วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.3) September – December 2022 บทความวิจัย

การศึกษาเชื้อเห็ดในสกุลนางรมที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส

A Study of Oyster Mushrooms for Producing Cellulase Enzyme

จิรพรพงศ์ นุ่มศิริ, ธีรวัฒน์ คิดเห็น, อภิวัฒน์ สุขเกษม และ ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย*

Jirapornpong Numsiri, Teerawat Khithen, Apiwat Sukkasem and Nattawut Rungjindamai*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Department of Biology, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Received : 18 October 2021

Revised : 11 December 2021

Accepted : 23 December 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเห็ดสกุลนางรม (Oyster mushroom, *Pleurotus* spp.) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) และเห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดนางรมจาก 7 จังหวัดในภาคกลางและภาคตะวันออกของประเทศไทย รวมจำนวน 15 ตัวอย่าง แยกเชื้อเห็ดจากตัวอย่าง 2 ประเภท ได้แก่ ดอกเห็ดสดและหัวเชื้อเห็ดในเมล็ดข้าวฟ่าง ได้เชื้อเห็ดบริสุทธิ์จำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ นางฟ้า นางรม และเป๋าฮื้อ จำนวน 5, 6 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ นำเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ที่แยกได้ 13 ไอโซเลตมาศึกษาความสามารถในการเจริญของเส้นใยเห็ดบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) และทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร Czapek Dox Agar (CZ) ที่ผสมกับ 1% ของ carboxymethyl cellulose (CMC) บ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่าเชื้อเห็ดสกุลนางรมจำนวน 3 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้รวดเร็วและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด ได้แก่ เห็ดนางฟ้า ไอโซเลต PS5 เห็ดนางรม ไอโซเลต PO7 และ เห็ดเป๋าฮื้อ ไอโซเลต PC1 ซึ่งสามารถนำไปศึกษาต่อยอดด้านการเพาะเลี้ยงเห็ดต่อไปในอนาคต เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว และสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี

คำสำคัญ : เห็ดนางรม ; เห็ดนางฟ้า ; เห็ดเป๋าฮื้อ ; เห็ดกินได้ ; เซลลูเลส

Abstract

The objective of this research was to study three species of *Pleurotus* spp., are widely consumed edible mushrooms, consisting of *P. sajor-caju*, *P. ostreatus* and *P. cystidiosus*. Basidiocarp and spawn on sorghum seeds were collected from seven provinces in Central and Eastern of Thailand. Thirteen isolates were recovered from 15 samples which include *P. sajor-caju*, *P. ostreatus* and *P. cystidiosus* for 5, 6 and 2 isolates, respectively. The studies of their growth rates and enzymatic capability were performed on potato dextrose ager (PDA) and Czapek Dox Agar mixed with 1% carboxymethyl cellulose (CZ+CMC), respectively. Both media were incubated at 25ºC for seven days. The three most potential isolates were selected including *P. sajor-caju* PS5, *P. ostreatus* PO7 and *P. cystidiosus* PC1. Therefore, these mushrooms have potential for development in the future. Because they can grow rapidly and produce cellulase effectively.

Keywords : oyster mushroom ; cellulase ; edible mushroom ; *Pleurotus*

***Corresponding author. E-mail** : nattawut.ru@kmitl.ac.th

บทนำ

เห็ดเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเกษตรกรสามารถเพาะเห็ดได้หลายชนิด ในทุกภาคของประเทศ เป็นอาหารที่คนทั่วไปนิยมรับประทาน สามารถนำไปปรุงอาหารได้หลายชนิด มีคุณค่าทางอาหารสูง โดยเฉพาะโปรตีนและแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบ แต่มีปริมาณไขมันน้อย ดังนั้นจึงถือว่าเห็ดเป็นอาหารสุขภาพที่สำคัญ เห็ดสกุลนางรม (Oyster mushroom) อยู่ในสกุล *Pleurotus* เป็นเห็ดที่ได้รับความนิยมในผลิตเพื่อการค้า ให้ผลผลิตสูง สามารถเพาะให้ดอกได้ตลอดปี มีราคาสูง มีรสชาติอร่อย เนื้อเห็ดมีความเหนียวและยืดหยุ่น คล้ายเนื้อหอยนางรม และมีธาตุอาหารหลายชนิด (Rajarathnam *et al.* 2009)

