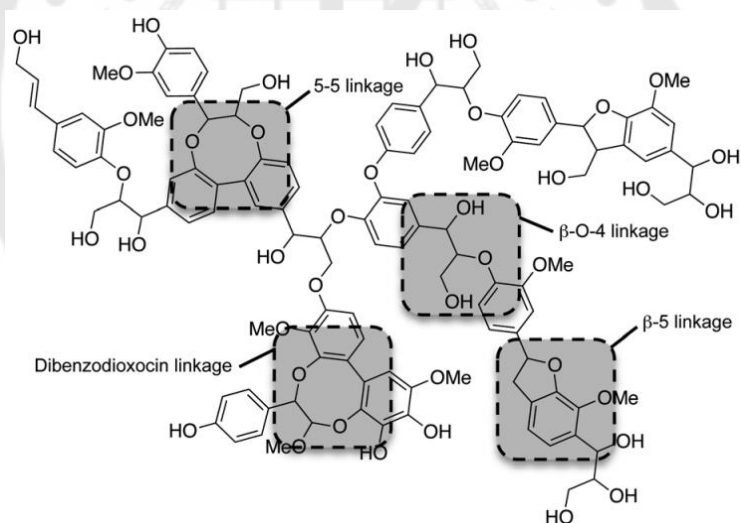
ที่มา : (a) Jerzy Opiola. (2011). Retrieved December 26, 2017 from [https://commons.wikimedia.org/wiki/Trametes_versicolor?uselang=cs#/media/File:Trametes_versicolor_G4_\(1\).JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/Trametes_versicolor?uselang=cs#/media/File:Trametes_versicolor_G4_(1).JPG). (online).⁽¹³⁾ (b) Heino Lepp. (2012). Retrieved December 26, 2017 from <https://www.anbg.gov.au/fungi/case-studies/microporus-xanthopus-growth.html>. (online).⁽¹⁴⁾ (c) Nick Kurzenko. (2007). Retrieved December 26, 2017 from https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?seq_num=368100&one=T. (online).⁽¹⁵⁾ (d) Larry Grand. (2008). Retrieved December 26, 2017 from http://www.messiah.edu/oakes/fungi_on_wood/poroidfungi/speciespages/Phlebiatremellosa.htm. (online).⁽¹⁶⁾ (e) Jason Hollinger. (2007). Retrieved December 26, 2017 from [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pycnoporus_cinnabarinus_\(1002812302\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pycnoporus_cinnabarinus_(1002812302).jpg) (online).⁽¹⁷⁾ (f) Gary Lincoff. (2011). Retrieved December 26, 2017 from <http://garylincoff.com/wp-content/uploads/2011/12/stereumOstrea.jpg>. (online).⁽¹⁸⁾

ส่วนลิกนินเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ที่มีโครงสร้างซับซ้อนพบอยู่ล้อมรอบมัดของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ส่วนใหญ่ประกอบด้วยโครงสร้างพื้นฐานของมอนอเมอร์ (monomer) 3 ชนิด ได้แก่ *p*-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol (ภาพประกอบ 3) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติก มอนอเมอร์เหล่านี้เรียกว่า “ มอนอลิกนอล มอนอเมอร์ (monolignol monomer) ” เมื่อประกอบเป็นโครงสร้างของลิกนินแล้วจะอยู่ในรูปของหมู่ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) ได้แก่ *p*-hydroxyphenyl (H-type), guaiacyl (G-type) และ syringyl (S-type) ตามลำดับ โดยพืชแต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนของมอนอเมอร์ทั้ง 3 ชนิดแตกต่างกัน ปกติแล้วปริมาณของลิกนินพบมากที่สุดในไม้เนื้ออ่อน (24-33%) รองลงมาคือไม้เนื้อแข็ง (19-28%) และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น กล้วยพืช ไม้ไผ่ ชานอ้อย (15-25%) ทั้งนี้พันธะที่พบในการเชื่อมต่อกันของมอนอเมอร์ เช่น C-C, C-O-C, β -O-4 ซึ่งพันธะที่พบมากที่สุดคือ β -aryl ether (β -O-4) (ภาพประกอบ 4) ลิกนินจัดเป็นโครงสร้างที่ย่อยสลายได้ยากที่สุดในผนังเซลล์พืช มีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถย่อยลิกนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งหนึ่งในนั้นคือราไวท์รอต โดยราจะผลิตเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) และย่อยลิกนินได้อย่างไม่จำเพาะด้วยปฏิกิริยารีดอกซ์ เรียกเอนไซม์ที่ย่อยลิกนินได้นี้ว่า เอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติก (ligninolytic enzymes) เช่น แลคเคส (laccase) (Lac; EC 1.10.3.2, benzenediol:oxygen oxidoreductase), แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) (MnP; EC 1.11.1.13), ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) (LiP; EC 1.11.1.14), เวอร์ซาไทล์เปอร์ออกซิเดส (versatile peroxidase) (VP; EC 1.11.1.16) และ H₂O₂-forming enzymes เช่น ไกลออกซอลออกซิเดส (glyoxal oxidase) (GLOX; EC 1.2.3.5) และเอริลแอลกอฮอล์ออกซิเดส (aryl alcohol oxidase) (AAO; EC 1.1.3.7)⁽³⁾ ซึ่งราไวท์รอตแต่ละชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ ทั้งนี้ราไวท์รอตส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ แต่มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ ส่วนเอนไซม์อื่น ๆ พบว่ามีความสำคัญน้อยกว่าเอนไซม์หลักทั้ง 3 ชนิด



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างมอนอเมอร์ขององค์ประกอบลิกนิน ได้แก่ sinapyl alcohol (S), coniferyl alcohol (G) และ *p*-coumaryl alcohol (H)

ที่มา : Strassberger Z, Tanase S, Rothenberg G. The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. RSC Adv. 2014; 4: 25310-8.⁽¹⁹⁾



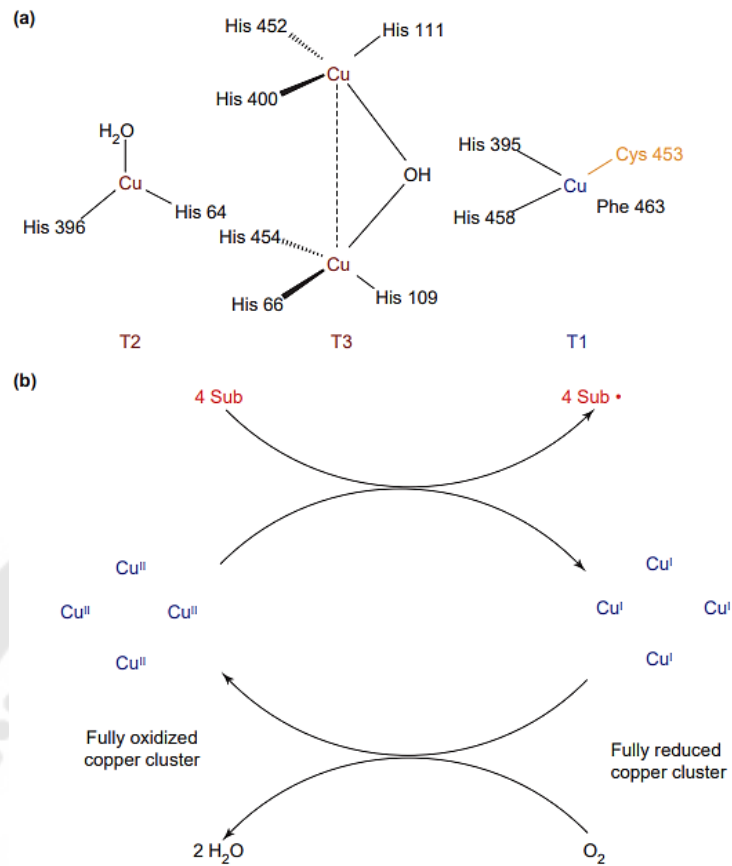
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของลิกนินที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์เชื่อมด้วยพันธะต่างๆ

ที่มา : Strassberger Z, Tanase S, Rothenberg G. The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. RSC Adv. 2014; 4: 25310-8.⁽¹⁹⁾

1.1 เอนไซม์แลคเคส

แลคเคสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มพอลีฟีนอล ออกซิเดส (polyphenol oxidase) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) และไม่ใช่ฟีนอล (non-phenolic compounds) ได้ เอนไซม์แลคเคสโดยทั่วไปมีอะตอมของทองแดง (copper, Cu^{2+}) ที่บริเวณแอคทีฟไซต์ (active site) จำนวน 4 อะตอมในโมเลกุล ได้แก่ บริเวณ type-1 (T1) 1 อะตอม type-2 (T2) 1 อะตอม และ type-3 (T3) 2 อะตอม (ภาพประกอบ 5a) โดยปฏิกิริยาเริ่มจากสารตั้งต้น (reducing substrate) จะให้อิเล็กตรอนกับ Cu^{2+} ที่บริเวณ T1 (ทำให้ Cu^{2+} เปลี่ยนเป็น Cu^+) ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนปฐมภูมิ (primary electron acceptor) จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกเคลื่อนย้ายไปยังบริเวณ T2 และ T3 ทำให้เอนไซม์อยู่ในสถานะที่มีอิเล็กตรอนเกิน (fully oxidized) จำเป็นต้องให้อิเล็กตรอนโดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอน 2 ตัวของ Cu ที่บริเวณ T3 จะถูกส่งให้ออกซิเจน ทำให้ได้น้ำ 2 โมเลกุล จากการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์แลคเคสจะกลับสู่สถานะเสถียรดั้งเดิม (ภาพประกอบ 5b)⁽³⁾ ส่วนสารตั้งต้นที่ถูกออกซิไดซ์จะเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ต่อเนื่องเพราะไม่เสถียร ทำให้โครงสร้างเกิดการสลายได้

เอนไซม์แลคเคสสามารถย่อยสารตั้งต้นได้อย่างไม่จำเพาะ และเกิดได้หลายปฏิกิริยาขึ้นกับชนิดของสารตั้งต้น สารตั้งต้นบางชนิดสามารถถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์แลคเคสโดยตรง เนื่องจากสามารถเข้าถึงบริเวณแอคทีฟไซต์ (active site) ของเอนไซม์ได้ง่าย (ภาพประกอบ 6a) ในขณะที่สารตั้งต้นบางชนิดไม่สามารถถูกออกซิไดซ์โดยตรงด้วยเอนไซม์เนื่องจากโครงสร้างของสารตั้งต้นมีขนาดใหญ่ จึงต้องผ่านสารเคมีตัวกลาง (chemical mediator) ในการเกิดปฏิกิริยา (ภาพประกอบ 6b) ตัวอย่างของสารเคมีตัวกลาง เช่น ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), HAA (3-Hydroxyanthranilic acid) และ HBT (N-hydroxybenzotriazole) ส่วนกรณีสุดท้ายคือเกิดปฏิกิริยาโดยอาศัยทั้งสารเคมีตัวกลาง และโคแฟกเตอร์ (cofactor) ชนิด FAD (flavin adenine dinucleotide) ของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (ภาพประกอบ 6c)



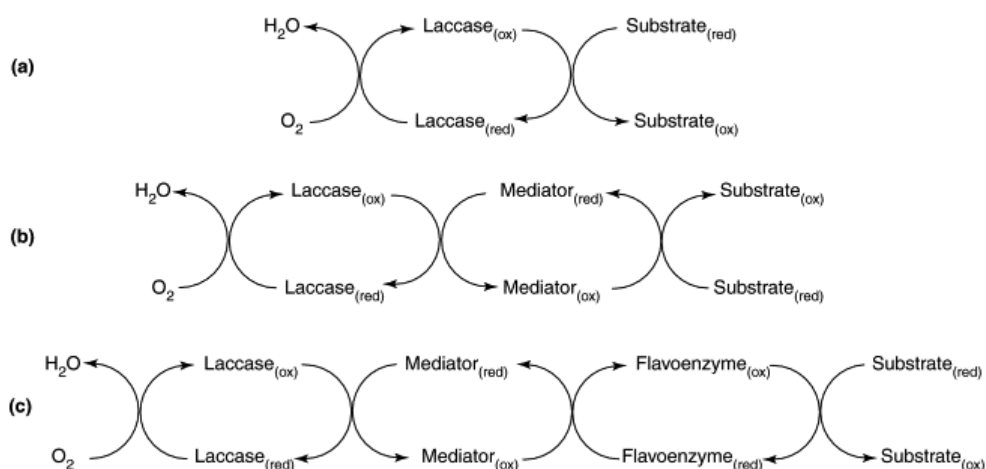
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างเอนไซม์แลคเคสของราไทรอท *Trametes versicolor* และการเร่งปฏิกิริยา

(a) ตำแหน่งแอคทีฟไซต์ของเอนไซม์แสดงตำแหน่งของ Cu^{2+} ที่พบ 4 อะตอม

(b) แผนภาพแสดงการเร่งปฏิกิริยา

หมายเหตุ: Sub• หมายถึง โมเลกุลของสารตั้งต้น (substrate) ที่ถูกออกซิไดซ์

ที่มา: Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. Trends Biotechnol. 2006; 24: 219-26.⁽²⁰⁾



ภาพประกอบ 6 แผนภาพแสดงการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ในการย่อยสลายสารตั้งต้นของเอนไซม์แลคเคส
 (a) การย่อยสลายตั้งต้นโดยตรง (b) การย่อยสลายตั้งต้นโดยผ่านสารตัวกลาง และ (c) การย่อยสลายตั้งต้นโดยผ่านสารตัวกลางและโคแฟกเตอร์ชนิด FAD ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase)

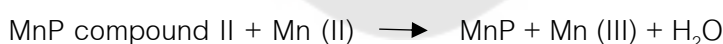
ที่มา: Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. Trends Biotechnol. 2006; 24: 219-26.⁽²⁰⁾

เนื่องจากเอนไซม์แลคเคสสามารถย่อยสลายตั้งต้นได้หลากหลายอย่างไม่จำเพาะ ทำให้ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง ทั้งนี้ราไวท์รอกทส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ในปริมาณที่แตกต่างกันและมีหลายไอโซฟอร์ม (isoform) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 60-80 กิโลดาลตัน (kDa) และมีค่า isoelectric point (pI) อยู่ในช่วง 3-6⁽¹¹⁾ ในธรรมชาติราไวท์รอกทผลิตเอนไซม์แลคเคสในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของการเจริญ การเกิดปฏิกิริยาในการก่อโรค การป้องกันภาวะเครียด และการลดความเป็นพิษของสารเคมี⁽²¹⁾ ทั้งนี้มีรายงานว่าเอนไซม์แลคเคสสามารถถูกกระตุ้นให้ผลิตได้ในปริมาณสูงโดยการเติม Cu^{2+} หรือสารประกอบที่มีวงอะโรมาติก เช่น veratryl alcohol และ 2,5-xylydine ตัวอย่างราไวท์รอกทบางชนิด เช่น *C. subvermispora* และ *Ganoderma lucidum* สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงขึ้นเมื่อใช้สารตั้งต้นที่เป็นลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose)⁽²⁾ ส่วนราไวท์รอกทชนิดอื่น ๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้แสดงในตาราง 1 นอกจากนี้เอนไซม์แลคเคสยังได้มีการ

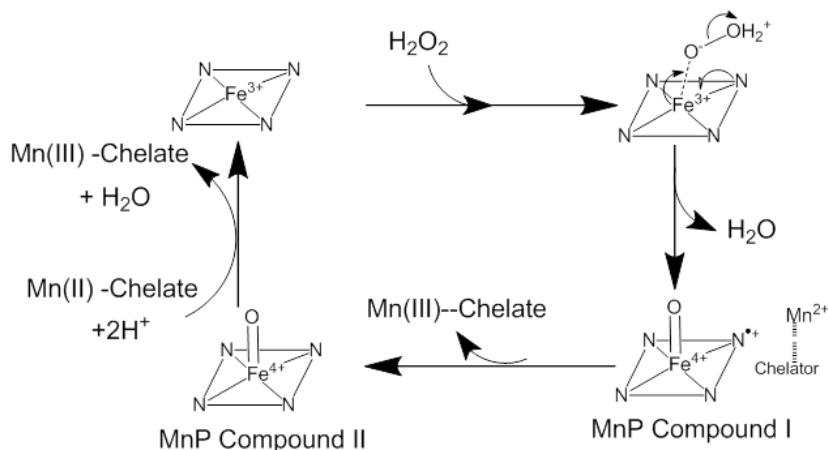
ผลิตในทางการค้าและมีความต้องการในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น เอนไซม์ยี่ห้อ Novozyme ซึ่งเป็นชื่อทางการค้าของเอนไซม์แลคเคสที่ได้จากราไวท์รอก *Trametes villosa* และ *Trametes pubescens* (Novozym 51003) และยี่ห้อ Zylite (Zytext Pvt Ltd, Mumbai) ซึ่งใช้ในการฟอกสีกางเกงยีนส์ เป็นต้น⁽²²⁾

1.2 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสอยู่ในกลุ่มฮีมีเปอร์ออกซิเดส (heme peroxidase) ซึ่งต้องการไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในการเร่งปฏิกิริยา โดยทั่วไปสามารถย่อยลิกนินได้เฉพาะบริเวณที่มีสารประกอบฟีนอลเท่านั้น นอกจากนี้เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสยังต้องการ Mn (II) ซึ่งทำหน้าที่ในการเป็นตัวกลาง (mediator) ในการเกิดปฏิกิริยากับสารตั้งต้น โดยปฏิกิริยาแสดงดังภาพประกอบ 7 เริ่มจากโมเลกุลของ H_2O_2 มาจับกับเอนไซม์บริเวณแอคทีฟไซต์ที่มีอะตอมของเหล็ก Fe^{3+} อยู่ ทำให้เกิดการสร้างพันธะกับอะตอมของ O^{2-} เกิดโครงสร้างของ MnP compound I (หรือ Fe^{4+} -oxo-porphyrin-radical complex) และน้ำ 1 โมเลกุล จากนั้น Mn (II) จะให้อิเล็กตรอน 1 ตัว กับ MnP compound I เปลี่ยนเป็น Mn (III) เกิดเป็น MnP compound II ต่อมา Mn (II) จะให้อิเล็กตรอนอีก 1 ตัว กับ MnP compound II เกิดการทำลายพันธะของ Fe^{4+} ที่จับกับอะตอมออกซิเจน ทำให้ออกซิเจนออกมาพร้อมกับไฮโดรเจน ได้น้ำ 1 โมเลกุล ส่วนเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสก็จะกลับสู่สภาวะเสถียรดังเดิมซึ่งแสดงในสมการดังนี้



ทั้งนี้กรดอินทรีย์ เช่น ออกซาเลต (oxalate), มาโลเนต (malonate) และ ไกลออกซีเลต (glyoxylate) สามารถจับกับ Mn (III) ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน Mn^{3+} - organic acid complex ที่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับสารประกอบฟีนอลของลิกนินได้ ทำให้ Mn (III) เปลี่ยนเป็น Mn (II) ซึ่งสามารถกลับไปเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ใหม่ได้⁽²³⁾



ภาพประกอบ 7 วงจรการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

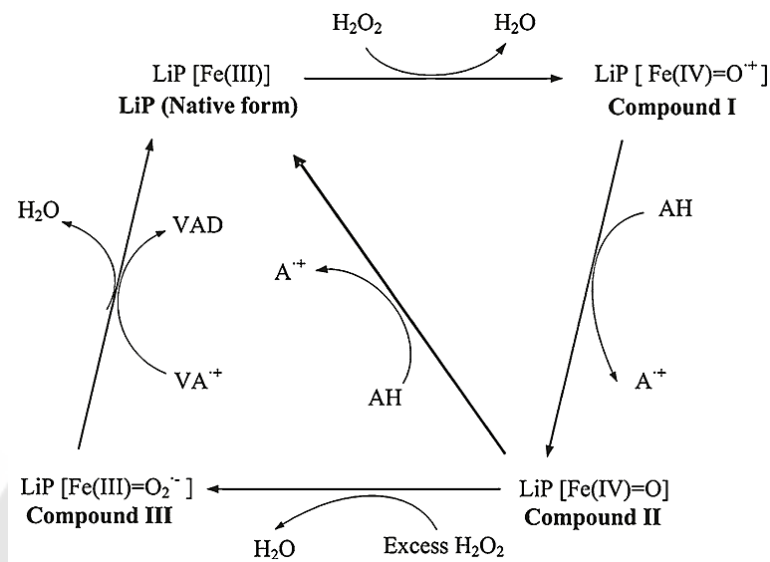
ที่มา : *Wikiwand*. (2013) Retrieved December 26, 2017 from http://www.wikiwand.com/en/Manganese_peroxidase#/Reaction_mechanism. (online).⁽²⁴⁾

1.3 เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส อยู่ในกลุ่มเดียวกับเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส คือต้องการ H₂O₂ ในการเร่งปฏิกิริยา สามารถย่อยสลายประกอบฟินอล และไม่ใช่ฟินอลได้ โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แสดงดังภาพประกอบ 8 เริ่มจากเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) ซึ่งประกอบด้วยอะตอม Fe (III) จะถูกออกซิไดซ์ด้วย H₂O₂ ทำให้เอนไซม์ขาดอิเล็กตรอนได้เป็น LiP compound I [Fe (IV)] และน้ำ 1 โมเลกุล จากนั้นสาร LiP compound I จะออกซิไดซ์สารตั้งต้น (electron-donor substrate; AH) ได้เป็นสาร LiP compound II [Fe (IV)] และสารตั้งต้นที่เสียอิเล็กตรอน (cation radical; A⁺) ทั้งนี้สาร LiP compound II [Fe (IV)] สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อได้ 2 กรณีคือ กรณีแรก LiP compound II [Fe (IV)] จะออกซิไดซ์สารตั้งต้นอีก 1 โมเลกุล ทำให้ได้ LiP [Fe (III)] กลับสู่สภาพเดิมที่เสถียร และเกิด A⁺ ส่วนกรณีที่สองเกิดในสภาวะที่มีสาร H₂O₂ มากเกินไป สาร LiP compound II [Fe (IV)] จะถูกรีดิวซ์ด้วยสาร H₂O₂ ได้เป็น LiP compound III [Fe (III)] ซึ่งเป็นรูปแบบของเอนไซม์ที่ไม่ไวในการเกิดปฏิกิริยา (inactive)

ทั้งนี้สารตั้งต้นบางชนิดไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยตรงกับอะตอม Fe (III) ของเอนไซม์ได้ จึงต้องอาศัยสารเคมีตัวกลาง (mediator) เช่น veratryl alcohol (VA) ซึ่งทำหน้าที่ได้ทั้งเป็นสารตั้งต้น และสารตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารตั้งต้นอื่น โดย

VA ที่ถูกออกซิไดซ์แล้วอยู่ในรูป VA^+ สามารถไปรีดิวซ์สารตั้งต้นอื่นต่อได้ รวมทั้งทำให้ LiP compound III [Fe (III)] เปลี่ยนกลับเป็น LiP [Fe (III)] เหมือนเดิมได้อีกด้วย ดังนั้นสาร VA สามารถช่วยป้องกันไม่ให้เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสอยู่ในสภาพที่ไม่ไวในการเกิดปฏิกิริยาได้⁽³⁾



ภาพประกอบ 8 วงจรการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

หมายเหตุ: AH = electron-donor substrate, A^+ = cation radical, VA = veratryl alcohol,
 VA^+ = VA radical cation

ที่มา : Wong DWS. Structure and Action Mechanism of Lignolytic Enzymes. Appl Biochem Biotechnol. 2009; 157: 174-209.⁽³⁾

เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 38 – 47 kDa และมีค่า pI อยู่ในช่วง 3.2 – 4.7⁽¹¹⁾ ราไทรอทชนิดแรกที่มีรายงานว่าผลิตเอนไซม์นี้ได้คือ *P. chrysosporium* ต่อมา มีรายงานว่าพบในราไทรอทชนิดอื่น ๆ เช่น *Bjerkandera* sp., *Coriolus versicolor*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *T. cervine* และ *T. versicolor* (ตาราง 1) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้

ตาราง 1 ตัวอย่างราไทรอร์ทที่มีรายงานการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติก

วงศ์ของรา	ชนิดของราไทรอร์ท	เอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติก (มวลโมเลกุล; kDa)
Agaricaceae	<i>Agaricus bisporus</i>	MnP (ND), Laccase (65)
	<i>Coprinus cinereus</i>	Laccase (58)
Ganodermataceae	<i>Ganoderma lucidum</i>	Laccase (40,66)
Lentinaceae	<i>Lentinus polychrous</i>	LiP (ND), MnP (ND), Laccase (ND)
	<i>Panus tigrinus</i>	MnP (43), Laccase (64)
Marasmiaceae	<i>Marasmius quercophilus</i>	Laccase (63)
Meripilaceae	<i>Rigidoporus lignosus</i>	MnP (42), Laccase (53)
Meruliaceae	<i>Abortiporus biennis</i>	MnP (38-45)
	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	MnP (ND), Laccase (68,71)
	<i>Phlebia radiata</i>	LiP (39-44), MnP (44-48), Laccase (64)
	<i>Phlebia tremellosa</i>	LiP (35-40), MnP (ND), Laccase (64)
Nidulariaceae	<i>Cyathus stercoreus</i>	MnP (ND), Laccase (70)
Omphalotaceae	<i>Lentinula edodes</i>	MnP (ND), Laccase (66)
Phanerochaetaceae	<i>Bjerkandera</i> sp.	LiP (40-42), MnP (44-45)
	<i>Bjerkandera adusta</i>	LiP (48), MnP (44-45)
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	LiP (38-43), MnP (46), Laccase (100)
Phanerochaetaceae	<i>Phanerochaete flavido-alba</i>	LiP (38-46), MnP (45), Laccase (94)
Physalacriaceae	<i>Armillaria mellea</i>	Laccase (60-62)

ตาราง 1 (ต่อ)

วงศ์ของรา	ชนิดของราไวท์รอต	เอนไซม์กลุ่มลิกนินในไลติก (มวลโมเลกุล; kDa)
Pleurotaceae	<i>Pleurotus eryngii</i>	MnP (43), Laccase (61,65)
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	MnP (42-45)
Polyporaceae	<i>Coriolopsis polyzona</i>	MnP (ND)
	<i>Dichomitus squalens</i>	MnP (48-48.9), Laccase (66)
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Laccase (81)
	<i>Pycnoporus coccineus</i>	LiP (ND), MnP (ND)
	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	LiP (ND), MnP (ND)
	<i>Trametes hirsuta</i>	Laccase (64-68)
	<i>Trametes trogii</i>	LiP (41-42)
	<i>Trametes versicolor</i>	LiP (43-45), MnP (49), Laccase (64)
Incertaesedis	<i>Junghuhnia separabilima</i>	LiP (43-47), Laccase (58-62)
	<i>Schizophyllum</i> sp.	MnP (ND)
Schizophyllaceae	<i>Schizophyllum</i> sp.	MnP (ND)
Strophariaceae	<i>Nematoloma frowardii</i>	MnP (42-44)

หมายเหตุ: ND = ไม่ได้ระบุหรือไม่มีรายงาน, LiP = เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส, MnP = เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส, Laccase = เอนไซม์แลคเคส

ที่ ม ๑ : Hatakka A. Biodegradation of Lignin. In: Hofrichter M SA, editor. Biopolymer, biology, chemistry, biotechnology, applications. New Jersey: Wiley-WCH; 2001., Tuor U, Winterhalter K, Fiechter A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. J Biotechnol. 1995; 41: 1-17., Vares T, Hatakka A. Lignin-degrading activity and ligninolytic enzymes of different white-rot fungi: effects of manganese and malonate. Can J Bot. 1997; 75: 61-71.^(11, 25, 26)

2. บทบาทและความสำคัญของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลิติก

มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาและนำเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลิติกที่ผลิตโดยราไวท์รอตไปประยุกต์ใช้ในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพและพบว่ามีประสิทธิภาพดี เช่น การผลิตเยื่อกระดาษ การบำบัดมลพิษทางชีวภาพ การกำจัดสารพิษในน้ำเสีย การปรับสภาพ (pretreatment) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อนำมาผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ รวมถึงการนำไปใช้ด้านอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง เป็นต้น⁽⁶⁾

2.1 การผลิตเยื่อกระดาษด้วยวิธีการทางชีวภาพ

เยื่อกระดาษเป็นผลผลิตที่ได้จากไม้ที่ผ่านกระบวนการกำจัดลิกนินออก ด้วยวิธีเชิงกล (mechanical pulping) และวิธีทางเคมี (chemical pulping) เพื่อให้เยื่อกระดาษมีสีขาว ซึ่งกระบวนการดังกล่าวมีราคาสูงและทำให้เกิดของเสียตกค้าง ดังนั้นเพื่อลดการใช้สารเคมี ค่าใช้จ่ายและอันตรายที่เกิดกับคนและสิ่งแวดล้อมจึงมีการนำวิธีทางชีวภาพเข้ามาใช้ในการปรับสภาพไม้โดยใช้ราไวท์รอตที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลิติกได้ดี มาย่อยลิกนินในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ ซึ่งพบว่านอกจากจะทำให้ความเหนียวของกระดาษดีขึ้นแล้วยังสามารถลดการใช้พลังงานในกระบวนการผลิตอีกด้วย ตัวอย่างราไวท์รอตที่มีการนำมาใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษ เช่น *P. chrysosporium*, *Trametes sanguinea*, *Trametes coccinea* และ *Coriolus hirsutus* เป็นต้น^(7, 27) นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างงานวิจัยของ Husaini และคนอื่น ๆ (2011) ที่นำราไวท์รอต *Coriolus versicolor* และ *Pycnoporus coccineus* มาใช้ในการฟอกสีเยื่อกระดาษจากไม้กระถินเทพา (*Acacia mangium*) ซึ่งพบกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในปริมาณที่สูงและเมื่อเสร็จสิ้นการปัมเป็นเวลา 60 วันพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 270.51 ญูนิตต่อมิลลิลิตร (*C. versicolor*) และ 274.36 ญูนิตต่อมิลลิลิตร (*P. coccineus*) ซึ่งสามารถลดปริมาณลิกนินได้ร้อยละ 9.42 และ 8.10 ตามลำดับ⁽²⁸⁾

2.2 การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ

สารมลพิษที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม นอกจากจะมีเป็นจำนวนมากแล้วยังมีหลากหลายชนิด เช่น โพลีคลอริเนต ไบฟีนิล (polychlorinated biphenyl; PCBs), สารประกอบไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon), สีย้อมสังเคราะห์, ยาฆ่าแมลง, เอสเทอร์, โลหะหนักและผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม เป็นต้น สารมลพิษเหล่านี้มีความเป็นพิษสูงและก่อให้เกิดโรคมะเร็ง แม้ว่าปัจจุบันได้มีการกำจัดสารพิษดังกล่าวโดยการขุดหลุมฝัง และการเผาด้วยความร้อนสูง แต่วิธีการเหล่านี้มีประสิทธิภาพต่ำและมีค่าใช้จ่ายสูง ทำให้วิธีการบำบัดทางชีวภาพโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยและ/หรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง

สารมลพิษให้อยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษต่ำหรือไม่มีพิษเลย จึงเป็นวิธีที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพสูง⁽²⁹⁾ ทั้งนี้เนื่องจากสารมลพิษส่วนใหญ่มีโครงสร้างของวงอะโรมาติกเป็นองค์ประกอบซึ่งสามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลติก ทำให้ราไวท์รอตเป็นที่สนใจและถูกนำมาใช้ในการบำบัดสารพิษดังกล่าวอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างราไวท์รอตที่มีรายงานการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ เช่น *P. chrysosporium* สามารถใช้กำจัดสารมลพิษ anthracene (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) และ Victoria blue ที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากโรงงานย้อมผ้าได้ ในขณะที่ *T. versicolor* สามารถย่อยสาร trichloroethylene, pentachlorophenol และ amaranth ซึ่งเป็นสีสังเคราะห์ได้ ส่วน *IrpeX lacteus* พบว่าสามารถใช้ลดปริมาณ PAHs ได้หลายชนิด ได้แก่ phenanthrene, anthracene, fluoranthene และ pyrene⁽³⁰⁾ เช่นเดียวกับ *Trametes polyzona* RYNF13 ซึ่งเป็นราไวท์รอตพันธุ์อื่นสามารถย่อย PAHs ชนิด phenanthrene, fluorene และ pyrene ได้⁽³¹⁾

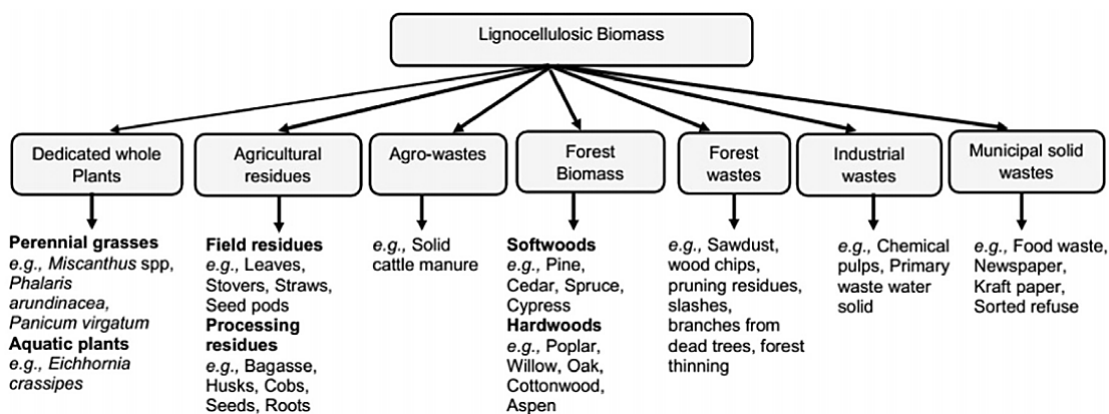
2.3 การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อการผลิตพลังงานชีวภาพ

การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประเภทลิกนินเซลลูโลส เพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตพลังงานชีวภาพ เช่น เอทานอล และก๊าซชีวภาพ ได้รับความสนใจอย่างสูงและมีการศึกษาวิจัยอย่างแพร่หลาย เนื่องจากองค์ประกอบของลิกนินเซลลูโลสมีส่วนของคาร์โบไฮเดรตเป็นจำนวนมาก (55-75% ในส่วนของแข็งทั้งหมด) ซึ่งเหมาะที่จะนำมาใช้ผลิตพลังงาน แต่ปัญหาหนึ่งในการนำคาร์โบไฮเดรตดังกล่าวมาใช้นั้นต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนคือการสลายองค์ประกอบทางพอลิเมอร์ของลิกนินเซลลูโลสให้อยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยการกำจัดลิกนิน ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสและเพิ่มความพรุนของวัสดุ⁽³²⁾ ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้กระบวนการทางเคมีและทางกายภาพมาช่วยในการทำลายองค์ประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพสูงแต่การนำสารเคมีมาใช้มักทำให้เกิดการปนเปื้อนและเกิดผลพลอยได้ที่อาจไปขัดขวางในกระบวนการอื่น⁽³³⁾ จึงได้หันมาใช้ในการปรับสภาพด้วยวิธีการทางชีวภาพ (biological pretreatment) ที่มีความปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าโดยการใส่เชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะราไวท์รอตที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ประกอบด้วย เอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร้ออกซิเดส ในการทำลายพันธะของเซลลูโลสและลิกนิน⁽³²⁾ ตัวอย่างราไวท์รอตที่นำมาศึกษา เช่น *P. chrysosporium*, *I. lacteus*, *T. hirsuta*, *Pycnoporus* sp. และ *C. subvermispora* เป็นต้น⁽³³⁾ ตัวอย่างงานวิจัยของ Nazarpour และคนอื่น ๆ (2013) ได้นำไม้ยางพารามาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลโดยการปรับสภาพด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้ราไวท์รอต

C. subvermispora นาน 90 วัน พบว่าได้ผลผลิตน้ำตาลที่สูงขึ้นเท่ากับ 27.67% เมื่อเทียบกับ ยางพาราที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพมีค่าเท่ากับ 2.88% ส่วนความเข้มข้นเอทานอลที่ได้สูงสุดมีค่า เท่ากับ 17.9 กรัมต่อลิตร และเมื่อครบระยะเวลาการหมักนาน 120 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 53%⁽³⁴⁾ นอกจากนี้ Rouches และคนอื่น ๆ (2016) นำฟางข้าวสาลีมาผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยรา ไวท์รอกหลายสายพันธุ์ และพบว่าสายพันธุ์ *Polyporus brumalis* BRFM 985 สามารถเพิ่ม ผลผลิตของก๊าซมีเทนได้สูงที่สุดถึง 43% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม⁽³⁵⁾

3. การผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดลิกโน เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้น

เนื่องจากลิกโนเซลลูโลสจัดเป็นชีวมวลที่มีเป็นจำนวนมากที่สุดชนิดหนึ่งในโลกและมี ราคาถูกประกอบกับประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมและมีอุตสาหกรรมแปรรูปผลผลิตทาง การเกษตรหลากหลายรูปแบบ เช่น อุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล อุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์มดิบ จึงทำให้เกิดของเสียเหลือทิ้งที่ไม่มีมูลค่าเป็นจำนวนมาก เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย กากมันสำปะหลัง ทะลายปาล์มเปล่า และกากตะกอนดีแคเนเตอร์ เป็นต้น (ภาพประกอบ 9) ซึ่งวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ นอกจากจะนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตพลังงานทดแทนทางชีวภาพแล้ว ยังสามารถนำมาใช้เป็น สารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่มีมูลค่าและมีประโยชน์ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ ออกซิเดส โดยใช้ราไวท์รอก ซึ่งกระบวนการผลิตนั้นนิยมผลิตโดยการหมักแบบแห้งหรือ solid-state fermentation (SSF) มากกว่า submerged fermentation (SmF)⁽³⁶⁾ เนื่องจากมีรายงานว่า ให้ผลผลิตที่สูงกว่า เกิดของเสียที่เป็นของเหลวน้อยกว่า ใช้พลังงานต่ำกว่า และที่สำคัญสามารถ นำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรม มาใช้ในการหมักได้โดยตรง เพื่อเป็นแหล่ง คาร์บอนและสารอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ตัวอย่างราไวท์รอกที่นำมาใช้ผลิต เอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรม แสดงในตาราง 2



ภาพประกอบ 9 ตัวอย่างของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

ที่มา : Zabed H, Sahu JN, Boyce AN, Faruq G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. Renew Sust Energy Rev. 2016; 66: 751-74.⁽³⁷⁾

ตาราง 2 ตัวอย่างราไวท์รอกที่ผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกโนไลติกโดยใช้วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง

