

การตัดแยกและลักษณะสมบัติของราที่สลายสารพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน



นางสาวกุลณี ชูพึ่งอาตม์

สถาบันวิทยบริการ
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF POLYCYCLIC AROMATIC
HYDROCARBON DEGRADING FUNGI**



Miss Kunlanee Chupungars

**สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การคัดแยกและลักษณะสมบัติของราที่สลายสารพอลิไซคลิก
แอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน

โดย

นางสาวกุลณี ชูฟังอาดัม

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

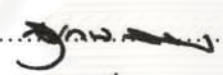
อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาตรีบัณฑิต


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เริงพิพัฒน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปันพานิชการ)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุตตัน เจริญพรวัฒนา)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจกรณ์ ประภักดี)

กุลณี ชูฟ้าอาดม : การคัดแยกและลักษณะสมบัติของราที่สลายสารพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน. (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON DEGRADING FUNGI) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน, อ. ที่ปรึกษาร่วม: อ.ดร.ปาหนัน เริงสำราญ 187 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกราที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายสารประกอบกลุ่มพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน โดยเก็บตัวอย่างมาจากแหล่งต่างๆในประเทศไทยและนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ จากตัวอย่างราที่แยกได้ทั้งหมด 153 ไอโซเลต พบว่ามีเพียง 1.3% ที่ได้แสดงความสามารถสูงในการย่อยสลายสารประกอบกลุ่มดังกล่าว จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างบริเวณ ITS1 และ ITS2 พบว่าไอโซเลตที่มีความสามารถสูงที่สุดในการย่อย PAH ได้หลายชนิด คือ *Agrocybe* sp. CU-43 รองลงมาได้แก่ *Xylaria* sp. CU-1 เมื่อทดสอบในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด พบว่าราทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถย่อย PAH ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรหลายชนิดได้ดี โดยพบว่า *Agrocybe* sp. CU-43 และ *Xylaria* sp. CU-1 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้ดีที่สุดคือย่อยสลายได้ 100% และ 94.5% ภายใน 6 วัน ตามลำดับ และสามารถย่อยสลายแอนทราซีนได้ 91.2% และ 68.0% ย่อยพีแนนทรีนได้ 99.2% และ 71.0% ภายใน 21 วัน ย่อยฟลูออแรนทรีนได้ 67.9% และ 24.3% และย่อยไพรีนได้ 81.2% และ 24.3% ภายใน 30 วันตามลำดับ และพบว่า *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถทนต่อฟลูออรีนได้สูงถึง 750 มก.ต่อลิตร สารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยสลายฟลูออรีนที่สำคัญ ได้แก่ 9-ฟลูออรีนอลซึ่งพบเป็นสารมัธยันตร์หลักและ 9-ฟลูออรีโนน โดยสารมัธยันตร์ทั้ง 2 ชนิด มีความเป็นพิษน้อยกว่าฟลูออรีน และพบว่า 9-ฟลูออรีนอลไม่ใช่สารมัธยันตร์สุดท้ายของกระบวนการย่อยสลายฟลูออรีน *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถผลิตแลคเคสได้สูง ร่วมกับผลิตแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสในระหว่างที่มีการย่อยสลายฟลูออรีนเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร โดยมีแอกติวิตีของแลคเคสสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 เท่ากับ 470 หน่วยต่อมล. และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 4.34 หน่วยต่อมล. แต่ไม่พบแอกติวิตีของลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนแลคเคสซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการสลายฟลูออรีนโดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแลคเคสของ *Agrocybe* sp. CU-43 พบว่าการแสดงออกของยีนแลคเคสสอดคล้องกับแอกติวิตีที่ตรวจพบในระหว่างการย่อยสลายฟลูออรีน นอกจากนี้รา *Agrocybe* sp. CU-43 ยังมีการเจริญได้ดีในระหว่างการย่อยสลายฟลูออรีนเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตรด้วย *Agrocybe* sp. CU-43 ยังสามารถย่อยสลายฟลูออรีนความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อดินแห้ง 1 กรัมในแบบจำลองดินได้ ทั้งในภาวะที่ปลอดเชื้อซึ่งย่อยฟลูออรีนได้อย่างสมบูรณ์และในภาวะที่อยู่ร่วมกับเชื้อท้องถิ่นที่สามารถย่อยฟลูออรีนได้ 98% ในเวลา 4 สัปดาห์ งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ได้รายงานการพบแอกติวิตีและการแสดงออกของแลคเคสในระหว่างการย่อยสลายฟลูออรีนด้วยราในสกุล *Agrocybe* และเป็นรายงานแรกที่ได้แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนแลคเคสของราในสกุล *Agrocybe* รวมทั้งเป็นรายงานแรกที่ได้แสดงว่าราในสกุล *Xylaria* สามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนได้ รา *Xylaria* sp. CU-1 และ *Agrocybe* sp. CU-43 ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้มีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อบำบัดการปนเปื้อนของสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำและในดินได้ต่อไป