เห็ดสกุลนางรม (*Pleurotus*) ได้แก่ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม และเห็ดเป๋าฮื้อ จัดเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ เกษตรกรผู้เพาะเห็ดส่วนใหญ่นิยมเพาะ เนื่องจากเพาะได้ง่าย การดูแลรักษาไม่ยุ่งยาก การเกิดโรคและแมลงน้อย สามารถเพาะให้ออกดอกได้ตลอดทั้งปีโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีอยู่ในท้องถิ่น และมีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงในระดับอุสาหกรรม ดอกเห็ดสกุลนางรมโดยทั่วไป มีลักษณะทรงร่ม ผิวเรียบ มีสีขาว ครีม น้ำตาลอ่อน ไปจนถึงสีเทาดำ ก้านดอกทรงกระบอก มีครีบด้านล่างของดอกเห็ด เส้นใยเจริญเต็มถุงก้อนเห็ดใช้ระยะเวลา 25-45 วัน ที่อุณหภูมิ 30-33°C และออกดอกนาน 2-3 เดือนที่อุณหภูมิ 20-30°C ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 75-85% (Saengwanich *et al*. 2013) เห็ดกลุ่มนี้เป็นเห็ดที่เพาะเลี้ยงให้ออกดอกได้ง่าย ให้ผลผลิตเร็ว สามารถเพาะโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ขี้เลื่อย และฟางข้าว เป็นต้น ดังนั้นจึงใช้เงินเริ่มต้นทุนไม่มากนัก แต่พบว่าให้ผลตอบแทนสูงและมีระยะเวลาการคืนทุนสั้น (Thaneerananon & Vilalai, 2019)

การสร้างเอนไซม์ของเห็ดเป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงเห็ด เนื่องจากเห็ดจะสร้างเอนไซม์จากภายในแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยแหล่งอาหารแล้วนำสารอาหารกลับสู่เซลล์ เห็ดราส่วนใหญ่ที่ดำรงชีวิตในธรรมชาติและเกี่ยวข้องกับพืชสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ (Aschariyaphotha *et al*. 2018) กลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการใช้เพื่อย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เนื่องจากวัสดุพวกนี้มีองค์ประกอบหลักเป็นสารจำพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อเห็ดสกุลนางรมจากแหล่งเพาะเห็ดทั่วประเทศ เพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญบนอาหาร potato dextrose agar และเพื่อศึกษาคุณสมบัติของเห็ดสกุลนางรมที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การเก็บตัวอย่างเห็ดสกุลนางรม และสถานที่เก็บตัวอย่าง

เลือกเก็บตัวอย่างเห็ดสกุลนางรม (*Pleurotus* spp.) จาก 7 จังหวัดในภาคกลางและภาคตะวันออก โดยเลือกเก็บตัวอย่างเห็ด 3 ชนิดได้แก่ เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า และเห็ดเป๋าฮื้อ เห็ด รายละเอียดแสดงไว้ในภาพที่ 1 และตารางที่ 1 สามารถแบ่งตัวอย่างของเห็ดที่เก็บได้เป็น 2 ประเภทได้แก่ (1) ดอกเห็ดสด และ (2) หัวเชื้อเห็ดในเมล็ดข้าวฟ่าง เก็บตัวอย่างด้วยการซื้อจากตลาดสดและแหล่งเพาะเห็ด โดยดอกเห็ดที่เก็บมาต้องไม่อ่อนไม่แก่เกินไป และยังไม่บานเต็มที่ ก้านดอกสีขาว หมวกเห็ดมีสีขาวครีมไปจนถึงเทาดำ เก็บตัวอย่างดอกเห็ดจำนวน 0.5 กิโลกรัมต่อแหล่ง และสำหรับหัวเชื้อเห็ดในเมล็ดข้าวฟ่าง เก็บตัวอย่างจำนวน 2 ขวด ต่อสถานที่ เลือกขวดที่มีเส้นใยของเห็ดเจริญอย่างน้อยครึ่งขวด

ดอกเห็ดสด

หัวเชื้อในเมล็ดข้าวฟ่าง

ภาพที่ 1 ลักษณะดอกเห็ดสกุลนางรมชนิดสด (ก) และหัวเชื้อเห็ดเจริญบนเมล็ดข้าวฟ่าง (ข)

ตารางที่ 1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อเห็ดจากแหล่งต่างๆ