ชนิดของลิกโนเซลลูโลส	ชนิดของราไวท์รอก	เอนไซม์
ชานอ้อย (bagasse)	<i>Trametes versicolor</i>	MnP, Laccase
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP, LiP, Laccase
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	
ฟางข้าวสาลี (wheat straw)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP, LiP
	<i>Phlebia radiata</i>	MnP, LiP, Laccase
	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Laccase
ขี้เลื่อย (sawdust)	<i>Coriolus hirsutus</i>	MnP, Laccase
	<i>Rigidoporus lignosus</i>	MnP
กาบมะพร้าว (coconut coir)	<i>Pleurotus sp.</i>	Laccase
กากธัญพืช (brewer's spent grain)	<i>Trametes versicolor</i> ATCC 20869	Laccase

ที่มา: Rodríguez Couto S, Sanromán MA. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem Eng J.* 2005; 22: 211-9., Soccol CR, Da Costa ESF, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, De Vandenberghe LPS. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol Res Innov.* 2017; 1: 52-71.^(36, 38)

กากตะกอนดีแคนเตอร์จากอุตสาหกรรมผลิตปาล์มน้ำมันดิบ

ปัจจุบันประเทศไทยมีการผลิตน้ำมันปาล์มดิบสูงถึง 9.99 แสนตันต่อปี (ข้อมูลปี 2561) และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ทั้งนี้ในกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มเมื่อนำทะเลลายปาล์มดิบหนัก 1 ตัน มาเข้าสู่กระบวนการต่าง ๆ จะเกิดของเสียที่เป็นผลพลอยได้ ดังนี้ น้ำทิ้ง 0.6-0.8 ลูกบาศก์เมตร, ทะลายปาล์มเปล่า 23%, เส้นใยปาล์ม 13.5% และกากตะกอนดีแคนเตอร์ 3.5% ดังภาพประกอบ 10 ซึ่งกากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นส่วนหนึ่งของเสียที่ได้จากกระบวนการทำบริสุทธิ์น้ำมันปาล์มดิบ โดยส่วนที่อยู่เหนือตะกอนจะถูกนำไปกรองจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์⁽¹⁾



ภาพประกอบ 10 กากตะกอนดีแคนเตอร์

ที่มา: Sunzen group. Retrieved May 17, 2018 from <http://www.sunzen.com.my/portfolio/dry-decanter-cake/>. (online).⁽³⁹⁾

กากตะกอนดีแคนเตอร์ ประกอบไปด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในปริมาณสูง ดังแสดงในตาราง 3 นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบของธาตุอาหารสูง นิยมนำมาใช้เป็นปุ๋ยหมัก (fertilizer) และอาหารสัตว์ (animal feed) เป็นหลัก ทั้งนี้มีรายงานว่าสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลสและโพลีโอส (cellulose and polyose) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) และไบโอบอยล์ (bio-oil) ได้ แต่ต้องผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์หลายขั้นตอนซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานการนำกากตะกอนดีแคนเตอร์มาใช้เป็นแหล่งผลิตเอทานอลใน กลุ่มลิกนินไนด์ติกโดยใช้ราไวหรือหมาก่อน

ตาราง 3 คุณลักษณะของกากตะกอนดีแคนเตอร์

พารามิเตอร์	กากตะกอนดีแคนเตอร์
เซลลูโลส (%)	50.06
เฮมิเซลลูโลส (%)	30.74
ลิกนิน (%)	10.40
ไนโตรเจน (%)	1.70
คาร์บอน (%)	44.77
ไฮโดรเจน (%)	6.46
น้ำมันและไขมัน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	43,000
ของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	216,081

ที่มา : Rongwang C, Polprasert S, Kanchanasuta S. Effect of partial ozonation and thermal pretreatment on biogas production from palm oil decanter cake. Chem Eng Trans. 2017; 57: 1987-92.⁽¹⁾

ทั้งนี้อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันมีศักยภาพสูงในการนำของเสียต่าง ๆ ที่ได้จากการผลิตน้ำมันปาล์มดิบไปผลิตพลังงานชีวภาพและเป็นหนึ่งในภาคอุตสาหกรรมที่มีส่วนร่วมอย่างมากในการจัดหาแหล่งพลังงานทดแทน⁽¹⁾ ซึ่งกากตะกอนดีแคนเตอร์สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) เช่น ก๊าซชีวภาพ (biogas) ไบโอบิวทานอล (biobutanol) และไบโอดีเซล (biodiesel) ได้ เช่นเดียวกับส่วนอื่น ๆ ของปาล์มน้ำมัน^(40, 41) ดังนั้นเมื่อนำไปผลิต

เชื้อเพลิงชีวภาพจึงต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพก่อนโดยการกำจัดลิกนิน ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มจำนวนช่องว่างในตัววัสดุก่อนที่จะไปสู่ขั้นตอนต่อไป⁽⁷⁾ ทั้งนี้เนื่องจากกากตะกอนดีแคนเตอร์มีขนาดเล็ก ดังนั้นจึงน่าจะง่ายต่อการปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์จากราไรหรือทที่มีโอกาสเพิ่มผลผลิตในการผลิตก๊าซชีวภาพต่อไปได้ในอนาคต

ที่ผ่านมาทีมงานวิจัยที่นำราไรหรือทมาใช้ในการย่อยส่วนอื่น ๆ ของปาล์มน้ำมัน เช่น ทางปาล์มน้ำมัน (oil palm frond) ซึ่งพบว่ามีราไรหรือทจำนวน 7 ไอโซเลท (จากการคัดเลือก 63 ไอโซเลท) ที่สามารถลดปริมาณลิกนินจาก 30% เหลือเท่ากับ 15-18% ภายในเวลา 30 วัน เมื่อหมักแบบแห้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และให้ค่าการผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส สูงที่สุดเท่ากับ 0.896 ± 0.02 และ 0.799 ± 0.07 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ⁽⁴²⁾

4. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกโดยการหมักแบบแห้ง และการออกแบบการทดลอง

การหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation; SSF) คือกระบวนการที่เชื้อจุลินทรีย์เจริญบนวัสดุของแข็งที่ไม่มีหรือแทบจะไม่มีน้ำอิสระหลงเหลืออยู่⁽⁴³⁾ วิธีนี้ถูกนำไปใช้ในการผลิตสารเมแทบอไลต์ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ กรดอินทรีย์ และสารประกอบอะโรมาติก เป็นต้น รวมถึงนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ และการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นต้น⁽⁴⁴⁾ ข้อดีของการหมักแบบแห้ง คือลดต้นทุนที่ใช้ในการผลิต ผลผลิตที่ได้มีปริมาณและความเข้มข้นสูงขึ้น นอกจากนี้ใช้อุปกรณ์พื้นฐานอย่างง่ายในการหมัก⁽⁴⁵⁾

4.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก

การหมักแบบแห้งเพื่อการผลิตเอนไซม์ให้ได้ในปริมาณสูงนั้นมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสารตั้งต้นแล้ว ยังขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และค่า pH เป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสารตั้งต้นนั้น ๆ เพื่อผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณสูงที่สุด⁽⁴⁵⁾

4.1.1 ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของราไรหรือทที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์โดยการหมักแบบแห้งนั้น มีรายงานว่าปริมาณที่ใช้มากเกินไปไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ให้สูงขึ้น⁽⁴⁵⁾ ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Akhtar และคนอื่น ๆ (1998) ผลิตเอนไซม์ลิกนินโอไลติกโดยใช้ *P. chrysosporium*

ปริมาณต่าง ๆ บนชิ้นไม้ พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 2-5% จะให้ปริมาณเอนไซม์ที่สูงที่สุด แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 20% พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้สูงขึ้นได้⁽⁴⁶⁾

4.1.2 แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

เป็นปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการหมักโดยแหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งกรณีนี้คือสารลิกโนเซลลูโลส ดังนั้นราไวท์รอกที่คัดเลือกมาจะต้องมีความเหมาะสม สามารถเจริญและใช้สารตั้งต้นดังกล่าวได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นและชนิดของไนโตรเจนในการหมักนั้นมีผลต่อการผลิตและกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ของราไวท์รอก⁽⁴⁵⁾ ตัวอย่างงานวิจัยของ Mikiashvili และคนอื่น ๆ (2006) ที่ศึกษาราไวท์รอก *Pleurotus ostreatus* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำพบว่าราผลิตเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้น้อย ทั้งนี้เนื่องจากอัตราส่วนระหว่างปริมาณของคาร์บอนและไนโตรเจน มีความสำคัญต่อกระบวนการหมักสามารถนำมาซึ่งผลิตภัณฑ์ที่สูงขึ้นได้⁽⁴⁷⁾ นอกจากนี้ชนิดของไนโตรเจนยังมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ เช่น *P. eryngii* และ *P. ostreatus* สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส ได้สูงที่สุดเมื่อใช้ในโตรเจนชนิด $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในขณะที่การผลิตเอนไซม์กลุ่มเปอร์ออกซิเดสของรา *P. ostreatus* สามารถผลิตได้สูงเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิด peptone เป็นต้น⁽⁴⁸⁾

4.1.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการพัฒนากระบวนการทางชีวภาพพบว่ามีผลกระทบในหลายด้าน ตัวอย่างเช่น การเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (protein denaturation) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzymatic inhibition) และการส่งเสริมหรือยับยั้งในการผลิตสารเมแทบอไลต์ นอกจากนี้อุณหภูมียังมีผลต่อการจัดกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ตามช่วงของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญ⁽⁴⁵⁾ ราไวท์รอกส่วนใหญ่ในฟิล์มเบสิดิโอไมโคตาเป็นชนิด mesophile ซึ่งสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-35 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่มีรายงานว่าสามารถย่อยลิกนินได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ตัวอย่างงานวิจัยของ Patel และคนอื่น ๆ (2009) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์แลคเคสของรา *P. ostreatus* คือ 28 องศาเซลเซียส⁽⁴⁹⁾ ส่วนงานวิจัยของ Wan และ Li (2010) ซึ่งศึกษาผลของอุณหภูมิในช่วง 4-37 องศาเซลเซียส ต่อการย่อยลิกนินของใบและซังข้าวโพดพบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ราไวท์รอกสามารถย่อยลิกนินได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามราไวท์รอกบางชนิด เช่น *P. chrysosporium* สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิสูงเท่ากับ 39 องศาเซลเซียส เป็นต้น⁽⁵⁰⁾

4.1.4 ความชื้น

ความชื้นของสารตั้งต้นในกระบวนการหมักแบบแห้งมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเจริญและการผลิตสารทุติยภูมิของรา โดยมีรายงานก่อนหน้านี้นี้กล่าวว่าความชื้นเริ่มต้นในช่วง 70-80% เป็นความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการย่อยลิกนินและการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกของราไวท์รอตส่วนใหญ่ Asgher และคนอื่น ๆ (2006) ศึกษาการหมักแบบแห้งของ *P. chrysosporium* โดยใช้ขี้ข้าวโพด ที่ความชื้นต่าง ๆ ในช่วง 40-90% พบว่าที่ความชื้น 70% ให้ปริมาณเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุด⁽⁵¹⁾ ต่อมา Shi และคนอื่น ๆ (2008) ศึกษา *P. chrysosporium* ในการย่อยต้นฝ้าย พบว่าที่ความชื้นของสารตั้งต้นเท่ากับ 75% สามารถย่อยลิกนินได้ถึง 27.6% ซึ่งสูงกว่าที่ความชื้น 65% ถึง 7%⁽⁵²⁾ นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ศึกษา *C. subvermispora* ในการหมักใบและขี้ข้าวโพด ที่ความชื้น 60, 75 และ 85% พบว่าที่ความชื้นสูงจะสามารย่อยลิกนินได้มากขึ้น โดยสามารถย่อยได้เท่ากับ 19.48, 29.54 และ 31.33% ตามลำดับ⁽⁵⁰⁾

4.1.5 ค่าพีเอช (pH)

ค่า pH เป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการหมัก เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเจริญและแสดงกิจกรรมในช่วง pH ที่ต่างกัน การควบคุมค่า pH เป็นปัญหาที่ยังส่งผลต่อกระบวนการหมักแบบแห้ง⁽⁵³⁾ เนื่องจากปรับค่า pH ได้ยาก ราไวท์รอตส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่สภาวะเป็นกรดมีค่า pH ประมาณ 4.0-5.0 ซึ่งราหลายชนิดจะลดค่า pH ของสารตั้งต้นในระหว่างการเจริญ ทั้งนี้ค่า pH เริ่มต้นของการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสโดยรา *P. chrysosporium* ที่ pH เท่ากับ 4.0 และ 5.5 ให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 2,600 ยูนิตต่อลิตร และ 1,375 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ⁽⁵⁴⁾ ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมที่รา *P. ostreatus* สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 5.0⁽⁴⁹⁾

4.1.6 ปัจจัยอื่น ๆ

การให้อากาศเป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญในการหมักแบบแห้ง เนื่องจากการผลิตเอนไซม์จากการย่อยลิกนินนั้นต้องอาศัยออกซิเจน โดยการเลี้ยงราไวท์รอตในฟลาสก์ที่มีขนาดน้อยกว่า 500 มิลลิลิตร โดยการใช้จุกสำลีถือว่าเพียงพอกับอากาศที่หมุนเวียนในระบบ⁽⁵⁵⁾ ส่วนการหมักในถังที่มีขนาดใหญ่จำเป็นต้องมีการให้อากาศที่เพิ่มขึ้น

ขนาดของสารตั้งต้นที่มีอนุภาคใหญ่เกินไปพบว่าอาจส่งผลให้การเจริญของเส้นใยราสะดุด เนื่องจากเข้าถึงชีวมวลนั้น ๆ ได้ยาก และยังป้องกันการเข้าถึงของอากาศ น้ำ และสารเมแทบอลิต์อีกด้วย ทั้งนี้การลดขนาดของสารตั้งต้นให้พอเหมาะอาจช่วยให้การหมุนเวียนอากาศ

ดีขึ้น ทำให้เส้นใยราเจริญได้ดี แต่อาจจะไม่ส่งผลกับการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้สูงขึ้น ตัวอย่างงานวิจัยของ Reid (1989) ได้เลี้ยงรา *Phlebia tremellosa* บนชิ้นไม้ที่มีขนาด 10 มิลลิเมตร พบว่าราสามารถย่อยลิกนินได้ไม่ต่างจากการใช้ชิ้นไม้ขนาด 40 มิลลิเมตร⁽⁵⁶⁾ นอกจากนี้มีรายงานว่าการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนไลติกจากราไทรอธ โดยใช้ชานอ้อยขนาดต่างๆ เป็นสารตั้งต้น ได้แก่ 0.92, 1.68 และ 2.9 มิลลิเมตร พบว่าได้ปริมาณของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน⁽⁵⁷⁾

4.2 การออกแบบการทดลองทางสถิติที่ใช้ในงานวิจัย

วิธีการทางสถิติได้นำมาประยุกต์ใช้ในการช่วยกำหนดผลกระทบและปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยด้านกายภาพ (physiological factors) ที่มีบทบาทในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน⁽⁴⁵⁾ ตัวอย่างเช่น

4.2.1 การออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design (PBD)

เป็นแผนการทดลองที่ใช้ในการคัดเลือกปัจจัยออกบางส่วน เพื่อลดปัจจัยลงให้เหลือเฉพาะปัจจัยที่สำคัญและมีอิทธิพลต่อตัวแปรตอบสนอง โดยอาศัยหลักการของเมตริกซ์ Hadamard ซึ่งจำนวนการทดลองจะเปลี่ยนไปในเทอมของ 4 คือ 4, 8, 12, 16, 20... โดยแต่ละปัจจัยประกอบด้วยค่าต่ำสุด (-1) หรือ สูงสุด (+1) จากจำนวนปัจจัยทั้งหมด (n-1) โดยที่ n คือจำนวนการทดลองทั้งหมด ซึ่งการสร้างแผนการทดลองแบบ PBD มีข้อดีคือสามารถกำหนดจำนวนการทดลองที่จำกัดในการศึกษาปัจจัยได้เป็นจำนวนมากพร้อมๆ กัน⁽⁵⁸⁾ ดังภาพประกอบ 11

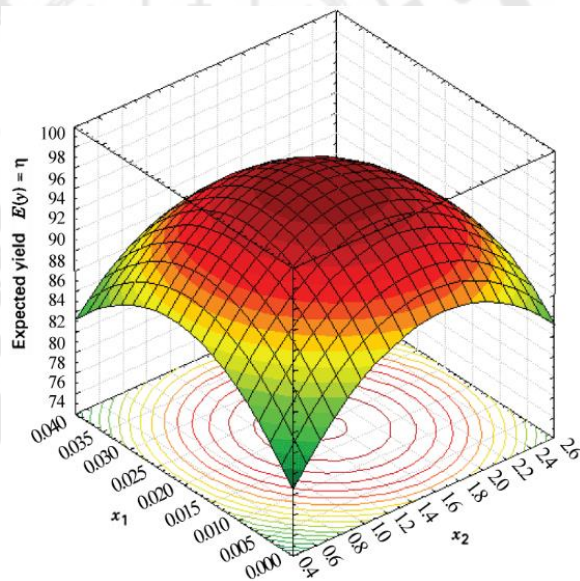
<i>k</i>	<i>N</i>	Plackett-Burman pattern
11	12	++-+++--+-
19	20	++--++++-+-+-----++-
23	24	+++++--+-+--++--+-+-----
35	36	-+-++++-++-++++-++++-+-+-----+-+--+

ภาพประกอบ 11 แผนการทดลองแบบ PBD ที่มีจำนวนการทดลองทั้งหมด (N) เท่ากับ 12, 20, 24 และ 36 ชุดการทดลอง *k* คือจำนวนปัจจัยที่ต้องทำการกลั่นกรอง

ที่มา: Cavazzuti M. Design of Experiments. Optimization methods: From theory to design scientific and technological aspects in mechanics. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013.⁽⁵⁹⁾

4.2.2 วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology; RSM)

เป็นการรวบรวมเทคนิคทางสถิติและคณิตศาสตร์เพื่อนำมาใช้ในการสร้างแบบจำลองและวิเคราะห์ปัญหา โดยผลตอบสนองที่เราสนใจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายตัวเพื่อที่จะได้ค่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ตัวอย่างเช่น ถ้าต้องการหาระดับปัจจัยที่ 1 (x_1) และปัจจัยที่ 2 (x_2) ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลผลิต (y) มากที่สุด จะหาได้จากสมการถดถอยคือ $y = f(x_1, x_2) + \varepsilon$ โดยที่ ε คือความคลาดเคลื่อนที่แสดงในผลตอบสนอง ซึ่งผลตอบสนองที่คาดการณ์ (expected value) คือ $E(y) = f(x_1, x_2) = \eta$ โดยที่ η คือพื้นผิวตอบสนอง (response surface) ที่จะพล็อตเทียบกับระดับของ x_1 และ x_2 และเพื่อให้เห็นรูปร่างและตำแหน่งของจุดที่เหมาะสมของพื้นผิวตอบสนองชัดเจน มักจะใช้การพล็อตโครงร่าง (contour plot) ของพื้นผิวตอบสนอง โดยในการพล็อตโครงร่างเส้นผลตอบสนองคงที่จะลากไปตามแกน x_1 และ x_2 ในแต่ละโครงร่างจะสอดคล้องกับความสูงของพื้นผิวตอบสนอง (ภาพประกอบ 12)^(60, 61)



ภาพประกอบ 12 พื้นผิวตอบสนอง 3 มิติแสดงผลผลิตที่คาดการณ์ไว้ (η) เป็นฟังก์ชันของปัจจัยที่ 1 (x_1) และปัจจัยที่ 2 (x_2) และพล็อตโครงร่างของพื้นผิวตอบสนอง

ที่ ม า : Sridevi V, Lakshmi M, Swamy A, Rao M. Implementation of response surface methodology for phenol degradation using *Pseudomonas putida* (NCIM 2102). Bioremed Biodegrad. 2011; 2: 1-7.⁽⁶²⁾

ปัญหาที่พบของพื้นผิวตอบสนองคือ ถ้าพื้นผิวที่เราสนใจศึกษามีขนาดใหญ่ จะไม่สามารถใช้แบบจำลองพหุนามกำลังหนึ่งหรือกำลังสองในการหาผลตอบสนองได้ จึงมีวิธีการออกแบบพื้นผิวตอบสนองอื่นๆ มาใช้ในการหาค่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ วิธีการกำลังสองน้อยสุด (Ordinary least squares method; OLS) การออกแบบสำหรับฟิตแบบจำลองอันดับที่หนึ่งและอันดับที่สอง (first and second-order model) โดยการออกแบบสำหรับฟิตแบบจำลองอันดับที่สองจะเน้นการสร้างแบบจำลองควอดราติก (quadratic model) ของผลตอบสนอง ได้แก่ วิธีการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design; CCD) และวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken (Box-Behnken design; BBD)

วิธีการพื้นผิวตอบสนองจึงเป็นกระบวนการเพื่อปรับปรุงและหาจุดที่เหมาะสม โดยเริ่มจากการวางแผนการทดลอง ตัวอย่างเช่น การทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 3 ปัจจัย (3-level factorial design) การออกแบบด้วยวิธี CCD หรือการออกแบบด้วยวิธี BBD แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเพื่อสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนอง เพื่อสร้างโมเดลในการหาจุดที่เหมาะสมที่ต้องการ ซึ่งวิธีการพื้นผิวตอบสนองนั้นประสบความสำเร็จอย่างมากในการนำมาใช้หาจุดที่เหมาะสมขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และปรับปรุงกระบวนการหมักแบบแห้งให้ดีขึ้น⁽⁴⁵⁾

ตัวอย่างงานวิจัยของ Hariharan และ Nambisan (2013) ได้ทำการคัดแยกจากต้นไม้ที่ตายแล้วและซากใบไม้ จากนั้นนำมาทำการหมักแบบแห้งโดยใช้ใบสับปะรดเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก พบว่าเชื้อ *Ganoderma lucidum* ผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด ต่อมาหาสภาวะที่เหมาะสมแบบที่ละปัจจัยและออกแบบแผนการทดลองแบบ PBD พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ได้แก่ ระยะเวลาในการบ่ม การกวน และ Tween-80 จากนั้นนำปัจจัยมาวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองด้วยการออกแบบแผนการทดลองแบบ BBD พบว่าได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุด⁽⁶³⁾ ส่วนงานวิจัยของ Karp และคนอื่น ๆ (2015) ได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสและการกำจัดลิกนินของชานอ้อยโดยเชื้อ *P. ostreatus* ในการหมักแบบแห้ง ซึ่งมีปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ค่า pH, ปริมาณน้ำอิสระ (a_w), อุณหภูมิ, CuSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , asparagine และ yeast extract ทำการออกแบบการทดลองด้วยวิธี PBD และหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนองด้วยการออกแบบ CCD กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ yeast extract CuSO_4 และ ferulic acid ซึ่งเป็นตัวชักนำที่ ถูกเพิ่มเข้ามา ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 6.4 กรัมต่อลิตร 172.6 ไมโครโมลาร์ และ 1.86 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าในวันที่ 5 ของการหมักแบบแห้งสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสได้

สูงสุดเท่ากับ 151.6 ยูนิต์ต่อกรัม นอกจากนี้ปริมาณลิกนินของชานอ้อยยังลดลงจาก 31.89% เหลือ 26.36% ภายหลังการหมักแบบแห้งเป็นเวลา 5 วัน⁽⁶⁴⁾

5. คุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโไลติก

เอนไซม์แต่ละชนิดมีคุณลักษณะเฉพาะในการทำงานและความเสถียรแตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาและตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ ก่อนนำไปใช้ประโยชน์ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ เช่น ค่า pH อุณหภูมิ สารเคมี ตัวยับยั้ง และความจำเพาะกับสารตั้งต้น นอกจากนี้ยังรวมถึงความเสถียรของเอนไซม์ที่มีต่อค่า pH และอุณหภูมิต่าง ๆ อีกด้วย เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้⁽⁶⁵⁾

ตัวอย่างงานวิจัยของ Patel และคนอื่น ๆ (2014) ได้ศึกษาราวไรท์รอก *P. ostreatus* HP-1 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ดีจากกระบวนการหมักแบบแห้ง มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 68,420 Da และมีค่า pi เท่ากับ 3.5 เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส และรักษากิจกรรมของเอนไซม์ได้ 61% ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปฏิกริยาของเอนไซม์สามารถถูกยับยั้งโดยสารโซเดียมเอไซด์และ ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)⁽⁶⁶⁾ ในงานวิจัยของ Xiaobin และคนอื่น ๆ (2007) ได้ศึกษาเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตจากราวไรท์รอก *Schizophyllum* sp. F17 ในกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้ไม้ยางเป็นสารตั้งต้น หลังจากทำบริสุทธิ์เอนไซม์แล้วพบว่าได้ผลผลิตของกิจกรรมเอนไซม์ (% yield) เท่ากับ 3.8% และปัจจัยความบริสุทธิ์ (purification factor) เท่ากับ 9.2 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 48.7 kDa จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE เอนไซม์มีความเสถียรในสภาวะที่มีค่า pH ระหว่าง 4.0-7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง⁽⁶⁷⁾ ส่วนงานวิจัยของ Kong และคนอื่น ๆ (2016) ได้ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากราวไรท์รอก *Echinodontium taxodii* 2538 พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 53.4 kDa เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และมีลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N คือ GTTPSNGVVVP มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อปรับที่ pH เท่ากับ 3.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทั้งนี้พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรสูงภายหลังการบ่มนานถึง 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังทนต่อค่า pH ในช่วงกว้าง (2.0-6.0) และอุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียสได้⁽⁶⁸⁾

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

ตาราง 4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
กระดาษกรอง whatman No.1 (filter paper)	GE healthcare	UK
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)	Olympus	Japan
กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope)	Olympus	Japan
เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลอง (heating block)	Wisd	Korea
เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Denver instrument	USA
เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System)	Bio-Rad	USA
เครื่องบดตัวอย่างแบบหยาบ (cutting mills)	Retsch	Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (high speed refrigerated microcentrifuge)	Tomy	Japan
เครื่องวัด pH (pH meter)	Ohaus	USA
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)	Labomed	USA
เครื่องเขย่าสาร (vortex)	IKA Works	Malaysia
เครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)	Labwit	Australia
เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA thermocycler)	Bioer	China
ชุดเครื่องแก้วกรองสารละลาย (funnel)	Pyrex	USA
ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (-20 องศาเซลเซียส)	Sanyo	Japan
ตู้ป้อนเชื้อ (incubator)	Sheldon	USA

ตาราง 4 (ต่อ)

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	Shal-lab	Germany
ตู้อบลมร้อน (hot air oven)	Sheldon	USA
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)	Tomy	Japan

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ตาราง 5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Acetic acid (CH_3COOH)	Merck	Germany
Agar	Marine chemical	India
Ammonium persulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)	Himedia	India
Ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Merck	Germany
Citric acid anhydrous ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	Fluka	Switzerland
Copper (II) sulphate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem	Australia
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	Ajax Finechem	Australia
Di-sodium hydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4)	Ajax Finechem	Australia
DNA ladder (1,500 bp)	Thermo Scientific	Germany
DNA loading dye (6x)	RBC Bioscience	Taiwan
D-glucose	Ajax Finechem	Australia
Favorprep TM DNA extraction mini kit	Favorgen Biotech	Taiwan
Favorprep TM Gel/PCR purification mini kit	Favorgen Biotech	Taiwan
Ferrous sulphate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Carlo Erba Reagents	Italy
Guaiacol ($(\text{CH}_3\text{O})\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$)	Sigma	China

ตาราง 5 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Hydrogen peroxide 30% (H ₂ O ₂)	Merck	Germany
L-asparagine (C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ ·H ₂ O)	Merck	Germany
L-tartaric acid (C ₄ H ₆ O ₆)	Fluka	Switzerland
Magnesium sulfate monohydrate (MnSO ₄ ·H ₂ O)	Ajax Finechem	Australia
Magnesium sulphate heptahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Ajax Finechem	Australia
Mineral oil	Acros organics	Belgium
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH ₂ PO ₄)	Ajax Finechem	Australia
Potato dextrose agar (PDA)	Himedia	India
Remazol Brilliant Blue R	Sigma-aldrich	China
Sodium acetate (CH ₃ COONa·3H ₂ O)	Ajax Finechem	Australia
Sodium azide (NaN ₃)	APS	Australia
Sodium dihydrogen orthophosphate (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	Ajax Finechem	Australia
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck	Germany
Sodium L-tartrate dibasic dihydrate (C ₄ H ₄ Na ₂ O ₆ ·2H ₂ O)	Sigma-aldrich	USA
Sodium nitrate (NaNO ₃)	Ajax Finechem	Australia
Streptomycin	General drugs house	Thailand
Top Taq 2x master mix	Qiagen	Germany
Tri-sodium citrate (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)	Ajax Finechem	Australia
Tris hydrochloride	Himedia	India
Tween 80	Ajax Finechem	Australia
ViSafe green gel stain	Vivantis	Malaysia

ตาราง 5 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Water sterile DNase/RNase-free	Thermo Scientific	Germany
Yeast Extract Powder	Himedia	India
Zinc sulphate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Ajax Finechem	Australia
2-Mercaptoethanol (C_2H_6OS)	Himedia	India
2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)	Roche Diagnostics	Germany
2,6-Dimethoxyphenol ($C_8H_{10}O_3$)	Aldrich	India
3,4-Dimethoxybenzyl alcohol (veratryl alcohol)	Aldrich	Germany

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมและเพาะเลี้ยงราไวก์รอก

สำรวจและเก็บตัวอย่างส่วนฟรุติบอดี้ (fruiting body) ของเห็ดในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา (Basidiomycota) ในพื้นที่ป่าจังหวัดอุดรธานี, สกลนคร, นครพนม และชัยภูมิ ที่พบการเจริญบนไม้ จากนั้นนำมาฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) และใช้ใบมีดปราศจากเชื้อตัดส่วนเนื้อเยื่อชั้นใน (inner tissue) ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) ที่เติมยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเส้นใยราเจริญให้เพาะเลี้ยงซ้ำบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. การคัดเลือกสายพันธุ์ราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติกได้บนอาหารแข็ง

ทดสอบการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติกจากราบริสุทรีที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยวิธี agar plate screening บนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose asparagine agar (GAE) (ภาคผนวก ก) ที่มี pH เท่ากับ 5 โดยเติมอินดิเคเตอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของแต่ละการทดสอบทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ guaiacol 0.01%, ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Remazol brilliant blue R (RBBR) 0.01% จากนั้นทำการทดสอบโดยนำเชื้อราบริสุทรีอายุ 7 วันมาตัดเส้นใยด้วย cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.75 มิลลิเมตร แล้ววางบนกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมอินดิเคเตอร์แต่ละชนิด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยและโซนสีรอบเส้นใย ซึ่งผลบวกในการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม guaiacol และ ABTS จะเกิดโซนสีน้ำตาลและสีเขียวรอบเส้นใย ตามลำดับ ส่วนอาหารที่เติม RBBR ซึ่งมีสีน้ำเงินจะเกิดเป็นโซนสีรอบเส้นใย⁽⁶⁹⁾ ตัวอย่างราที่ให้ผลบวกในการทดสอบบนอาหารที่เติมอินดิเคเตอร์ ชนิดใดชนิดหนึ่งจะจัดอยู่ในกลุ่มราไวท์รอก

3. การจัดจำแนกชนิดของราไวท์รอก

3.1 การศึกษาราไวท์รอกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตัวอย่างราไวท์รอกที่ให้ผลบวกในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติกที่ดี นำมาศึกษาเพื่อการระบุชนิดโดยศึกษาลักษณะรูปร่าง ขนาด และสีของดอกเห็ด โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ส่วนของชั้นไฮมีเนียม (hymenium) ลักษณะของเบสิเดียม (basidium) รูปร่าง ขนาด และสีของเบสิดีโอสปอร์ (basidiospore) โดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดร่วมกับลักษณะของเส้นใยราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นศึกษาลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยเขียนใยรา มาวางบนแผ่นสไลด์ที่หยดด้วยสี lactophenol cotton blue แล้วตรวจดูลักษณะของเส้นใย (hyphae) ผนังกัน (septate) และแคลมป์คอนเนกชัน (clamp connection) เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิด⁽⁷⁰⁾

3.2 การศึกษาราวไรท์รหโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS)

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยราบริสุทธิรมาบดและทำการสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (Favorprep™ DNA extraction mini kit) ตามวิธีในคู่มือของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าความเข้มข้นที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง โดยที่ OD260 เท่ากับ 1 จะเทียบเท่ากับปริมาณดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอคำนวณได้จากอัตราส่วนของ OD260/OD280 ซึ่งควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.7-2.0 สารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส⁽⁷¹⁾

3.2.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)

ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจะเลือกใช้คู่ไพรเมอร์ของ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (forward) และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (reverse)⁽⁷²⁾ ซึ่งขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ควรมีขนาดอยู่ในช่วง 500-900 คู่เบส จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ Top Taq 2X master mix kit ดังตาราง 6 รวมถึงเวลาและอุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ดังตาราง 7

ตาราง 6 ส่วนผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของราไวท์รห

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Forward primer (10 µM)	1	0.4 ไมโครโมลาร์
Reverse primer (10 µM)	1	0.4 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
Top Taq 2x master mix	12.5	1 ยูนิต
Water sterile Dnase/RNase-free	5.5	-

หมายเหตุ: ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร

ตาราง 7 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณ ITS ของราไวท์รอก

ปฏิกิริยา PCR	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Initial denaturation	94	5
Denaturation	94	1
Annealing	50-56*	1
Extension	72	1
Final Extension	72	10

ขั้นตอน Denaturation ถึง Extension ทำซ้ำ 35 รอบ

หมายเหตุ: * หมายถึง ช่วงอุณหภูมิที่อาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของรา

การตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอใช้วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยนำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วมาตรวจสอบด้วยชุดเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ในสารละลาย 0.5X TBE buffer (ภาคผนวก ข) ผสมกับ ViSafe Green Gel Strain และหยอดดีเอ็นเอลงในช่องเจลโดยใช้แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (1,500 bp DNA ladder) ในการเปรียบเทียบขนาด จากนั้นตั้งค่ากระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำเจลไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลแล้วบันทึกภาพ

3.2.3 การทำซันดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย FavorPrep™ purification mini kit ตามวิธีในคู่มือของบริษัทผู้ผลิต แล้วจึงส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลที่ได้มาตรวจสอบด้วยโปรแกรม Chromas 2.6.5 (Technelysium Pty.Ltd)⁽⁷³⁾ จากนั้นนำไปเทียบเคียงค่าร้อยละความเหมือน (% similarity) กับฐานข้อมูล GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) ด้วยโปรแกรม BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อใช้เทียบเคียงในการจัดจำแนกชนิดทั้งในระดับสกุลและชนิด

3.2.4 การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของราไวท์รอก

ศึกษาความสัมพันธ์ของราไวท์รอกโดยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงจากฐานข้อมูล GenBank มาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ (alignment) ด้วยโปรแกรม MUSCLE⁽⁷⁴⁾ จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม MEGA 7⁽⁷⁵⁾ โดยใช้วิธี maximum likelihood วิเคราะห์ค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) ของแผนภูมิจำนวน 1,000 ซ้ำ

4. การหมักแบบแห้งโดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้น

ตัวอย่างราไวท์รอกที่ให้ผลบวกจากการทดสอบด้วยวิธี agar plate screening นำมาทดสอบการเจริญบนกากตะกอนดีแคนเตอร์โดยการหมักแบบแห้ง และการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก ได้แก่ แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส

4.1 การหมักแบบแห้ง

กากตะกอนดีแคนเตอร์ที่ได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มของบริษัทสุขสมบูรณ์ กรุ๊ป จำกัด จังหวัดชลบุรี เตรียมโดยนำกากตะกอนดีแคนเตอร์มาผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4-5 วัน หรือจนกว่ากากตะกอนดีแคนเตอร์มีน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำกากตะกอนดีแคนเตอร์ส่งตรวจวิเคราะห์ปริมาณลิกนิน และองค์ประกอบอื่น ๆ โดยสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กระบวนการหมักแบบแห้งเริ่มจากชั่งกากตะกอนดีแคนเตอร์ 10 กรัม ใส่ลงในหลอดเพาะเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับความชื้นด้วยอาหาร basal medium (ภาคผนวก ก) ให้มีค่าความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 65% และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.75 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยราบริสุทธิอายุ 7 วันที่เจริญบนอาหาร basal medium agar จำนวน 1 plug เชี่ยลงในหลอดเพาะเชื้อ และปมไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตและบันทึกการเจริญของเส้นใยในแต่ละวัน

4.2 การสกัดและการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

นำหลอดเพาะเชื้อที่ผ่านกระบวนการหมักไปสกัดเอนไซม์ โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 100 mM (pH 5.0) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นแยกส่วนน้ำโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง whatman No.1 และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (centrifuge) โดยใช้ค่าแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Relative centrifugal force; RCF) 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำเอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) ที่ได้ไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์

4.2.1 กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส

ผสม 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) ความเข้มข้น 0.5 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 100 mM (pH 4.5) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กับเอนไซม์สกัดหยาบปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ 0 และ 60 วินาที นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของแลคเคส คือปริมาณเอนไซม์แลคเคสที่ใช้ในการเปลี่ยนสาร ABTS 1 μmol ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง (Extinction coefficient; ϵ) เท่ากับ $36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽⁷⁶⁾

4.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

ผสม 2,6-dimethoxyphenol ความเข้มข้น 10 mM (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 120 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมทาร์เทรต ความเข้มข้น 250 mM (pH 4.5) ปริมาตร 240 ไมโครลิตร แมงกานีสซัลเฟต ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 4 mM ปริมาตร 120 ไมโครลิตร เพื่อให้สารมีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 2,6-dimethoxyphenol ความเข้มข้น 1 mM สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมทาร์เทรต ความเข้มข้น 50 mM แมงกานีสซัลเฟต ความเข้มข้น 1 mM และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.4 mM จากนั้นเติมเอนไซม์สกัดหยาบปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 469 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ 0 และ 60 วินาที นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส คือปริมาณเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการเปลี่ยนสาร 2,6-dimethoxyphenol 1 μmol ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสงเท่ากับ $10,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽⁷⁷⁾

4.2.3 กิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

ผสม veratryl alcohol ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 240 ไมโครลิตร สารละลาย บัฟเฟอร์ไซเดียมทาร์เทรต ความเข้มข้น 50 mM (pH 2.5) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 240 ไมโครลิตร และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.4 mM ปริมาตร 120 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ สกัดหยาบปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ 0 และ 60 วินาที นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดย กำหนดให้ 1 ยูนิตของลิกนินเปอร์ออกซิเดส คือปริมาณเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการ เปลี่ยนสาร veratryl alcohol 1 μmol ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (ค่าคงที่ของการ ดูดกลืนแสงเท่ากับ $9,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽⁷⁷⁾ โดยสูตรการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ มีดังนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\Delta \text{Abs} \times V \times D}{\epsilon \times v \times t}$$