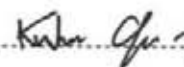
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

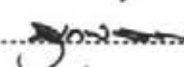
ปีการศึกษา 2550

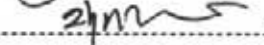
ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม







4673842823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: BIODEGRADATION / POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS / SCREENING / FLUORENE / AGROCYBE

KUNLANEE CHUPUNGARS : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON DEGRADING FUNGI. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF.SUTHEP THANİYAVARN, Ph.D., THESIS COADVISOR : PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., 187 pp.

The present study investigated PAHs biodegradation by fungi isolated and available in Thailand. Among 153 isolates, only 1.3% showed high degradation potential. The results from fungal identification by comparing ITS1 to ITS2 region of the rRNA encoding region suggested that the high PAHs degrading fungi were *Agrocybe* sp. CU-43 and *Xylaria* sp. CU-1. PAHs tested were added to the medium at 100 ppm, supernatant obtained after incubation were extracted and subjected to HPLC analysis for the presence of PAHs and/or its respective metabolites. *Agrocybe* sp. CU-43 and *Xylaria* sp. CU-1 showed 100% and 94.5% degradation of fluorene within 6 days, 91.2% and 68.0% for anthracene and 99.2% and 71.0% for phenanthrene in 21 days. Fluoranthene was degraded 67.9%, 24.3% and pyrene was degraded 81.2%, 24.3 % within 30 days by *Agrocybe* sp. CU-43 and *Xylaria* sp. CU-1 respectively. *Agrocybe* sp. CU-43 showed potential to degrade fluorene up to 750 ppm. The intermediates obtained when analysed by reversed-phase HPLC equipped with a C18 column was identified as 9-fluorenol and 9-fluorenone, the less toxic intermediates of fluorene. The major intermediate, 9-fluorenol, was not dead-end metabolite during fluorene degradation. High activities of laccase, manganese peroxidase were detected during 500 ppm fluorene degradation in N-limiting medium but not lignin peroxidase. The activities of laccase peaked in the 3rd week at 470 unit/ml and the highest manganese peroxidase activities was found in the final week which was 4.34 unit/ml. Reverse transcription-PCR with specific primers for *Agrocybe* sp. CU-43 laccase gene revealed that laccase expression was correlated to laccase activities during fluorene degradation in N-limiting medium. *Agrocybe* sp. CU-43 showed potential to degrade 250 ppm fluorene in soil model, fluorene was completely degraded within 4 weeks in sterile condition and 98% degraded when *Agrocybe* sp. CU-43 and soil microflora were used. This work is the first report of laccase activity and its expression during fluorene degradation by *Agrocybe* spp. as well as reports the partial nucleotide sequence of laccase gene in *Agrocybe* spp. It is also the first to report potential of *Xylaria* spp. in degrading PAHs. *Xylaria* sp. CU-1 and *Agrocybe* sp. CU-43 isolated from this work therefore have potential for fungal bioremediation in water and soil.