ชนิดเห็ด (ชื่อวิทยาศาสตร์)	วันที่เก็บ	รหัส	สถานที่เก็บ	จังหวัด	ประเภทตัวอย่าง	ผลการแยกเชื้อ
เห็ดนางรม	27 พ.ย. 61	PO1	ตลาดไท	ปทุมธานี	ดอกเห็ดสด	+
(*P. ostreatus*)		PO2	ตลาดไท	ปทุมธานี	หัวเชื้อเห็ด	+
		PO3	ฟาร์มเห็ดบางกระเจ้า	สมุทรปราการ	หัวเชื้อเห็ด	+
		PO4	ตลาดสดพัทยา	ชลบุรี	ดอกเห็ดสด	-
		PO5	ตลาดสดบ่อบัว	ฉะเชิงเทรา	ดอกเห็ดสด	-
	23 ธ.ค. 61	PO6	ฟาร์มเห็ดศรีทอง	นครปฐม	หัวเชื้อเห็ด	+
		PO7	ฟาร์มเห็ดไพลิน	นนทบุรี	หัวเชื้อเห็ด	+
	5 ม.ค. 62	PO8	ฟาร์มเห็ดโพธาราม	ราชบุรี	หัวเชื้อเห็ด	+
เห็ดนางฟ้า	7 ธ.ค. 61	PS1	ตลาดไท	ปทุมธานี	ดอกเห็ดสด	+
(*P. sajor-caju*)	15 ธ.ค. 61	PS2	ฟาร์มเห็ดศรีทอง	นครปฐม	หัวเชื้อเห็ด	+
	19 ธ.ค. 61	PS3	ฟาร์มเห็ดโพธาราม	ราชบุรี	หัวเชื้อเห็ด	+
	23 ธ.ค. 61	PS4	ฟาร์มเห็ดศรีทอง	นครปฐม	หัวเชื้อเห็ด	+
		PS5	ฟาร์มเห็ดไพลิน	นนทบุรี	หัวเชื้อเห็ด	+
เห็ดเป๋าฮื้อ	15 ม.ค. 62	PC1	ฟาร์มเห็ดโพธาราม	ราชบุรี	หัวเชื้อเห็ด	+
(*P. cystidiosus*)	15 ม.ค. 62	PC2	ฟาร์มเห็ดโพธาราม	ราชบุรี	หัวเชื้อเห็ด	+
		รวม		7 จังหวัด	15 ตัวอย่าง	13 ไอโซเลต

หมายเหตุ + = สามารถแยกได้เชื้อบริสุทธิ์ - = ไม่สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้

การแยกเชื้อเห็ด

การแยกเชื้อเห็ดจากดอกเห็ด

ทำการแยกเชื้อเห็ดจากก้านดอก ใช้วิธีดัดแปลงจาก Saengwanich *et al*. 2013 โดยเลือกดอกเห็ดที่มีขนาดใหญ่ แต่ยังไม่บานเต็มที่ เลือกตัวอย่างเห็ดที่มีก้านดอกสีขาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 เซนติเมตร และหมวกเห็ดสีครีมไปจนถึงสีเทาดำ มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 2-5 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) ใช้ใบมีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปผ่านไฟ แล้วนำไปตัดส่วนด้านในของก้านเห็ดและหมวกเห็ดที่ไม่สัมผัสกับอากาศและสิ่งแวดล้อม ทำในสภาพปลอดเชื้อ ตัดออกเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาดเล็ก โดยตัดทั้งหมด 5-10 ชิ้น จากนั้นใช้ปากคีบนำไปวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่มียาปฏิชีวนะด้วยวิธีปลอดเชื้อ โดยวางตัวอย่างเนื้อเยื่อเห็ดจำนวน 3 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ ปิดจานอาหารด้วยแผ่นพาราฟิล์มแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อพบว่ามีเส้นใยเจริญออกจากตัวอย่างชิ้นเห็ด ทำการแยกเชื้อลงบนอาหาร PDA แบบไม่ผสมยาปฏิชีวนะ จะได้เชื้อเห็ดบริสุทธิ์ออกมาใช้ในการศึกษาต่อไป

การแยกเชื้อเห็ดจากเมล็ดข้าวฟ่าง

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อราเขี่ยเชื้อเห็ดที่บรรจุอยู่ในขวด นำไปวางลงบนจานเพาะอาหาร PDA เลือกเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเส้นใยเห็ดขึ้นจนทั่วเมล็ดข้าวฟ่าง โดยวางเมล็ดข้าวฟ่างจำนวน 3 เมล็ด ต่อ 1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อโดยทุกขั้นตอนใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ทำการปิดจานเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยแผ่นพาราฟิล์ม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อพบว่ามีเส้นใยเจริญออกจากตัวอย่างชิ้นเห็ด ทำการแยกเชื้อลงบนอาหาร PDA แบบไม่ผสมยาปฏิชีวนะ จะได้เชื้อเห็ดบริสุทธิ์ออกมาใช้ในการศึกษาต่อไป

การศึกษาคุณสมบัติของเห็ดสกุลนางรม

อัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดบนอาหารแข็ง PDA

นำเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ที่เก็บรักษาไว้บน PDA slant มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน เมื่อโคโลนีของเชื้อเห็ดโตเต็มที่ ใช้ cork borer เบอร์ 1 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะลงบนเส้นใยเชื้อราบริเวณขอบของโคโลนี แล้วใช้เข็มเขี่ยถ่ายเชื้อของชิ้นวุ้น โดยคว่ำส่วนด้านที่เป็นเส้นใยติดมาแนบติดกับอาหารในจานเพาะเลี้ยง PDA โดยวางตรงจุดกึ่งกลางของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด โดยเก็บข้อมูลในวันที่ 0, 3, 5 และ 7 โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อเห็ดเป็นค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีจากแนวตั้งและแนวนอนที่ตั้งฉากกัน วัดค่าเป็นเซนติเมตร แต่ละไอโซเลตของเชื้อเห็ดทำ 3 ซ้ำ (อาหาร PDA 3 จาน) แล้วนำค่าทั้ง 3 มาหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Error, SE)

การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CZ+CMC

เตรียมอาหาร Czapek Dox Agar (CZ) ผสมกับ 1% ของ carboxymethyl cellulose (CMC) ลงเชื้อเห็ดด้วยการใช้ cork borer เบอร์ 1 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) เจาะลงบนเส้นใยของหัวเชื้อเห็ด วางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเห็ดลงบนอาหาร CZ+CMC โดยคว่ำส่วนด้านที่เป็นเส้นใยติดกับอาหาร วางลงบนจุดกึ่งกลางของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ปิดพาราฟิล์มที่จานเพาะเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 7 วัน ทำการวัดอัตราการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสด้วยการเทสารละลาย 1% Congo red ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนหน้าอาหาร CZ+CMC ที่มีโคโลนีของเชื้อเห็ดเจริญอยู่ ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเทสารละลาย Congo red ทิ้ง จากนั้นล้างด้วยสารละลายน้ำเกลือ 1 % (1% NaCl) ปริมาณ

5 มิลลิลิตร แล้วเทสารละลายน้ำเกลือทิ้ง ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อเห็ด เฉพาะส่วนที่เป็นสีขาว เนื่องจากส่วนสีขาวแสดงถึงบริเวณที่เซลลูโลสถูกย่อยสลายจนหมด จึงไม่ติดสีแดงของ Congo red โดยวัดในแนวตั้งฉากกัน หน่วยเป็นเซนติเมตร ในการทดลองการทดสอบเอนไซม์เซลลูเลส ทำ 5 ซ้ำ ต่อ 1 ไอโซเลต (5 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ)