หมายเหตุ : ΔAbs = ความแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงก่อนและหลังทำ ปฏิกิริยา, V = ปริมาณสารทั้งหมดในปฏิกิริยา (มิลลิลิตร), D = ระดับการเจือจาง, ϵ = ค่าคงที่ของการ ดูดกลืนแสง ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), v = ปริมาณเอนไซม์สกัดหยาบ (มิลลิลิตร) และ t = เวลาที่ใช้ในการ ป่ม (นาที)

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ด้วยการออกแบบการทดลองทางสถิติ

จากผลการทดลองในข้อ 4 คัดเลือกสายพันธุ์ราไวท์รอตที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง ที่สุด มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์สูงที่สุด โดยการ ออกแบบการทดลองทางสถิติ

5.1 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

กากตะกอนดีแคนเตอร์ปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับ ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 65% ด้วยอาหาร basal medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ใช้แหล่ง ไนโตรเจนแตกต่างกัน 3 ชุดการทดลอง (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ) ได้แก่ peptone, yeast extract และ sodium nitrate จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศา เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำ cork borer ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยราบริสุทธิอายุ 7 วันที่เจริญบนอาหาร basal medium agar

จำนวน 5 plugs เขี่ยลงในพลาสติกแล้วบ่มไว้ในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 13 วัน โดยเก็บตัวอย่างมาสกัดเอนไซม์และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 4.2 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 100 mM (pH 5.0) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บทุกวันที่ 1, 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 นำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% ด้วยโปรแกรม Minitab[®] 18 (Minitab Inc., PA, USA) เพื่อคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดมาทำการทดลองต่อไป

5.2 วิธี Plackett-Burman Design (PBD)

เป็นการออกแบบการทดลองเพื่อคัดเลือกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกลั่นกรองปัจจัยจำนวนมาก⁽⁸⁰⁾ โดยในการทดลองนี้ได้ศึกษาปัจจัยของส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ทั้งหมด 9 ปัจจัย ได้แก่ glucose, yeast extract, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ Tween 80 ซึ่งได้แบ่งระดับปัจจัยออกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ -1, 0 และ 1 ดังแสดงในตาราง 8 โดยค่า 0 คือค่าที่คาดการณ์ว่าน่าจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด สามารถสร้างแบบการทดลองดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 8 ค่าปัจจัยของแต่ละระดับที่ใช้ในการออกแบบการทดลองตามวิธี PBD

ปัจจัย	ชนิดของปัจจัย	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)		
		-1	0	1
X1	Glucose	2	5	8
X2	Yeast extract	1	2.5	4
X3	KH_2PO_4	0.1	0.4	0.7
X4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.5	0.75
X5	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005	0.01	0.015
X6	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.025	0.05	0.075
X7	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.125	0.25	0.375
X8	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005	0.01	0.015
X9	Tween 80	0.05	0.1	0.15

ตาราง 9 แบบการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลติกโดยใช้วิธี PBD

การทดลอง	ปัจจัย								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
3	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
5	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
6	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
7	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
9	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
10	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
11	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ: X1 = Glucose, X2 = Yeast extract, X3 = KH_2PO_4 , X4 = $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, X5 = $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, X6 = $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, X7 = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, X8 = $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ X9 = Tween 80

เมื่อทำการทดลองครบทั้ง 13 การทดลอง (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ) ตามวิธี PBD⁽⁷⁸⁾ แล้วจึงนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการถดถอยเชิงพหุคูณเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลติก และค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (R-Squared; R^2) ด้วยโปรแกรม Minitab[®] 18 โดยถ้ามีค่านัยสำคัญของการทดสอบ (p -value) น้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปัจจัยนั้นมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลติกซึ่งปัจจัยดังกล่าวจะถูกคัดเลือกไปทำการทดลองในขั้นต่อไป

5.3 วิธี Central Composite Design (CCD)

การออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD⁽⁶¹⁾ จะนำปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองในข้อ 5.2 โดยพิจารณาจากค่านัยสำคัญของการทดสอบ (p -value) ที่มีค่าน้อยกว่า 0.05 ซึ่งพบว่ามี 2 ปัจจัยที่แสดงให้เห็นว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient) และค่าความแปรผันของตัวแปรตอบสนองซึ่งสามารถแปรผันค่าของปัจจัยได้โดยวิธี CCD จะแบ่งระดับปัจจัยให้มีความละเอียดมากขึ้นออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -1.414 ($-\alpha$), -1, 0, 1 และ 1.414 ($+\alpha$) โดยค่า 0 คือค่าของปัจจัยที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดจากวิธี PBD ดังแสดงในตาราง 10 และแบบการทดลองดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 10 ค่าปัจจัยของแต่ละระดับที่ใช้ในการออกแบบการทดลองตามวิธี CCD

ปัจจัย	ชนิดของปัจจัย	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)				
		-1.414	-1	0	1	1.414
X1	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.073	0.125	0.25	0.375	0.426
X2	Glucose	0.758	2	5	8	9.242

ตาราง 11 แบบการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกโดยใช้วิธี CCD

การทดลอง	X1	X2
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1.414	0
6	1.414	0
7	0	-1.414
8	0	1.414
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

หมายเหตุ: X1 = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ X2 = Glucose

ต่อมาจึงนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์หาสมการถดถอยและหาพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface methodology) ด้วยโปรแกรม Design-Expert software version 11⁽⁷⁹⁾ เพื่อสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface plot) และแผนภาพคอนทัวร์ (contour plot) ในการทำนายค่าของปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณสูงสุด จากนั้นทำการทดลองโดยใช้ค่าที่ได้จากการทำนายเพื่อยืนยันความถูกต้องของแบบการทดลอง

6. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มลิกนินในไลติก

6.1 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังวิธีในข้อ 4.2 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 3 ถึง 7 ดังนี้ สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต ความเข้มข้น 100 mM (pH 3.0 และ 3.5), สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 100 mM (pH 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5) และสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 100 mM (pH 6.0, 6.5 และ 7.0) โดยค่า pH ใดที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

6.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังวิธีในข้อ 4.2 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เหมาะสมจากข้อ 6.1 บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 30, 37, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิใดที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคืออุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

6.3 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่อค่า pH

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้มาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ตั้งแต่ 3 ถึง 7 ดังนี้ สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต ความเข้มข้น 100 mM (pH 3.0 และ 3.5), สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 100 mM (pH 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5) และสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 100 mM (pH 6.0, 6.5 และ 7.0) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเอนไซม์สกัดหยาบมาปรับค่า pH ให้เท่ากับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ที่เหมาะสม แล้วนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เหมาะสม และบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 6.1 และ 6.2 ตามลำดับ

6.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้มาบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 30, 37, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เหมาะสม และบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 6.3

7. การปรับสภาพกากตะกอนดีแคนเตอร์ด้วยเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลิติก

ผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลิติกจากรำไทรอบที่มีคุณสมบัติเหมาะสมโดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้นภายใต้สภาวะและส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 5.3 จากนั้นสกัดเอนไซม์โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ปรับ pH ให้มีค่าที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แล้วนำเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้มาปรับสภาพกากตะกอนดีแคนเตอร์ เริ่มจากชั่งกากตะกอนดีแคนเตอร์ 20 กรัม ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำเอนไซม์สกัดหยาบ ปริมาตร 70 มิลลิลิตร เทลงพลาสติก และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน นำส่วนของกากตะกอนดีแคนเตอร์มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน หรือจนกว่าจะได้น้ำหนักคงที่ จากนั้นนำกากตะกอนดีแคนเตอร์หลังการปรับสภาพไปวิเคราะห์หาปริมาณลิกนินที่เหลือโดยสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมและเพาะเลี้ยงราไวรัสรอท

ตัวอย่างฟรุตติงบอดี้ของราที่รวบรวมได้จากพื้นที่ 4 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยได้แก่ จังหวัดอุดรธานี สกลนคร นครพนม และชัยภูมิ ซึ่งมีสภาพเป็นป่าเบญจพรรณผสมเต็งรัง มีพันธุ์ไม้ยาง เต็ง รัง ประดู่ และมะค่า เป็นไม้สำคัญ ในช่วงเดือนมีนาคม – กรกฎาคม พ.ศ. 2560 (ภาพประกอบ 13) จำนวน 264 ตัวอย่าง (ตาราง 12) จากอุดรธานี (UD) 19 ตัวอย่าง สกลนคร (PP) 33 ตัวอย่าง นครพนม (NP) 13 ตัวอย่าง และชัยภูมิ (PW) 199 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างราส่วนใหญ่มีการเจริญบนไม้เนื้อแข็ง บางตัวอย่างสามารถเปลี่ยนสีเนื้อไม้จากสีน้ำตาลให้จางลงได้ และบางตัวอย่างสามารถย่อยเนื้อไม้ให้เปื่อยยุ่ยได้อีกด้วย โดยลักษณะฟรุตติงบอดี้ของราที่รวบรวมได้มีความหลากหลายทั้งสี รูปร่าง และ ขนาด บางชนิดมีลักษณะเป็นปื้นแนบกับเนื้อไม้ บางชนิดเป็นแผ่นคล้ายพัด บางชนิดมีก้านคล้ายถ้วย เป็นต้น (ภาพประกอบ 14)

จากตัวอย่างราที่รวบรวมได้สามารถแยกเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ได้จำนวน 150 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 56.82 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด (ตาราง 12) สำหรับตัวอย่างราที่ไม่สามารถเพาะเชื้อบริสุทธิ์ได้ อาจเนื่องจากฟรุตติงบอดี้ของร่าบางชนิดมีลักษณะบอบบางทำให้แยกเนื้อเยื่อด้านในออกมาเพาะเลี้ยงได้ยาก เกิดการปนเปื้อนราชนิดอื่น หรือบางตัวอย่างโดนทำลายด้วยแมลงที่อยู่ด้านใน หรือบางตัวอย่างมีสภาพเก่าจนไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ตัวอย่างราบริสุทธิ์ที่แยกเพาะเลี้ยงได้นับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA มีลักษณะของเส้นใยราที่หลากหลาย แต่ส่วนใหญ่มีอัตราการเจริญที่เร็ว คือเจริญเต็มจานเพาะเชื้อภายในระยะเวลา 5-7 วัน เมื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยร่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเส้นใยส่วนใหญ่มีผนังกัน และมีราจำนวน 88 ไอโซเลท ที่พบโครงสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น (ภาพประกอบ 15) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของราในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา ดังนั้นจึงนำตัวอย่างราทั้ง 88 ไอโซเลท ไปทดสอบคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินไลติกในการทดลองต่อไป ส่วนตัวอย่างที่เหลือ 62 ไอโซเลท ที่ไม่พบโครงสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น อาจเป็นราในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตาหรือแอสโคไมโคตาที่ปนเปื้อน ทั้งนี้ราส่วนใหญ่ไม่สร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในห้องปฏิบัติการจึงไม่สามารถจัดจำแนกชนิดในระดับไฟลัม และ/หรือสกุลได้ในเบื้องต้น ซึ่งต้องอาศัยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลในการพิสูจน์

เอกลักษณ์ของรากลุ่มดังกล่าว ดังนั้นการศึกษารั้งนี้จึงไม่ได้เลือกมาศึกษาต่อ และเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ที่อุณหภูมิตั้ง 4 องศาเซลเซียส

ส่วนฟรุติติงบอดีของตัวอย่างราที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมดเก็บรักษาเป็นตัวอย่างแห้งในสภาวะสุญญากาศเพื่อใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อการระบุชนิด และใช้ในการอ้างอิงต่อไป



ภาพประกอบ 13 สภาพพื้นที่ป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

(a) จังหวัดอุดรธานี (b) จังหวัดสกลนคร (c) จังหวัดนครพนม และ (d) จังหวัดชัยภูมิ

ตาราง 12 ข้อมูลการเก็บรวบรวมและเพาะเลี้ยงราไวท์รอกจากพื้นที่ 4 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

พื้นที่ จังหวัด	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะของพื้นที่	จำนวน ฟรุติงบอดี	จำนวนเชื้อ บริสุทธิ์
อุดรธานี	UD17-01 – UD17-19	ป่าเบญจพรรณผสมเต็งรัง	19	14
สกลนคร	PP17-01 – PP17-33	ป่าเบญจพรรณผสมเต็งรัง	33	25
นครพนม	NP17-01 – NP17-13	ป่าเบญจพรรณ	13	11
ชัยภูมิ	PW17-01 – PW17-248	ป่าเบญจพรรณผสมเต็งรัง	199	100
รวม			264	150





ภาพประกอบ 14 ตัวอย่างฟรุติติ่งบอดี้ของราที่เก็บรวบรวมได้จากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
ของประเทศไทย



ภาพประกอบ 15 ตัวอย่างราบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2. การคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกได้บนอาหารแข็ง

ราในกลุ่มเบสิดิโอไมซีทจำนวน 88 ไอโซเลท นำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกเบื้องต้น บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เติมอินดิเคเตอร์ 3 ชนิด ได้แก่ guaiacol, ABTS และ RBBR โดยผลบวกของการทดสอบ guaiacol จะเกิดโซนสีน้ำตาลและ ABTS จะเกิดโซนสีเขียวรอบเส้นใยรา ส่วน RBBR ซึ่งมีสีน้ำเงินจะถูกย่อยเกิดเป็นโซนใสรอบเส้นใยรา พบว่ามีตัวอย่างราที่ให้ผลบวกกับอินดิเคเตอร์อย่างน้อย 1 ชนิด ในการทดสอบจำนวนทั้งสิ้น 63 ไอโซเลท โดยราส่วนใหญ่สามารถย่อย guaiacol ได้มากที่สุด (57 ไอโซเลท) รองลงมาคือ ABTS (54 ไอโซเลท) และ RBBR (30 ไอโซเลท) ตามลำดับ (ตาราง 13) ในขณะที่มีราจำนวน 26 ไอโซเลทที่ไม่สามารถย่อยอินดิเคเตอร์ใดได้เลย จากผลการทดสอบข้างต้นสามารถสรุปเป็นแผนภูมิแสดงสัดส่วนจำนวนราในการย่อยอินดิเคเตอร์ทั้ง 3 ชนิดได้ดังภาพประกอบ 16

อย่างไรก็ตามมีราจำนวน 28 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 3 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 32 จากตัวอย่างราที่ทดสอบทั้งหมด (ภาพประกอบ 17) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างราส่วนใหญ่ที่สามารถย่อย guaiacol ได้ จะสามารถย่อย ABTS ได้เช่นกัน ดังนั้นจึงพบว่าที่สามารถย่อยอินดิเคเตอร์ทั้ง 2 ชนิดได้มากถึง 51 ไอโซเลท ในขณะที่ RBBR เป็นสีสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนจึงมีราจำนวนน้อยที่ย่อยได้ จากผลการทดสอบพบราจำนวน 6 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยอินดิเคเตอร์ทั้ง 3 ชนิด ได้อย่างสมบูรณ์ (++++) ได้แก่ PP17-06, PP17-33, PW17-111, PW17-134, PW17-145 และ PW17-177 (ตาราง 13)

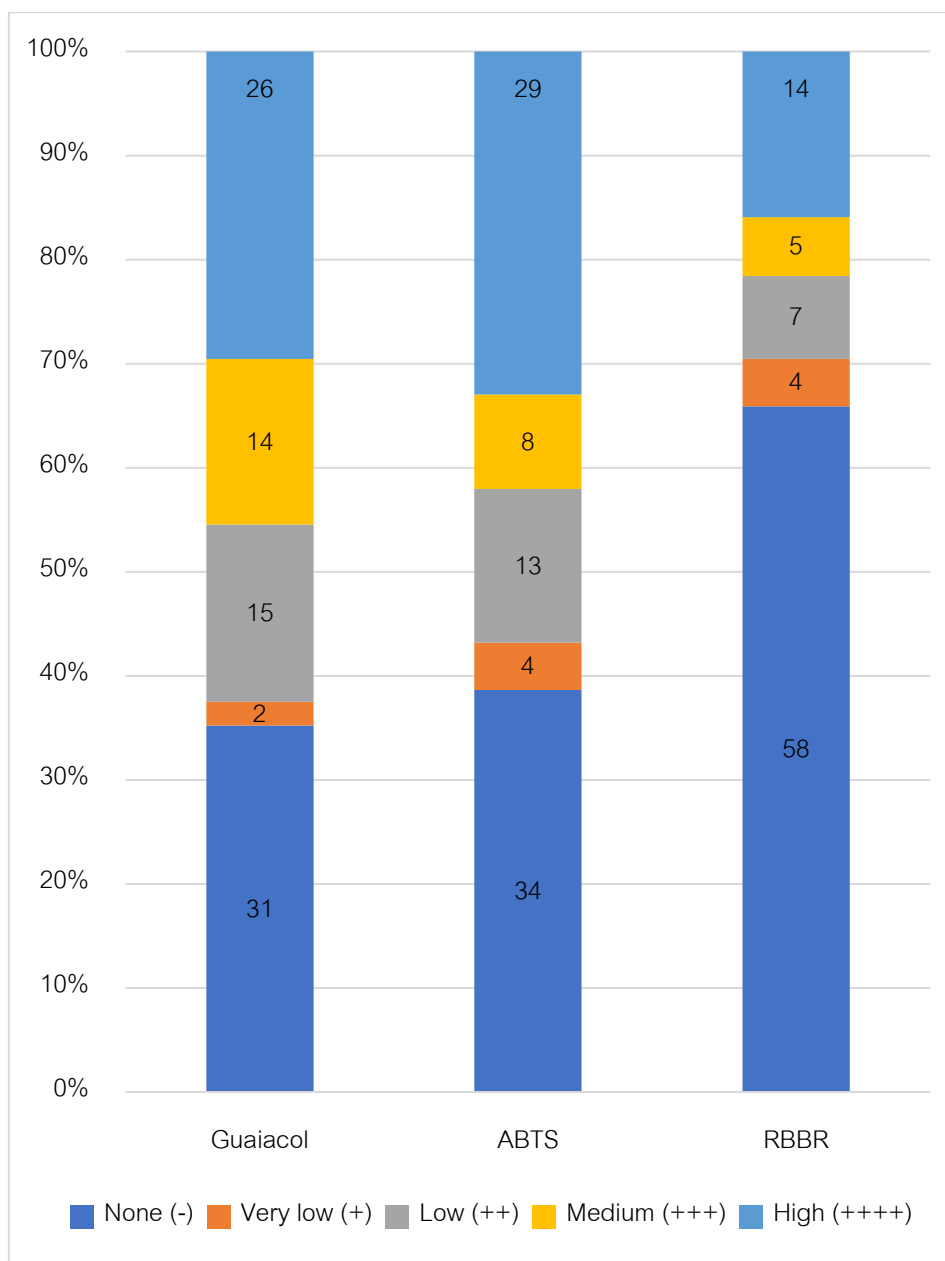
ตาราง 13 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกของรากกลุ่มเบสิติโอไมซีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เติมอินดิเคเตอร์

ตัวอย่างราก	ระดับผลบวกของการทดสอบ			ตัวอย่างราก	ระดับผลบวกของการทดสอบ		
	Guaiacol*	ABTS*	RBBR**		Guaiacol*	ABTS*	RBBR**
UD17-02.1	-	-	-	UD17-17.2	++++	++++	-
UD17-03	-	-	-	UD17-19	++	+++	-
UD17-04	++++	++++	-	PP17-01	-	-	-
UD17-05	-	-	-	PP17-02	++++	++++	-
UD17-05.2	-	-	-	PP17-03.1	-	-	-
UD17-06P.1	++	++++	-	PP17-03.2.1	++++	++++	-
UD17-06P.2	++	++++	-	PP17-03.2.2	-	-	-
UD17-06C.1	+	-	-	PP17-04	++++	+++	++
UD17-06C.2	++	+++	+++	PP17-05	++++	++++	-
UD17-07	-	-	-	PP17-06	++++	++++	++++
UD17-08.1	+	++++	-	PP17-06.2	-	-	-
UD17-08.2	++++	++++	-	PP17-08	-	-	-
UD17-10	-	-	-	PP17-10	-	-	-
UD17-11	-	-	-	PP17-12	-	-	-
UD17-12.1	++	++	-	PP17-13	+++	++++	-
UD17-12.2	-	-	-	PP17-14	+++	++++	-
UD17-14.1	-	-	-	PP17-16.1	++	++++	-
UD17-14.2	++	+++	-	PP17-16.1-2	-	-	-
UD17-15.1	-	+++	-	PP17-16.2	++++	+	-
UD17-15.2	++	+++	-	PP17-17	++++	++++	-
UD17-16.1	++	+++	-	PP17-18	++++	++++	-
UD17-16.2	-	-	-	PP17-19	-	++++	-
UD17-17.1	+++	-	-	PP17-20	+++	+++	++

ตาราง 13 (ต่อ)

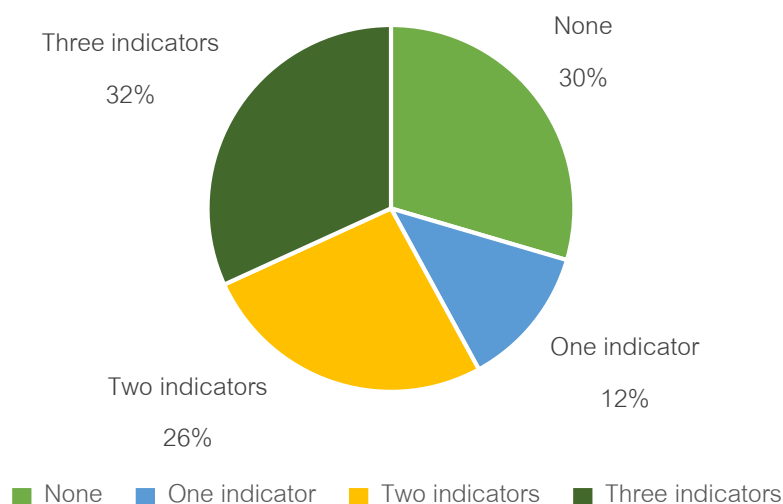
ตัวอย่างรา	ระดับผลบวกของการทดสอบ			ตัวอย่างรา	ระดับผลบวกของการทดสอบ		
	Guaiacol*	ABTS*	RBBR**		Guaiacol*	ABTS*	RBBR**
PP17-21	++++	-	-	PW17-111	++++	++++	++++
PP17-22	+++	++++	-	PW17-121	+++	++	++
PP17-23.1	++	-	-	PW17-124	+++	++	++++
PP17-23.2	+++	++++	-	PW17-131	-	-	-
PP17-24	-	-	-	PW17-134	++++	++++	++++
PP17-25	++++	++++	-	PW17-135	+++	++	++++
PP17-26	-	-	-	PW17-136	+++	+	+
PP17-28	-	-	-	PW17-139	++++	++++	+++
PP17-29	++	-	-	PW17-143	++	++++	++++
PP17-30	-	++++	-	PW17-145	++++	++++	++++
PP17-33	++++	++++	++++	PW17-154	++++	++++	+++
NP17-02	-	-	++++	PW17-155	+++	++	++
NP17-08	-	-	++++	PW17-171	+++	++	+
NP17-12	-	-	-	PW17-173	++++	++	++++
PW17-06	++++	++	++++	PW17-174	++++	+	+
PW17-12A	++	-	-	PW17-177	++++	++++	++++
PW17-25	-	-	-	PW17-188A	-	-	-
PW17-41	++++	++	++++	PW17-199	++++	++	+++
PW17-43	-	-	-	PW17-219	+++	++++	+
PW17-75	+++	+	++	PW17-221	++	++	++
PW17-108	++++	++	++	PW17-230	++	++	+++

หมายเหตุ : Guaiacol และ ABTS: None (-); Very low (+ 0.1-10 มิลลิเมตร); Low (++ 10.1-20.0 มิลลิเมตร); Medium (+++ 20.1-30.0 มิลลิเมตร); High (++++ > 30.1 มิลลิเมตร), RBBR: None (-); Very low (+); Low (++); Medium (+++); High (++++)



ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงค่าร้อยละของจำนวนและประสิทธิภาพในการย่อยอินดิเคเตอร์ 3 ชนิด

หมายเหตุ : Guaiacol และ ABTS: None (-); Very low (+ 0.1-10 มิลลิเมตร); Low (++ 10.1-20.00 มิลลิเมตร); Medium (+++ 20.1-30.0 มิลลิเมตร); High (++++ > 30.1 มิลลิเมตร),
RBBR: None (-); Very low (+); Low (++); Medium (+++); High (++++)



ภาพประกอบ 17 กราฟวงกลมแสดงค่าร้อยละของจำนวนราที่สามารถย่อยอินดิเคเตอร์ได้

None = ไม่สามารถย่อยได้; One indicator = สามารถย่อยอินดิเคเตอร์ได้ 1 ชนิด; Two indicators = สามารถย่อยอินดิเคเตอร์ได้ 2 ชนิด; Three indicators = สามารถย่อยอินดิเคเตอร์ได้ 3 ชนิด

อย่างไรก็ตามจากผลการทดสอบคุณสมบัติของรากุ่มเบสดีไอไมซีสในการย่อยอินดิเคเตอร์ 3 ชนิด บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าราดังกล่าวผลิตเอนไซม์ชนิดไหนในกลุ่มลิกนินไลติก ดังนั้นจึงต้องมีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดในการทดลองต่อไป

3. การผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินในไลติกโดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักแบบแห้ง

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินในไลติกโดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักแบบแห้ง จึงได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากตะกอนดีแคนเตอร์โดยห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเส้นใย กระดาษ และสิ่งทอ สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ด้วยวิธี TAPPI Test พบว่ากากตะกอนดีแคนเตอร์มีปริมาณลิกนินสูงถึงร้อยละ 30.62 ดังแสดงในตาราง 14 ซึ่งน่าจะใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินในไลติกได้ดี ส่วนกากตะกอนดีแคนเตอร์ หลังจากการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วพบว่ากากตะกอนจับกันเป็นก้อนดินแข็งขนาดต่าง ๆ จึงได้นำไปบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างแบบหยาบ (cutting mills) ให้มีขนาดเล็กลงและร่อนผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหมักต่อไป (ภาพประกอบ 18)

ตาราง 14 องค์ประกอบของกากตะกอนดีแคนเตอร์ที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม

องค์ประกอบ	ร้อยละของน้ำหนักวัตถุบอบแห้ง (% by oven dry weight)
ปริมาณลิกนิน	30.62
ปริมาณไฮโดรเซลลูโลส	37.10
ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส	22.39
ปริมาณเฮมิเซลลูโลส	14.71



ภาพประกอบ 18 กากตะกอนดีแคแเตอร์จากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม บริษัทสุขสมบูรณ์ (a) กากตะกอนดีแคแเตอร์จากโรงงาน (b) กากตะกอนดีแคแเตอร์หลังการอบแห้ง และ (c) กากตะกอนดีแคแเตอร์หลังการบด

ตัวอย่างราไวท์รอตจำนวน 63 ไอโซเลท ที่ให้ผลบวกจากการทดสอบด้วยวิธี agar plate screening นำมาทดสอบความสามารถในการเจริญบนกากตะกอนดีแคแเตอร์และผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก ได้แก่ แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส ภายใต้สภาวะการหมักแบบแห้ง พบว่าราที่สามารถเจริญบนกากตะกอนดีแคแเตอร์และมีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งมีจำนวนเพียง 24 ไอโซเลท ซึ่งมีระดับการเจริญจากน้อย (+) ปานกลาง (++) และมาก (+++) หรือเจริญเต็มหลอดภายในระยะเวลา 7 วัน (ภาพประกอบ 19 และตาราง 15) ผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกทั้ง 3 ชนิด จากเอนไซม์สกัดหยาบ พบว่ามีราจำนวน 24 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ มีค่าอยู่ในช่วง 6.40 ถึง 680.00 ยูนิตต่อลิตร โดยราที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงสุดคือ PP17-33 ส่วนเอนไซม์แลคเคสพบว่ามีราจำนวน 23 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตได้ มีค่าอยู่ในช่วง 5.00 ถึง 470.00 ยูนิตต่อลิตร โดยราที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสสูงสุดคือ NP17-02 ในขณะที่เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีราเพียง 7 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตได้ มีค่าอยู่ในช่วง 0.17 ถึง 3.44 ยูนิตต่อลิตร โดยราที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสูงสุดคือ PW17-219

ทั้งนี้ มีราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกได้ทั้ง 3 ชนิด จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ PP17-33, PW17-111, PW17-134, PW17-136, PW17-154, PW17-173 และ PW17-219 โดยราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ในปริมาณสูงคือ PP17-33 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 315.56 ยูนิตต่อลิตร เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 680.00 ยูนิตต่อลิตร และเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 2.41 ยูนิตต่อลิตร นอกจากนี้ PP17-33 ยังมี

อัตราการเจริญบนกากตะกอนดีแคนเตอร์ได้ในระดับดีมาก (+++) อีกด้วย ดังนั้นในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติจิงเลือกกราฟไอโซเลท PP17-33 ไปศึกษาในลำดับต่อไป โดยศึกษาเฉพาะเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่านั้น เนื่องจากเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสวัดได้ในปริมาณที่ต่ำ



ภาพประกอบ 19 การหมักแบบแห้งของราโดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้นในหลอดเพาะเชื้อที่ความชื้นเท่ากับ 65% อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตาราง 15 ระดับการเจริญของราและกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติกภายใต้กระบวนการหมักแบบแห้งในหลอดเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

ไอโซเลข	ระดับการเจริญ	กิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติก (ยูนิตต่อลิตร)		
		แลคเคส	แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	ลิกนินเปอร์ออกซิเดส
PP17-04	++	81.12	198.40	-
PP17-06	+++	64.00	120.00	-
PP17-17	++	398.34	230.40	-
PP17-18	++	65.89	94.00	-
PP17-20	++	300.56	68.40	-
PP17-22	++	13.34	595.20	-
PP17-25	++	45.67	94.60	-
PP17-33	+++	315.56	680.00	2.41
NP17-02	+++	470.00	317.20	-
NP17-08	+	21.56	50.80	-
PW17-06	++	460.56	127.40	-
PW17-41	+	54.12	71.00	-
PW17-43	++	260.00	227.20	-
PW17-111	+	49.45	63.60	0.43
PW17-134	+	33.78	66.20	1.03
PW17-136	+	36.89	68.40	3.44
PW17-145	+++	23.34	61.60	-
PW17-154	+	317.78	86.60	0.17
PW17-171	++	-	82.20	-
PW17-173	++	62.89	53.60	0.17
PW17-177	+++	367.23	183.20	-

ตาราง 15 (ต่อ)

ไอโซเลท	ระดับการเจริญ	กิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก (ยูนิตต่ออลิตร)		
		แลคเคส	แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	ลิกนินเปอร์ออกซิเดส
PW17-219	+++	30.56	55.40	1.72
PW17-221	+	5.00	6.40	-
PW17-230	+++	66.12	112.80	-

หมายเหตุ : ระดับการเจริญ: None (-); Low (+ 0.1-30.0 มิลลิเมตร); Medium (++ 30.1-60.0 มิลลิเมตร); High (+++ > 60.1 มิลลิเมตร)

เนื่องจากการเจริญของราและการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกมีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นถ้าราไม่สามารถเจริญบนสารตั้งต้นหรือเจริญได้น้อยก็จะทำให้การผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณน้อยตามไปด้วย ซึ่งจากผลการทดลองมีจำนวน 24 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกได้ ซึ่งจะถูกนำไปจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีววิทยาไม่เลกุลต่อไป

4. การจัดจำแนกชนิดของราไทรอท

ตัวอย่างราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกได้จำนวน 24 ไอโซเลท นำมาจัดจำแนกชนิดโดยศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีววิทยาโมเลกุล ดังนี้

4.1 การศึกษาราไทรอทโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราจำนวน 24 ไอโซเลท ทั้งลักษณะรูปร่าง ขนาด และสีของฟรุตติงบอดี รวมทั้งเบสิดิโอสปอร์ ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์ ผงกั้น และแคลมป์คอนเนคชั่น พบว่าสามารถจัดจำแนกรตามวงศ์ได้ 5 วงศ์ ได้แก่ Cerrenaceae, Hericiaceae, Incrustoporiaceae, Polyporaceae และ Stereaceae ประกอบด้วย 9 สกุล 15 ชนิด โดยราส่วนใหญ่จัดอยู่ในวงศ์ Polyporaceae จำนวน 5 สกุล ได้แก่ *Coriolopsis* (3 ไอโซเลท), *Ganoderma* (8 ไอโซเลท), *Microporus* (5 ไอโซเลท), *Nigroporus* (1 ไอโซเลท) และ *Trametes* (3 ไอโซเลท) ส่วนวงศ์ Cerrenaceae, Hericiaceae, Incrustoporiaceae และ Stereaceae พบวงศ์ละ 1 สกุล ได้แก่ *Pseudolagarobasidium* (1 ไอโซเลท), *Dentipellis* (1 ไอโซเลท), *Tyromyces* (1 ไอโซเลท) และ *Aleurodiscus* (1 ไอโซเลท) ตามลำดับ รายละเอียดแสดงในตาราง 16 และภาพประกอบ 20-34

อย่างไรก็ตามเนื่องจากฐานข้อมูลของราไทรอทในประเทศไทยมีจำกัด และเห็นราในแต่ละพื้นที่มีความหลากหลายสูง เช่น รูปร่าง ลักษณะ สี ขนาดของฟรุตติงบอดี และสปอร์ ทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดของราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว จึงต้องใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุลร่วมด้วย

ตาราง 16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราไวท์รอก

ชนิดของรา	รหัส	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
Polyporaceae		
<i>Corioloopsis aspera</i> (Jungh) Teng	NP17-02 NP17-08	<p>ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นบาง โค้ง ครึ่งวงกลมคล้ายพัด เนื้อเยื่อเหนียว พบการเจริญเป็นกลุ่มขนาด (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 3.9 – 4.2 x 5.8 – 6.6 x 0.6 – 2.0 เซนติเมตร ฐานดอกเห็ดที่ติดกับเนื้อไม้มีลักษณะคอดเล็กลง ไม่มีก้าน ขอบดอกเรียบ หน้าดอกแบ่งเป็นโซน (zonate) สีต่าง ๆ ได้แก่ สีน้ำตาลเข้ม น้ำตาลอ่อน และเหลืองอ่อน ถึงขาว สลับกัน ใต้ดอกเห็ดสีครีม มีรู (pores) จำนวนมาก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร</p> <p>เบสิดิโอสปอร์: พบเพียง 2 สปอร์ และพบซิสทีเดีย (cystidia) รูปร่างต่างๆ (ภาพประกอบ 20)</p> <p>หมายเหตุ: การระบุชนิดอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากพบสปอร์น้อยมาก</p>
<i>C. retropicta</i> (Lloyd) Teng	PW17-134	<p>ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นบาง โค้ง ครึ่งวงกลมคล้ายพัด เนื้อเยื่อเหนียว พบการเจริญเป็นกลุ่มขนาด (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 2.0 - 3.5 x 2.8 - 4.8 x 0.2 - 0.4 เซนติเมตร ฐานดอกเห็ดที่ติดกับเนื้อไม้มีลักษณะคอดเล็กลง ไม่มีก้าน ขอบดอกเรียบ หน้าดอกแบ่งเป็นโซนสีต่าง ๆ ได้แก่ สีน้ำตาลเข้ม น้ำตาลอ่อน และเหลืองอ่อน ใต้ดอกเห็ดสีน้ำตาลแดง มีรูจำนวนมาก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร</p> <p>เบสิดิโอสปอร์: ขนาด (ยาว x กว้าง) 9.0 – 11.0 x 4.0 – 6.0 ไมครอน รูปร่างรี ปลายด้านหนึ่งเล็กกว่า ผิวขรุขระ ไม่เรียบ สีใส (ภาพประกอบ 21)</p>

ตาราง 16 (ต่อ)

ชนิดของรา	รหัส	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
<i>Ganoderma lingzhi</i> S.H. Wu, Y. Cao & Y.C. Dai	PW17-43 PP17-22	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นหนา โค้ง ทรงกลม หรือรูป ไต ผิวเรียบ มันเงา (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 1.4 x 3.7 x 3.0 เซนติเมตร มีก้านยาว 14.8 เซนติเมตร สี น้ำตาลดำ ขอบดอกเรียบ หน้าดอกแบ่งเป็นโซนสีน้ำตาล แดง ใต้ดอกเห็ดสีเหลืองครีม มีรูจำนวนมาก ขนาดเส้น ผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร เบสิดิโอสปอร์: ขนาด (ยาว x กว้าง) 6.5 – 8.0 x 5.0 – 6.5 ไมครอน สีน้ำตาล รูปร่างกลมรี ปลายมน ผิวขรุขระ (ภาพประกอบ 22)
<i>Ganoderma</i> sp. 1	PW17-145	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นหนา โค้ง ครึ่งวงกลม ผิว เรียบ มัน (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 6.2 – 7.0 x 7.7 – 8.3 x 0.8 – 1.8 เซนติเมตร ฐานดอกเห็ดที่ติดกับเนื้อไม้มี ลักษณะคอดเล็กกลง มีก้านสั้น ๆ สีน้ำตาลแดง ขอบดอก เรียบ หน้าดอกแบ่งเป็นโซนสีต่าง ๆ ได้แก่ สีน้ำตาลแดงที่ โคนดอก จากนั้นเป็นชั้นสีน้ำตาลเข้ม สีเหลืองอ่อนถึง ขาว ใต้ดอกเห็ดสีขาว มีรูจำนวนมาก ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร เบสิดิโอสปอร์: ขนาด (ยาว x กว้าง) 5.5 – 7.0 x 2.8 – 4.5 ไมครอน สีใส รูปร่างกลมรี ปลายมนแคบ ผิวเรียบ (ภาพประกอบ 23)

ตาราง 16 (ต่อ)