Field of study Biotechnology

Student's signature

Kunlanee Chupungars

Academic year 2007

Advisor's signature

Suthep Thaniyavarn

Co-advisor's signature

Panan Rerngsamran

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้วิชาการความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดจนตรวจแก้ไข ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาได้รับประธาน กรรมการในการสอบ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจภรณ์ ประภักดิ์ ที่กรุณาได้รับกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ และช่วยกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ เป็นอย่างสูงที่ให้ คำแนะนำในการศึกษาทั้งในระดับปริญญาโทและปริญญาเอก ตลอดจนการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยเสมอมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ และขอกราบ ขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่ให้คำปรึกษา ข้อคิด และคำแนะนำ ในตลอดระยะเวลาที่ศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินการวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่มี ส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนใน การวิจัยและทุนสนับสนุนการวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา น้ำ पीและน้อง ทุก ๆ ท่านที่ให้การสนับสนุนทั้ง ในด้านการเงินตลอดระยะเวลาที่ศึกษา การค้นคว้า และความช่วยเหลือทุก ๆ เรื่อง ตลอดจน กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา รวมทั้งเพื่อน ๆ ทุกคน โดยเฉพาะเพื่อน ๆ กลุ่มสตรีวิทยา คุณพรพรรณ ดุลยกาจัน คุณทรงรัตน์ สีวะอมรัตน์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การค้นคว้าเอกสาร และให้คำปรึกษาด้านคณิตศาสตร์และสถิติ ตลอดจนถึงการจัดทำรูปเล่ม รวมทั้งเป็นกำลังใจใน การศึกษาครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญรูป	ฉ
สัญลักษณ์ และคำย่อ	ด
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทัศนวิจารณ์วรรณกรรม.....	4
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	48
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	48
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ.....	51
3.3 แบคทีเรีย.....	53
3.4 พลาสติดและโพลิโกนิวคลีโอไทด์ไฟรเมอร์.....	53
3.5 วิธีดำเนินการวิจัย	54
3.5.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์.....	54
3.5.2 การคัดกรองราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลาย ลิกนิน.....	55
3.5.3 การคัดกรองราที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม PAH.....	55
3.5.4 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAH ในอาหารเหลว.....	55
3.5.5 การสกัด PAH จากอาหารเหลวและการวัดปริมาณ PAH	56
3.5.6 การวิเคราะห์สารมัยันตร์.....	57
3.5.7 การตรวจสอบความสามารถในการย่อย 9-ฟลูออรีนอล.....	57
3.5.8 รูปแบบการย่อยฟลูออรีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยரசายพันธุ์ที่คัด เลือก.....	58
3.5.9 การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินในระหว่างการ ย่อยฟลูออรีนของราที่คัดเลือก.....	58
3.5.9.1 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคส.....	58
3.5.9.2 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส.....	59

3.5.9.3 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส.....	59
3.5.10 การตรวจสอบการเจริญของราสายพันธุ์ที่คัดเลือกในระหว่างการย่อย ฟลูออรีน.....	60
3.5.11 การศึกษารูปแบบการย่อยสลายฟลูออรีนในแบบจำลองดินของราที่ คัดเลือก.....	60
3.5.11.1 การเตรียมดิน ศึกษาลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบ ทางเคมีของดิน.....	60
3.5.11.2 การเตรียมหัวเชื้อและเตรียมดินสำหรับแบบจำลองดิน.....	61
3.5.11.3 การทดสอบการย่อยสลายฟลูออรีนในแบบจำลองดิน.....	61
3.5.11.4 การสกัดฟลูออรีนจากตัวอย่างดิน.....	62
3.5.12 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา.....	62
3.5.12.1 การเลี้ยงราเพื่อเตรียมสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ.....	63
3.5.12.2 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ.....	63
3.5.12.3 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ.....	64
3.5.12.4 การวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส.....	64
3.5.12.5 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ เมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction).....	64
3.5.12.6 การทำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรสให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR Clean up Gel Extraction.....	66
3.5.12.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพื่อพิสูจน์ เอกลักษณ์ของราที่คัดเลือก.....	66
3.5.13 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแลคเคสในระหว่างการย่อย ฟลูออรีนโดยราที่คัดเลือก.....	66
3.5.13.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อเตรียมสกัดอาร์เอ็นเอ.....	66
3.5.13.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	67
3.5.13.3 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ อาร์เอ็นเอ.....	67
3.5.13.4 การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธีฟอร์มาลดีไฮด์ อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	68
3.5.13.4.1 การเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอสำหรับวิเคราะห์ ด้วยวิธีฟอร์มาลดีไฮด์อะกาโรสเจลอิเล็กโทร โฟรีซิส.....	68