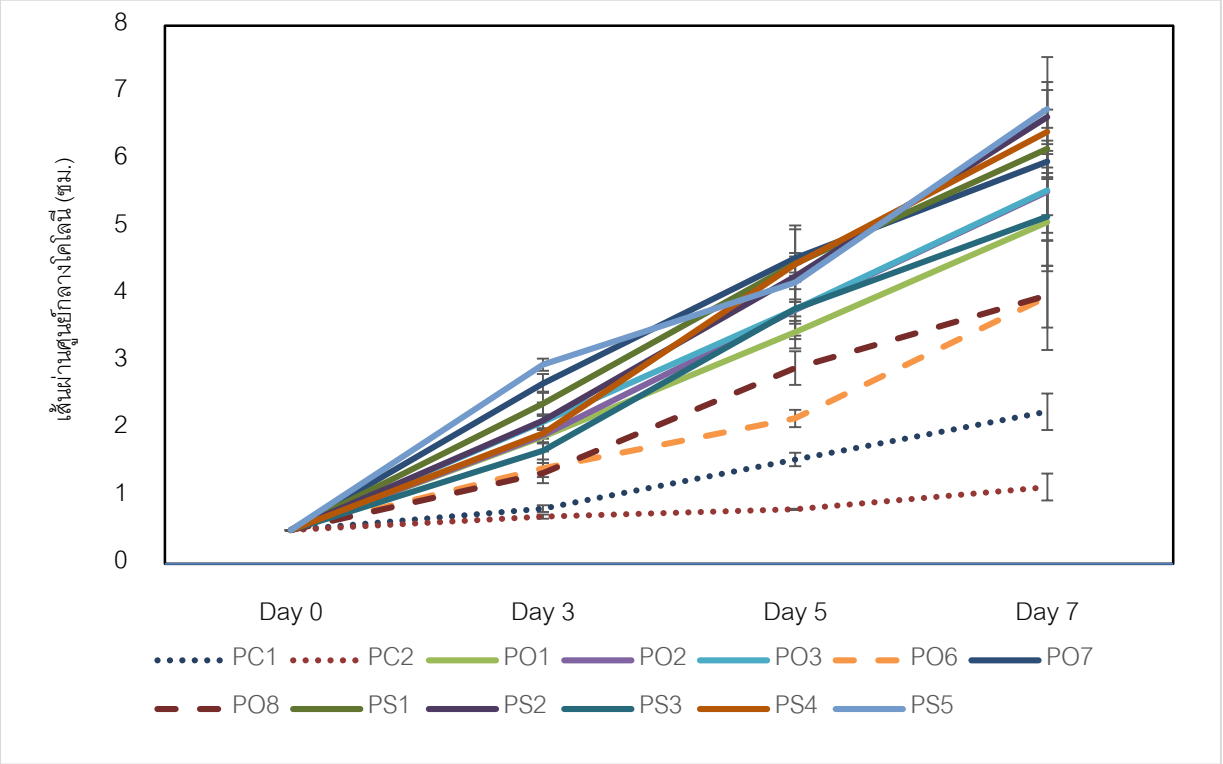
ผลการวิจัย

การแยกเชื้อเห็ด

ผลการเก็บตัวอย่างเห็ดสกุลนางรม 3 ชนิดคือ เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้าและเห็ดเป๋าฮื้อ จาก 7 จังหวัด ได้แก่ ปทุมธานี สมุทรปราการ ชลบุรี ฉะเชิงเทรา นครปฐม นนทบุรี และราชบุรี จำนวน 15 แหล่ง (ตารางที่ 1) สามารถแยกเชื้อเห็ดให้บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลต แบ่งเป็น เห็ดนางฟ้า (รหัส PS) 5 ไอโซเลต เห็ดนางรม (รหัส PO) 6 ไอโซเลต และเห็ดเป๋าฮื้อ (รหัส PC) 2 ไอโซเลต โดยที่ 2 ตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้คือ PO4 (ตลาดสดพัทยา จ.ชลบุรี) และ PO5 (ตลาดสดบ่อบัว จ.ฉะเชิงเทรา) ซึ่งเป็นทั้ง 2 ตัวอย่างเป็นดอกเห็ดสดที่จำหน่ายในท้องตลาด

อัตราการเจริญของเห็ดสกุลนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อเห็ดสกุลนางรมที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อศึกษาอัตราการเจริญ และความสามารถในสร้างเส้นใย โดยบ่มนาน 7 วัน (ภาพที่ 2) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อเห็ดในวันที่ 0, 3, 5 และ 7 พบว่าสามารถแบ่งอัตราการเจริญของเห็ดที่ศึกษาได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ (1) มีอัตราการเจริญเร็ว (มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง >5 เซนติเมตร ภายใน 7 วัน) มีจำนวน 9 ไอโซเลต ได้แก่ PO1, PO2, PO3, PO7, PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 กลุ่มที่ (2) มีอัตราการเจริญปานกลาง (มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 เซนติเมตร ภายใน 7 วัน) มีจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ PO6 และ PO8 และกลุ่มที่ (3) มีอัตราการเจริญช้า (มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 เซนติเมตร ภายใน 7 วัน) มีจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ PC1 และ PC2 โดยสังเกตพบว่าเห็ดกลุ่มที่มีอัตราการเจริญเร็วและปานกลาง มีลักษณะการเจริญคล้ายกัน คือเส้นใยของเชื้อเห็ดเริ่มเจริญตั้งแต่วันที่ 3 และเจริญเติบโตขึ้นเป็นลำดับ เมื่อครบ 7 วันมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีอยู่ในช่วง 4-7 เซนติเมตร ในขณะที่กลุ่มเห็ดที่เส้นใยเจริญเติบโตช้า เริ่มเจริญขึ้นในวันที่ 5 เป็นต้นไป โดยมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร สำหรับเชื้อเห็ด 3 ชนิดที่มีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA รวดเร็ว ได้แก่ เห็ดนางฟ้า ไอโซเลต PS5 เห็ดนางรมไอโซเลต PO7 และ เห็ดเป๋าฮื้อ ไอโซเลต PC1 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6.76, 5.98 และ 2.26 เซนติเมตร ตามลำดับ

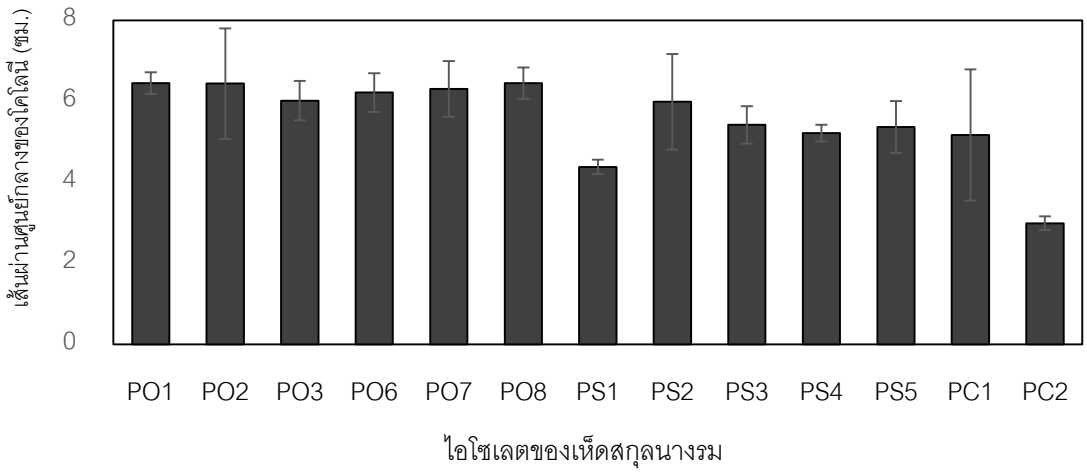


ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงอัตราการเจริญเติบโตเห็ดสกุล *Pleurotus* บนอาหาร PDA ระยะเวลา เพาะเลี้ยง 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