ชนิดของรา	รหัส	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
<i>Ganoderma</i> sp. 2	PW17-06	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นหนา โค้ง ทรงกลม ผิวขรุขระ
	PW17-111	มันเงา (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 1.8 – 6.0 x 2.5 –
	PW17-154	10.2 x 0.8 – 2.0 เซนติเมตร ฐานดอกเห็ดที่ติดกับเนื้อไม้
	PW17-177	มีลักษณะคอดเล็กลง มีก้านสั้น ๆ ขอบดอกเรียบ หน้า
	PW17-230	ดอกแบ่งเป็นโซนสีน้ำตาลแดง น้ำตาลเข้ม ถึง สีดำ ได้ ดอกเห็ดสีน้ำตาลแดง มีรูจำนวนมาก ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร เบสิดิโอสปอร์: ขนาด (ยาว x กว้าง) 7.6 – 9.5 x 4.5 – 5.5 ไมครอน สีน้ำตาล รูปร่างกลมรี ปลายมนกว้าง ผิวเรียบ (ภาพประกอบ 24)
<i>Microporus</i> sp. 1	PP17-04	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นหนา โค้ง ครึ่งวงกลม ผิว
	PW17-173	เรียบ มัน (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 2.0 – 4.2 x 3.2 – 7.0 x 0.3 – 0.5 เซนติเมตร ฐานดอกเห็ดที่ติดกับเนื้อไม้มี ลักษณะคอดเล็กลง มีก้านสั้น ๆ สีน้ำตาลแดง ขอบดอก เรียบ หน้าดอกแบ่งเป็นโซนสีต่าง ๆ ได้แก่ สีน้ำตาลแดงที่ โคนดอก จากนั้นเป็นชั้นสีน้ำตาลเข้ม สีเหลืองอ่อนถึงขาว ใต้ดอกเห็ดสีขาว มีรูจำนวนมาก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร เบสิดิโอสปอร์: ขนาด (ยาว x กว้าง) 8.0 – 9.0 x 3.5 – 5.0 ไมครอน สีน้ำตาล รูปร่างกลมรี ปลายมนกว้าง ผิวเรียบ (ภาพประกอบ 25) หมายเหตุ: พบสปอร์จำนวนน้อย

ตาราง 16 (ต่อ)

ชนิดของรา	รหัส	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
<i>Microporus</i> sp. 2	PP17-17 PP17-20 PP17-25	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นหนา ทรงกลม ผิวเรียบ มัน (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 1.8 – 3.3 x 2.1 – 4.5 x 0.8 – 1.2 เซนติเมตร ฐานดอกเห็ดที่ติดกับเนื้อไม้มีลักษณะคอดเล็กลง มีก้านสั้น ๆ ขอบดอกเรียบ ปลายบานออก หน้าดอกแบ่งเป็นโซนสีต่าง ๆ ได้แก่ สีน้ำตาลที่โคนดอก จากนั้นเป็นชั้นสีน้ำตาลอ่อนและสีน้ำตาลเข้มสลับกัน ส่วนปลายสีขาวครีม ใต้ดอกเห็ดสีครีม มีรูจำนวนมาก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร เบสิดิโอสปอร์: ไม่พบ (ภาพประกอบ 26) หมายเหตุ: ตัวอย่างอ่อน (immature) ยังไม่สร้างสปอร์
<i>Nigroporus vinosus</i> (Berk.) Murrill	PW17-221	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นบาง ทรงครึ่งวงกลมคล้ายพัด เนื้อเยื่อเหนียว ผิวเรียบ มันเงา (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 5.2 – 5.9 x 6.1 – 6.5 x 2.0 – 2.5 เซนติเมตร ฐานดอกเห็ดที่ติดกับเนื้อไม้มีลักษณะคอดเล็กลง ขอบดอกหยัก หน้าดอกแบ่งเป็นโซนสีต่าง ๆ ได้แก่ สีน้ำตาลที่โคนฐาน และเป็นชั้นสีน้ำตาลเข้มไปถึงขอบดอก ใต้ดอกผิวเรียบ แบ่งเป็นชั้นสีน้ำตาล และสีน้ำตาลอ่อนบริเวณขอบดอก เบสิดิโอสปอร์: ไม่พบ (ภาพประกอบ 27) หมายเหตุ: การระบุชนิดอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากไม่พบสปอร์

ตาราง 16 (ต่อ)

ชนิดของรา	รหัส	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
<i>Trametes elegans</i> (Spreng.) Fr.	PP17-06	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นบาง โค้ง รูปพัด เนื้อเยื่อเหนียว ผิวหยาบเป็นร่อง พบการเจริญเป็นกลุ่ม ขนาด (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 4.4 – 8.0 x 7.6 – 10.2 x 1.5 – 1.9 เซนติเมตร ฐานดอกเห็ดที่ติดกับเนื้อไม้ไม่มีลักษณะคอดเล็กลง ไม่มีมีก้าน ขอบดอกเรียบ หน้าดอกแบ่งเป็นโซนสีขาวครีม สลับกับสีน้ำตาลอ่อน ใต้ดอกเห็ดสีน้ำตาล มีรูจำนวนมาก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร เบสิดิโอสปอร์: ขนาด (ยาว x กว้าง) 6.3 – 7.5 x 4.0 – 5.2 ไมครอน สีใส รูปร่างกลมรี ปลายมนแคบ ผิวเรียบ พบซิสทีเดีย (ภาพประกอบ 28)
<i>T. hirsuta</i> (Wulfen) Lloyd	PW17-41	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นบาง โค้ง ทรงกลม หรือรูปไต หรือไม่มีรูปร่างที่ชัดเจน ผิวหยาบ เนื้อเยื่อเหนียว ขนาด (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 3.9 – 7.3 x 6.0 – 11.1 x 1.7 – 2.5 เซนติเมตร ขอบดอกหยัก หน้าดอกแบ่งเป็นโซนสีเขียวย่อปนบริเวณฐานไปจนถึงชั้นสีเหลืองครีม หรือเขียวอ่อน บริเวณขอบดอก ใต้ดอกเห็ดสีเหลืองครีม มีรูจำนวนมาก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร เบสิดิโอสปอร์: ขนาด (ยาว x กว้าง) 10.0 – 10.5 x 6.0 – 6.5 ไมครอน สีใส รูปร่างกลมรี ปลายมนกว้าง ผิวขรุขระ พบซิสทีเดีย (ภาพประกอบ 29) หมายเหตุ: พบสปอร์จำนวนน้อย

ตาราง 16 (ต่อ)

ชนิดของรา	รหัส	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
<i>T. sanguinea</i> (L.) Lloyd	PP17-18	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นหนา โค้ง ครึ่งวงกลม เนื้อเยื่อเหนียว ผิวหยาบเป็นร่อง ขนาด (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 5.2 – 6.2 x 7.5 – 10.3 x 1.2 – 2.0 เซนติเมตร ฐานดอกเห็ดที่ติดกับเนื้อไม้มีลักษณะคอดเล็กลง ไม่มีก้าน ขอบดอกหยัก หน้าดอกแบ่งเป็นสีส้มสลับกับชั้นสีเหลืองครีม และน้ำตาลอ่อน ไปจนถึงสีน้ำตาลส้มบริเวณขอบ ใต้ดอกเห็ดสีน้ำตาลแดง มีรูจำนวนมาก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร เบสิดิโอสปอร์: ขนาด (ยาว x กว้าง) 7.5 – 11.0 x 4.0 – 6.0 ไมครอน สีใส รูปร่างกลมรี ปลายมนกว้าง ผิวขรุขระ (ภาพประกอบ 30)
Incrustoporiaceae		
<i>Tyromyces</i> <i>Xuchilensis</i> (Murrill) Ryvarden	PW17-171	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นบาง โค้ง ครึ่งวงกลม เนื้อเยื่อเหนียว พบการเจริญเป็นกลุ่ม ขนาด (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 3.0 – 4.0 x 4.0 – 5.0 x 0.2 – 0.3 เซนติเมตร ฐานดอกเห็ดที่ติดกับเนื้อไม้มีลักษณะคอดเล็กลง ไม่มีก้าน ขอบดอกเรียบ ดอกเห็ดแบ่งเป็นโซนสีขาวครีมและน้ำตาลอ่อน ใต้ดอกเห็ดสีเหลืองอมส้ม มีลักษณะเป็นแผ่น ริวระบายจำนวนมาก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร เบสิดิโอสปอร์: ขนาด (ยาว x กว้าง) 4.0 – 4.5 x 3.5 – 4.2 ไมครอนเมตร สีใส รูปร่างค่อนข้างกลม ผิวเรียบ (ภาพประกอบ 31)

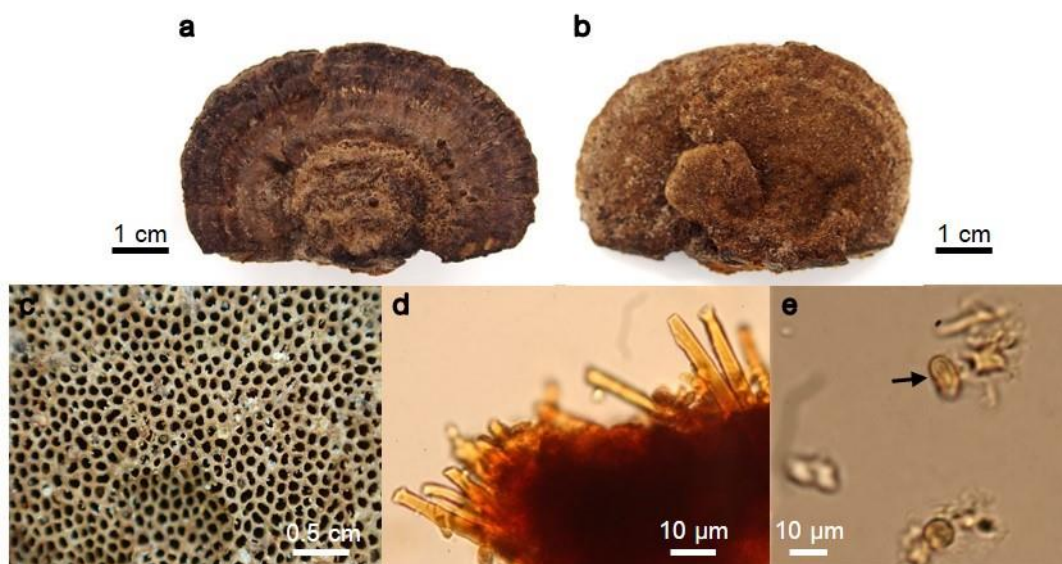
ตาราง 16 (ต่อ)

ชนิดของรา	รหัส	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
Cerenaceae		
<i>Pseudolagarobasidium</i> sp.	PP17-33	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นบาง เจริญแนบติดกับเปลือกไม้ ขนาด (กว้าง x ยาว) เท่ากับ 3.7 x 11.9 เซนติเมตร ด้านหน้ามีลักษณะคล้ายฟันปลา (teeth) เป็นแท่งกลมขนาดเล็กสีน้ำตาลอ่อน ยาวประมาณ 0.5 - 1 มิลลิเมตร เบสิดิโอสปอร์: ขนาด (ยาว x กว้าง) 3.0 – 4.7 x 2.0 – 3.0 ไมครอน สีใส รูปร่างยาวรี ปลายมน ผิวเรียบ (ภาพประกอบ 32)
Hericiaceae		
<i>Dentipellis parmastoi</i> (Nikol.) Stalpers	PW17-136	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นบาง ส่วนใหญ่เจริญแนบติดกับเปลือกไม้ ส่วนปลายเจริญตั้งขึ้นเป็นแผ่นเนื้อเยื่อเหนียว พบการเจริญเป็นแผ่น ขนาด (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 5.0 – 12.0 x 12.5 – 21.6 x 0.1 – 0.2 เซนติเมตร ด้านหลังหยาบไม่เรียบ แบ่งเป็นโซนสีครีม สลับกับสีน้ำตาลอ่อน ด้านหน้ามีลักษณะคล้ายฟันปลา เป็นแท่งกลมขนาดเล็กยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร จำนวนมาก เบสิดิโอสปอร์: ขนาด (ยาว x กว้าง) 8.5 – 11.0 x 5.5 – 6.0 ไมครอน สีใส รูปร่างกลมรี ปลายมนแคบ ผิวเรียบ พบสีที่เดียวจำนวนมาก (ภาพประกอบ 33)

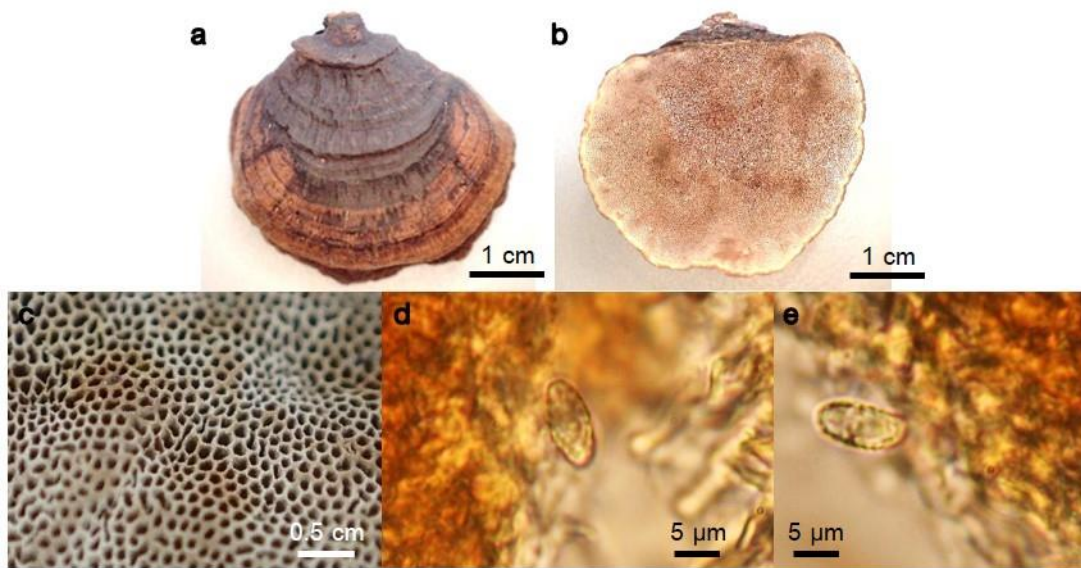
ตาราง 16 (ต่อ)

ชนิดของรา	รหัส	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
Stereaceae		
<i>Aleurodiscus</i> sp.	PW17-219	ดอกเห็ด: มีลักษณะเป็นแผ่นบาง เจริญแนบติดกับเปลือกไม้ ขนาด (กว้าง x ยาว) เท่ากับ 2.7 – 3.3 x 5.2 – 9.4 เซนติเมตร ด้านหน้าผิวเรียบ สีน้ำตาลจนถึงสีน้ำตาลอ่อน เบสิดิโอสปอร์: ขนาด (ยาว x กว้าง) 5.5 – 7.3 x 3.0 – 4.8 ไมครอน สีใส รูปร่างกลมรี ปลายมนแคบ ผิวเรียบ (ภาพประกอบ 34)

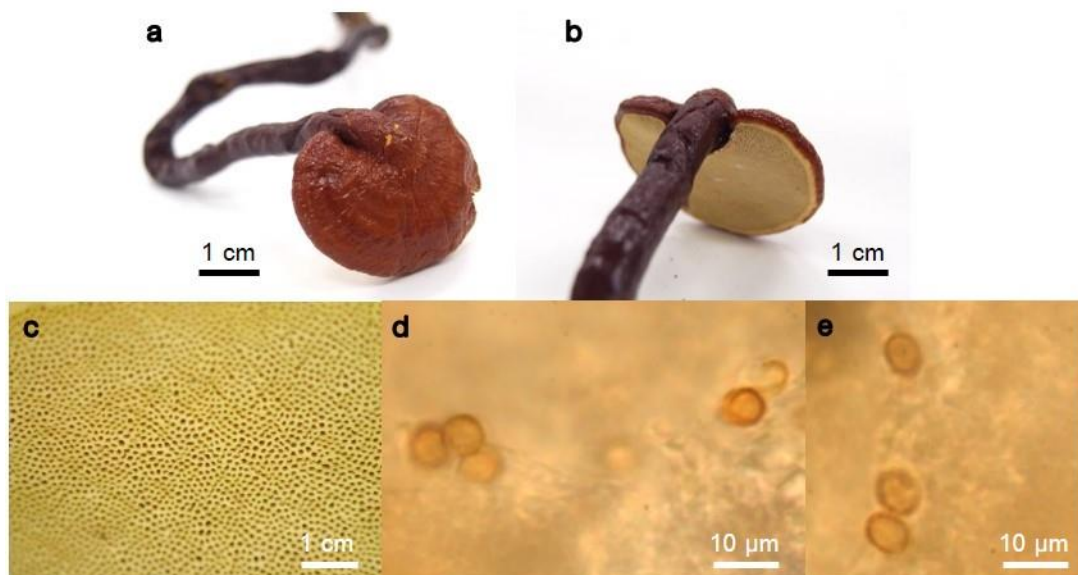
หมายเหตุ: รหัสตัวอย่างที่แสดงอักษรตัวหนาคือมีภาพประกอบ และได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว



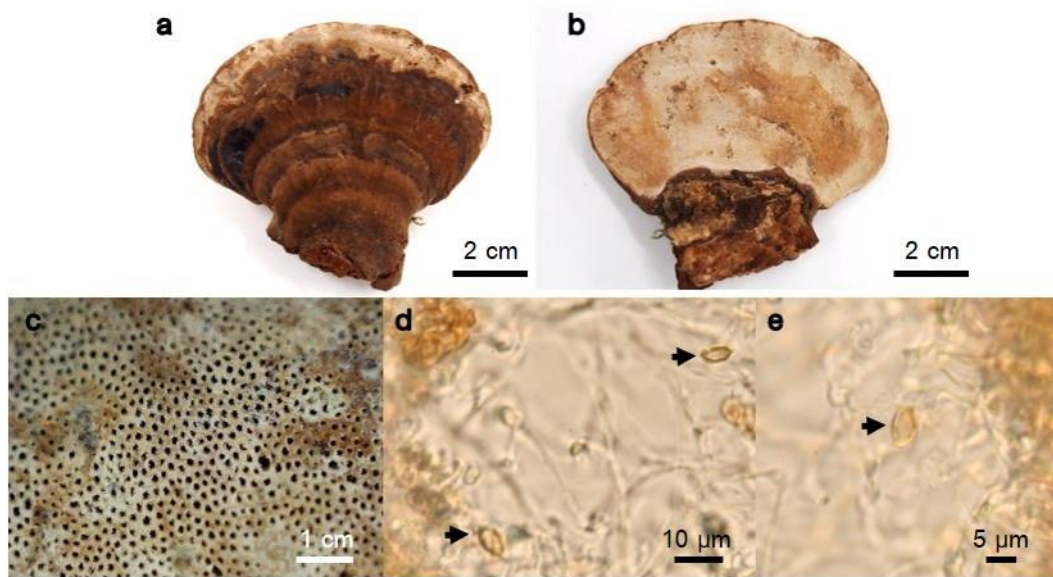
ภาพประกอบ 20 *Coriopsis aspera* (NP17-02) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด, (d) สปอร์เดี่ยว และ (e) เบสิดิโอสปอร์



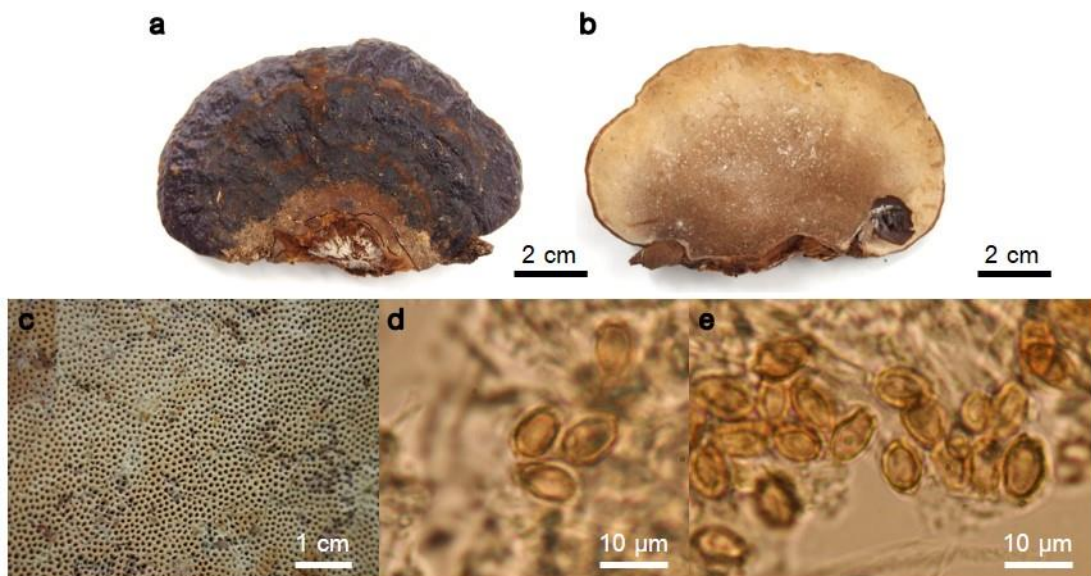
ภาพประกอบ 21 *Coriopsis retropecta* (PW17-134) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์



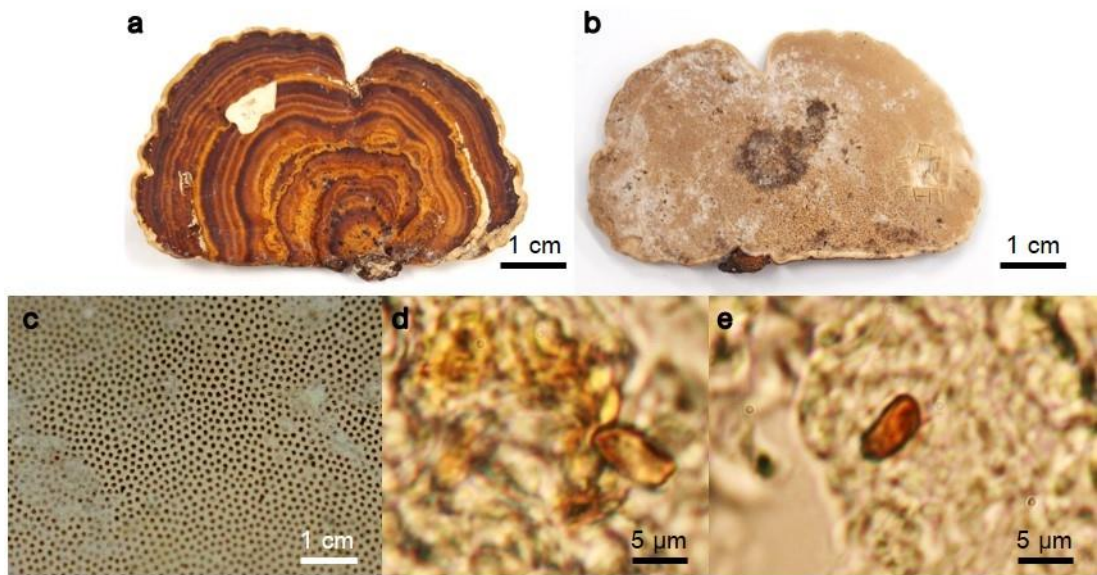
ภาพประกอบ 22 *Ganoderma lingzhi* (PW17-43) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์



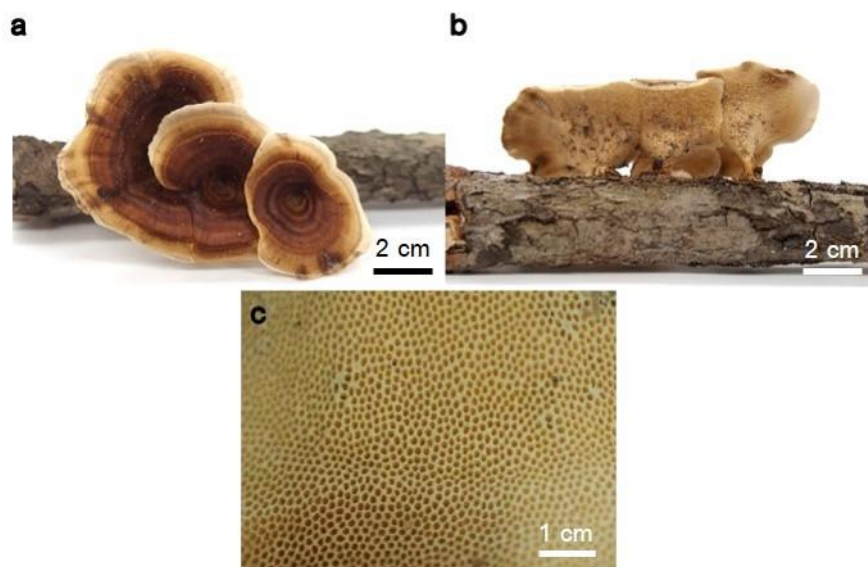
ภาพประกอบ 23 *Ganoderma* sp. 1 (PW17-145) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์



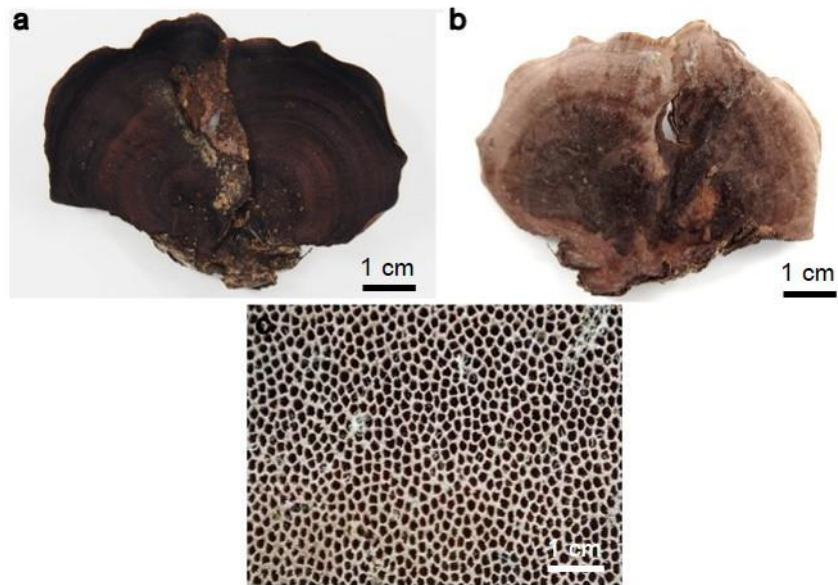
ภาพประกอบ 24 *Ganoderma* sp. 2 (PW17-111) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์



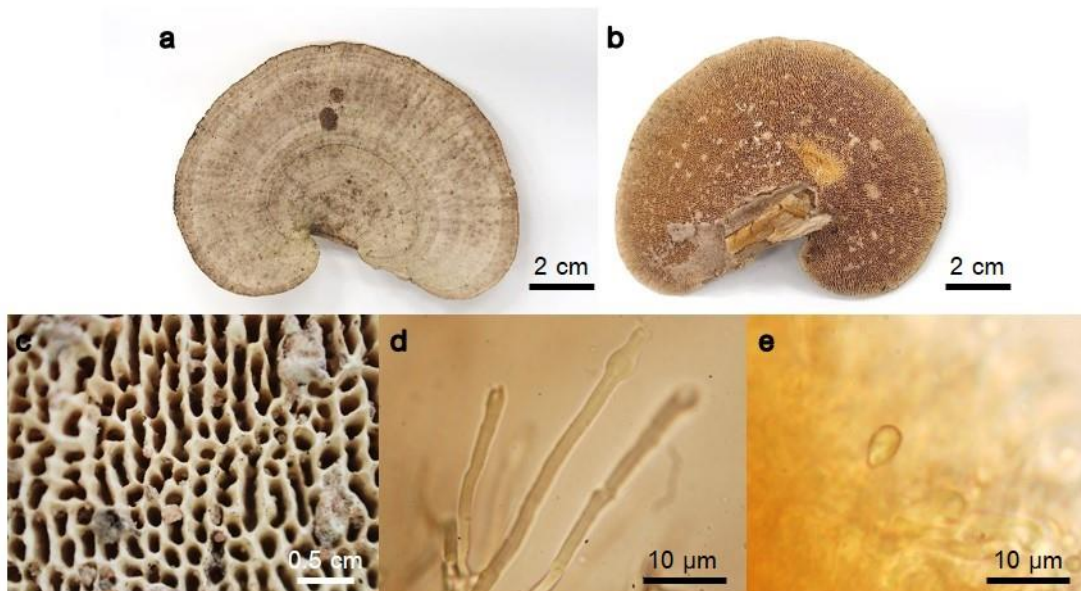
ภาพประกอบ 25 *Microporus* sp. 1 (PW17-173) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์



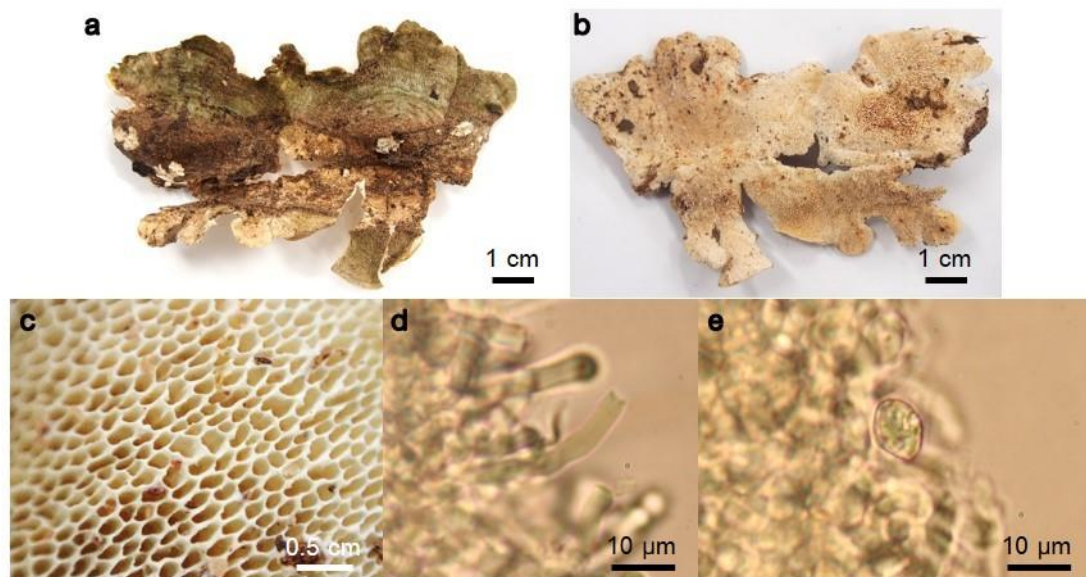
ภาพประกอบ 26 *Microporus* sp. 2 (PP17-17) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด และ (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด



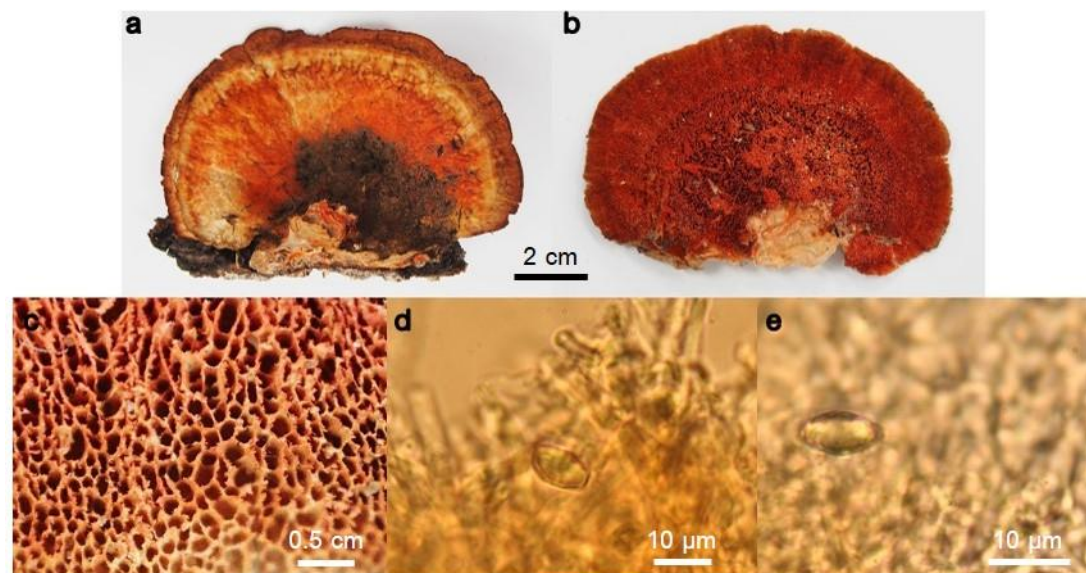
ภาพประกอบ 27 *Nigroporus vinosus* (PW17-221) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด และ (c) ลักษณะของรูปร่างด้านหลังดอกเห็ด



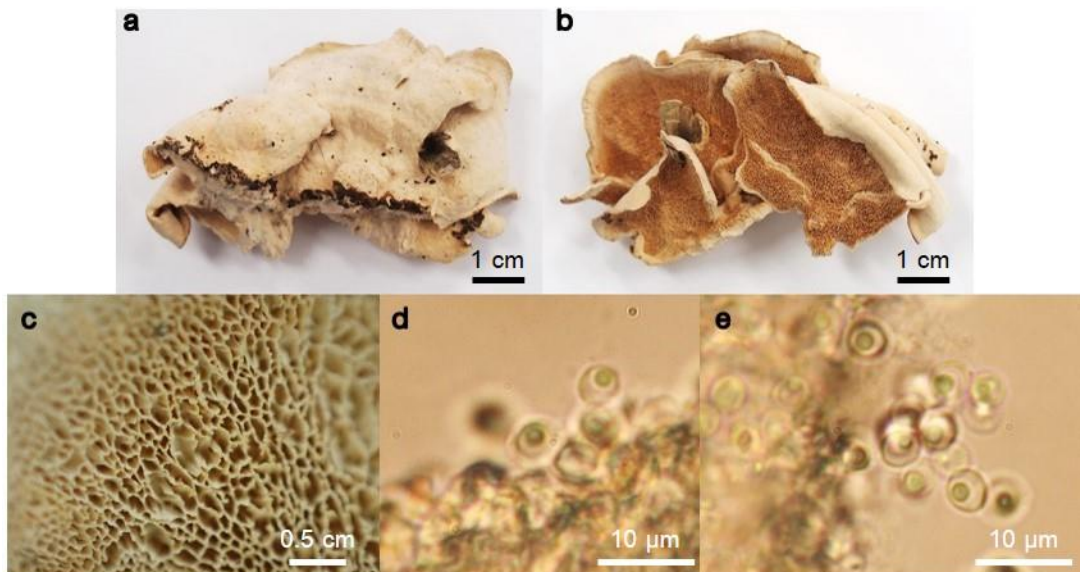
ภาพประกอบ 28 *Trametes elegans* (PP17-06) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูปร่างด้านหลังดอกเห็ด, (d) ซีสที่เดี่ยว และ (e) เบสิดิโอสปอร์



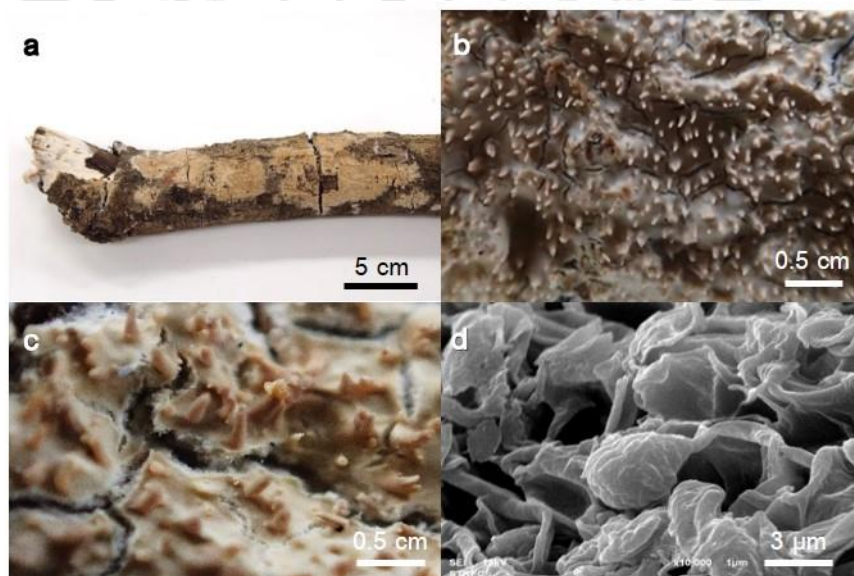
ภาพประกอบ 29 *Trametes hirsuta* (PW17-41) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูปร่างด้านหลังดอกเห็ด, (d) สปอร์เดี่ยว และ (e) เบสิดิโอสปอร์



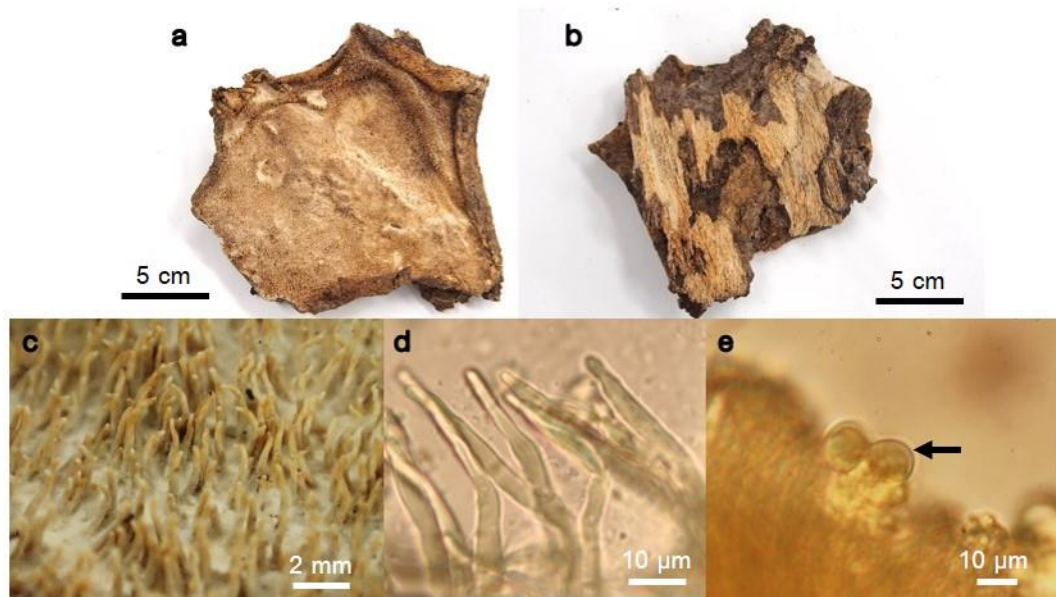
ภาพประกอบ 30 *Trametes sanguinea* (PP17-18) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูปร่างด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์