3.5.13.4.2	การเตรียมฟอร์มัลดีไฮด์อะกาโรสเจล.....	68
3.5.13.5	การสังเคราะห์สาย cDNA	69
3.5.13.5.1	การสังเคราะห์ cDNA สายแรก.....	69
3.5.13.5.2	การสังเคราะห์ cDNA สายที่สอง.....	69
3.5.13.6	โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแลคเคส และยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (<i>gdp</i>) เพื่อใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR.....	70
3.5.13.6.1	โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน แลคเคส.....	70
3.5.13.6.2	โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ยีน <i>gdp</i>	70
3.5.13.6.3	การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อหาลำดับนิวคลีโอ ไทด์บางส่วนของยีนแลคเคสและ <i>gdp</i> ของราที่ คัดเลือก.....	70
3.5.13.7	การทำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันให้บริสุทธิ์ด้วย ชุด QIAquick Gel Extraction Kit.....	72
3.5.13.8	การโคลนผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	72
3.5.13.8.1	การไลเกต (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด เวกเตอร์.....	72
3.5.13.8.2	การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ของ <i>E. coli</i> DH5 α	73
3.5.13.8.3	การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้า คอมพิเทนต์เซลล์.....	74
3.5.13.8.4	การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดที่ต้องการ.....	74
3.5.13.8.5	การสกัดพลาสมิด.....	75
3.5.13.8.6	การยืนยันผลของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วย ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	75
3.5.13.8.7	การตรวจสอบทิศทางการเข้าของชิ้นดีเอ็นเอในรีคอมบิ แนนท์พลาสมิด.....	77
3.5.13.8.8	การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนแลคเคสและชิ้น ยีน <i>gdp</i> ที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด.....	77

3.5.13.9	โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแลคเคสและยีน <i>gdp</i> ของราที่คัดเลือกสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR.....	78
3.5.13.10	การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR.....	78
บทที่ 4	ผลการวิจัย.....	80
4.1	ตัวอย่างราและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์.....	80
4.2	การคัดกรองราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน.....	80
4.3	การทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม PAH.....	82
4.4	การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAH ในอาหารเหลว.....	84
4.5	รูปแบบการย่อยฟลูออรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยราไอโซเลต CU-43.....	91
4.6	การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินในระหว่างการย่อยฟลูออรีนของราไอโซเลต CU-43.....	97
4.7	การตรวจสอบการเจริญของราสายพันธุ์ที่คัดเลือกในระหว่างการย่อยฟลูออรีน.....	98
4.8	การศึกษารูปแบบการย่อยสลายฟลูออรีนในแบบจำลองดินของราที่คัดเลือก.....	99
4.8.1	ผลการเตรียมดิน การศึกษาลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน.....	99
4.8.2	การทดสอบการย่อยฟลูออรีนโดยราไอโซเลต CU-43 ในแบบจำลองดิน.....	100
4.9	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราคัดเลือก.....	106
4.9.1	การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ.....	106
4.9.2	การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนบริเวณ ITS และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์.....	106
4.10	การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแลคเคสในระหว่างการย่อยฟลูออรีนโดย <i>Agrocybe</i> sp. CU-43.....	108
4.10.1	การเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีนแลคเคสของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์.....	109
4.10.2	การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน <i>gdp</i> ของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์.....	114
4.10.3	การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA.....	117
4.10.4	การแสดงออกของยีน <i>gdp</i> และยีนแลคเคสของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 ในระหว่างการย่อยฟลูออรีน.....	118
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	120
	รายการอ้างอิง.....	130

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก	146
ภาคผนวก ข	152
ภาคผนวก ค	155
ภาคผนวก ง	160
ภาคผนวก จ	161
ภาคผนวก ฉ	165
ภาคผนวก ช	166
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	187



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของ PAH ที่ US-EPA จัดเป็นสารอันตรายที่ควรให้ความสำคัญในลำดับต้น.....7
2.2	ตัวอย่างราที่สามารถย่อย PAHs ได้.....19
2.3	สรุปการทำงานของเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน.....34
3.1	โพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพริเมอ์ที่ใช้ในการทดลอง.....53
4.1	กลุ่มความสามารถของเชื้อที่เกิดปฏิกิริยากับสีทดสอบ.....81
4.2	แนวโน้มในการผลิตเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสและลิกนินเพอร์ออกซิเดสของราไอโซเลตต่างๆ.....82
4.3	ความสามารถของเชื้อในการเจริญบนอาหารที่มี PAH เป็นส่วนประกอบ..... 83
4.4	ความสามารถของราไอโซเลต CU-1 และ CU-43 ในการย่อย PAH ชนิดต่างๆ ในอาหารเหลวที่มีไนโตรเจนจำกัด.....90
4.5	ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน.....100