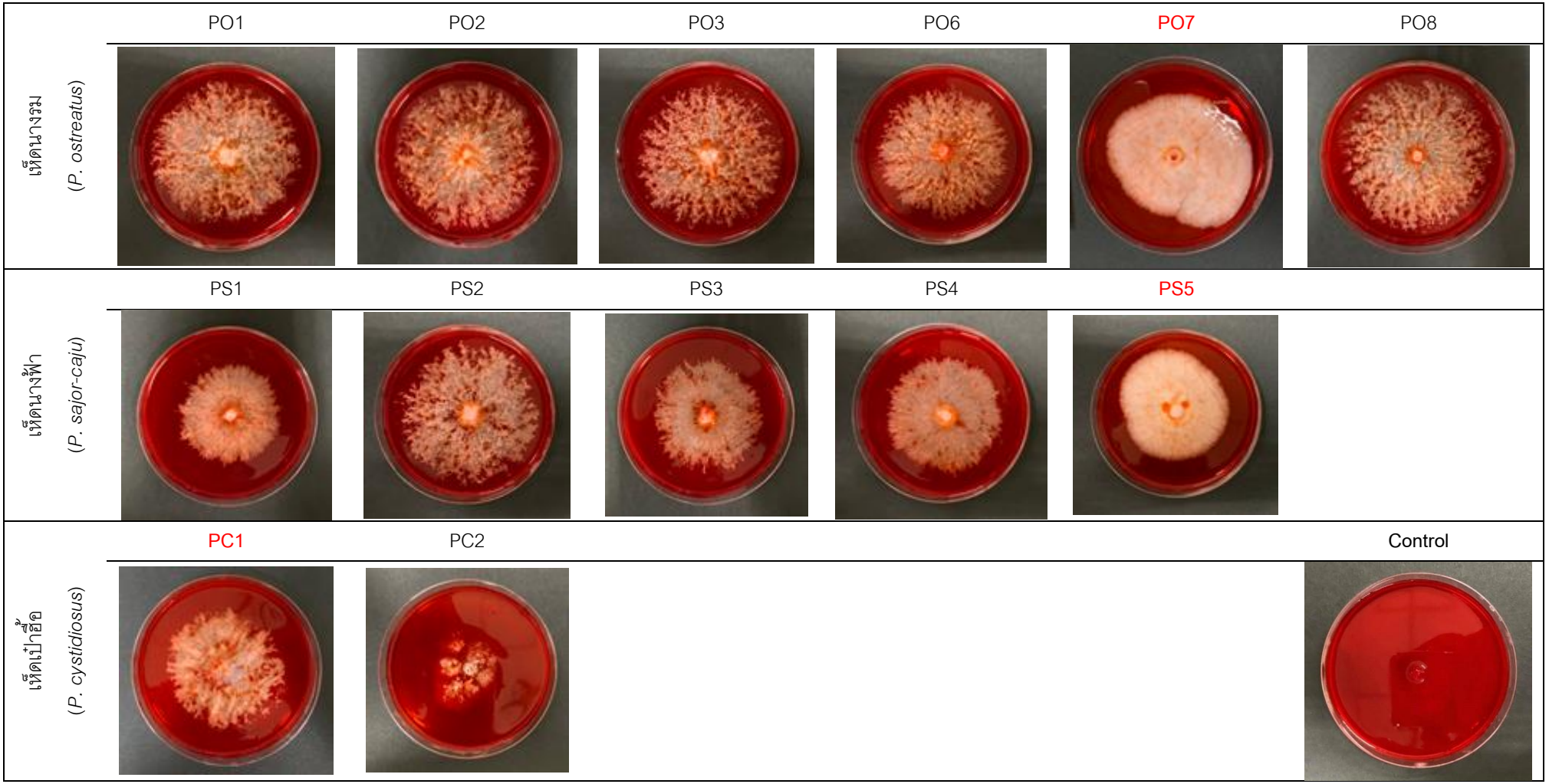
หมายเหตุ : PS = เห็ดนางฟ้า, PO = เห็ดนางรม และ PC = เห็ดเป๋าฮื้อ

การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเห็ดสกุลนางรมบนอาหาร CZ+CMC

ความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเห็ดสกุลนางรม บนอาหาร Czapek dox agar (CZ) โดยใช้สาร carboxymethyl cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน (CZ+CMC) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ผลการศึกษาผลบวกคือการเจริญของเส้นใยบนอาหารและเมื่อย้อมแล้วเป็นสีขาว เนื่องจากไม่ติดสีแดงของสี Congo red กราฟเปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่วัดได้แสดงไว้ในภาพที่ 3 โดยรวมพบว่าขนาดของโคโลนี ที่ได้จากเห็ดนางรม (รหัส PO) มีขนาดใหญ่ที่สุด อยู่ในช่วง 6.02-6.45 เซนติเมตร รองลงมาคือเห็ดนางฟ้า (รหัส PS) มีขนาดอยู่ในช่วง 4.38-5.99 เซนติเมตร และเห็ดเป๋าฮื้อ (รหัส PC) มีขนาดวงใสโดยรวมเล็กที่สุดโดยอยู่ในช่วง 2.99-5.17 เซนติเมตร ชุดควบคุมลบ (negative control) เป็นอาหาร CZ+CMC ที่วางชิ้นวุ้นที่ไม่มีเชื้อเห็ด พบว่าไม่มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ดังนั้นเมื่อนำไปย้อมสีจึงพบเป็นลักษณะสีแดงทั้งหมด สำหรับลักษณะของโคโลนีของเห็ดสกุลนางรมที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแสดงไว้ในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเห็ดสกุลนางรมบนอาหาร CZ+CMC เมื่อเพาะเลี้ยงที่ 25 ° C นาน 7 วัน
หมายเหตุ : PS = เห็ดนางฟ้า, PO = เห็ดนางรม และ PC = เห็ดเป๋าฮื้อ



ภาพที่ 4 ลักษณะของโคโลนีของเห็ดสกุลนางรมที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อทดสอบบนอาหาร CZ+CMC ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วิจารณ์ผลการวิจัย

การแยกเชื้อเห็ดควรใช้ตัวอย่างดอกเห็ดสดที่เพิ่งเก็บใหม่ๆ จะมีโอกาสได้เชื้อบริสุทธิ์สูงที่สุด เนื่องจากการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างดอกเห็ดสดที่ขายตามท้องตลาดนั้น มีโอกาสได้เชื้อบริสุทธิ์น้อยกว่า เนื่องจากดอกเห็ดตามท้องตลาดมีอาจมีการปนเปื้อนภายนอกจากจุลินทรีย์อื่นๆ ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการต่างๆ รวมถึงดอกเห็ดที่ขายในท้องตลาดอาจจะมีความแก่เกินไป จึงทำให้เชื้อเห็ดมีสภาพไม่เหมาะสมสำหรับนำมาแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ดังนั้นการแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อศึกษาในขั้นเริ่มต้น จึงควรเริ่มแยกเชื้อจากดอกเห็ดที่สดและใหม่ เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ไปศึกษาในขั้นต่อๆ ไป สูตรและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญของเห็ด งานวิจัยของ Mahadevan and Shanmugasudaram (2018) ศึกษาการเจริญของเห็ด *P. sapidus* บนอาหารที่แตกต่างกัน 6 ชนิด ได้แก่ (1) Potato Dextrose Agar (PDA), (2) Malt Extract Agar (MEA), (3) Glucose Peptone Agar (GPA), (4) Yeast Malt Ager (YMA), (5) Saboraud's Dextrose Agar (SDA), (6) Czapek Dox Agar (CDA) พบว่าเห็ด *P. sapidus* สามารถเจริญบนอาหาร MEA, PDA และ YMA ได้ดี เส้นผ่านศูนย์กลางกว้างเต็มจานเพาะเลี้ยง และมีลักษณะเส้นใยหนา จึงทำให้เห็นว่า อาหารสูตรดังกล่าวช่วยส่งเสริมการเจริญของเห็ด *P. sapidus* ได้เป็นอย่างดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hoa and Wang (2015) ที่ศึกษาเห็ดนางรมและเห็ดเป๋าฮื้อ พบว่าอาหาร PDA และ yam dextrose agar (YDA) เหมาะต่อการเจริญของเห็ดทั้ง 2 ชนิด เนื่องจากในอาหารพวกนี้มีแหล่งคาร์บอนที่สำคัญเช่น น้ำตาลกลูโคส และแป้ง ที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ โดยพบว่าอาหาร PDA เป็นอาหารที่เหมาะสมในการนำมาใช้เพื่อการศึกษาการเจริญของเห็ดในสกุล *Pleurotus* โดยสามารถกระตุ้นให้เห็ดทั้ง 3 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม และเห็ดเป๋าฮื้อ โตได้ดีภายในระยะเวลาเพียง 7 วัน

สำหรับการศึกษาการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายเซลลูโลส ผลการศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Baldrian *et al.* (2003 ซึ่งพบว่าเห็ดสกุลนางรม สามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิดเพื่อย่อยสลายสารพอลิเมอร์จำพวก cellulose และ hemicellulose ได้เป็นอย่างดี โดยพบว่าแม้ว่าเห็ด *P. nebrodensis* ไม่ได้สร้างโซนใส (transparent circle) แต่ยังคงสามรถย่อยสลายสาร CMC ได้เป็นอย่างดี และในผลการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าเห็ดทั้ง 3 ชนิด ไม่ได้สร้างโซนใสเช่นเดียวกัน แต่ก็สามารถเห็นสภาวะการย่อยสลาย CMC ได้เป็นอย่างดี เหตุที่เห็ดกลุ่มนี้ไม่ได้สร้างโซนใสขนาดกว้างอาจเนื่องจากปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตและปล่อยออกมานอกเซลล์ยังไม่มากพอ แต่เอนไซม์ดังกล่าวยังมีปริมาณและประสิทธิภาพมากเพียงพอในการย่อยสลายเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และงานวิจัยของ Atri and Sharma (2012) พบว่าเห็ดสกุล *Pleurotus* 5 ชนิด ได้แก่ *P. cystidiosus, P. floridanus, P. sapidus P. pulmonarius* และ *P. sajor–caju* สามารถเจริญได้ดีบนอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเห็ดสกุลนางรมเป็นเห็ดที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้เป็นอย่างดี และอาหาร CZ ผสม CMC เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในการสร้างเอนไซม์ในเห็ดสกุล *Pleurotus*

สารเซลลูโลสซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของพืชหลายชนิด ดังนั้นจึงสามารถพบเซลลูโลสได้ทั่วไปในธรรมชาติ แต่เนื่องจากเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่โครงสร้างจัดเรียงตัวเป็นระเบียบที่จับกันด้วยพันธะเบต้า 1,4 ไกลโคซิดิกและพันธะไฮโดรเจนทำให้ยากต่อการย่อยสลาย ส่งผลให้ไม่สามารถละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ทั่วไป แต่พบว่าเห็ดหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซล์เซลลูเลสได้เป็นอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เห็ดสามารถย่อยสลายเซลลูโลสในซากพืชซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ เพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงแล้วดูดซึมกลับไปยังเซลล์และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป (Wu and Shin 2016) ดังนั้นการศึกษาถึงความสามารถในการ

เจริญของเห็ดแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่เห็ดจะสร้างเส้นใยได้อย่างรวดเร็ว และออกดอกได้ในระยะเวลาสั้น ทำให้เก็บผลผลิตได้เร็วขึ้น และการศึกษาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแสดงถึงความสามารถของเห็ดในการย่อยสลายวัสดุเพาะเห็ด เช่น ขี้เลื่อย ฟางข้าว ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นคุณสมบัติขั้นพื้นฐานนี้เป็นสิ่งที่สำคัญ เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อเห็ด เพื่อพัฒนาในการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

สรุปผลการวิจัย

สามารถแยกเชื้อเห็ดได้รวมทั้งหมด 13 ไอโซเลต แบ่งเป็นเห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) เห็ดนางรม (*P. ostreatus*) และเห็ดเป๋าฮื้อ (*P. cystidiosus*) จำนวน 5, 6 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ เมื่อศึกษาความสามารถในการเจริญบนอาหาร PDA และการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CZ ผสม CMC พบว่ามีเห็ดที่เจริญเร็วและสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุด 3 ไอโซเลต ได้แก่ เห็ดนางฟ้า ไอโซเลต PS5, เห็ดนางรม ไอโซเลต PO7 และ เห็ดเป๋าฮื้อ ไอโซเลต PC1

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารอ้างอิง

Aschariyaphotha W., Wattanuruk, D. & Nilrit, P. (2018). Cellulase activity assay from woody destroying fungi in alcohol production from water hyacinth (*Eichornia crassipes*) by simultaneous saccharification and fermentation. *VRU Research and Development Journal, 13*(3), 23-33. (in Thai)

Atri, N.S. & Sharma, S.K. (2012). Qualitative estimation of cellulases and lignin modifying enzymes in five wild fungal species selected from Northern West India. *Academic Journal of Plant Sciences, 5* (1), 23-27.

Baldrian, P. & Gabriel, J. (2003). Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiology Letters, 220,* 235-240.

Hoa, H.T. & Wang C.L. (2015). The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus osteratus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology, 43*(1), 14-23.

Mahadevan, K. & Shanmugasundaram, K. (2018). Comparative effect of different culture media on mycelial growth performance of *Pleurotus sapidus*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7*(4), 874-878.

Rajarathnam, S., Bano, Z. & Miles, P. (2009). *Pleurotus* mushrooms. Part I A. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding and cultivation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 26*(2), 157-223.

Saengwanich, U., Suwannarith, P., Payappanont, A., Laungsa-ard, J., Chansrikul, A. & Sakolruk, B. (2013). The List of Biological Resources – Mushrooms. Biodiversity-based Economy Development Office. (in Thai).

Thaneerananon, I. & Vilalai, P. (2019). Cost and return analysis of investment on oyster mushroom farming in Nakhon Pathom : Case study learning resources. *Journal of Management Science Nakhon Pathom Rajabhat University 6* (1), 91-108. (in Thai)

Wu, Y. and Shin, H.J. (2016). Cellulase from the fruiting bodies and mycelia of edible mushrooms: A review. *Journal of Mushrooms, 14*(4), 127-135.