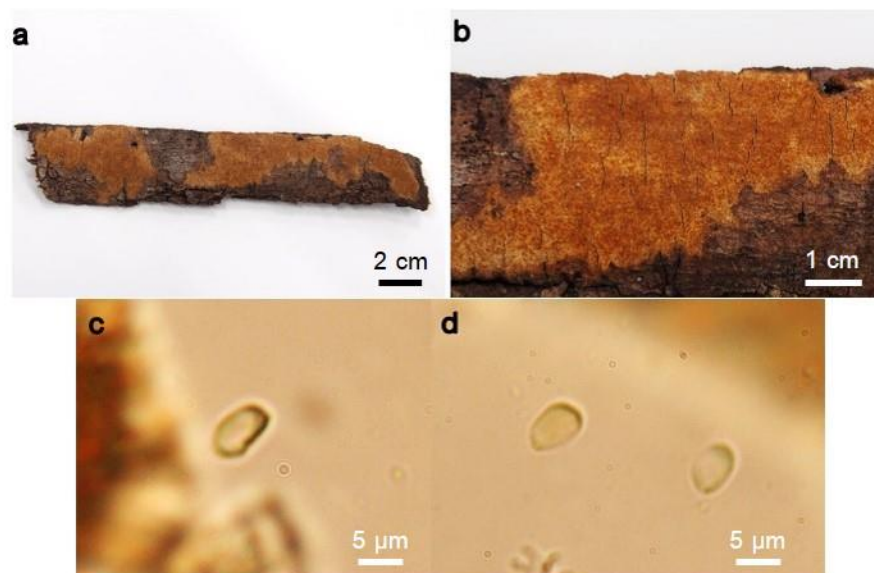
ภาพประกอบ 31 *Tyromyces xuchilensis* (PW17-171) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด และ (d-e) เบสิดิโอสปอร์



ภาพประกอบ 32 *Pseudolagarobasidium* sp. (PP17-33) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b-c) ลักษณะก้านบนดอกเห็ด และ (d) เบสิดิโอสปอร์



ภาพประกอบ 33 *Dentipellis parmastoi* (PW17-136) (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด, (d) ซีสปอร์เดี่ยว และ (e) เบสิดิโอสปอร์



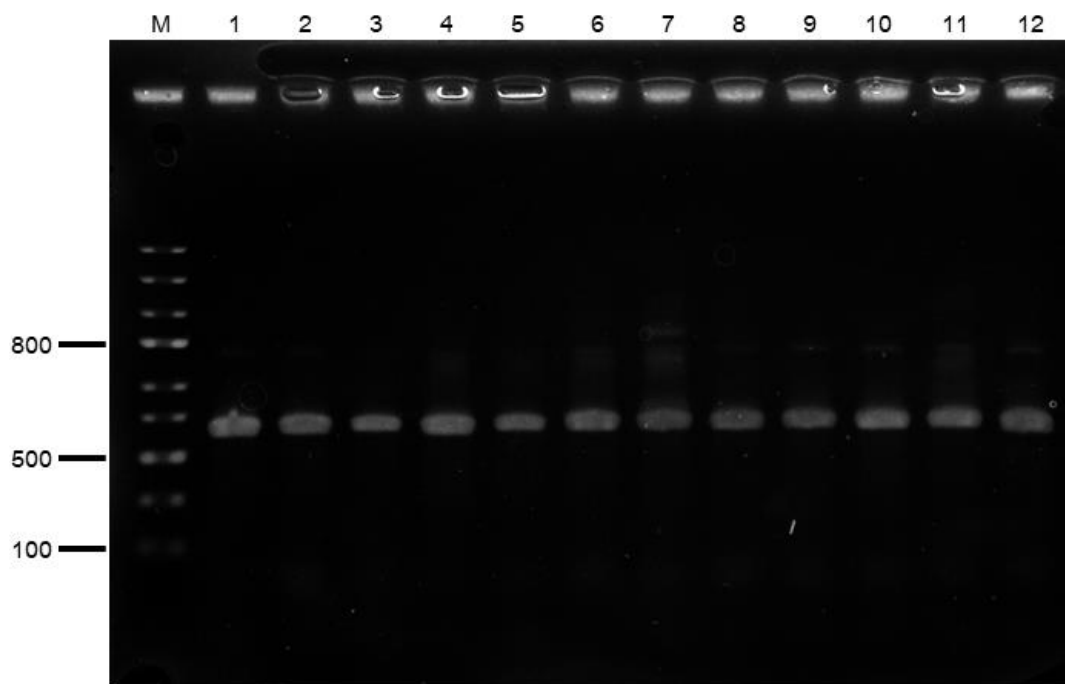
ภาพประกอบ 34 *Aleurodiscus* sp. (PW17-219) (a-b) ด้านหน้าของดอกเห็ด และ (c-d) เบสิดิโอสปอร์

4.2 การศึกษาราวไรท์รอกโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของราไวท์รอกจำนวน 24 ไอโซเลท สามารถจัดจำแนกชนิดได้ 9 สกุล 15 ชนิด (ตาราง 17) นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ต่อดัวยลักษณะทางชีววิทยาโมเลกุล โดยนำเส้นใยราบริสุทธิมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยวิธี PCR จากนั้นตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าดีเอ็นเอมีขนาดอยู่ระหว่าง 500 ถึง 800 คู่เบส เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ดังภาพประกอบ 35 หลังจากนำดีเอ็นเอไปทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำมาเทียบเคียงค่าร้อยละความเหมือน (% similarity) กับฐานข้อมูล GenBank โดยค่าร้อยละความเหมือนที่มากกว่าหรือเท่ากับ 97 แสดงว่าเป็นชนิดเดียวกัน จากผลการเทียบเคียงพบว่ามีตัวอย่างราไวท์รอกจำนวน 11 ไอโซเลท ที่มีค่าร้อยละความเหมือนมากกว่า 97 กับราที่สามารถระบุชนิดได้ในฐานข้อมูล ได้แก่ *Corioloopsis aspera* (NP17-02 และ NP17-08), *C. retropicta* (PW17-134), *Ganoderma lingzhi* (PW17-43 และ PP17-22), *Nigroporus vinosus* (PW17-221), *Trametes elegans* (PP17-06), *T. hirsuta* (PW17-41), *T. sanguinea* (PP17-18), *Tyromyces xuchilensis* (PW17-171) และ *Dentipellis parmastoi* (PW17-136) (ตาราง 17) ในขณะที่ราอีก 11 ไอโซเลท มีค่าร้อยละความเหมือนมากกว่า 97 กับราที่สามารถระบุชนิดได้มากกว่า 1 ชนิด ทำให้ราทั้ง 11 ไอโซเลท ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ในระดับชนิด ได้แก่ *Ganoderma* sp. 1 (PW17-145) ซึ่งมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99.79 กับ *G. fornicatum* (JX840349) และ *G. australe* (LC084748) ประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมากจึงยังไม่สามารถระบุชนิดได้ *Ganoderma* sp. 2 (PW17-06, PW17-111, PW17-154, PW17-177 และ PW17-230) มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99.41 กับ *G. mastoporum* (MF680427) และ *G. orbiforme* (MG279187) จึงยังไม่สามารถระบุชนิดได้ เช่นเดียวกับ *Microporus* sp. 1 (PP17-04 และ PW17-173) ที่มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 กับ *M. xanthopus* (KT273357) และ *M. vernicipes* (KP715551) ในขณะที่ *Microporus* sp. 2 (PP17-17, PP17-20 และ PP17-25) ค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 กับ *M. xanthopus* (KX580186) และร้อยละ 99 กับ *M. vernicipes* (KP715551) จึงยังไม่สามารถระบุชนิดได้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS ไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างในระดับชนิดของราบางชนิดในสกุล *Ganoderma* และ *Microporus*

ทั้งนี้มี 2 ไอโซเลท ที่มีค่าร้อยละความเหมือนน้อยกว่า 97 ได้แก่ *Pseudolagarobasidium* sp. (PP17-33) ซึ่งมีความใกล้เคียงสูงที่สุดกับ *P. belizense*

(NR120036.1) เท่ากับร้อยละ 95.53 และ *Aleurodiscus* sp. (PW17-219) มีความใกล้เคียงสูงสุดกับ *Aleurodiscus tenuissimus* (KX306876) เท่ากับร้อยละ 91.33 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของราไวท์รอตจากการศึกษาครั้งนี้ได้ฝากไว้ในฐานข้อมูล GenBank และ accession numbers แสดงในตาราง 18



ภาพประกอบ 35 ผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของตัวอย่างราไวท์รอต ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR (M) DNA ladder (1) PW17-135 (2) PW17-136 (3) PW17-139 (4) PW17-143 (5) PW17-145 (6) PW17-154 (7) PW17-155 (8) PW17-171 (9) PW17-173 (10) PW17-174 (11) PW17-177 และ (12) PW17-188

ตาราง 17 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ที่ได้จากราเห็ดที่เก็บที่ฐานข้อมูล GenBank

Phylum/Family	Species	Isolate	GenBank* accession No.	Blast results	GenBank accession No.	% Similarity
Basidiomycota						
Polyporaceae	<i>Coriopsis aspera</i>	NP17-02	MK589268	<i>Coriopsis aspera</i> strain JZ47	MG719304.1	99.82
	<i>C. aspera</i>	NP17-08	MK589269	<i>Coriopsis aspera</i> strain JZ47	MG719304.1	99.82
	<i>C. retropicta</i>	PW17-134	MK589270	<i>Coriopsis retropicta</i> voucher Dai9870	KC867404.1	100.00
	<i>Ganoderma lingzhi</i>	PW17-43	MK589272	<i>Ganoderma lingzhi</i> voucher Dai12374	JQ781867.1	100.00
	<i>G. lingzhi</i>	PP17-22	MK589278	<i>Ganoderma lingzhi</i> isolate AL- R5	MH160076.1	100.00
	<i>Ganoderma</i> sp. 1	PW17-145	MK589271	<i>Ganoderma fornicatum</i> strain BCRC35374	JX840349.1	99.79
	<i>Ganoderma</i> sp. 2	PW17-06	MK589273	<i>Ganoderma mastoporum</i> isolate K15-86	MF680427.1	99.41

ตาราง 17 (ต่อ)

Phylum/Family	Species	Isolate	GenBank* accession No.	Blast results	GenBank accession No.	% Similarity
Polyporaceae	<i>Ganoderma</i> sp. 2	PW17-111	MK589274	<i>Ganoderma mastoporium</i>	JX840350.1	99.83
				voucher TNM-F0018838		
	<i>Ganoderma</i> sp. 2	PW17-154	MK589275	<i>Ganoderma mastoporium</i>	JX840350.1	99.66
				voucher TNM-F0018838		
	<i>Ganoderma</i> sp. 2	PW17-177	MK589276	<i>Ganoderma mastoporium</i>	JX840350.1	99.83
				voucher TNM-F0018838		
	<i>Ganoderma</i> sp. 2	PW17-230	MK589277	<i>Ganoderma mastoporium</i>	JX840350.1	99.83
				voucher TNM-F0018838		
	<i>Microporus</i> sp. 1	PP17-04	MK589279	<i>Microporus xanthopus</i> voucher ELEB15a	KT273357.1	100.00
	<i>Microporus</i> sp. 1	PW17-173	MK589280	<i>Microporus verricipes</i> voucher ZJ1003DKJ03	KU863045.1	100.00
	<i>Microporus</i> sp. 2	PP17-17	MK589281	<i>Microporus</i> sp. isolate NG7	KX580186.1	99.60

ตาราง 17 (ต่อ)

Phylum/Family	Species	Isolate	GenBank* accession No.	Blast results	GenBank accession No.	% Similarity
Polyporaceae	<i>Microporus</i> sp. 2	PP17-20	MK589282	<i>Microporus xanthopus</i> isolate NG7	KX580186.1	100.00
	<i>Microporus</i> sp. 2	PP17-25	MK589283	<i>Microporus xanthopus</i> isolate NG7	KX580186.1	99.66
	<i>Nigroporus vinosus</i>	PW17-221	MK589284	<i>Nigroporus vinosus</i> isolate X839	JN710576.1	98.31
	<i>Trametes elegans</i>	PP17-06	MK589285	<i>Trametes elegans</i>	LC176779.1	100.00
	<i>T. hirsuta</i>	PW17-41	MK589286	<i>Trametes hirsuta</i> voucher 420526MF0049	MH141999.1	100.00
	<i>T. sanguinea</i>	PP17-18	MK589287	<i>Trametes sanguinea</i> strain CBS	MH857087.1	100.00
Incrustoporiaceae	<i>Tyromyces xuchilensis</i>	PW17-171	MK589288	<i>Tyromyces xuchilensis</i> voucher Dai 12234	KX161649.1	99.81

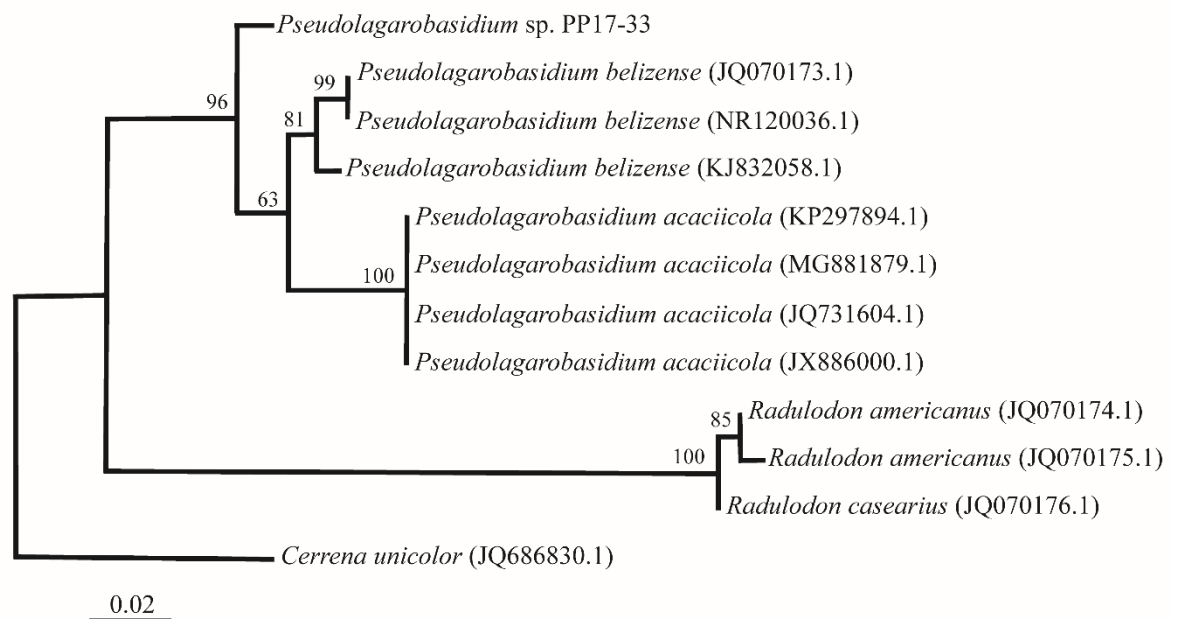
ตาราง 17 (ต่อ)

Phylum/Family	Species	Isolate	GenBank* accession No.	Blast results	GenBank accession No.	% Similarity
Cerrenaceae	<i>Pseudolagarobasidium</i>	PP17-33	MK589289	<i>Pseudolagarobasidium</i>	NR120036.1	95.53
	sp.			belizense CFMR DLC04-31		
Hericiaceae	<i>Dentipellis parmastoi</i>	PW17-136	MK589290	<i>Dentipellis parmastoi</i> voucher	JQ349113.1	99.62
				Cui 8513		
Stereaceae	<i>Aleurodiscus</i> sp.	PW17-219	MK589291	<i>Aleurodiscus tenuissimus</i> voucher Dai16124	KX306876.1	91.33

หมายเหตุ: * หมายถึง accession No. ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS จากการศึกษาครั้งนี้

4.3 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33

เนื่องจากผลการทดลองก่อนหน้านี้รา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 มีการเจริญที่ดีและสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ได้ในปริมาณสูง ซึ่งได้เลือกใช้ในการทดลองต่อไป ดังนั้นจึงได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างละเอียดเพื่อการระบุชนิด รวมทั้งความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไอโซเลท PP17-33 กับ *Pseudolagarobasidium* ชนิดต่าง ๆ จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมีเพียง 2 ชนิด รวมทั้งสกุลใกล้เคียง ได้แก่ *Radulodon* โดยกำหนดให้ *Cerrena unicolor* (JQ686830) เป็น out group⁽⁸⁰⁾ ผลแสดงในภาพประกอบ 36 ซึ่งสามารถแบ่ง clade ความสัมพันธ์ออกเป็น 2 clades ได้แก่ clade I ของราในสกุล *Pseudolagarobasidium* ประกอบด้วย 3 ชนิด ของ *P. belizense*, *P. acaciicola* และ *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 ซึ่งไอโซเลท PP17-33 แยกถึงความสัมพันธ์ออกจากอีก 2 ชนิด อย่างชัดเจนด้วยค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) ที่สูงเท่ากับร้อยละ 96 เป็นการยืนยันว่าไอโซเลท PP17-33 เป็นคนละชนิดกับ *P. belizense* และ *P. acaciicola* แต่เนื่องจากราในสกุลนี้มีรายงานทั้งสิ้น 12 ชนิด ซึ่งอีก 10 ชนิด ไม่มีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ดังนั้นจึงต้องศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท PP17-33 เทียบเคียงกับ holotype ของ *Pseudolagarobasidium* ชนิดที่ใกล้เคียงชนิดอื่น ๆ เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ที่ถูกต้องต่อไป ส่วน clade II ประกอบด้วยราสกุล *Radulodon americanus* และ *R. casearius* ซึ่งแยกออกจาก clade I ด้วยค่าความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 100 แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS สามารถแยกชนิดของราได้ในระดับสกุลและชนิด โดยเฉพาะในสกุล *Pseudolagarobasidium*



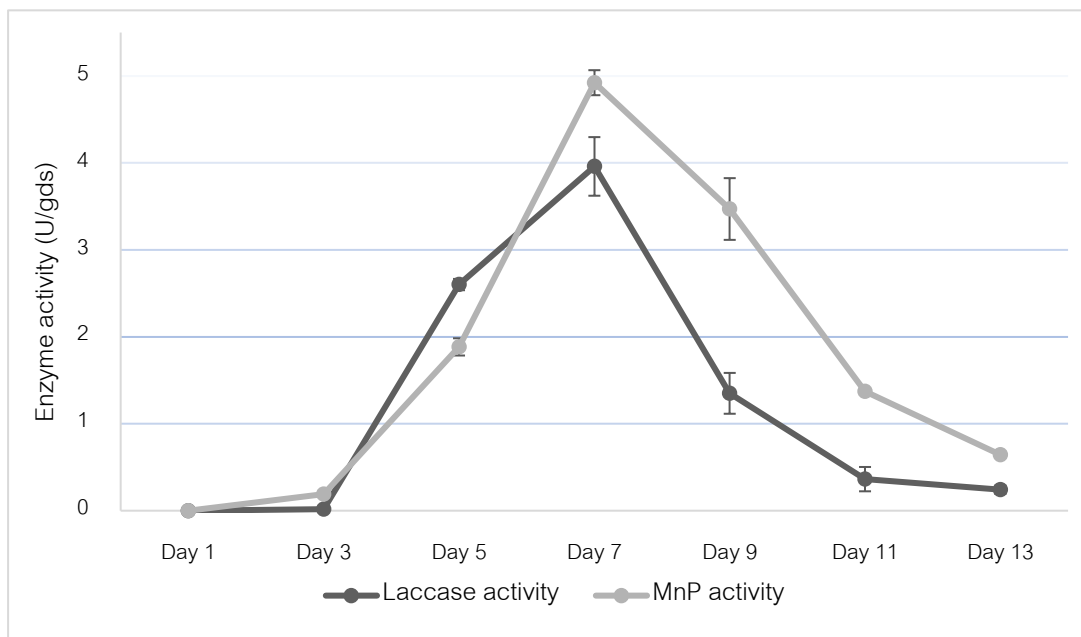
ภาพประกอบ 36 แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการของรา *Pseudolagarobasidium* กับสายพันธุ์ใกล้เคียง โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS ด้วยวิธี maximum likelihood โปรแกรม MEGA 7 ตัวเลขบนแผนภูมิแสดงค่าร้อยละความเชื่อมั่นที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ 1,000 ครั้ง

5. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โดยใช้กากตะกอนดีแคแเตอร์เป็นสารตั้งต้นด้วยวิธีทางสถิติ

จากการคัดเลือกราไวท์รอกที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิดิกได้สูง พบว่ารา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 มีกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุด ในขณะที่ลิกนินเปอร์ออกซิเดสต่ำ ดังนั้นจึงเลือกหาไอโซเลทดังกล่าวมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสต่อในกระบวนการหมักแบบแห้ง โดยใช้กากตะกอนดีแคแเตอร์เป็นสารตั้งต้นด้วยวิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติ มีลำดับดังนี้

5.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

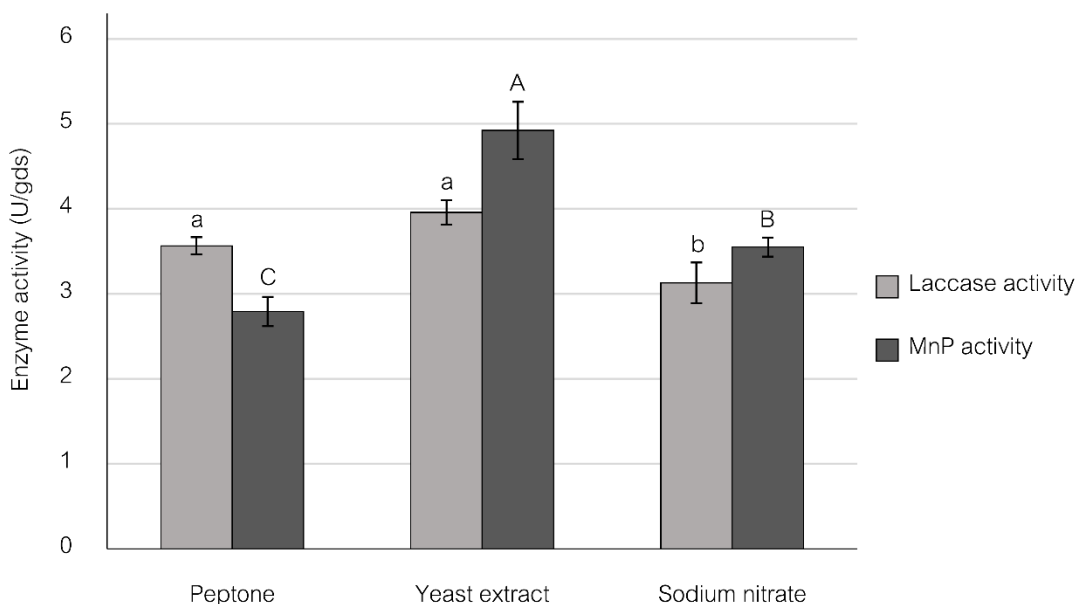
ผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตจากรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 โดยการใช้กากตะกอนดีแคแเตอร์เป็นสารตั้งต้นปริมาณ 10 กรัม ความชื้นเท่ากับ 65% ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บตัวอย่างมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดทุก 2 วัน เป็นเวลา 13 วัน และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีค่าสูงสุดในวันที่ 7 หลังจากการบ่มดังภาพประกอบ 37 (ภาคผนวก ค ตาราง 31) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้เวลาในการบ่มนาน 7 วัน ส่วนสภาวะอื่น ๆ ในการเลี้ยงเชื้อใช้ตามที่ระบุข้างต้น



ภาพประกอบ 37 กราฟแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสต่อระยะเวลาในการบ่มของรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 เมื่อใช้กากตะกอนดีแคเนเตอร์ เป็นสารตั้งต้น ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

5.2 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยใช้แหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ได้แก่ peptone, yeast extract และ sodium nitrate พบว่าเมื่อใช้ yeast extract หรือ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสสูงสุดเท่ากับ 3.9600 ± 0.144 และ 3.5667 ± 0.102 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 4.9233 ± 0.337 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อบ่มนาน 7 วัน ดังภาพประกอบ 38 (ภาคผนวก ค ตาราง 31) ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่เลือกใช้ ได้แก่ yeast extract เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงสุด



ภาพประกอบ 38 กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของรา

Pseudolagarobasidium sp. PP17-33 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ (peptone, yeast extract และ sodium nitrate) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง Mean \pm Standard Deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กคือค่าทางสถิติของเอนไซม์แลคเคส และอักษรพิมพ์ใหญ่ของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

5.3 การคัดเลือกปัจจัยของส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี PBD

จากการศึกษาปัจจัยขององค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อราที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 ตามวิธี PBD โดยทั้งสองเอนไซม์ใช้ชุดการทดลองร่วมกันและมีจำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษาเท่ากับ 9 ปัจจัย ได้แก่ glucose, yeast extract, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ tween-80 โดยกำหนดแทนด้วยตัวอักษร X1 – X9 ตามลำดับ และกำหนดค่าของแต่ละปัจจัย 2 ระดับ ได้แก่ ระดับต่ำ (-1) และระดับสูง (+1) โดยค่ากลาง (0) คือค่าที่คาดการณ์ว่าน่าจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด (ตาราง 9) สามารถออกแบบการทดลองได้จำนวน 13 ชุดการทดลอง โดยทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ รายละเอียดของแต่ละชุดการทดลองและผลของกิจกรรมเอนไซม์แสดงในตาราง 18 พบว่าชุดการทดลองที่ 7 ให้ค่ากิจกรรม

ของเอนไซม์สูงที่สุดโดยเอนไซม์แลคเคสมีค่าเท่ากับ 3.053 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าเท่ากับ 3.313 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยมีปัจจัยการทดลอง (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ glucose 2 กรัม, yeast extract 1 กรัม, KH_2PO_4 0.1 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 กรัม, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 กรัม, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.075 กรัม, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.375 กรัม, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 กรัม และ tween-80 0.15 กรัม (pH 5) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน



ตาราง 18 กิจกรรมของเอนไซม์แลคเตสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิต์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) จากการศึกษาปัจจัยทั้ง 9 ปัจจัยด้วยวิธี PBD

การทดลอง	ปัจจัย									กิจกรรมของ	
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	เอนไซม์แลคเตส (ยูนิต์ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	กิจกรรมของเอนไซม์ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิต์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)
1	8	4.0	0.1	0.75	0.015	0.075	0.125	0.005	0.05	1.410	1.990
2	8	1.0	0.7	0.75	0.015	0.025	0.125	0.005	0.15	1.764	2.216
3	2	4.0	0.7	0.75	0.005	0.025	0.125	0.015	0.05	1.572	2.893
4	8	4.0	0.7	0.25	0.005	0.025	0.375	0.005	0.15	2.422	2.973
5	8	4.0	0.1	0.25	0.005	0.075	0.125	0.015	0.15	1.687	2.156
6	8	1.0	0.1	0.25	0.015	0.025	0.375	0.015	0.05	2.555	2.570
7	2	1.0	0.1	0.75	0.005	0.075	0.375	0.005	0.15	3.053	3.313
8	2	1.0	0.7	0.25	0.015	0.075	0.125	0.015	0.15	2.048	2.966
9	2	4.0	0.1	0.75	0.015	0.025	0.375	0.015	0.15	2.140	2.516
10	8	1.0	0.7	0.75	0.005	0.075	0.375	0.015	0.05	2.581	3.198

ตาราง 18 (ต่อ)

การทดลอง	ปัจจัย									กิจกรรมของเอนไซม์ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิต์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9		
11	2	4.0	0.7	0.25	0.015	0.075	0.375	0.005	0.05	1.892	3.080
12	2	1.0	0.1	0.25	0.005	0.025	0.125	0.005	0.05	1.898	2.786
13	5	2.5	0.4	0.50	0.010	0.050	0.250	0.010	0.10	2.255	2.656

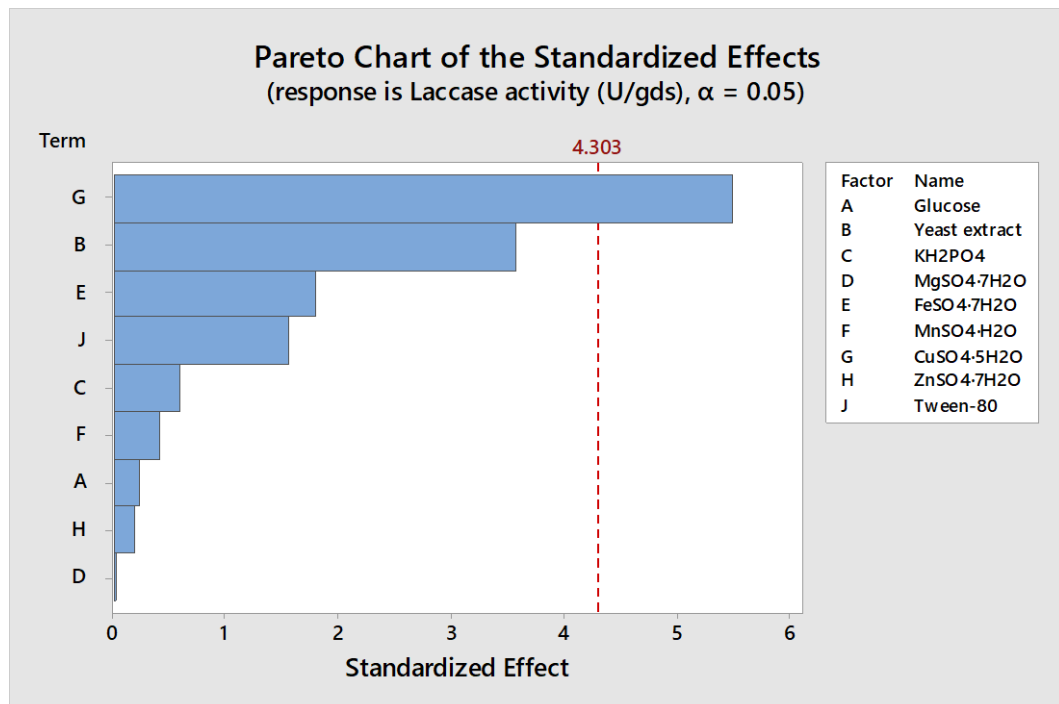
หมายเหตุ : X1 = glucose, X2 = yeast extract, X3 = KH_2PO_4 , X4 = $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, X5 = $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, X6 = $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, X7 = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, X8 = $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ X9 = tween-80 หน่วยคือ กรัมต่อลิตร

5.3.1 เอนไซม์แลคเคส

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (ตาราง 19) พบว่า มีค่าระดับความเป็นอิสระ (degree of freedom; DF) เท่ากับ 10 โดยปัจจัยที่ส่งผลกับผลตอบสนองหรือเอนไซม์แลคเคสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คือ มีค่า p -value น้อยกว่า 0.05 ได้แก่ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ มีค่าเท่ากับ 0.032 ดังแสดงบนกราฟพาเรโต (Pareto chart) ที่ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ มีค่ามากกว่าเส้นวิกฤตจึงส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ดังภาพประกอบ 39 ส่วนการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (R-squared; r^2) มีค่าเท่ากับ 96.14% และค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ที่ปรับค่าแล้ว (adjusted R-Squared; r^2_{adj}) เท่ากับ 76.81% ซึ่งถือว่ายอมรับได้ (ค่าที่ยอมรับได้ต้องมากกว่า 70%) ดังแสดงในตาราง 20

ตาราง 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการถดถอยเชิงพหุคูณต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี PBD

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	10	2.50047	0.25005	4.98	0.179
Linear	9	2.47384	0.27487	5.47	0.164
Glucose	1	0.00282	0.00282	0.06	0.835
Yeast extract	1	0.64218	0.64218	12.78	0.070
KH_2PO_4	1	0.01794	0.01794	0.36	0.611
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	0.00003	0.00003	0.00	0.984
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	0.16427	0.16427	3.27	0.212
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1	0.00853	0.00853	0.17	0.720
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1	1.51514	1.51514	30.15	0.032
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	0.00173	0.00173	0.03	0.870
Tween-80	1	0.12120	0.12120	2.41	0.261
Curvature	1	0.02662	0.02662	0.53	0.542
Error	2	0.10051	0.05026		
Total	12	2.60098			



ภาพประกอบ 39 กราฟพารेटโต้แสดงปัจจัยของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ที่มีค่ามากกว่าเส้นวิกฤตซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตาราง 20 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แลคเคสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี PBD

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		1.790	0.368	4.86	0.040	
Glucose	-0.0102	-0.0051	0.0216	-0.24	0.835	1.00
Yeast extract	-0.3084	-0.1542	0.0431	-3.57	0.070	1.00
KH ₂ PO ₄	-0.258	-0.129	0.216	-0.60	0.611	1.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.012	0.006	0.259	0.02	0.984	1.00
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-46.8	-23.4	12.9	-1.81	0.212	1.00
MnSO ₄ ·H ₂ O	2.13	1.07	2.59	0.41	0.720	1.00
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5.685	2.843	0.518	5.49	0.032	1.00
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.8	2.4	12.9	0.19	0.870	1.00
Tween-80	4.02	2.01	1.29	1.55	0.261	1.00
Ct Pt		0.170	0.233	0.73	0.542	1.00

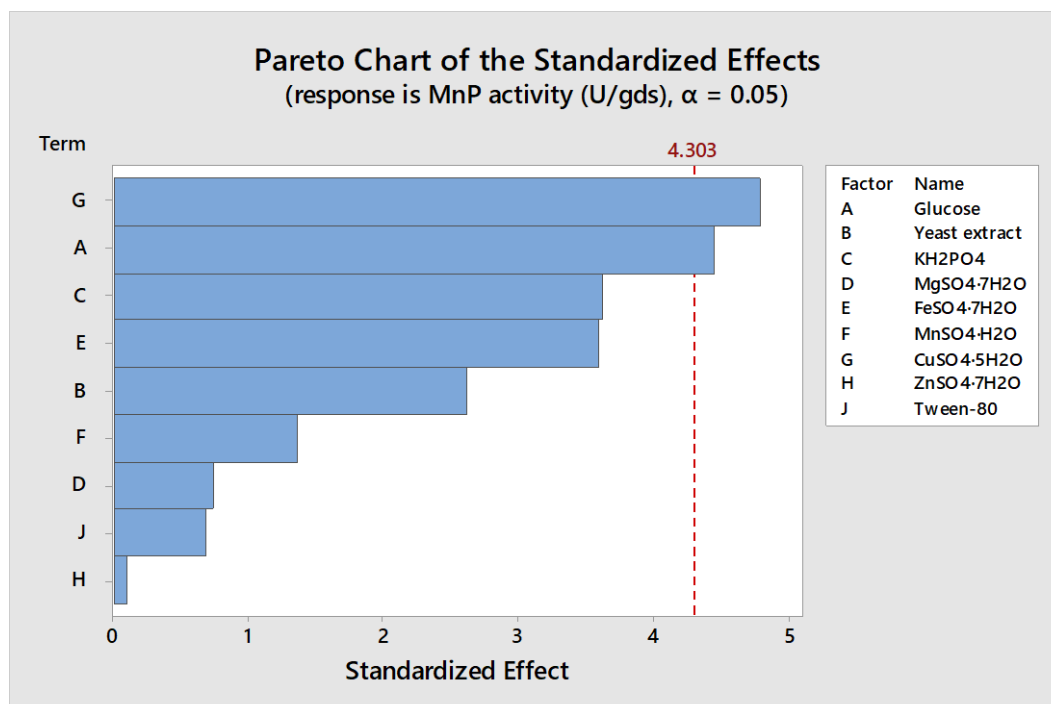
หมายเหตุ : ค่า R-squared = 96.14% และ adjusted R-Squared = 76.81%

5.3.2 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส พบว่า มีค่า DF เท่ากับ 10 โดยปัจจัยที่ส่งผลกับผลตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญซึ่งมีค่า *p*-value น้อยกว่า 0.05 ได้แก่ glucose มีค่าเท่ากับ 0.047 และ CuSO₄·5H₂O มีค่าเท่ากับ 0.032 ดังตาราง 21 สอดคล้องกับกราฟฟารเรโตซึ่งแสดงว่า glucose และ CuSO₄·5H₂O มีค่ามากกว่าเส้นวิกฤตซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังภาพประกอบ 40 ส่วนการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส พบว่า *r*² มีค่าเท่ากับ 97.52% และ *r*²_{adj} มีค่าเท่ากับ 85.12% ซึ่งถือว่ายอมรับได้ ดังแสดงในตาราง 22

ตาราง 21 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการถดถอยเชิงพหุคูณต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แอมกานีสเปอร้ออกซิเดสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี PBD

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	10	1.99098	0.199098	7.87	0.118
Linear	9	1.98703	0.220781	8.72	0.107
Glucose	1	0.50062	0.500617	19.78	0.047
Yeast extract	1	0.17304	0.173040	6.84	0.120
KH ₂ PO ₄	1	0.33167	0.331669	13.10	0.069
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	0.01367	0.013669	0.54	0.539
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1	0.32703	0.327030	12.92	0.069
MnSO ₄ ·H ₂ O	1	0.04675	0.046750	1.85	0.307
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1	0.58212	0.582121	23.00	0.041
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1	0.00029	0.000290	0.01	0.925
Tween-80	1	0.01184	0.011844	0.47	0.565
Curvature	1	0.00395	0.003950	0.16	0.731
Error	2	0.05062	0.025309		
Total	12	2.04160			



ภาพประกอบ 40 กราฟพาเรโตแสดงปัจจัยของ CuSO₄·5H₂O และ glucose ที่มีค่ามากกว่าเส้นวิกฤตซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความ

เชื่อมั่นร้อยละ 95

ตาราง 22 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดล้นใจต่อกิจกรรมของ
เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี PBD

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		2.945	0.261	11.28	0.008	
Glucose	-0.1362	-0.0681	0.0153	-4.45	0.047	1.00
Yeast extract	-0.1601	-0.0801	0.0306	-2.61	0.120	1.00
KH ₂ PO ₄	1.108	0.554	0.153	3.62	0.069	1.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-0.270	-0.135	0.184	-0.73	0.539	1.00
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-66.03	-33.02	9.18	-3.59	0.069	1.00
MnSO ₄ ·H ₂ O	4.99	2.50	1.84	1.36	0.307	1.00
CuSO ₄ ·5H ₂ O	3.524	1.762	0.367	4.80	0.041	1.00
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-1.97	-0.98	9.18	-0.11	0.925	1.00
Tween-80	-1.257	-0.628	0.918	-0.68	0.565	1.00
Ct Pt		-0.065	0.166	-0.40	0.731	1.00