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	โครงสร้างของฟลูออรีน10
2.2	สามเหลี่ยมของการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ.....17
2.3	โครงสร้างของลิกนิน (ก) และเปรียบเทียบหน่วยย่อยของลิกนินกับโครงสร้างของ PAH (ข).....23
2.4	โครงสร้างของไกวเอคอลล.....24
2.5	โครงสร้างของ phenol red25
2.6	โครงสร้างของ azure B26
2.7	กลไกการออกซิเดชันโดยแลคเคส28
2.8	ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นโดยแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส.....29
2.9	การเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส.....30
2.10	ปฏิกิริยาการสลาย 2,6 DMP โดยแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส.....31
2.11	สมการออกซิเดชันที่เกิดขึ้นโดยลิกนินเพอร์ออกซิเดส.....32
2.12	ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นโดยลิกนินเพอร์ออกซิเดส.....33
2.13	รูปแบบทั่วไปของการสลาย PAH แบบใช้อากาศ.....38
2.14	วิธีการย่อยสลาย PAH โดยสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ.....39
2.15	วิธีการย่อยสลาย PAH โดยจุลินทรีย์.....39
2.16	วิธีการแมแทบอลิซึมฟลูออรีนโดยจุลินทรีย์.....41
2.17	กระบวนการออกซิเดชันฟลูออรีนโดยรากลุ่มไวท์รอต <i>P. ostreatus</i>42
2.18	วิธีการแมแทบอลิซึมฟลูออรีนโดย <i>Cunninghamella elegans</i>42
2.19	วิธีการแมแทบอลิซึมแนพธาซีนโดย <i>Phlebia lindtneri</i>44
2.20	วิธีการย่อยสลายแอนทราซีนโดย <i>P. ostreatus</i>44
2.21	วิธีการย่อยสลายพีแนนทรินโดย <i>P. chrysosporium</i>45
2.22	วิธีการแมแทบอลิซึมพีแนนทรินโดย cytochrome P-450 โดย <i>P. ostreatus</i>45
2.23	วิธีการสลายไพรีน โดย <i>P. ostreatus</i>46
2.24	กระบวนการออกซิเดชันไพรีนโดยรากลุ่มไวท์รอต.....46
2.25	กระบวนการออกซิเดชันเบนโซ[เอ]ไพรีนโดยรากลุ่มไวท์รอต.....46
2.26	วิธีการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเบนโซ[เอ]ไพรีนด้วย cytochrome P-450 จาก <i>C. elegans</i>47
2.27	วิธีการแมแทบอลิซึมไดเบนโซ-พารา-ไดออกซินโดย <i>Phlebia lindtneri</i>47
3.1	แผนที่แสดงบริเวณ 5.8 S RDNA และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเรา.....65
4.1	แสดงการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสีทดสอบชนิดต่าง ๆ81

รูปที่	หน้า
4.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญของราที่คัดแยกในอาหาร Basal medium ที่มีฟิแนทรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรเป็นส่วนประกอบ.....	84
4.3 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงปริมาณฟลูออรีนในชุดควบคุม ในวันที่ 0 (ก) และวันที่ 6 (ข) ชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-1 ในวันที่ 0 (ค) และวันที่ 6 (ง) และชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-43 ในวันที่ 0 (จ) และวันที่ 6 (ฉ).....	85
4.4 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงปริมาณแอนทราซีนในชุดควบคุม ในวันที่ 0 (ก) และวันที่ 21 (ข) ชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-1 ในวันที่ 0 (ค) และวันที่ 21 (ง) และชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-43 ในวันที่ 0 (จ) และวันที่ 21(ฉ).....	86
4.5 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงปริมาณฟิแนทรีนในชุดควบคุม ในวันที่ 0 (ก) และวันที่ 21(ข) ชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-1 ในวันที่ 0(ค) และวันที่ 21(ง) และชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-43 ในวันที่ 0(จ) และวันที่ 21(ฉ)	87
4.6 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงปริมาณฟลูออแรนทรีนในชุดควบคุม ในวันที่ 0 (ก) และวันที่ 30 (ข) ชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-1 ในวันที่ 0 (ค) และวันที่ 30 (ง) และชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-43 ในวันที่ 0 (จ) และวันที่ 30 (ฉ)	88
4.7 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงปริมาณไพรีนในชุดควบคุม ในวันที่ 0 (ก) และวันที่ 30(ข) ชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-1 ในวันที่ 0(ค) และวันที่ 30(ง) และชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-43 ในวันที่ 0(จ) และวันที่ 30(ฉ).....	89
4.8 รูปแบบการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้นต่างๆ โดยราไอโซเลต CU-43 ในอาหาร ที่มีไนโตรเจนจำกัดความเข้มข้นฟลูออรีนที่ใช้ทดสอบได้แก่ 100 มก.ต่อลิตร (ก) 250 มก.ต่อลิตร (ข) 500 มก.ต่อลิตร (ค) 750 มก.ต่อลิตร (ง), และ 1000 มก.ต่อลิตร (จ).....	92
4.9 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงปริมาณฟลูออรีนที่เหลือจากการย่อย ฟลูออรีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร ด้วยราไอโซเลต CU-43 ในอาหาร ที่มีไนโตรเจนจำกัดบมที่อุณหภูมิ 28°ซ ในเวลาต่างๆ ได้แก่ สัปดาห์ที่ 0 (ก), สัปดาห์ที่ 1 (ข), สัปดาห์ที่ 2 (ค), สัปดาห์ที่ 3 (ง), สัปดาห์ที่ 4 (จ) และ ชุดควบคุมสัปดาห์ที่ 4 (ฉ).....	93