หมายเหตุ : ค่า R-squared = 97.52% และ adjusted R-Squared = 85.12%

ผลจากการศึกษาปัจจัยจำนวน 9 ปัจจัย ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 โดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH ตั้งต้นเท่ากับ 5.0 นาน 7 วัน พบว่าความเข้มข้นของ CuSO₄·5H₂O มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิด ในขณะที่ความเข้มข้นของ glucose มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ดังนั้นจึงนำปัจจัยทั้งสองชนิดมาศึกษาต่อเพื่อหาจุดที่สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้สูงที่สุดโดยวิธีการหาพื้นที่ผิวตอบสนอง ส่วนปัจจัยอื่น ๆ อีก 7 ปัจจัยเลือกใช้ตามชุดการทดลองที่ 7 (ตาราง 9) ซึ่งให้ค่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงที่สุด

5.4 การหาพื้นที่ผิวตอบสนองที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี CCD

นำปัจจัยที่ได้จากการคัดเลือกมาศึกษาหาจุดที่เหมาะสมโดยการหาพื้นที่ผิวตอบสนองด้วยวิธี CCD ต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสโดยมีปัจจัยที่ทำการศึกษจำนวน 2 ปัจจัย ได้แก่ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (X1) และ glucose (X2) โดยค่าที่กำหนดคำนวณตามวิธี CCD แสดงดังตาราง 12 สามารถออกแบบการทดลองได้จำนวน 13 ชุดการทดลอง (ตาราง 23) โดยทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ จากผลการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสมีค่าสูงที่สุดในชุดการทดลองที่ 4 เท่ากับ 6.183 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยใช้ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.375 กรัมต่อลิตร และ glucose ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 8 กรัมต่อลิตร ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าสูงที่สุดในชุดการทดลองที่ 6 เท่ากับ 5.560 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยใช้ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.426 กรัมต่อลิตร และ glucose ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร (ตาราง 23)

ตาราง 23 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการทดลองและ
การทำนายจากสมการถดถอย

การทดลอง	X1	X2	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	
			แลคเคส	แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
1	0.125	2	3.971	4.233
2	0.375	2	5.031	5.400
3	0.125	8	4.211	4.553
4	0.375	8	6.183	4.980
5	0.073	5	4.116	4.546
6	0.426	5	5.546	5.560
7	0.25	0.758	4.660	4.346
8	0.25	9.242	4.620	4.700
9	0.25	5	5.315	4.850
10	0.25	5	5.820	4.920
11	0.25	5	5.570	4.740
12	0.25	5	5.810	4.840
13	0.25	5	5.765	4.940

หมายเหตุ: X1 = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ X2 = glucose (หน่วยคือ กรัมต่อลิตร)

5.4.1 เอนไซม์แลคเคส

การวิเคราะห์สมการถดถอย

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ ความแปรปรวน และอิทธิพลของความเข้มข้น $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose ต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD (ตาราง 24) พบว่าแบบจำลองมีค่า F-value และ p-value เท่ากับ 13.86 และ 0.0016 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) ได้แก่ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (A), พจน์กำลังสองของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (A^2) และ พจน์กำลังสองของ glucose (B^2) ซึ่งมีค่า p-value เท่ากับ 0.0005, 0.0106 และ 0.0035 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ทั้งกำลังหนึ่งและกำลังสองมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ในขณะที่ความเข้มข้นของ glucose กำลังสองเท่านั้นที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient estimate) (ตาราง 25) ของตัวแปรที่มีอิทธิพล (A, A^2 , B^2) พบว่าพจน์กำลังสองของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (A^2) และ พจน์กำลังสองของ glucose (B^2) มีค่าเท่ากับ -0.3841 และ -0.4796 ตามลำดับ เนื่องจากค่าดังกล่าวเป็นค่าลบ แสดงให้เห็นว่าตัวแปรทั้งสองมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสในเชิงลบ กล่าวคือถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose สูงขึ้น จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสลดลง จากผลที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถเขียนสมการความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและผลตอบสนองต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} &= 2.005 + 14.31 \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \\ &+ 0.437 \text{ Glucose} - 24.58 \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} * \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0.0533 \text{ Glucose} * \text{Glucose} \\ &+ 0.608 \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} * \text{Glucose} \end{aligned} \quad (\text{สมการที่ 1})$$

ตาราง 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการถดถอยเชิงพหุคูณต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แลคเคสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-Value
Model	5.96	5	1.19	13.86	0.0016
A-CuSO ₄ ·5H ₂ O	3.19	1	3.19	37.15	0.0005
B-Glucose	0.2229	1	0.2229	2.59	0.1513
AB	0.2079	1	0.2079	2.42	0.1638
A ²	1.03	1	1.03	11.94	0.0106
B ²	1.60	1	1.60	18.62	0.0035
Residual	0.6017	7	0.0860		
Lack of Fit	0.4155	3	0.1385	2.98	0.1598
Pure Error	0.1862	4	0.0465		
Cor Total	6.56	12			

ตาราง 25 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดล้นใจต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แลคเคสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD

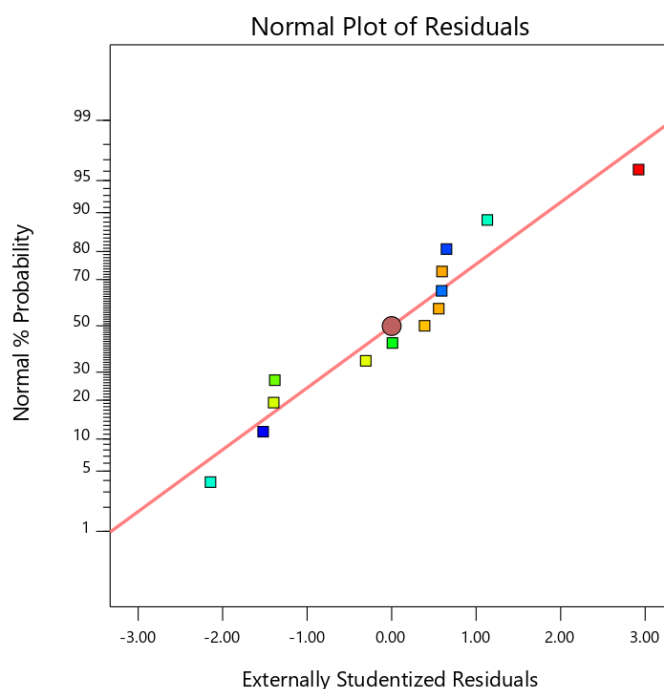
Factor	Coefficient	df	Standard	95% CI		VIF
	Estimate		Error	Low	High	
Intercept	5.66	1	0.1311	5.35	5.97	
A-CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.6318	1	0.1037	0.3867	0.8769	1.0000
B-Glucose	0.1669	1	0.1037	-0.0782	0.4120	1.0000
AB	0.2280	1	0.1466	-0.1186	0.5746	1.0000
A ²	-0.3841	1	0.1112	-0.6470	-0.1213	1.02
B ²	-0.4796	1	0.1112	-0.7425	-0.2168	1.02

หมายเหตุ : ค่า R-squared = 90.83% และ adjusted R-Squared = 84.27%

การตรวจสอบสมการถดถอย

จากค่าความเหมาะสมของสมการถดถอย (lack of fit) ที่ได้จากการทดลองมีค่า p -value เท่ากับ 0.1598 แสดงว่าสมการที่ได้จากการคำนวณมีความเหมาะสม เนื่องจากค่า p -value > 0.05 นอกจากนี้การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส พบว่ามีค่าเท่ากับ 90.83% และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว (r^2_{adj}) เท่ากับ 84.27% (ตาราง 25) สามารถอธิบายได้ว่าสมการถดถอยที่ได้สามารถอธิบายผลตอบสนองต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (หรือตัวแปรตาม) ได้เท่ากับ 84.27% ซึ่งมาจากอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษา ในขณะที่อีก 15.73% อาจมาจากอิทธิพลของปัจจัยอื่น

ส่วนการวิเคราะห์ค่าความคลาดเคลื่อน (residual analysis) จากการศึกษาข้อมูลบนกราฟ normal plot of residuals พบว่ามีการกระจายตัวของค่าความคลาดเคลื่อนเป็นการแจกแจงแบบปกติ คือกระจายใกล้แนวเส้นตรงซึ่งเป็นค่ามาตรฐาน ดังภาพประกอบ 41



ภาพประกอบ 41 กราฟ normal plot of residuals ของค่าความคลาดเคลื่อนจากข้อมูลในการวิเคราะห์สมการถดถอยของกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส

5.4.2 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

การวิเคราะห์สมการถดถอย

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ ความแปรปรวน และอิทธิพลของความเข้มข้น $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose ต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD (ตาราง 26) พบว่าแบบจำลองมีค่า F-value และ p-value เท่ากับ 30.57 และ 0.0001 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} < 0.05$) ได้แก่ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (A), พจน์อิทธิพลร่วมระหว่าง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose (AB), พจน์กำลังสองของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (A^2) และ พจน์กำลังสองของ glucose (B^2) ซึ่งมีค่า p-value เท่ากับ 0.0001, 0.0085, 0.0388 และ 0.0036 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของตัวแปรต่าง ๆ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ยกเว้นตัวแปรของความเข้มข้น glucose (B) เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient estimate) (ตาราง 27) ของตัวแปรที่มีอิทธิพล (A, AB, A^2 , B^2) พบว่าพจน์อิทธิพลร่วมระหว่าง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose (AB) และพจน์กำลังสองของ glucose (B^2) มีค่าเท่ากับ -0.1850 และ -0.1666 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเป็นลบ แสดงว่าตัวแปรทั้งสองมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเชิงลบ กล่าวคือถ้าเพิ่มความเข้มข้นของพจน์อิทธิพลร่วม และ glucose สูงขึ้น จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสลดลง จากผลที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถเขียนสมการความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและผลตอบสนองต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{กิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} &= 3.332 \\ &+ 2.35 \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.3252 \text{ Glucose} + 6.30 \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} * \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - \\ &0.01851 \text{ Glucose} * \text{Glucose} - 0.493 \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} * \text{Glucose} \end{aligned} \quad (\text{สมการที่ 2})$$

ตาราง 26 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการถดถอยเชิงพหุคูณต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-Value
Model	1.60	5	0.3197	30.57	0.0001
A-CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.15	1	1.15	109.60	< 0.0001
B-Glucose	0.0201	1	0.0201	1.92	0.2085
AB	0.1369	1	0.1369	13.09	0.0085
A ²	0.0673	1	0.0673	6.44	0.0388
B ²	0.1931	1	0.1931	18.47	0.0036
Residual	0.0732	7	0.0105		
Lack of Fit	0.0483	3	0.0161	2.59	0.1903
Pure Error	0.0249	4	0.0062		
Cor Total	1.67	12			

ตาราง 27 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดลินใจต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD

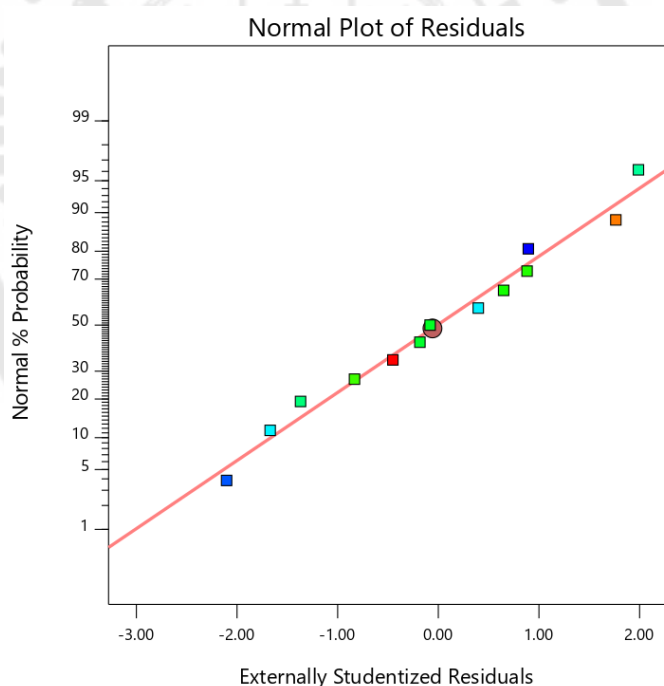
Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	4.86	1	0.0457	4.75	4.97	
A- CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.3785	1	0.0362	0.2930	0.4640	1.0000
B-Glucose	0.0501	1	0.0362	-0.0354	0.1356	1.0000
AB	-0.1850	1	0.0511	-0.3059	-0.0641	1.0000
A ²	0.0984	1	0.0388	0.0067	0.1901	1.02
B ²	-0.1666	1	0.0388	-0.2583	-0.0749	1.02

หมายเหตุ : ค่า R-squared = 95.62% และ adjusted R-Squared = 92.49%

การตรวจสอบสมการถดถอย

จากค่าความเหมาะสมของสมการถดถอย (lack of fit) ที่ได้จากการทดลองมีค่า p -value เท่ากับ 0.1903 แสดงว่าสมการที่ได้จากการคำนวณมีความเหมาะสม ส่วนการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสิ้นใจ (r^2) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส พบว่ามีค่าเท่ากับ 95.62% และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสิ้นใจที่ปรับค่าแล้ว (r^2_{adj}) เท่ากับ 92.49% (ตาราง 27) สามารถอธิบายได้ว่าสมการถดถอยที่ได้สามารถอธิบายผลตอบสนองต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ได้เท่ากับ 92.49% ซึ่งมาจากอิทธิพลจากปัจจัยที่ศึกษา ในขณะที่อีก 7.51% อาจมาจากอิทธิพลของปัจจัยอื่น

ส่วนการวิเคราะห์ค่าความคลาดเคลื่อน (residual analysis) จากการศึกษาค่าความคลาดเคลื่อน (residual analysis) จากการศึกษาข้อมูลบนกราฟ normal plot of residuals พบว่ามีการกระจายตัวของค่าความคลาดเคลื่อนเป็นการแจกแจงแบบปกติ คือกระจายใกล้แนวเส้นตรงซึ่งเป็นค่ามาตรฐาน ดังภาพประกอบ 42



ภาพประกอบ 42 กราฟ normal plot of residuals ของค่าความคลาดเคลื่อนจากข้อมูลในการวิเคราะห์สมการถดถอยของกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

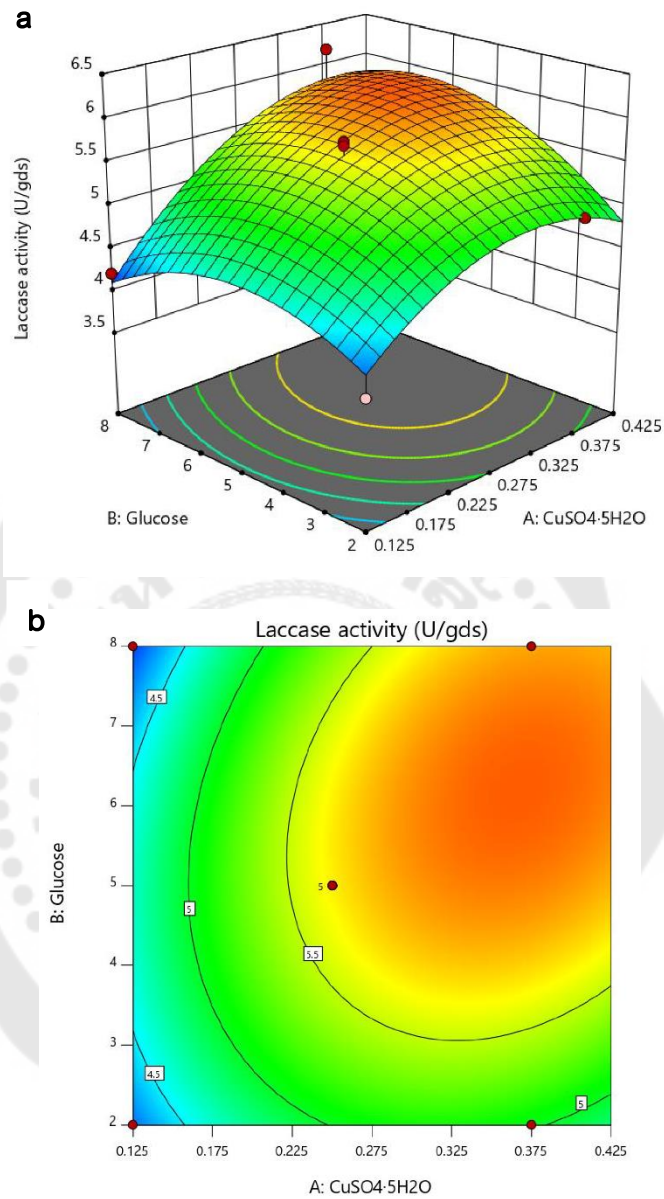
5.4.3 การทำนายค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากสมการถดถอย

ผลจากการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD ของปัจจัย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose ที่ผลิตจากรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 โดยใช้กากตะกอนดีแคแคโนเตอร์เป็นสารตั้งต้น สามารถสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของปัจจัยและผลตอบสนองของกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (สมการที่ 1) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (สมการที่ 2) สามารถใช้สมการทำนายกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ ผลแสดงในตาราง 28 จากนั้นนำค่าที่ทำนายมาสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง และแผนภาพคอนทัวร์ของปัจจัยทั้ง 2 ชนิดที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (ภาพประกอบ 43) และเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ภาพประกอบ 44) ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการทำนายมีความใกล้เคียงกับค่าจริงที่วัดได้จากการทดลอง

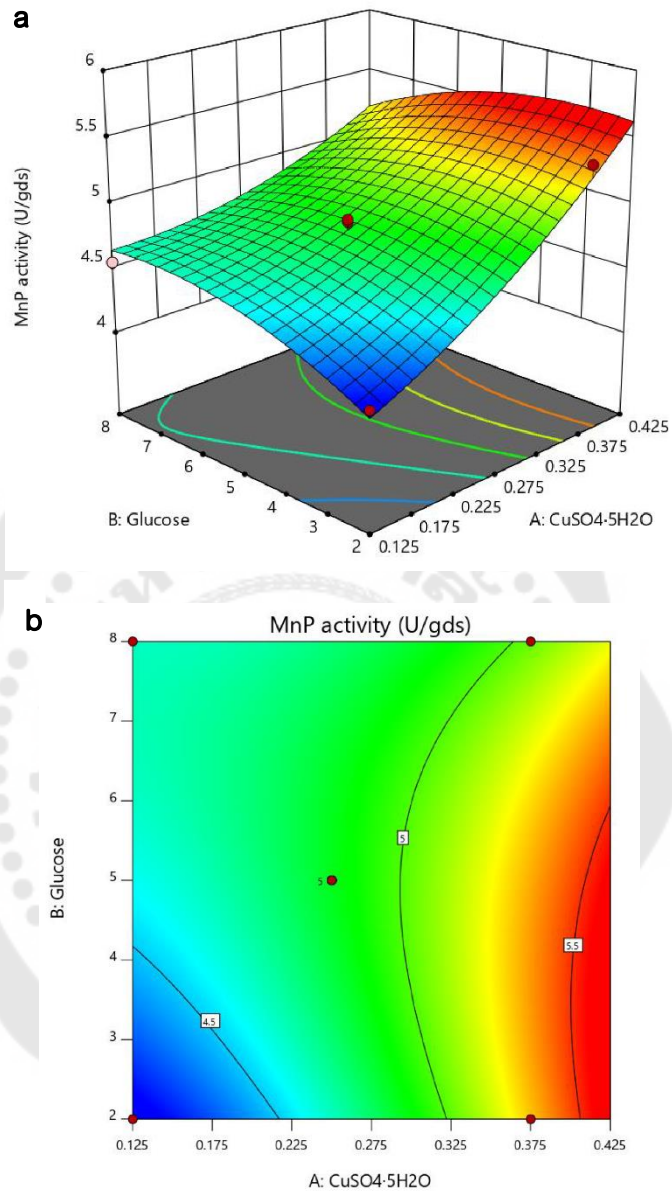
ตาราง 28 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเตสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการทดลองและการทำนายจากสมการถดถอย

การทดลอง	X1	X2	กิจกรรมของเอนไซม์แลคเตส		กิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	
			ค่าจากการทดลอง	ค่าทำนาย	ค่าจากการทดลอง	ค่าทำนาย
1	0.125	2	3.971	4.221	4.233	4.176
2	0.375	2	5.031	5.029	5.400	5.303
3	0.125	8	4.211	4.099	4.553	4.646
4	0.375	8	6.183	5.818	4.980	5.033
5	0.073	5	4.116	3.994	4.546	4.519
6	0.426	5	5.546	5.781	5.560	5.590
7	0.25	0.758	4.660	4.460	4.346	4.453
8	0.25	9.242	4.620	4.932	4.700	4.595
9	0.25	5	5.315	5.656	4.850	4.858
10	0.25	5	5.820	5.656	4.920	4.858
11	0.25	5	5.570	5.656	4.740	4.858
12	0.25	5	5.810	5.656	4.840	4.858
13	0.25	5	5.765	5.656	4.940	4.858

หมายเหตุ: X1 = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ X2 = glucose (หน่วยคือ กรัมต่อลิตร), กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยคือ ยูนิตต่อกรัม นาทีแห้ง)



ภาพประกอบ 43 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (a) และแผนภาพคอนทัวร์ (b) ของผลความเข้มข้น $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตจากรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 โดยใช้กากตะกอนดีแคเตอร์เป็นสารตั้งต้น



ภาพประกอบ 44 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (a) และแผนภาพคอนทัวร์ (b) ของผลความเข้มข้น $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตจากรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 โดยใช้กากตะกอนดีแคเตอร์เป็นสารตั้งต้น

5.5 การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงสุด

จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของปัจจัยและผลตอบสนองของกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส สามารถทำนายหาจุดที่เหมาะสมที่ให้ค่ากิจกรรมของแต่ละเอนไซม์สูงสุดในชุดการทดลองเดียวกัน ซึ่งสามารถทำนายได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสสามารถมีค่าสูงสุดได้เท่ากับ 5.900 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าสูงสุดได้เท่ากับ 5.400 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในสภาวะที่ใช้ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้นเท่ากับ 0.426 กรัมต่อลิตร และ glucose เข้มข้นเท่ากับ 6.756 กรัมต่อลิตร (ตาราง 29) จากการทดลองยืนยันค่าทำนาย พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าเท่ากับ 5.841 และ 5.156 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนาย แสดงให้เห็นว่าการออกแบบการทดลองทางสถิติมีประสิทธิภาพในการคัดเลือกปัจจัยที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์เพื่อให้ได้ปริมาณสูงสุด

จากผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงสุดด้วยวิธีทางสถิติจากการใช้รา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 ผลิตจากกากตะกอนดีแคนเตอรีนในสภาวะการหมักแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้น 65% ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 นาน 7 วัน เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ glucose 6.756 กรัม, yeast extract 1 กรัม, KH_2PO_4 0.1 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 กรัม, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 กรัม, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.075 กรัม, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.46 กรัม, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 กรัม และ Tween-80 0.15 กรัม

ตาราง 29 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเตสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่สูงที่สุดที่ได้จากการทำนายและการทดลอง

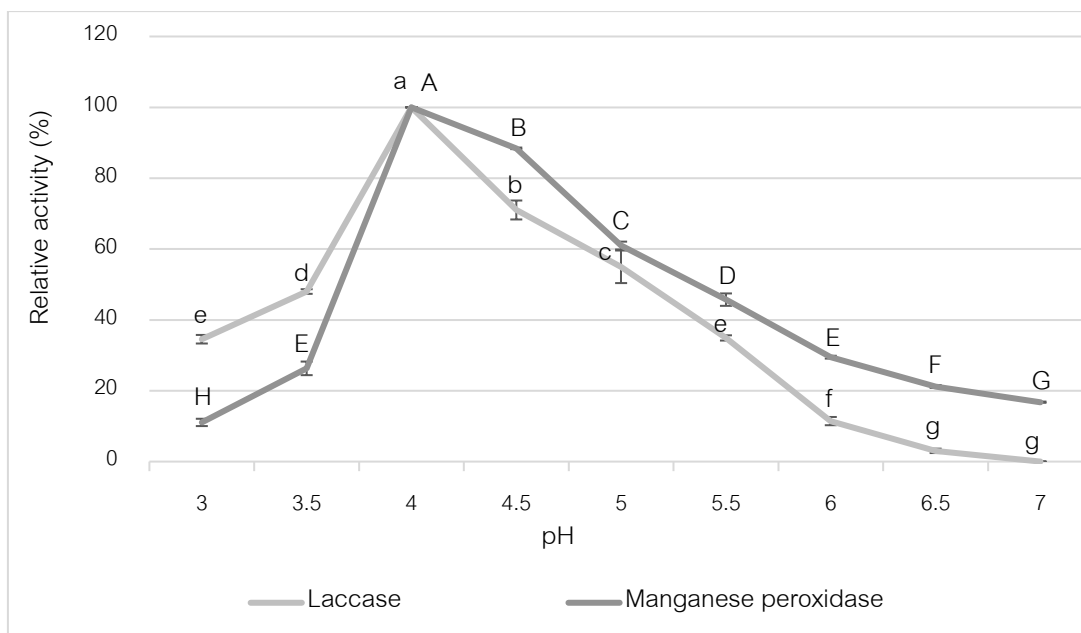
เอนไซม์เป้าหมาย	ความเข้มข้นของตัวแปร (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	glucose	แลคเตส
		แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
	ค่าทำนาย	ค่าทำนาย
แลคเตส	5.900	5.841
แมงกานีส	0.460	6.756
เปอร์ออกซิเดส		5.400
		5.156

6. คุณสมบัติของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์สกัดหยาบที่ได้จากรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 ผลิตจากกากตะกอนดีแคนเตอร์ในสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านี้ นำมาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส เพื่อหาค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด รวมทั้งศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิและค่า pH ต่าง ๆ ดังนี้

6.1 ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่ผลิตได้มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ pH เท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในช่วง pH นั้น ๆ จากผลการทดลองพบว่าค่า pH ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดคือ pH 4.0 คิดเป็นกิจกรรมสัมพัทธ์ (% relative activity) เท่ากับร้อยละ 100 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 รองลงมาคือ pH 4.5 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสลดลงเท่ากับร้อยละ 71.02 และ 88.42 ตามลำดับ ส่วน pH ที่มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์แลคเคสต่ำที่สุดคือ pH 7.0 มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.00 ส่วนเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าน้อยสุดที่ pH 3.0 มีค่าเท่ากับร้อยละ 11.05 ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 45 (ภาคผนวก ค ตาราง 32)

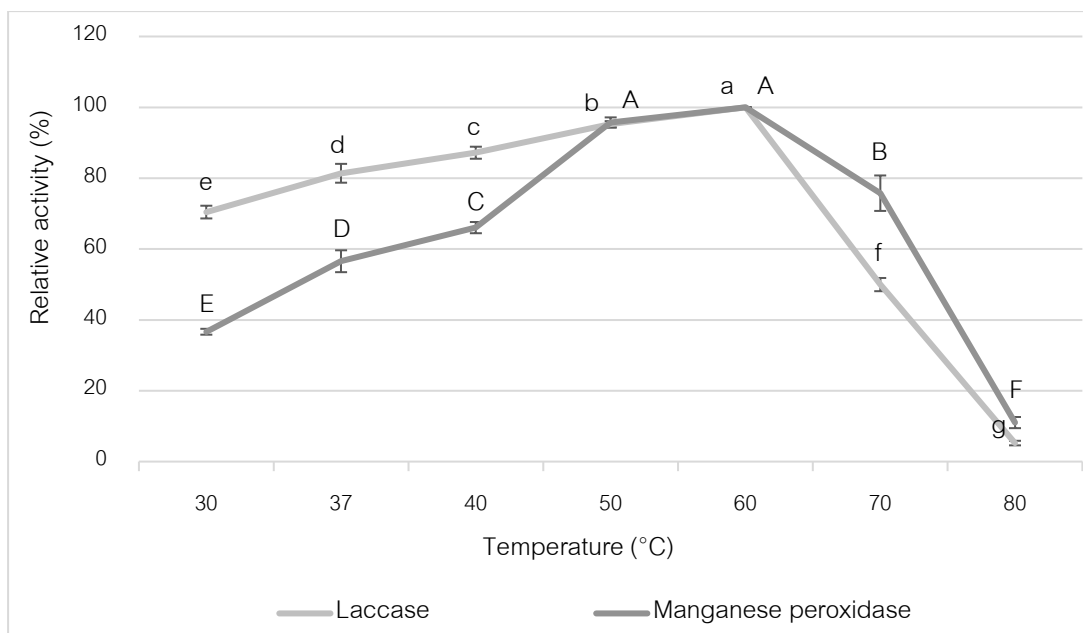


ภาพประกอบ 45 กิจกรรมสัมพันธ์ (%) ของค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง Mean \pm Standard Deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กคือค่าทางสถิติของเอนไซม์แลคเคส และอักษรพิมพ์ใหญ่ของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

6.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ที่ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดคือ pH 4.0 ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุด (กิจกรรมสัมพันธ์ร้อยละ 100) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่ากับร้อยละ 95.22 และ 95.72 ตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิที่มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสต่ำที่สุดคือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับร้อยละ 5.22 และ 11.00 ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 46 (ภาคผนวก ค ตาราง 33)



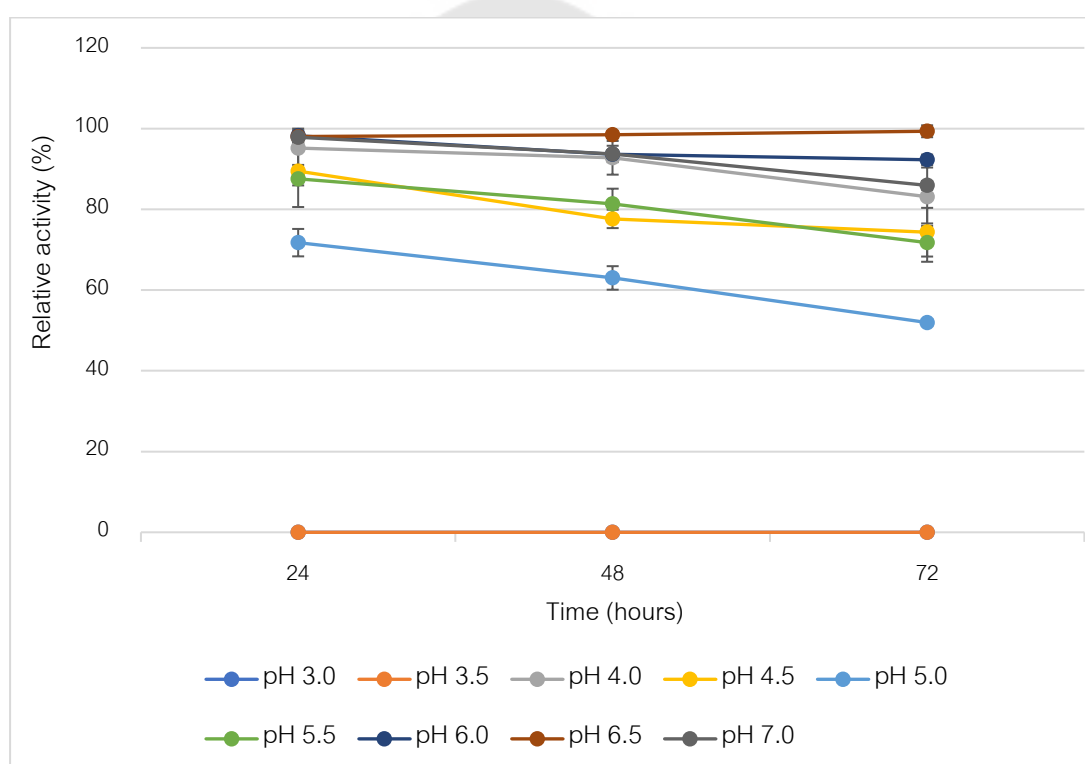
ภาพประกอบ 46 กิจกรรมสัมพันธ์ (%) ของค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง Mean \pm Standard Deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กคือค่าทางสถิติของเอนไซม์แลคเคส และอักษรพิมพ์ใหญ่ของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

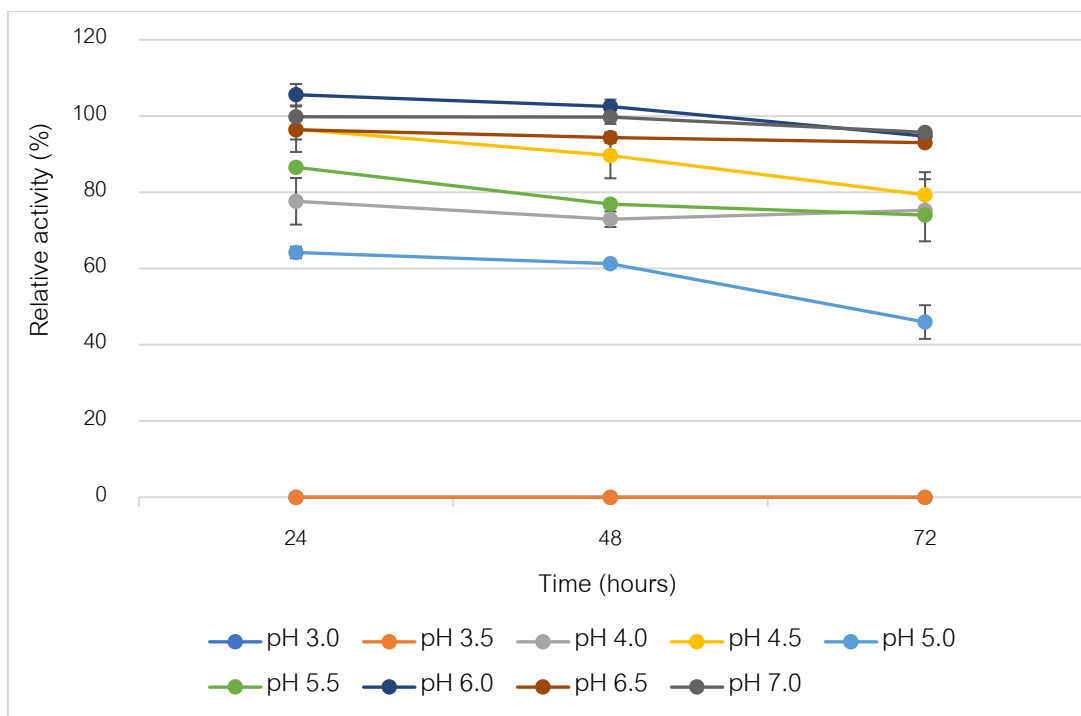
6.3 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อค่า pH

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่ผลิตได้มาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ความเข้มข้น 100 mM โดยปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ pH 4.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผลจากการทดลองพบว่าเอนไซม์แลคเคสมีความเสถียรสูงสุดที่ pH 6.5 แม้ว่าจะบ่มนานถึง 72 ชั่วโมง แต่ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ยังมีค่าเท่ากับร้อยละ 99.35 ไม่ต่างจากเวลาเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพประกอบ 47) ส่วนที่ pH 6.0 และ 7.0 เอนไซม์แลคเคสมีความเสถียรนาน 24 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ไม่ต่างจากเวลาเริ่มต้น แต่เมื่อบ่มนานขึ้นพบว่าค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 92.29 และ 85.93 ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่ pH 5.0 ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์แลค

ลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม และที่ pH 3.0 และ 3.5 ตรวจไม่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป ส่วนความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสต่อค่า pH พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่หลาย pH ได้แก่ pH 4.5, 6.0 และ 7.0 คือเมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไม่แตกต่างจากเวลาเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และมีค่าลดลงเมื่อบ่มนาน 72 ชั่วโมง โดยค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์เหลือเท่ากับร้อยละ 79.31, 94.74 และ 95.73 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 48) ในขณะที่ pH 3.0 และ 3.5 ให้ผลเช่นเดียวกับเอนไซม์แลคเคสคือตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ (ภาคผนวก ค ตาราง 34 และ 35)



ภาพประกอบ 47 กิจกรรมสัมพันธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสที่ pH เท่ากับ 3.0 – 7.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

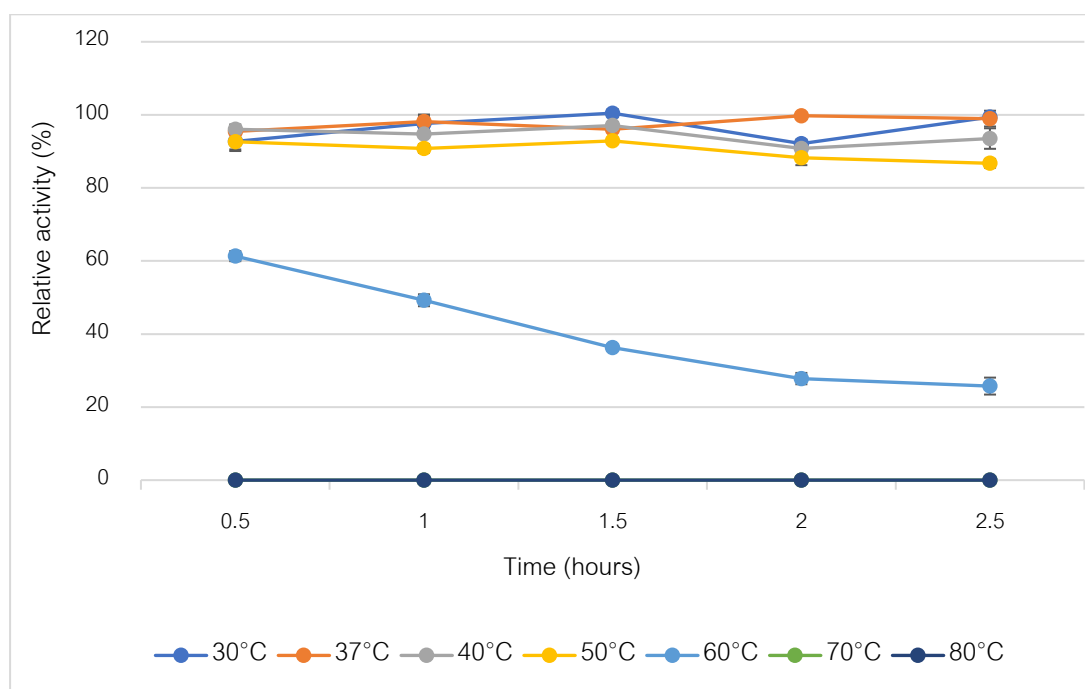


ภาพประกอบ 48 กิจกรรมสัมพันธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ pH เท่ากับ 3.0 – 7.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

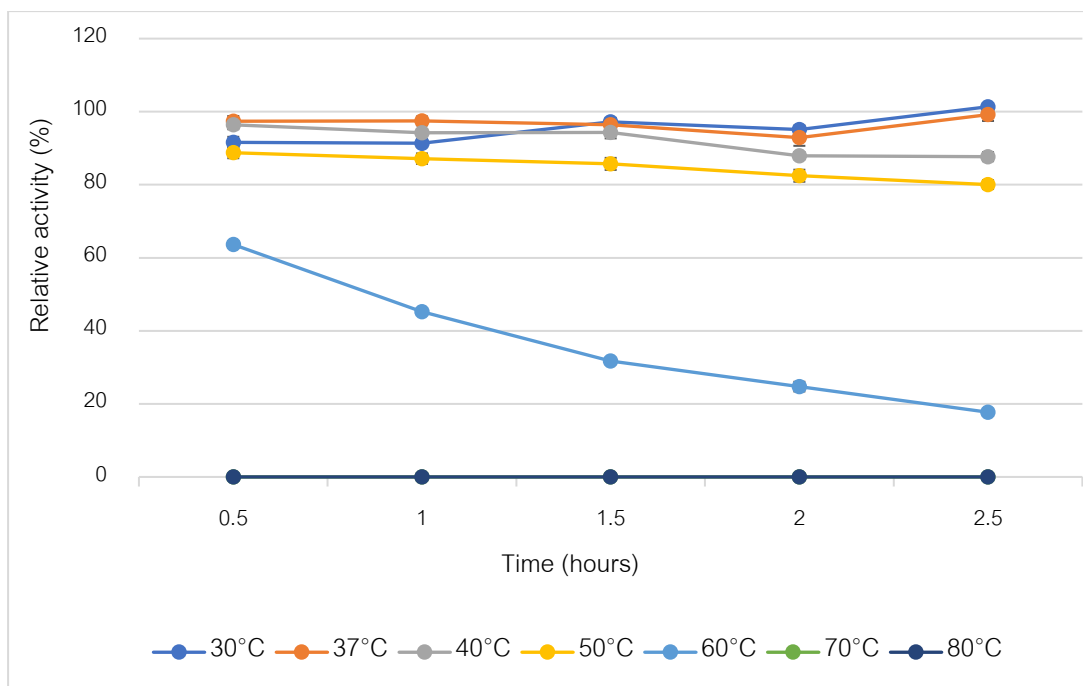
6.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้มาบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ สารละลายบัฟเฟอร์ไฮเดียมอะซิเตตที่ pH เท่ากับ 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์แลคเคสมีความเสถียร ได้นานถึง 2.5 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเวลาเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 49) ส่วนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรได้นาน 1.5 ชั่วโมง แล้วลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อบ่มนาน 2 และ 2.5 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มเอนไซม์ให้สูงขึ้นเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงตามระยะเวลาในการบ่ม โดยในชั่วโมงที่ 2.5 มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์เท่ากับร้อยละ 86.74 ในขณะที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2.5 ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ลดเหลือเพียงร้อยละ 25.74 และตรวจไม่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตั้งแต่ 0.5 ชั่วโมง เป็นต้นไป ส่วนความ

เสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์แลคเคสคือที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียร ได้นานถึง 2.5 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 50) และที่อุณหภูมิสูงขึ้นเท่ากับ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเท่ากับร้อยละ 87.68, 80.04 และ 17.72 ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 2.5 และตรวจไม่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับเอนไซม์แลคเคส (ภาคผนวก ค ตาราง 36 และ 37)



ภาพประกอบ 49 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30 – 80 องศาเซลเซียส เมื่อป้อนนาน 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ชั่วโมง



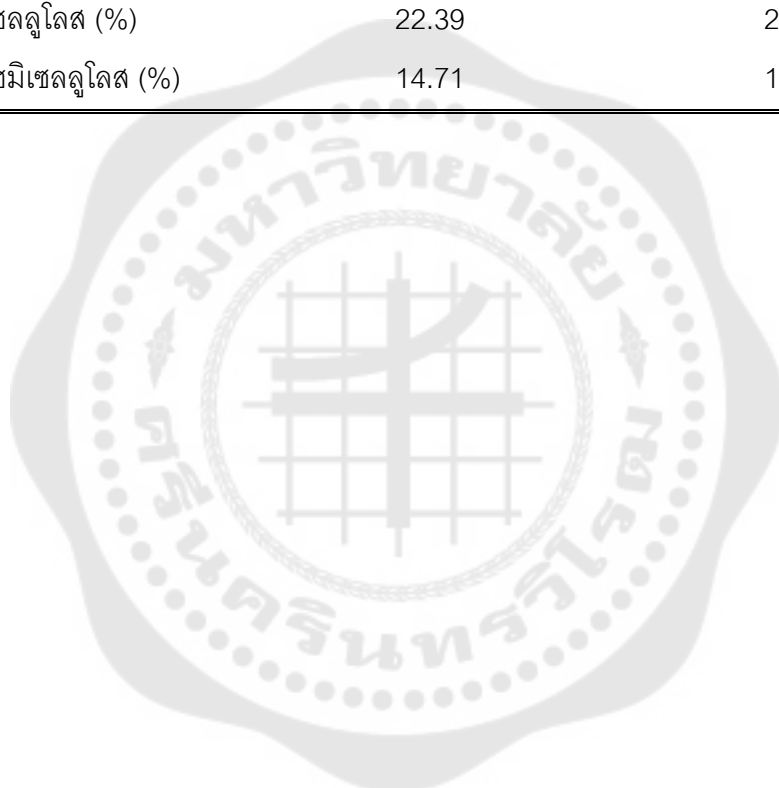
ภาพประกอบ 50 กิจกรรมสัมพันธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30 – 80 องศาเซลเซียส เมื่อป้อนาน 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ชั่วโมง

7. การปรับสภาพกากตะกอนดีแคนเตอร์ด้วยเอนไซม์สกัดหยาบ

จากการปรับสภาพกากตะกอนดีแคนเตอร์ด้วยเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้จากการหมักแบบแห้งของรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 เป็นเวลา 12 วัน พบว่าองค์ประกอบของกากตะกอนดีแคนเตอร์หลังการปรับสภาพ มีปริมาณลิกนินเท่ากับร้อยละ 25.49 ลดลงจากก่อนการปรับสภาพร้อยละ 16.75 ส่วนปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส มีค่าเท่ากับร้อยละ 20.11 และ 14.47 ตามลำดับ (ตาราง 30) ดังนั้นถ้าเพิ่มระยะเวลาในการปรับสภาพน่าจะสามารถลดปริมาณลิกนินได้มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้จะเห็นว่าปริมาณของเซลลูโลสภายหลังการปรับสภาพลดจากร้อยละ 10.18 อาจเนื่องจากในเอนไซม์สกัดหยาบมีเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ ซึ่งราไวท์รอกททั่วไปสามารถผลิตได้ เช่น เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เป็นต้น

ตาราง 30 องค์ประกอบของกากตะกอนดีแคนเตอร์ก่อนและหลังกระบวนการปรับสภาพเป็นเวลา 12 วัน

ข้อมูล	กากตะกอนดีแคนเตอร์ ก่อนการปรับสภาพ	กากตะกอนดีแคนเตอร์ หลังการปรับสภาพ
ปริมาณลิกนิน (%)	30.62	25.49
ปริมาณเซลลูโลส (%)	22.39	20.11
ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (%)	14.71	14.47



บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ตัวอย่างราเบสิดิโอไมซีสจำนวน 264 ตัวอย่าง รวบรวมจากพื้นที่ป่าเบญจพรรณผสมเต็งรังใน 4 จังหวัด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ส่วนใหญ่พบการเจริญบนไม้เนื้อแข็งสามารถเปลี่ยนสีเนื้อไม้จากสีน้ำตาลให้อ่อนลงหรือเป็นสีขาวได้ซึ่งอาจเกิดจากการย่อยสลายขององค์ประกอบของลิกนินในเนื้อไม้โดยเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก^(6, 7) ซึ่งราที่มีคุณสมบัติดังกล่าวเรียกว่าราไวท์รอต จากตัวอย่างทั้งหมดสามารถแยกเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 150 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 56.82 ซึ่งในจำนวนนี้มีเพียง 88 ไอโซเลท ที่พบโครงสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นของเส้นใยที่ผ่นกันซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของราในกลุ่มเบสิดิโอไมซีส ส่วนไอโซเลทที่ไม่พบโครงสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นแต่พบผ่นกันอาจเป็นราในกลุ่มเบสิดิโอไมซีสหรือแอสโคไมซีสที่ปนเปื้อนมาจากดินหรือชนิดที่เป็นพาราไซต์ของดอกเห็ด ด้วยเหตุนี้จึงเลือกเฉพาะตัวอย่างที่พบโครงสร้างของแคลมป์คอนเนคชั่นมาศึกษาต่อ ส่วนตัวอย่างราที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ได้ อาจเนื่องจากตัวอย่างเก่าเกินไป หรือฟรุตติงบอดี้มีลักษณะเป็นแผ่นบางทำให้แยกเนื้อเยื่อให้ปราศจากเชื้อปนเปื้อนได้ยาก หรือมีแมลงเจริญอยู่ภายใน ทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเชื้อจากเบสิดิโอสปอร์ของตัวอย่างที่ศึกษาได้จำนวนเชื้อบริสุทธิ์น้อยกว่าการเพาะเชื้อจากเนื้อเยื่อ อาจเนื่องจากเทคนิคที่ปล่อยให้สปอร์ตกลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (shooting method) ได้จำนวนสปอร์น้อยและมีอัตราการงอกต่ำ เพราะการปล่อยสปอร์จากดอกเห็ดส่วนใหญ่มีช่วงระยะเวลาจำกัดหลังจากเก็บตัวอย่างและอาศัยความชื้นสูงในการงอก⁽⁸¹⁾ นอกจากนี้สำหรับตัวอย่างราที่ยังไม่เจริญเต็มที่และยังไม่สร้างเบสิดิโอสปอร์ การแยกเพาะเชื้อบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด

ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกได้บนอาหารแข็งที่เติมอินดิเคเตอร์ 3 ชนิด พบว่ามีราที่ให้ผลบวกจำนวน 63 ไอโซเลท โดยราส่วนใหญ่สามารถย่อย guaiacol และ ABTS ได้ เพราะมีโครงสร้างไม่ซับซ้อน นอกจากนี้ราส่วนใหญ่ที่สามารถย่อยอินดิเคเตอร์ชนิดนี้ได้มักผลิตเอนไซม์แลคเคสเนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิด ใช้เป็นสารตั้งต้นในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ดังนั้น guaiacol และ ABTS จึงนิยมใช้ในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ในเบื้องต้น นอกจากนี้ยังมีสารตั้งต้นชนิดอื่นที่ใช้ในการตรวจหาเอนไซม์แลคเคส เช่น catechol, hydroquinone, syringaldazine และ catechin⁽⁸²⁾ ส่วน RBBR เป็นสีสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน เป็นอนุพันธ์ของสาร anthracene ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่

ก่อนมลพิษ (organic pollutant) นิยมใช้ในอุตสาหกรรมสีย้อม มีจุลินทรีย์น้อยชนิดที่สามารถย่อยได้⁽⁸³⁾ นิยมใช้ในการคัดเลือกราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกได้โดยเฉพาะเอนไซม์กลุ่มเปอร็อกซิเดส เช่น แมงกานีสเปอร็อกซิเดส และลิกนินเปอร็อกซิเดส จากผลการทดลองมีราจำนวน 30 ไอโซเลทที่สามารถย่อยสาร RBBR ได้ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสีสังเคราะห์ได้ในอนาคต ทั้งนี้มีราที่สามารถย่อยอินดิเคเตอร์ทั้ง 3 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ *Coriopsis retropicta* (PW17-134), *Ganoderma* sp.1 (PW17-145), *Ganoderma* sp.2 (PW17-111 และ PW17-177), *Pseudolagarobasidium* sp. (PP17-33) และ *Trametes elegans* (PP17-06) อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างราที่ให้ผลบวกจากการคัดเลือกร่วมด้วยอินดิเคเตอร์ทั้ง 3 ชนิด ยังไม่สามารถระบุชนิดของเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกได้ เนื่องจากราไวท์รอสสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกได้มากกว่าหนึ่งชนิด ประกอบกับงานวิจัยนี้ต้องการใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษให้เกิดประโยชน์ ได้แก่ กากตะกอนดีแคนเตอร์จากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม มาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์เพื่อเพิ่มมูลค่าโดยใช้ราไวท์รอส

กากตะกอนดีแคนเตอร์มีรายงานว่ามีส่วนประกอบของธาตุอาหารที่สามารถช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ได้ เช่น ไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัสเพนโตไซด์ (P_2O_5), ฟอสฟอรัสออกไซด์ (K_2O), แคลเซียมออกไซด์ (CaO) และ แมกนีเซียมออกไซด์ (MgO)⁽⁸⁴⁾ นอกจากนี้ Nutongkaew และคนอื่น ๆ (2014) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบของกากตะกอนดีแคนเตอร์ซึ่งเป็นของเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มทางภาคใต้ของประเทศไทย พบว่ามีปริมาณของสารอินทรีย์ที่เป็นคาร์บอนทั้งหมด (total organic carbon) เท่ากับร้อยละ 47.48, น้ำมันและกรีซ (oil and grease) ร้อยละ 0.92, ไนโตรเจนร้อยละ 0.90, ฟอสฟอรัสร้อยละ 0.33, โปแทสเซียมร้อยละ 0.85 และ แอช (ash) ร้อยละ 14.08 ซึ่งมีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์⁽⁸⁵⁾ ดังนั้นจึงได้ทดสอบความสามารถในการเจริญของตัวอย่างราไวท์รอสและการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกในเชิงปริมาณโดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้นภายใต้กระบวนการหมักแบบแห้ง

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากตะกอนดีแคนเตอร์ในงานวิจัยนี้เตรียมจากกากตะกอนอบแห้งจำนวน 80 กิโลกรัม โดยสุ่มไปวิเคราะห์พบว่ามีปริมาณลิกนินสูงถึงร้อยละ 30.62 เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส มีปริมาณเท่ากับร้อยละ 14.71 และ 22.39 ตามลำดับใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Razak และคนอื่น ๆ (2012) ซึ่งพบว่ากากตะกอนดีแคนเตอร์มีองค์ประกอบของลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส เท่ากับร้อยละ 30.66, 3.94 และ 21.61 ตามลำดับ⁽⁸⁶⁾ ในขณะที่งานวิจัยของ Adam และคนอื่น ๆ (2019) รายงานว่ากากตะกอนดีแคนเตอร์มีองค์ประกอบของลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส เท่ากับร้อยละ 25.30, 11.20 และ

29.40 ตามลำดับ⁽⁸⁷⁾ ทั้งนี้ปริมาณลิกนินของกากตะกอนดีแคนเตอร์ที่ได้จากต้นปาล์มน้ำมันซึ่งจัดเป็นไม้เนื้ออ่อนมีลิกนินอยู่ในช่วงร้อยละ 27-32 ของน้ำหนักแห้ง⁽⁸⁸⁾ ซึ่งจัดว่ามีปริมาณสูงสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกได้ อย่างไรก็ตามปริมาณองค์ประกอบต่าง ๆ ของกากตะกอนดีแคนเตอร์จากแต่ละพื้นที่ที่มีปริมาณแตกต่างกันน่าจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ทดสอบ ภูมิภาคที่ปลูกปาล์มน้ำมัน รวมทั้งกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มของแต่ละบริษัทจนได้กากตะกอนเหลือทิ้งสุดท้าย

ส่วนผลการทดสอบการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกของราไวท์รอกที่ศึกษาพบว่ามีจำนวน 24 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส หรือลิกนินเปอร์ออกซิเดส ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ เมื่อนำมาศึกษาเพื่อจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบว่าสามารถจัดจำแนกได้ 5 วงศ์ ได้แก่ Cerrenaceae, Hericiaceae, Incrustoporiaceae, Polyporaceae และ Stereaceae ประกอบด้วย 9 สกุล 15 ชนิด โดยราส่วนใหญ่จัดอยู่ในวงศ์ Polyporaceae (*Corioloopsis*, *Ganoderma*, *Microporus*, *Nigroporus* และ *Trametes*) ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่พบว่าราในวงศ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกได้ดี รวมทั้งมีการศึกษาอย่างกว้างขวางในการนำไปใช้ประโยชน์ อาจเนื่องจากรา Polyporaceae ส่วนใหญ่พบการเจริญบนไม้เนื้อแข็ง ทนแล้งได้ดี ทำให้พบการเจริญข้ามปี ที่สำคัญมีการศึกษาเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกในหลายชนิด เช่น *Bjerkandera*, *Corioloopsis*, *Ganoderma*, *Microporus*, *Polyporus* และ *Trametes*^(89, 90) ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราไวท์รอกที่ศึกษามีความหลากหลายถึง 9 สกุล ทำให้ยากต่อการระบุชนิดของแต่ละตัวอย่างให้ถูกต้องชัดเจนโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS จึงมีความสำคัญในการช่วยระบุชนิดได้ ผลการเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank ของราจำนวน 24 ไอโซเลท พบว่าสามารถระบุชนิดในระดับชนิดได้ 9 ชนิด ได้แก่ *Corioloopsis aspera*, *C. retropicta*, *Dentipellis parmastoi*, *Ganoderma lingzhi*, *Nigroporus vinosus*, *Trametes elegans*, *T. hirsuta*, *T. sanguinea* และ *Tyromyces xuchilensis* ส่วนที่ยังไม่สามารถระบุได้มี 6 ชนิด ได้แก่ *Aleurodiscus* sp., *Ganoderma* sp.1, *Ganoderma* sp.2, *Microporus* sp.1, *Microporus* sp.2 และ *Pseudolagarobasidium* sp. เนื่องจากมีค่าร้อยละความเหมือนต่ำกว่า 97 หรือมากกว่า 97 กับรามากกว่า 1 ชนิด อาจเป็นเพราะฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดราในประเทศยังมีจำกัดในฐานข้อมูล GenBank ทำให้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS จากราที่ศึกษาไปเทียบเคียงจึงมีค่าร้อยละความเหมือนต่ำกว่าชนิดของราซึ่งเป็นตัวอย่างจากต่างประเทศ

หรือตัวอย่างราที่ศึกษาอาจจะเป็นราชนิดใหม่ก็ได้ อย่างไรก็ตามในกรณีที่ต้องการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราชนิดใหม่มีความจำเป็นต้องศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างละเอียด เทียบเคียงกับตัวอย่าง holotype ของชนิดที่ใกล้เคียงก่อน จึงจะสามารถระบุชนิดที่ถูกต้องหรือเสนอชนิดใหม่ได้ ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของราทั้ง 24 ไอโซเลท จากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของราได้หลายชนิด ยกเว้นบางชนิดที่ ITS ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ เช่น *Ganoderma* sp.1 (PW17-145) มีความเหมือนสูงสุดกับ *G. austral* และ *G. fornicatum* เท่ากันคือร้อยละ 99 เช่นเดียวกับ *Ganoderma* sp.2 (PW17-06, PW17-111, PW17-154, PW17-177, PW17-230) ที่มีความเหมือนสูงสุดกับ *G. mastoporum*, *G. cupreum* และ *G. austral* เท่ากันคือร้อยละ 99 ซึ่งชนิดเหล่านี้จัดอยู่ใน *G. austral* species complex ซึ่งยากต่อการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ยังเป็นการเพิ่มฐานข้อมูลของราจากประเทศไทยซึ่งได้ฝากไว้ในฐานข้อมูล GenBank หมายเลข MK589268 – MK589291 เรียบร้อยแล้ว

ผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส หรือลิกนินเปอร์ออกซิเดสของราทั้ง 24 ไอโซเลท เมื่อใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้น พบว่าราไวท์รอตที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดสูงที่สุด ได้แก่ *Ganoderma* sp.2 (PW17-06), *Pseudolagarobasidium* sp. (PP17-33) และ *Aleurodiscus* sp. (PW17-219) ตามลำดับ ซึ่งราส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงที่สุด รองลงมาคือแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ส่วนเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสพบว่ามีราเพียง 7 ไอโซเลท ซึ่งตรวจพบได้ในปริมาณน้อย โดยไอโซเลทดังกล่าวมักผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่พบว่าราไวท์รอตส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ในขณะที่มีราเพียงส่วนน้อยที่สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้⁽⁸⁸⁾ แม้ว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด จะทำงานส่งเสริมกันในการย่อยลิกนิน แต่การทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสขึ้นกับปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยลิกนินซึ่งมีความจำเป็นในการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิด ในขณะที่เอนไซม์แลคเคสสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยลิกนินได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนซึ่งมีโอกาสตรวจพบได้ง่ายกว่า และอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ราไวท์รอตผลิตเอนไซม์แลคเคสได้มากกว่าเอนไซม์กลุ่มลิกนินในโลดิกชนิดอื่น⁽⁸⁸⁾ นอกจากนี้งานวิจัยของ Kinnunen และคนอื่น ๆ (2017) ได้ศึกษารราไวท์รอตและราย่อยสลายไม้ในกลุ่มเบสิดิโอไมซีทจำนวน 53 ไอโซเลท พบว่าราส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์

แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ในสภาวะต่าง ๆ ในขณะที่มีราเพียงร้อยละ 27 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ในสภาวะที่จำกัด เช่น สภาวะที่เป็นกรด (pH 3.0) เป็นต้น⁽⁹¹⁾ ดังนั้นการที่พบราจำนวนน้อยที่ผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้อาจเนื่องจากธรรมชาติของราแต่ละสายพันธุ์ องค์ประกอบของสารอาหาร ชนิดของสารตั้งต้น รวมทั้งสภาวะในการเพาะเลี้ยงราเพื่อการผลิตเอนไซม์เป้าหมาย อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้ยากที่จะพบการผลิตของเอนไซม์ทุกชนิดในปริมาณสูงภายใต้สภาวะเดียวกัน จากการทดลองมีราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนโลติกได้ทั้ง 3 ชนิด จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ *Aleurodiscus* sp. (PW17-219), *C. retropicta* (PW17-134), *D. parmastoi* (PW17-136), *Ganoderma* sp.2 (PW17-111 และ PW17-154), *Microporus* sp.1 (PW17-173) และ *Pseudolagarobasidium* sp. (PP17-33) ซึ่งราไวท์รอกที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนโลติกได้ทั้ง 3 ชนิดมีรายงานน้อย ตัวอย่างเช่น *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus* และ *Trametes versicolor* เป็นต้น^(25, 26) ส่วนรา *Aleurodiscus* sp. (PW17-219) ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ ซึ่งราในสกุลนี้ที่เคยมีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้คือ *A. amorphous*⁽⁹²⁾ ในขณะที่รา *C. retropicta* (PW17-134) เป็นชนิดที่เคยมีรายงานการค้นพบในประเทศไทยแล้ว⁽⁹³⁾ แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาคคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนโลติกมาก่อน ชนิดของราในสกุลนี้ที่เคยมีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ เช่น *C. glabrorigens* และ *C. gallica*^(89, 94) ส่วน *D. parmastoi* (PW17-136) เป็นอีกชนิดหนึ่งที่ยังไม่เคยมีการศึกษาเอนไซม์กลุ่มนี้มาก่อนเช่นกัน ในขณะที่ *Ganoderma* sp. และ *Microporus* sp. มีหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มนี้ได้ เช่น *G. lucidum*, *G. weberianum*, *G. applanatum*⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾ ส่วน *Microporus* ที่มีรายงานคือ *M. xanthopus* และ *M. affinis* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้⁽⁹⁰⁾ ที่น่าสนใจคือรา *Pseudolagarobasidium* sp. (PP17-33) ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการค้นพบราสกุลนี้ในบัญชีรายชื่อเห็ดราขนาดใหญ่ในประเทศไทยมาก่อน⁽⁹⁸⁾ และเคยมีรายงานการศึกษาเอนไซม์กลุ่มลิกนินโนโลติกเพียงชนิดเดียวคือ *P. acaciicola* ซึ่งมีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ จากงานวิจัยของ Thakur และ Gupte (2015) ได้ศึกษารรา *P. acaciicola* AGST3 ในกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสารตั้งต้น พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสและนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดสีสังเคราะห์ได้หลายชนิด⁽⁹⁹⁾ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Adak และคนอื่น ๆ (2016) รายงานการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากรา *P. acaciicola* LA1 ในกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้พืช *Parthenium* sp. เป็นสารตั้งต้น⁽¹⁰⁰⁾ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่า *P. acaciicola* สามารถผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและ

ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ ในขณะที่ *Pseudolagarobasidium* sp. (PP17-33) จากการศึกษาครั้งนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติกทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้สูงมีค่าเท่ากับ 315.56, 680.00 และ 2.41 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงได้เลือกกราฟไอโซเทปนี้มาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อผลิตเอนไซม์ต่อไป โดยเลือกศึกษาเฉพาะเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่านั้น เนื่องจากเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีค่าต่ำเกินไป

ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของรา *Pseudolagarobasidium* sp. (PP17-33) โดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์เป็นสารตั้งต้น พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส มีค่าสูงสุดในวันที่ 7 หลังจากการบ่มเชื้อ ดังนั้นจึงเลือกวันที่ 7 ในการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Adak และคนอื่น ๆ (2016) ที่ศึกษากระบวนการหมักแบบแห้งด้วยรา *P. acaciicola* LA1 โดยมีสารตั้งต้นคือพืช *Parthenium* sp., ฟางข้าว, ชานอ้อย และฟางข้าวสาลี เป็นเวลา 10 วัน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสมีค่าสูงสุดในวันที่ 7 ของการทดลอง⁽¹⁰⁰⁾ อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่ราไวท์รอสสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดนั้นขึ้นกับการเจริญของราแต่ละสายพันธุ์ ชนิดของสารตั้งต้น และสภาวะในการเลี้ยง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก่อน เมื่อมีการใช้ราต่างสายพันธุ์และสารตั้งต้นชนิดใหม่ ๆ

ผลการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ พบว่า yeast extract ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุด ในขณะที่ NaNO_3 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่ำ จึงเลือก yeast extract มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อเลี้ยงเชื้อราและหาปริมาณที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดให้ได้ปริมาณที่สูงที่สุดต่อไป ผลจากการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Adejaye และ Fasidi (2010) ที่พบว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากรา *Schizophyllum commune*⁽¹⁰¹⁾ และเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากรา *T. versicolor*⁽¹⁰²⁾ ส่วนเปปโตเนพบว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากรา *Trametes multicolor*⁽¹⁰³⁾ และรา *Cerrena* sp. HYB07 ซึ่งสามารถเพิ่มมวลชีวภาพได้มาก ขณะที่เมื่อใช้ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้ราผลิตเอนไซม์และมวลชีวภาพได้น้อย นอกจากนี้เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนแลคเคสในระดับ transcription จำนวน 8 ยีน ด้วยวิธี real time PCR พบว่าเมื่อใช้ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีการแสดงออกของยีนลดลง สอดคล้องกับปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้น้อยลง

(104) ทั้งนี้แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญอย่างมากในการเจริญของราและการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก โดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น yeast extract และ peptone ซึ่งราจะเจริญได้ดีกว่า ทำให้ผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น NH_4NO_3 และ NaNO_3 สอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ อย่างไรก็ตามปริมาณของไนโตรเจนและสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก โดยงานวิจัยของ Tekere และคนอื่น ๆ (2001) พบว่าราไวท์รอสสามารถผลิตแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ดี ทั้งในสภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนสูง ไนโตรเจนต่ำ รวมถึงสภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนสูง และไนโตรเจนสูงด้วย⁽¹⁰⁵⁾ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดและกระบวนการเมแทบอลิซึมของราแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นการศึกษาหาชนิดและปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก⁽²⁾

ผลการคัดเลือกปัจจัยของส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี PBD จาก 9 ปัจจัย ได้แก่ glucose, yeast extract, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ Tween-80 ในกระบวนการหมักแบบแห้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH ตั้งต้นเท่ากับ 5.0 เป็นเวลา 7 วัน พบว่าปัจจัยที่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส คือ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ส่วนปัจจัยที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสคือ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Fonseca และคนอื่น ๆ (2010) แสดงผลของ Cu^{2+} ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตเอนไซม์แลคเคสในปริมาณที่สูงของราในกลุ่มเบสิดีโอไมซีทา ได้แก่ *Coriolus versicolor*, *Ganoderma applanatum*, *Peniophora* sp. และ *Pycnoporus sanguineus* เป็นต้น⁽¹⁰⁶⁾ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Hess และคนอื่น ๆ (2002) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากรา *T. multicolor* ในถังหมักโดยเติม Cu^{2+} ความเข้มข้น 0.5 - 1.0 mM พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสสูงกว่าชุดควบคุม⁽¹⁰³⁾ โดยทั่วไปแล้วไอออนโลหะ เช่น Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} และ Zn^{2+} จัดเป็นสารอาหารที่จำเป็น (essential micronutrient) สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ช่วยเร่งปฏิกิริยาที่สำคัญต่าง ๆ ในกระบวนการเมแทบอลิซึม รวมทั้ง Cu^{2+} ที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์แลคเคส ซึ่งในโครงสร้างของเอนไซม์ประกอบด้วย Cu^{2+} ถึง 4 อะตอม จึงอาจส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส นอกจากนี้ยังเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ที่สำคัญชนิดอื่นๆ ในกลุ่มเอนไซม์ที่ต้องมีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ (Cu-dependent enzymes) เช่น cytochrome oxidase, Cu/Zn superoxide dismutase และ lysyl oxidase เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีความสำคัญในการเจริญของเซลล์ อย่างไรก็ตาม

ปริมาณคอปเปอร์ที่มากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อเซลล์เนื่องจากความเป็นพิษ ดังนั้นจึงต้องมีปริมาณคอปเปอร์ที่เหมาะสมถึงจะทำให้ได้ปริมาณของเอนไซม์ที่สูงที่สุดในกระบวนการผลิต⁽¹⁰⁷⁾ ส่วน glucose เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญและส่งผลโดยตรงกับการเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิดรวมทั้งราไวท์รอต เนื่องจากเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ง่ายในการเจริญ ซึ่งส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในงานวิจัยของ Schneider และคนอื่น ๆ (2018) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติก พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสจะสูงสุดเมื่อเติมกลูโคสที่ความเข้มข้นต่ำ และกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจะเพิ่มขึ้นเมื่อเติมกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงขึ้น⁽¹⁰⁸⁾ ดังนั้นปริมาณของน้ำตาลกลูโคสจึงมีความสำคัญและมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ สัมพันธ์กับองค์ประกอบของสารตั้งต้นและสายพันธุ์ราที่ศึกษา

จากปัจจัยของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงนำมาศึกษาหาจุดที่สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสให้สูงที่สุดโดยการหาพื้นที่ผิวตอบสนองด้วยวิธี CCD ทำให้สามารถเขียนสมการความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose กับกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ พบว่าจากสมการค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสสามารถเพิ่มได้สูงที่สุด เท่ากับ 6.183 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อใช้ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose เท่ากับ 0.375 และ 8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (adjusted R-squared = 84.27%) ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสามารถเพิ่มได้สูงที่สุด เท่ากับ 5.560 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อใช้ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose เท่ากับ 0.426 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (adjusted R-squared = 92.49%) จากกราฟพื้นผิวตอบสนองชี้ให้เห็นว่าปริมาณของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ มีผลกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิด ถ้า $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ มากเกินไปจะส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดลดลง อาจเนื่องจากความเป็นพิษต่อเซลล์ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ส่วนปริมาณ glucose ที่พอเหมาะจะช่วยส่งเสริมการเจริญของราและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูง ตัวอย่างงานวิจัยของ Schneider และคนอื่น ๆ (2018) ที่รายงานว่า glucose เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของราไวท์รอต *Marasmiellus palmivorus* แต่เมื่อใช้ glucose ปริมาณมากเกินไปจะเกิดการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ดังกล่าว เช่นเดียวกับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อปริมาณของ glucose เพิ่มขึ้น ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะลดลง อาจเนื่องจาก carbon catabolite repression (CCR) ซึ่งเป็นกลไกที่สามารถพบได้ในจุลินทรีย์ทั่วไปรวมทั้งรา คือในสถานะที่มี glucose และแหล่งคาร์บอนอื่นที่ซับซ้อนอยู่ด้วยกัน ราจะใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอนก่อนในกระบวนการเมแทบอลิซึมเพราะเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

จากนั้นจึงจะเปลี่ยนไปใช้แหล่งคาร์บอนอื่นที่ซับซ้อน ดังนั้นถ้าในสภาวะนั้นมีปริมาณ glucose มากเกินไปจะทำให้ราผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกที่จะมาย่อยสารลิกโนเซลลูโลสน้อยลง เนื่องจากไม่มีความจำเป็นในการที่จะใช้แหล่งคาร์บอนอื่นที่ซับซ้อน⁽¹⁰⁹⁾ เช่น กากตะกอน ดีแคนเตอร์ เป็นต้น ในรายการศึกษา CCR พบมากใน *Aspergillus nidulans* ซึ่งพบว่ามี CreA เป็น transcription factor เมื่อมี glucose ในระบบ CreA จะทำหน้าที่ยับยั้งยีนต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดที่สอง เช่น ลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นการยับยั้งในระดับ transcription⁽¹¹⁰⁾ ทั้งนี้ในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกจึงต้องควบคุมปริมาณ glucose ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมเพื่อจะได้ปริมาณของเอนไซม์สูงสุด

จากนั้นได้หาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดจากรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 ภายใต้สภาวะเดียวกันทำนายได้ว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสามารถมีค่าสูงสุดได้เท่ากับ 5.90 และ 5.40 ยูนิต์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในสภาวะที่ใช้ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ glucose เข้มข้นเท่ากับ 0.426 และ 6.756 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทำนายเพื่อให้ได้เอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงที่สุดภายใต้สภาวะเดียวกันนี้ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ได้จะต่ำกว่าการทำนายหาสภาวะที่ได้เอนไซม์แต่ละชนิดสูงที่สุดเล็กน้อย อาจเนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีความต้องการปัจจัยในปริมาณที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโกลติกแบบผสมที่มีค่ากิจกรรมรวมสูงที่สุดเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต ไม่ได้เน้นการผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์แต่ละชนิด จึงเลือกค่าทำนายที่ให้ผลรวมของยูนิต์เอนไซม์สูงสุด จากผลการทดลองยืนยันค่าทำนาย พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าเท่ากับ 5.841 และ 5.156 ยูนิต์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนาย และสามารถเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ให้สูงขึ้นจากเดิมที่ได้จากวิธี PBD คือเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้น 2.59 เท่า และเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น 1.94 เท่า อีกด้วย แสดงให้เห็นว่าการออกแบบการทดลองทางสถิติมีประสิทธิภาพในการคัดเลือกปัจจัยที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์เพื่อให้ได้ปริมาณสูงที่สุด สรุปคือสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่มีค่ากิจกรรมสูงที่สุดจากรา *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33 โดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์ปริมาณ 10 กรัม เป็นสารตั้งต้นในการหมักแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 65 (ปรับโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร) ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 นาน 7 วัน โดยมีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องเติม (กรัมต่อลิตร) ดังนี้

glucose 6.756 กรัม , yeast extract 1 กรัม , KH_2PO_4 0.1 กรัม , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 กรัม , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 กรัม , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.075 กรัม , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.46 กรัม , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 กรัม และ Tween-80 0.15 กรัม

เอนไซม์สกัดหยาบของแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตได้นำมาศึกษาคุณสมบัติของค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิด พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าเท่ากันคือ 4.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Kumar และคนอื่น ๆ (2016) พบว่าค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์แลคเคสของรา *Aspergillus flavus* มีค่าเท่ากับ 5.0 และ 70-80 องศาเซลเซียส⁽¹¹¹⁾ ส่วนการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แลคเคส 3 ไอโซฟอร์ม (isoform) (Lac1, Lac2 และ Lac3) ของรา *Pleurotus nebrodensis* พบว่าทุกไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) มีค่า pH ที่เหมาะสมเท่ากันคือ 3.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมของ Lac1 และ Lac3 มีค่าเท่ากับ 50-60 องศาเซลเซียส ส่วน Lac2 มีค่าเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส⁽¹¹²⁾ เป็นต้น อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์แลคเคสมีค่าหลากหลายแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์รา นอกจากนี้มีรายงานว่าเอนไซม์แลคเคสที่ได้จากรามักมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 3.6 - 5.2 เนื่องจากราส่วนใหญ่สามารถปรับตัวในการเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในสภาวะนั้น⁽¹¹³⁾ นอกจากนี้ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์แลคเคสยังขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นในการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้ ABTS เป็นสารตั้งต้น ซึ่งมีค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 3 - 5⁽¹¹⁴⁾

ส่วนผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากเอนไซม์สกัดหยาบพบว่าเอนไซม์แลคเคสมีความเสถียรสูงสุดที่ pH 6.5 นานถึง 72 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่ต่างจากเวลาเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคือ pH 6.0 ในขณะที่เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีความเสถียรต่อค่า pH ที่กว้างกว่าคือ pH 4.5, 6.0 และ 7.0 นาน 48 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่ต่างจากเวลาเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความเสถียรในช่วง pH ที่กว้างใกล้เคียงกันคือ 4.0 - 7.0 โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดมากกว่าร้อยละ 70 แม้จะบ่มนานถึง 72 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเอนไซม์ทั้งสองชนิดไม่ทนต่อ pH 3.0 และ 3.5 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0.5 เป็นต้นไป ส่วนผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสพบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 2.5 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่ต่างจากเวลาเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้

เอนไซม์ทั้งสองชนิดยังมีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ค่อนข้างกว้างเหมือนกันคือ 30 – 50 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดมากกว่าร้อยละ 80 แม้จะบ่มนานถึง 2.5 ชั่วโมง ทั้งนี้เอนไซม์ทั้งสองชนิดไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงถึง 70 และ 80 องศาเซลเซียสได้ เหตุที่เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความเสถียรในช่วง pH และอุณหภูมิที่ค่อนข้างกว้างนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ที่ทดสอบเป็นเอนไซม์สกัดหยาบซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดอาจประกอบไปด้วยหลายไอโซฟอร์ม โดยแต่ละไอโซฟอร์มอาจมีคุณสมบัติในการทนต่อค่า pH และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เช่น การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสบริสุทธิ์จำนวน 3 ไอโซฟอร์มของรา *P. nebrodensis* ต่อค่า pH นาน 24 ชั่วโมง พบว่า Lac3 มีความเสถียรต่อค่า pH ในช่วง 4.0 – 8.0 โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงกว่าร้อยละ 90 ในขณะที่ Lac1 และ Lac2 มีความเสถียรต่ำกว่าในช่วง pH เดียวกัน โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์อยู่ในช่วงร้อยละ 60 – 90 และ 60 – 70 ตามลำดับ ส่วนความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมินั้นพบว่าเอนไซม์แลคเคสทั้ง 3 ไอโซฟอร์มมีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มนานขึ้นพบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ Lac1 และ Lac3 ลดลงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 80 ในนาทีที่ 140 เป็นต้น⁽¹¹²⁾ นอกจากนี้ Ramirez-Cavazos และคนอื่นๆ (2014) พบว่าเอนไซม์แลคเคสบริสุทธิ์ 2 ไอโซฟอร์ม (LacI และ LacII) ที่ผลิตจากรา *Pycnoporus sanguineus* มีความเสถียรสูงสุดที่ pH 7.0 – 8.0 เมื่อบ่มนาน 140 นาที ส่วนอุณหภูมิมีความเสถียรสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 30 ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเท่ากับ 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่า LacI มีความเสถียรมากกว่า LacII อย่างไรก็ตามความเสถียรของเอนไซม์ต่อปัจจัยต่างๆ เช่น pH และอุณหภูมิ ขึ้นอยู่กับชนิดและโครงสร้างของเอนไซม์ ซึ่งมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ⁽¹¹⁵⁾ จากผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์สกัดหยาบของแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในสภาวะที่มีค่า pH 4.0 - 7.0 และอุณหภูมิ 30 – 60 องศาเซลเซียสได้