รูปที่		
4.10	โครมาโทแกรมจาก HPLC จากการตรวจสอบด้วยเกรเดียนต์เมทานอลของสารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยฟลูออรีนโดยราไอโซเลต CU-43 (ก) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนโนล และ 9-ฟลูออรีนโนน (ข) และเมื่อผสมสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนโนล (ค) และสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนโนน (ง) ลงในตัวอย่าง.....	95
4.11	โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงการย่อย 9-ฟลูออรีนโนลความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัดโดยราไอโซเลต CU-43 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°ซ ในเวลาต่างๆ ได้แก่สัปดาห์ที่ 0 (ก) และสัปดาห์ที่ 1 (ข) และเติมไพรีนเพื่อเป็น internal standard	96
4.12	รูปแบบการผลิตแลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และลิกนินเพอร์ออกซิเดส ในระหว่างการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร โดยราไอโซเลต CU-43.....	98
4.13	การเจริญของราไอโซเลต CU-43 ในระหว่างการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร.....	99
4.14	รูปแบบการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้น 250 มก.ต่อลิตรด้วยราไอโซเลต CU-43 ในแบบจำลองดินในภาวะต่างๆ	103
4.15	การเจริญของราไอโซเลต CU-43 ในแบบจำลองดิน.....	103
4.16	โครมาโทแกรมการสลายฟลูออรีนด้วยราไอโซเลต CU-43 ในแบบจำลองดินในภาวะปลอดเชื้อ	104
4.17	โครมาโทแกรมการสลายฟลูออรีนด้วยราไอโซเลต CU-43 ในแบบจำลองดินในภาวะไม่ปลอดเชื้อ.....	105
4.18	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไอโซเลต CU-1 (ก) และไอโซเลต CU-43 (ข)	106
4.18	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของราไอโซเลต CU-1 (ก)และไอโซเลต CU-43(ข) เป็นแม่แบบและใช้คูปราเมอร์ ITS1-F (ฟอร์เวิร์ด) และ ITS4 (รีเวิร์ส).....	107
4.19	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คูปราเมอร์ <i>Plac-F</i> และ <i>Plac -R</i>	109
4.20	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาด 800 คู่เบสเมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คูปราเมอร์ <i>Plac-F</i> และ <i>Plac -R</i>	110