เมื่อนำเอนไซม์สกัดหยาบที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสมมาใช้ในการปรับสภาพกากตะกอนดีแคนเตอร์โดยใช้เอนไซม์ 70 มิลลิลิตร ต่อกากตะกอนดีแคนเตอร์ 20 กรัม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที นาน 12 วัน พบว่าสามารถลดปริมาณลิกนินของกากตะกอนดีแคนเตอร์ได้เท่ากับร้อยละ 16.75 นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของเซลลูโลสลดลงร้อยละ 10.18 อีกด้วย อาจเนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้เป็นเอนไซม์สกัดหยาบซึ่งอาจมีเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่เราสามารถผลิตได้ เช่น เอนไซม์เซลลูเลส จึงทำให้ปริมาณเซลลูโลสลดลงด้วยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Song และคนอื่นๆ (2013) ซึ่งนำรา *Irpex lacteus* มาใช้ในการปรับ

สภาพซังข้าวโพดปริมาณ 8 กรัม ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถลดปริมาณลิกนินได้เท่ากับร้อยละ 18.20 ในเวลา 14 วัน และลดได้ถึงร้อยละ 43.80 ในเวลา 42 วัน⁽¹¹⁶⁾ ในขณะที่ Machado และ Ferraz (2017) นำรา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Laetiporus sulphurous*, *P. ostreatus* และ *Ceriporiopsis subvermispora* มาปรับสภาพขานอ้อยก่อนนำไปผลิตเอทานอลพบว่าสามารถลดปริมาณลิกนินได้ร้อยละ 5.31, 10.62 และ 21.74 เมื่อบ่มนาน 14 วัน และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มนานขึ้นเป็น 60 วัน พบว่ารา *L. sulphurous* ไม่สามารถลดปริมาณลิกนินได้เพิ่มขึ้นอาจเนื่องจากเป็นราในกลุ่มบราวน์รอต (brown-rot fungi) ในขณะที่รา *P. ostreatus* และ *C. subvermispora* ซึ่งเป็นราไวท์รอตสามารถลดปริมาณลิกนินได้เพิ่มขึ้นเท่ากับร้อยละ 11.11 และ 48.82 ตามลำดับ⁽¹¹⁷⁾ อย่างไรก็ตามการปรับสภาพของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมชนิดลิกโนเซลลูโลสโดยใช้ราไวท์รอตหรือเอนไซม์กลุ่มลิกโนไลติก นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดและประสิทธิภาพของเอนไซม์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับสภาวะในการปรับสภาพ โครงสร้างและองค์ประกอบของสารตั้งต้นอีกด้วย แม้ว่าการนำเอนไซม์สกัดหยาบมาประยุกต์ใช้ในครั้งนี้จะลดปริมาณลิกนินได้ไม่มากนักซึ่งอาจต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพเพื่อลดปริมาณลิกนินให้ได้สูงขึ้นหรืออาจนำไปใช้ร่วมกับวิธีอื่น รวมทั้งเพิ่มระยะเวลาในการปรับสภาพให้นานขึ้นเป็นต้น

บรรณานุกรม

1. Rongwang C, Polprasert S, Kanchanasuta S. Effect of partial ozonation and thermal pretreatment on biogas production from palm oil decanter cake. *Chemical Engineering Transactions*. 2017; 57: 1987-92.
2. Isroi MR, Millati R, Syamsiah S, Niklasson C, Cahyanto MN, Ludquist K, et al. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review. *BioResources*. 2011; 6(4): 5224-59.
3. Wong DWS. Structure and Action Mechanism of Lignolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009; 157(2): 174-209.
4. Rodriguez-Couto S. Industrial and environmental applications of white-rot fungi. *Mycosphere*. 2017; 8: 456-66.
5. นิวัฒน์ เสนาะเมือง. เห็ดป่าเมืองไทย ความหลากหลายและการใช้ประโยชน์. กรุงเทพฯ: ยูนิเวอร์ซิตีเทคโนโลยี แอนด์ เทคโนโลยี; 2553.
6. Peralta RM, da Silva BP, Gomes C rrea RC, Kato CG, Vicente Seixas FA, Bracht A. Chapter 5 - Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. In: Brahmachari G, editor. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Academic Press*; 2017. p. 119-49.
7. Singh AP, Singh T. Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass and Bioenergy*. 2014; 62: 198-206.
8. Kirk TK, Lamar RT, Glaser JA. The Potential of White-Rot Fungi in Bioremediation. In: Mongkolsuk S, Lovett PS, Trempy JE, editors. *Biotechnology and Environmental Science: Molecular Approaches*. Boston, MA: Springer US; 1992. p. 131-8.
9. Alonso DM, Wettstein SG, Dumesic JA. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chemical Society Reviews*. 2012; 41(24): 8075-98.
10. Blanchette RA. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany*. 1995; 73(1): 999-1010.
11. Hatakka A. Biodegradation of Lignin. In: Hofrichter M SA, editor. *Biopolymer, biology, chemistry, biotechnology, applications*. New Jersey: Wiley-WCH; 2001. p. 129-45.

12. Daniel G. Chapter 8 - Fungal Degradation of Wood Cell Walls. In: Kim YS, Funada R, Singh AP, editors. *Secondary Xylem Biology*. Boston: Academic Press; 2016. p. 131-67.
13. Jerzy O. 2011 [December 26,2017]; Retrieved December 26,2017, from [https://commons.wikimedia.org/wiki/Trametes_versicolor?uselang=cs#/media/File:Trametes_versicolor_G4_\(1\).JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/Trametes_versicolor?uselang=cs#/media/File:Trametes_versicolor_G4_(1).JPG). (online).
14. Heino L. 2012 [December 26,2017]; Retrieved December 26,2017, from <https://www.anbg.gov.au/fungi/case-studies/microporus-xanthopus-growth.html>. (online).
15. Nick K. 2007 [December 26, 2017]; Retrieved December 26, 2017, from https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?seq_num=368100&one=T. (online).
16. Larry G. 2008 [December 26, 2017]; Retrieved December 26, 2017, from http://www.messiah.edu/oakes/fungi_on_wood/poroidfungi/speciespages/Phlebiatremellosa.htm (online).
17. Jason H. 2007 [December 26, 2017]; Retrieved December 26, 2017, from [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pycnoporus_cinnabarinus_\(1002812302\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pycnoporus_cinnabarinus_(1002812302).jpg) (online).
18. Gary L. 2011 [December 26, 2017]; Retrieved December 26, 2017, from <http://garylincoff.com/wp-content/uploads/2011/12/stereumOstrea.jpg>. (online).
19. Strassberger Z, Tanase S, Rothenberg G. The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. *RSC Advances*. 2014; 4(48): 25310-8.
20. Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*. 2006; 24(5): 219-26.
21. Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 1994; 140(1): 19-26.
22. Niladevi KN. Ligninolytic Enzymes. In: Singh nee' Nigam P, Pandey A, editors. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2009. p. 397-414.
23. Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 2002; 30(4): 454-66.
24. Wikiwand. 2013 [December 26, 2017]; Retrieved December 26, 2017, from

http://www.wikiwand.com/en/Manganese_peroxidase#/Reaction_mechanism. (online).

25. Tuor U, Winterhalter K, Fiechter A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*. 1995; 41(1): 1-17.
26. Vares T, Hatakka A. Lignin-degrading activity and ligninolytic enzymes of different white-rot fungi: effects of manganese and malonate. *Canadian Journal of Botany*. 1997; 75(1): 61-71.
27. Kirk TK, Burgess RR, Koning JW. Use of Fungi in Pulping Wood: An Overview of Biopulping Research. In: Leatham GF, editor. *Frontiers in Industrial Mycology*. Boston, MA: Springer US; 1992. p. 99-111.
28. Husaini A, Ahmad Fisol F, Chia Yun L, Hussain H, Muid S, Roslan H. Lignocellulolytic enzymes produced by tropical white rot fungi during biopulping of *Acacia mangium* wood chips. *Journal of Biochemical Technology*. 2011; 3: 245-50.
29. Sharma B, Dangi AK, Shukla P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *Journal of Environmental Management*. 2018; 210: 10-22.
30. Gao D, Du L, Yang J, Wu W-M, Liang H. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010; 30(1): 70-7.
31. Teerapatsakul C, Pothiratana C, Chitradon L, Thachepan S. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a thermotolerant white rot fungus *Trametes polyzona* RYNF13. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2016; 62(6): 303-12.
32. Singh R, Shukla A, Tiwari S, Srivastava M. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014; 32: 713-28.
33. Vasco-Correa J, Ge X, Li Y. Chapter 24 - Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: Mussatto SI, editor. *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. Amsterdam: Elsevier; 2016. p. 561-85.
34. Nazarpour F, Abdullah DK, Abdullah N, Motedayen N, Zamiri R. Biological Pretreatment of Rubberwood with *Ceriporiopsis subvermisporea* for Enzymatic Hydrolysis

- and Bioethanol Production. *BioMed Research International*. 2013; 2013: 1-9.
35. Rouches E, Zhou S, Steyer JP, Carrere H. White-Rot Fungi pretreatment of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion: Impact of glucose supplementation. *Process Biochemistry*. 2016; 51(11): 1784-92.
36. Soccol CR, Costa ESF, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LPdS. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*. 2017; 1(1): 52-71.
37. Zabed H, Sahu JN, Boyce AN, Faruq G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016; 66: 751-74.
38. Rodríguez Couto S, Sanromán MA. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*. 2005; 22(3): 211-9.
39. Sunzen. [May 17, 2018]; Retrieved May 17, 2018, from <http://www.sunzen.com.my/portfolio/dry-decanter-cake/>. (online).
40. Dewayanto N, Isha R, Nordin MR. Use of palm oil decanter cake as a new substrate for the production of bio-oil by vacuum pyrolysis. *Energy Conversion and Management*. 2014; 86: 226-32.
41. Kanchanasuta S, Pisutpaisal N. Waste utilization of palm oil decanter cake on biogas fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2016; 41(35): 15661-6.
42. Namoolnoy P, Phoolphundh S, Wongwicharn A. Biodegradation of lignin in oil palm fronds by white rot fungi. *Kasetsart J (Nat Sci)*. 2011; 45: 254-9.
43. Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. 2000; 35(10): 1153-69.
44. Lizardi-Jiménez MA, Hernández-Martínez R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech*. 2017; 7(1): 44.
45. Gassara F, Brar SK, Tyagi RD, John RP, Verma M, Valero JR. Parameter optimization for production of ligninolytic enzymes using agro-industrial wastes by response surface method. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2011; 16(2): 343-51.

46. Akhtar M, Scott GM, Swaney RE, Kirk TK. Overview of Biomechanical and Biochemical Pulping Research. *Enzyme Applications in Fiber Processing*: American Chemical Society; 1998. p. 15-26.
47. Mikiashvili N, Wasser SP, Nevo E, Elisashvili V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006; 22(9): 999-1002.
48. Stajic M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser SP, Nevo E, et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 38(1): 65-73.
49. Patel H, Gupte A, Gupte S. Effect of Different culture conditions and inducers on production of laccase by a Basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResources*. 2009; 4(1): 268-84.
50. Wan C, Li Y. Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresource Technology*. 2010; 101(16): 6398-403.
51. Asgher M, Asad MJ, Legge RL. Enhanced lignin peroxidase synthesis by *Phanerochaete chrysosporium* in solid state bioprocessing of a lignocellulosic substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006; 22(5): 449-53.
52. Shi J, Chinn MS, Sharma-Shivappa RR. Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*. 2008; 99(14): 6556-64.
53. Rodriguez-Leon JA, Soccol CR, Pandey A, Rodriguez DE. Factors Affecting Solid-state Fermentation. In: Pandey A, Soccol CR, Larroche C, editors. *Current Developments in Solid-state Fermentation*. New York, NY: Springer New York; 2008. p. 26-47.
54. Fujian X, Hongzhang C, Zuohu L. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. *Bioresource Technology*. 2001; 80(2): 149-51.
55. Reid ID. Solid-state fermentations for biological delignification. *Enzyme and Microbial Technology*. 1989; 11(12): 786-803.

56. Reid ID. Optimization of solid-state fermentation for selective delignification of aspen wood with *Phlebia tremellosa*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1989; 11(12): 804-9.
57. Membrillo I, Sánchez C, Meneses M, Favela E, Loera O. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*. 2008; 99(16): 7842-7.
58. ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา, พงศ์ชนัน เหลืองไพบูลย์. การออกแบบและวิเคราะห์การทดลอง. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ท็อป; 2551.
59. Cavazzuti M. Design of Experiments. Optimization methods: From theory to design scientific and technological aspects in mechanics. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013. p. 25-70.
60. สายชล สิ้นสมบุญรัตน์ทอง. การวางแผนแบบการทดลองเล่ม 2. กรุงเทพฯ: จามจุรีโปรดักท์; 2558.
61. Montgomery D. Design and analysis of experiments. ed t, editor. New York: John Wiley & Sons; 2012.
62. Sridevi V, Lakshmi M, Swamy A, Rao M. Implementation of response surface methodology for phenol degradation using *Pseudomonas putida* (NCIM 2102). *Bioremed Biodegrad*. 2011; (2): 121.
63. Yasmeeen Q, Asgher M, Sheikh MA, Nawaz H. Optimization of Ligninolytic Enzymes Production through Response Surface Methodology. *BioResources*. 2013; 8(1): 944-68.
64. Karp SG, Faraco V, Amore A, Letti LAJ, Thomaz Soccol V, Soccol CR. Statistical Optimization of Laccase Production and Delignification of Sugarcane Bagasse by *Pleurotus ostreatus* in Solid-State Fermentation. *BioMed Research International*. 2015: 1-8.
65. จิตติมา เจริญพานิช. เอนไซม์วิทยา. เอนไซม์วิทยา. กรุงเทพฯ: โอ เอส พริ้นติ้ง เฮ้าส์; 2553.
66. Patel H, Gupte S, Gahlout M, Gupte A. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. *3 Biotech*. 2014; 4(1): 77-84.
67. Xiaobin C, Rong J, Pingsheng L, Shiqian T, Qin Z, Wenzhong T, et al. Purification

of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007; 41(3): 258-64.

68. Kong W, Chen H, Lyu S, Ma F, Yu H, Zhang X. Characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Echinodontium taxodii* 2538, and its use for the degradation of lignin-related compounds. *Process Biochemistry*. 2016; 51(11): 1776-83.

69. Kalmis E, Yasa I, Kalyoncu F, Pazarbasi B, Kocyigit A. Ligninolytic enzyme activities in mycelium of some wild and commercial mushrooms. *Afr J Biotechnol*. 2008; 7(23): 4314-20.

70. บารมี สกลรักษ์. เห็ดหึ่ง: กลุ่มป่าแก่งกระจาน เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด เอ็น พี จี เอ็นเตอร์ไพรส์; 2560.

71. Promega. Genomic DNA Purification Instructor's Manual. USA: Promega corporation; 2008. p. 1-11.

72. J White T, Bruns T, Lee S, Taylor J, A Innis M, H Gelfand D, et al. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. 1990.

73. Technelysium. [May 18, 2018]; Retrieved May 18, 2018, from <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>. (online).

74. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32(5): 1792-7.

75. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011; 28(10): 2731-9.

76. Gomes E, Aguiar AP, Carvalho CC, Bonfá MRB, Silva Rd, Boscolo M. Ligninases production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009; 40: 31-9.

77. Rahman MDM, Jusoh I, Husaini A, Seman IA, Sing NN. Biodegradation and ligninolytic enzymes profiles of the newly synthesized organotin(IV)-treated non-durable

- tropical wood species. *Journal of Biochemical Technology*. 2014; 5(3): 743-50.
78. Plackett RL, Burman JP. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*. 1946; 33(4): 305-25.
79. Silva M, Souza VB, Santos VS, Kamida HM, Vasconcellos-Neto JR, Góes-Neto A, et al. Production of Manganese Peroxidase by *Trametes villosa* on Unexpensive Substrate and Its Application in the Removal of Lignin from Agricultural Wastes. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2014; 5: 1067-77.
80. Nakasone KK, Lindner DL. Taxonomy of *Pseudolagarobasidium* (Polyporales, Basidiomycota). *Fungal Diversity*. 2012; 55: 155-69.
81. Choi Y-W, Hyde K, Ho W, W Choi Y, Ho A. Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity*. 1999; 3: 29-38.
82. Devasia S, Nair A. Screening of Potent Laccase Producing Organisms Based on the Oxidation Pattern of Different Phenolic Substrates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2016; 5: 127-37.
83. Machado K, Matheus D, Bononi V. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2005; 36: 246-52.
84. Haron K, Mohammed AT, Halim RM, Din AK. Palm-based bio-fertilizer from decanter cake and boiler ash of palm oil mill. *Malaysian Palm Oil Board (MPOB)*. 2008.
85. Nutongkaew T, Duangsuwan W, Prasertsan S, Prasertsan P. Effect of inoculum size on production of compost and enzymes from palm oil mill biogas sludge mixed with shredded palm empty fruit bunches and decanter cake. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2014; 36: 275-81.
86. Razak M, Ibrahim M, Lai Yee P, Hassan M, Abd-Aziz S. Utilization of oil palm decanter cake for cellulase and polyoses production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2012; 17: 547-55.
87. Adam M, Sulaiman A, Baharuddin A, Mokhtar M, Subbian K, Tabatabaei M. Characterization of Delignified Oil Palm Decanter Cake (OPDC) for Polymer Composite Development. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information*

Technology. 2019; 9: 384-9.

88. Janusz G, Pawlik A, Justyna S, Swiderska-Burek U, Jarosz-Wilkolazka A, Paszczynski A. Lignin degradation: Microorganisms, Enzymes Involved, Genomes Analysis and Evolution. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017; 41: 941-62.

89. Risna R, Suhirman. Ligninolytic enzyme production by Polyporaceae from Lombok, Indonesia. *Fungal diversity*. 2002; 9: 123-34.

90. Abinaya Shri T, Deepa P, Nithya T. Screening, optimization and separation of ligninolytic enzyme by polyporaceae group fungi. *International Journal of Science Innovations and Discoveries*. 2013; 3: 434-45.

91. Kinnunen A, Maijala P, Jarvinen P, Hatakka A. Improved Efficiency in Screening for Lignin-Modifying Peroxidases and Laccases of Basidiomycetes. *Current Biotechnology*. 2017; 6(2): 105-15.

92. Thorn RG. The Use of Cellulose Azure Agar as a Crude Assay of Both Cellulolytic and Ligninolytic Abilities of Wood-inhabiting Fungi. *Proceedings of The Japan Academy Series B-physical and Biological Sciences*. 1993; 69: 29-34.

93. Choeyklin R, Hattori T, Jones E. A checklist of aphyllorphoraceous fungi in Thailand: Part I. New records. *Mycosphere*. 2011; 2: 161-77.

94. Xu X, Feng L, Han Z, Luo S, Wu Am, Xie J. Selection of high laccase-producing *Coriolopsis gallica* strain T906: mutation breeding, strain characterization and the features of extracellular laccase. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2016; 26: 1570-8.

95. de Souza Silva C, de Melo I, de Oliveira P. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005; 37(3): 324-9.

96. Morgenstern I, Klopman S, Hibbett D. Molecular Evolution and Diversity of Lignin Degrading Heme Peroxidases in the Agaricomycetes. *Journal of molecular evolution*. 2008; 66: 243-57.

97. Torres Farradá G, Manzano A, Rineau F, Ledo L, Sánchez-López MI, Thijs S, et al. Diversity of Ligninolytic Enzymes and Their Genes in Strains of the Genus *Ganoderma*: Applicable for Biodegradation of Xenobiotic Compounds. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8: 1-16.

98. Chandrasrikul A, Suwanarit P, Sangwanit U, Lumyong S, Payapanon A, Sanoamuang N, et al. Check list of mushrooms (Basidiomycetes) in Thailand. Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning: Ministry of natural Resources and Environment; 2011.
99. Thakur S, Gupte A. Optimization and hyper production of laccase from novel agaricomycete *Pseudolagarobasidium acaciicola* AGST3 and its application in in vitro decolorization of dyes. *Annals of Microbiology*. 2015; 65: 185-96.
100. Adak A, Tiwari R, Singh S, Sharma S, Nain L. Laccase Production by a Novel White-Rot Fungus *Pseudolagarobasidium acaciicola* LA 1 Through Solid-State Fermentation of *Parthenium* Biomass and Its Application in Dyes Decolorization. *Waste and Biomass Valorization*. 2016; 7: 1-9.
101. Adejaye OD, Fasidi IO. Effect of cultural conditions on biomass and laccase production in submerged medium by *Schizophyllum commune* (FR.), a Nigerian edible mushroom. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 9: 600-9.
102. Asgher M, Iqbal H. Characterization of a novel manganese peroxidase purified from solid state culture of *Trametes versicolor* IBL-04. *BioResources*. 2011; 6: 4317-30.
103. Hess J, Leitner C, Galhaup C, D Kulbe K, Hinterstoisser B, Steinwender M, et al. Enhanced Formation of Extracellular Laccase Activity by the White-Rot Fungus *Trametes multicolor*. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2002; 98: 229-41.
104. Yang J, Wang G, Ng TB, Lin J, Ye X. Laccase Production and Differential Transcription of Laccase Genes in *Cerrena* sp. in Response to Metal Ions, Aromatic Compounds, and Nutrients. *Frontiers in microbiology*. 2016; 6: 1558-.
105. Tekere M, Zvauya R, Read J. Ligninolytic enzyme production in selected sub-tropical white rot fungi under different culture conditions. *Journal of basic microbiology*. 2001; 41: 115-29.
106. Fonseca MI, Shimizu E, Zapata P, Villalba L. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). *Enzyme and Microbial Technology*. 2010; 46: 534-9.

107. Labbé S, Thiele DJ. Copper ion inducible and repressible promoter systems in yeast. *Methods in Enzymology*: Academic Press; 1999. p. 145-53.
108. Schneider W, Fontana R, Mendonça S, Siqueira F, Dillon A, Camassola M. High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources. *Process Biochemistry*. 2018; 69: 1-11.
109. Adnan M, Zheng W, Islam W, Arif M, Abubakar Y, Wang Z-h, et al. Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 19: 1-23.
110. Ries L, Beattie S, Espeso E, Cramer R, Goldman G. Diverse Regulation of the CreA Carbon Catabolite Repressor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 2016; 203: 335-52.
111. Kumar R, Kaur J, Jain S, Kumar A. Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2016 2016/06/01/; 14: 125-31.
112. Yuan X, Tian G, Zhao Y, Zhao L, Wang H, Ng TB. Biochemical Characteristics of Three Laccase Isoforms from the Basidiomycete *Pleurotus nebrodensis*. *Molecules*. 2015; 21: 1-15.
113. Madhavi V, Lele S. Laccase: Properties and Applications. *BioResources*. 2009; 4: 1694-717.
114. Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T. Characterization of Laccases and Peroxidases from Wood-Rotting Fungi (Family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; 64: 1601-6.
115. Ramírez-Cavazos LI, Junghanns C, Ornelas-Soto N, Cárdenas-Chávez DL, Hernández-Luna C, Demarche P, et al. Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014; 108: 32-42.
116. Song L, Yu H, Ma F, Zhang X. Biological Pretreatment under Non-sterile

Conditions for Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. *BioResources*. 2013; 8: 3802-16.

117. Machado AdS, Ferraz A. Biological pretreatment of sugarcane bagasse with basidiomycetes producing varied patterns of biodegradation. *Bioresource Technology*. 2017; 225: 17-22.

118. Téllez-Téllez M, Fernández F, Montiel-González A, Sánchez C, Díaz-Godinez G. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*. 2008; 81: 675-9.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. Potato dextrose agar (PDA)

Potato dextrose agar	39	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำไปต้มจน agar ละลายแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Glucose asparagine agar (GAE)

Glucose	10	กรัม
L-asparagine	1	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.5	กรัม
MgSO ₄ ·H ₂ O	0.5	กรัม
FeSO ₄ ·H ₂ O	0.01	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เท่ากับ 5 แล้วเติม agar ลงไป ต้มจน agar ละลายแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ: สูตรอาหารที่ใช้ดัดแปลงจาก Kalmis และคนอื่นๆ (2008)⁽⁶⁹⁾

3. Basal medium

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม

ปรับ pH ให้เท่ากับ 5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ: สูตรอาหารที่ใช้ดัดแปลงจาก Téllez-Téllez และคนอื่นๆ (2008)⁽¹¹⁸⁾



ภาคผนวก ข
สารเคมีและบัพเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ข

สารเคมีและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง

1. 1% Agarose

Agarose	1	กรัม
0.5X TBE buffer	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันแล้วต้มจนผง agarose ละลายจนหมด

2. 100 mM Sodium acetate buffer

Sodium acetate	0.82	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันแล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 3.5 ด้วย acetic acid

3. 50 mM Sodium tartrate buffer

Sodium L-tartrate dibasic dihydrate	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันแล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 4.5 ด้วย L-tartaric acid

4. 1 mM 2,6-dimethoxyphenol

2,6-dimethoxyphenol	0.015	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันแล้วนำไปใช้งาน

5. Coomassie brilliant blue R-250 ใน 10% acetic acid

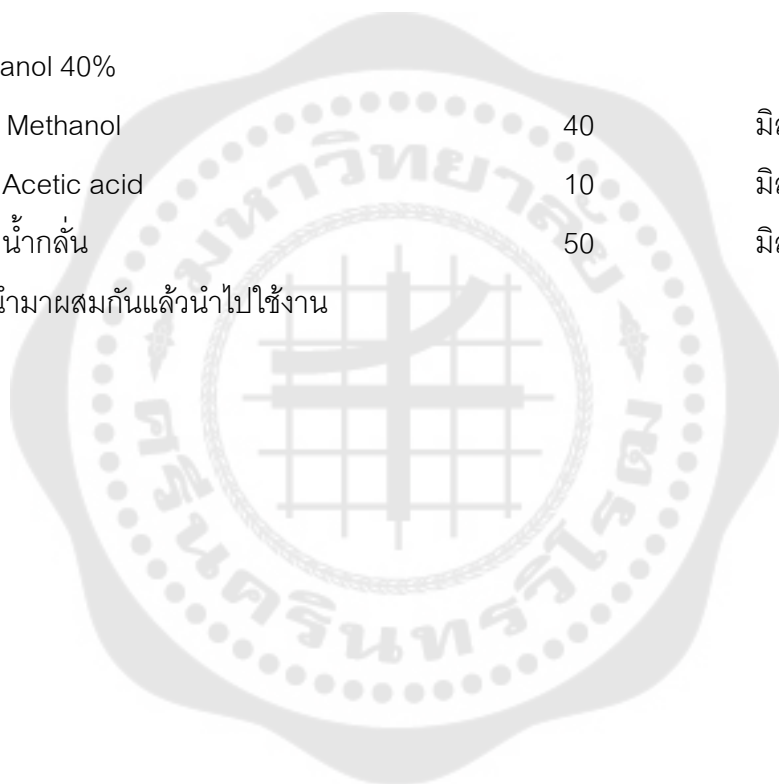
Ethanol	150	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	50	มิลลิลิตร
Coomassie brilliant blue R	1	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

นำ Coomassie brilliant blue R มาละลายใน ethanol ก่อน แล้วจึงเติมน้ำกลั่น และ Glacial acetic acid ปริมาตรรวม 500 มิลลิลิตร

6. Methanol 40%

Methanol	40	มิลลิลิตร
Acetic acid	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันแล้วนำไปใช้งาน





ภาคผนวก ค
ข้อมูลทางสถิติ

ภาคผนวก ค

ตาราง 31 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเตสและแมงกานีสออกซิเดสในการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิดเป็นเวลา 13 วัน

วันที่ทำการทดลอง	peptone		yeast extract		sodium nitrate	
	แลคเตส	แมงกานีสออกซิเดส	แลคเตส	แมงกานีสออกซิเดส	แลคเตส	แมงกานีสออกซิเดส
1	0	0	0	0	0	0
3	0	0.2347 ± 0.032	0.0197 ± 0.004	0.1920 ± 0.144	0	0.2293 ± 0.042
5	1.6330 ± 0.105	1.1227 ± 0.060	2.6013 ± 0.099	1.8840 ± 0.065	1.0367 ± 0.089	0.9947 ± 0.092
7	3.5667 ± 0.102	2.7933 ± 0.172	3.9600 ± 0.144	4.9233 ± 0.337	3.1300 ± 0.240	3.5500 ± 0.111
9	2.1833 ± 0.330	2.3400 ± 0.105	1.3500 ± 0.355	3.4700 ± 0.235	1.6067 ± 0.191	2.7167 ± 0.313
11	0.2623 ± 0.013	0.9880 ± 0.087	0.3633 ± 0.026	1.3720 ± 0.140	0.2747 ± 0.008	1.0360 ± 0.073
13	0.2083 ± 0.007	0.7780 ± 0.039	0.2410 ± 0.029	0.6430 ± 0.049	0.1963 ± 0.008	0.3897 ± 0.017

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดง Mean ± Standard Deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95

ตาราง 32 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคสและ
แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

pH	กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์	
	เอนไซม์แลคเคส	เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
3.0	34.5368 ± 1.210 ^e	11.0526 ± 1.033 ^H
3.5	48.0054 ± 0.650 ^d	26.3158 ± 1.918 ^E
4.0	100.00 ^a	100.00 ^A
4.5	71.0210 ± 2.671 ^b	88.4210 ± 0.225 ^B
5.0	54.9831 ± 4.599 ^c	60.9774 ± 1.112 ^C
5.5	34.9020 ± 0.737 ^e	45.7143 ± 1.752 ^D
6.0	11.4266 ± 1.166 ^f	29.4737 ± 0.396 ^E
6.5	3.0290 ± 0.619 ^g	21.2030 ± 0.406 ^F
7.0	0.0000 ± 0.000 ^g	16.7669 ± 0.172 ^G

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง Mean ± Standard Deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้
One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95
ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กคือค่าทางสถิติของเอนไซม์แลคเคส และอักษรพิมพ์ใหญ่ของ
เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

ตาราง 33 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของค่าคุณภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

คุณภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของค่าคุณภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	
	เอนไซม์แลคเคส	เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
30	70.4291 ± 1.797 ^e	36.6511 ± 0.830 ^E
37	81.3836 ± 2.660 ^d	56.5575 ± 3.087 ^D
40	87.1876 ± 1.701 ^c	66.0423 ± 1.580 ^C
50	95.2273 ± 0.874 ^b	95.7261 ± 1.437 ^A
60	100.00 ^a	100.00 ^A
70	49.9615 ± 1.865 ^f	75.7612 ± 5.006 ^B
80	5.2210 ± 0.646 ^g	11.0070 ± 1.574 ^F

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง Mean ± Standard Deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95 ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กคือค่าทางสถิติของเอนไซม์แลคเคส และอักษรพิมพ์ใหญ่ของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

ตาราง 34 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสที่ pH เท่ากับ 3.0 – 7.0 เมื่อป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

pH	กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสที่เวลาต่างๆ (ชั่วโมง)			
	0	24	48	72
3.0	100.00 ^a	-	-	-
3.5	100.00 ^a	-	-	-
4.0	100.00 ^a	95.1808 ± 4.173 ^{ab}	92.7712 ± 4.173 ^{ab}	83.1326 ± 7.228 ^b
4.5	100.00 ^a	89.4737 ± 8.899 ^{ab}	77.6316 ± 2.279 ^{bc}	74.3421 ± 6.029 ^c
5.0	100.00 ^a	71.7579 ± 3.397 ^b	63.0163 ± 2.915 ^c	51.9693 ± 0.880 ^d
5.5	100.00 ^a	87.5625 ± 1.637 ^b	81.3438 ± 3.777 ^b	71.7655 ± 4.748 ^c
6.0	100.00 ^a	98.2202 ± 1.772 ^a	93.6717 ± 0.823 ^b	92.2874 ± 1.286 ^b
6.5	100.00 ^a	98.0443 ± 1.568 ^a	98.5006 ± 0.790 ^a	99.3481 ± 1.476 ^a
7.0	100.00 ^a	97.8684 ± 0.691 ^a	93.7272 ± 2.034 ^b	85.9318 ± 1.116 ^c

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง Mean ± Standard Deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95

ตาราง 35 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ pH เท่ากับ 3.0 – 7.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

pH	กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่เวลา ต่างๆ (ชั่วโมง)			
	0	24	48	72
3.0	100.00 ^a	-	-	-
3.5	100.00 ^a	-	-	-
4.0	100.00 ^a	77.6471 ± 6.113 ^b	72.9412 ± 2.037 ^b	75.2941 ± 8.150 ^b
4.5	100.00 ^a	96.5517 ± 5.972 ^a	89.6552 ± 5.972 ^{ab}	79.3103 ± 5.972 ^b
5.0	100.00 ^a	64.2150 ± 1.490 ^b	61.2447 ± 0.489 ^b	45.9689 ± 4.416 ^c
5.5	100.00 ^a	86.5672 ± 0.789 ^b	76.9154 ± 0.911 ^c	74.0299 ± 0.597 ^d
6.0	100.00 ^a	105.6000 ± 2.806 ^a	102.5140 ± 1.814 ^{ab}	94.7429 ± 0.791 ^c
6.5	100.00 ^a	96.4151 ± 2.568 ^{ab}	94.3396 ± 1.337 ^b	93.0189 ± 0.589 ^b
7.0	100.00 ^a	99.8183 ± 1.031 ^a	99.7275 ± 1.786 ^a	95.7312 ± 0.629 ^b

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง Mean ± Standard Deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95

ตาราง 36 ปฏิกิริยารวมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แลคเตสต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30 – 80 องศาเซลเซียส เมื่อประมาณ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปฏิกิริยารวมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แลคเตสที่เวลาต่างๆ (ชั่วโมง)					
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
30	100.00 ^a	92.7058 ± 2.176 ^b	97.5894 ± 2.085 ^a	100.4660 ± 1.097 ^a	92.1264 ± 1.118 ^b	99.3691 ± 0.705 ^a
37	100.00 ^a	95.4684 ± 1.903 ^b	98.1585 ± 1.934 ^{ab}	96.0892 ± 0.501 ^{ab}	99.7622 ± 0.698 ^a	98.9759 ± 2.162 ^{ab}
40	100.00 ^a	96.0374 ± 0.682 ^{abc}	94.7131 ± 3.343 ^{abc}	97.0721 ± 0.958 ^{ab}	90.8021 ± 1.572 ^c	93.5129 ± 2.807 ^{bc}
50	100.00 ^a	92.5920 ± 2.492 ^b	90.8021 ± 1.168 ^{bc}	92.8714 ± 0.651 ^b	88.2671 ± 2.036 ^c	86.7358 ± 1.203 ^c
60	100.00 ^a	61.3245 ± 1.379 ^b	49.2396 ± 1.631 ^c	36.3167 ± 0.357 ^d	27.8014 ± 1.552 ^e	25.7424 ± 2.319 ^e
70	100.00 ^a	-	-	-	-	-
80	100.00 ^a	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง Mean ± Standard Deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey

ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95

ตาราง 37 กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แอมงานีสเปอรอกซิเดสต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30 – 80 องศาเซลเซียส เมื่อไม่นาน 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (%) ของความเสถียรของเอนไซม์แอมงานีสเปอรอกซิเดสที่เวลาต่างๆ (ชั่วโมง)					
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
30	100.00 ^a	91.6365 ± 1.485 ^c	91.3667 ± 1.090 ^c	97.2120 ± 0.561 ^b	95.1437 ± 1.090 ^b	101.349 ± 0.867 ^a
37	100.00 ^a	97.3919 ± 1.427 ^a	97.4818 ± 1.216 ^a	96.4027 ± 1.914 ^{ab}	92.8955 ± 2.246 ^b	99.1904 ± 1.734 ^a
40	100.00 ^a	96.4027 ± 1.216 ^{ab}	94.2444 ± 2.095 ^b	94.3343 ± 1.648 ^b	87.9494 ± 0.972 ^c	87.6797 ± 1.236 ^c
50	100.00 ^a	88.7588 ± 1.502 ^b	87.1401 ± 1.427 ^b	85.7012 ± 1.648 ^{bc}	82.4638 ± 1.648 ^{cd}	80.0358 ± 1.216 ^d
60	100.00 ^a	63.6240 ± 0.473 ^b	45.2787 ± 0.813 ^c	31.6996 ± 0.486 ^d	24.7302 ± 1.330 ^e	17.7158 ± 0.957 ^f
70	100.00 ^a	-	-	-	-	-
80	100.00 ^a	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดง Mean ± Standard Deviation และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พิสิฐุ ธรรมวิทยากร
วัน เดือน ปี เกิด	4 มีนาคม 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2558 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม จาก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2562 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	89/969 ซอยนวมินทร์81แยก3-16 แขวงนวมินทร์ เขตบึงกุ่ม กรุงเทพมหานคร 10240
ผลงานตีพิมพ์	Thamvithayakorn P, Phosri C, Khaengraeng R, Whalley AJS, Suwannasai N. Ligninolytic enzyme production from white-rot fungi by using oil palm decanter cake as substrate to high value add products. Asian Mycological Congress 2019. 1 - 4 October 2019, Mie Center for the Arts, Japan. Thamvithayakorn P, Phosri C, Pisutpaisal N, Krajangsang S, Whalley AJS, Suwannasai N. Utilization of oil palm decanter cake for valuable laccase and manganese peroxidase enzyme production from a novel white-rot fungus, Pseudolagarobasidium sp. PP17-33. 3 Biotech. 2019; 9: 417.
รางวัลที่ได้รับ	ทุนพัฒนาศักยภาพทางวิชาการ นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2560 และ 2561 ทุนการศึกษานับสนุนการเข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานของนิสิตระดับ บัณฑิตศึกษา (GRAD S-3-63) จากบัณฑิตวิทยาลัย ในงานประชุม "Asian Mycological Congress 2019", Tsu, Japan