รูปที่		
4.22	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คู่ ไพรเมอร์ lacAg-F1 และ lacAg-R1.....	111
4.23	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาด 850 คู่เบส เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้ คู่ไพรเมอร์ pJET-F และ pJET-R อักษรขีดเส้นใต้แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ ขนาด 450 คู่เบส.....	112
4.24	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาด 450 คู่เบส เมื่อใช้ โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คู่ไพรเมอร์ lacAg-F1 และ lacAg-R1.....	112
4.25	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแลคเคสจาก <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 ที่ทราบทั้งหมดและ ตำแหน่งคู่ไพรเมอร์ lac F-1 และ lacR-2 แสดงด้วยอักษรขีดเส้นใต้.....	113
4.26	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คู่ ไพรเมอร์ lacF-1 และ lacR-2.....	114
4.27	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คู่ ไพรเมอร์ gdp-F และ gdp-R.....	115
4.28	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน gdp จาก <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 ที่ได้จากการ วิเคราะห์หรีดคอมพิแนนท์พลาสมิดที่ให้ผลบวกโดยใช้คู่ไพรเมอร์ gdp-F และ gdp-R และตำแหน่งคู่ไพรเมอร์ gdpAaege 474-F และ gdpAaege 755-R.....	116
4.29	ฟอร์มัลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของอาร์เอ็นเอของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43.....	117
4.30	ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาด 200 คู่เบส ที่เกิดขึ้นจากการใช้โครโมโซมอล ดีเอ็นเอของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คู่ไพรเมอร์ gdp Aaege474-F และ gdp Aaege755-R อุณหภูมิในการแอลนีย์ที่ 55°ซ.....	117
4.31	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส cDNA ที่สกัดจากเซลล์แห้งซึ่งเก็บตัวอย่างในระยะเวลาต่าง ๆ ของการย่อย ฟลูออรีนเป็นแม่แบบร่วมกับคู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะกับแลคเคสและ gdp ของ <i>Agrocybe</i> sp. CU-43.....	119
5.1	กระบวนการย่อยสลายฟลูออรีนอย่างสมบูรณ์ของกระบวนการย่อยสลายฟลูออรีน.....	128

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

°ซ	= องศาเซลเซียส
%	= เปอร์เซ็นต์
มก.	= มิลลิกรัม
มล.	= มิลลิลิตร
ชม.	= เซนติเมตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ปัญหาการปนเปื้อนของมลพิษในสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน ทวีความรุนแรงมากขึ้นเรื่อย ๆ และแพร่กระจายในหลายประเทศ พื้นที่การปนเปื้อนที่มากขึ้นมีสาเหตุจากกิจกรรมหรือกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมที่ไม่ได้ตระหนักถึงความสำคัญต่อสิ่งแวดล้อม มีการปลดปล่อยสารพิษหรือของเสียจากกระบวนการผลิตที่ยังไม่ผ่านกระบวนการบำบัดออกสู่สิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันมีรายงานหลายฉบับที่ชี้ให้เห็นว่า พื้นที่บริเวณปนเปื้อนหรือมีการสะสมสารพิษ มีผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ เฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกา มีกากของเสียอันตรายเกิดขึ้นมากกว่า 800 ล้านปอนด์ต่อปีแต่มีเพียง 10% เท่านั้นที่ได้รับการกำจัดแบบถูกวิธี (Reddy และ Mathew, 2001) โดยสารประกอบที่มีความเป็นพิษที่พบมาก ได้แก่ สารประกอบกลุ่มพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน หรือ PAH (U.S. Environmental Protection Agency, 1991) เพนตะคลอโรฟีนอล (PCP) 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (Srinivasan และคณะ, 1995) เบนซีน โทลูอีน ไซลีน เป็นต้น ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มักมีความคงทนต่อการย่อยสลายในสิ่งแวดล้อม และบางชนิดยังมีรายงานว่า เป็นสารก่อมะเร็งหรือมีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Hamman, 2004) ซึ่งปัญหาการสะสมสารพิษในสิ่งแวดล้อมนี้เป็นปัญหาระดับโลก สารปนเปื้อนหลัก ๆ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ โลหะหนัก และสารประกอบอินทรีย์ที่โดยมากพบร่วมหรือเกิดจากผลิตภัณฑ์จากฟอสซิล ได้แก่ น้ำมันดิบและผลิตภัณฑ์จากน้ำมัน เช่น จากการผลิตน้ำมัน จากโรงงานปิโตรเคมี สำหรับการปนเปื้อน PAH ในประเทศไทย พบว่า 91% เกิดการสันดาปของน้ำมันเชื้อเพลิงที่ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ PAH ยังสามารถกระจายอยู่ในอากาศได้โดยเกิดการรวมตัวกับฝุ่นละออง เขม่าควัน และยังพบ PAH สะสมอยู่ในอนุภาคดิน โดยเฉพาะบริเวณที่มีการจราจรหนาแน่น ย่านธุรกิจการค้าและอุตสาหกรรม เป็นต้น

PAH เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างของอะตอมคาร์บอนและไฮโดรเจนรวมกันเป็นวงแหวนแอโรแมติกเบนซีน มีหลายรูปแบบทั้งเรียงกันเป็นแนวตรง (linear) เป็นมุม (angular) หรือเกาะกันเป็นกลุ่ม (cluster) PAH จัดเป็นกลุ่มมลพิษที่สำคัญต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีความเป็นพิษ มีอัตราการระเหยต่ำ มีการสลายตัวช้า (Coates และคณะ, 1997) PAH ส่วนใหญ่ละลายน้ำได้น้อยมาก โดยพบว่าความสามารถในการละลายจะลดลงเมื่อมีจำนวนวงแหวนที่เชื่อมต่อกันเพิ่มขึ้นหรือมีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยึดเกาะกับตะกอนดินได้ดี ทำให้สารดังกล่าวมีความคงทนสูงเมื่อสารประกอบกลุ่มนี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจึงเกิดการตกค้างหรือสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นาน (Rockne และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานหลายฉบับที่ชี้ให้เห็นว่า PAH หลายชนิดมีความเป็นพิษสูง อาจเป็นสารที่

ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้สารประกอบกลุ่มนี้ยังมีการสะสมและเพิ่มปริมาณในสิ่งแวดล้อมและสะสมเพิ่มขึ้นเป็นลำดับขั้นของผู้บริโภคในห่วงโซ่อาหาร (Narro และคณะ, 1992)

PAH สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ มักพบเป็นส่วนประกอบของน้ำมันปิโตรเลียม ถ่านหิน และมักพบ PAH เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของไม้ ถ่านหิน น้ำมันเชื้อเพลิง แก๊ส ชยะ หรือสารอินทรีย์อื่น ๆ (Lau และคณะ, 2003; Verdin และคณะ, 2004) ตัวอย่างเช่น ฟลูออรีน ไพรีน เบนโซ[เอ]ไพรีน เป็นต้น

หลายหน่วยงานพยายามหาแนวทางบำบัดสารพิษที่เกิดขึ้น วิธีการจัดการกับสารพิษ โดยทั่วไปมักใช้วิธีการขุดดินที่ปนเปื้อนสารพิษออกจากพื้นที่ การกั้นพื้นที่ปนเปื้อนออกจากพื้นที่บริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อน หรือการห้ามใช้พื้นที่บริเวณที่มีการปนเปื้อน กระบวนการเหล่านี้ไม่ได้เป็นการบำบัดอย่างแท้จริงเพียงแต่เป็นการลดการแพร่กระจายของสารพิษ นอกจากนี้ยังเป็นการย้ายสารพิษจากจุดหนึ่งไปสู่อีกจุดหนึ่ง ซึ่งต้องระมัดระวังในทุกขั้นตอนของการเคลื่อนย้าย (Vidali, 2001) วิธีการบำบัดที่เป็นการแก้ปัญหาได้อย่างถาวรคือการทำลายสารพิษอย่างสมบูรณ์หรือเปลี่ยนรูปให้เป็นสารที่มีความเป็นพิษน้อยลง ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี เช่น การบำบัดด้วยวิธีทางกายภาพ เช่นการเผาที่อุณหภูมิสูง การฝังกลบในพื้นที่ปลอดภัย การบำบัดด้วยวิธีทางเคมี เช่นการเติมสารเคมีเพื่อเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน การตกตะกอน เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้ต้องใช้การลงทุนสูง เช่น การขนย้ายดินจากพื้นที่ปนเปื้อนเพื่อไปบำบัดในพื้นที่ปิด การสร้างเตาเผาอุณหภูมิสูงซึ่งต้องลงทุนสูงใช้พลังงานในการเผาสูงมาก การเติมสารเคมีอาจทำให้เกิดปฏิกิริยารุนแรงและไม่สามารถคาดเดาสารพิษตกค้างที่จะเกิดขึ้นได้และต้องใช้ความระมัดระวังในระหว่างการปฏิบัติงาน นอกจากนี้เมื่อสิ้นสุดกระบวนการยังเกิดกากสารพิษและแก๊สพิษที่ต้องนำมาบำบัดต่อ (Uyesugi และ Kovalick, 1994) การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพเป็นการใช้ความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์และความสามารถในการปรับตัวให้ดำรงอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารพิษ ส่งผลให้จุลินทรีย์มีการสร้างวิถีที่ช่วยในการสลายสารพิษที่มีโครงสร้างแบบต่าง ๆ ได้ ข้อดีของวิธีนี้คือค่าใช้จ่ายต่ำ สามารถประยุกต์ใช้ในหลายพื้นที่ เช่น พื้นที่ที่มีความเค็มสูง มีความเป็นกรด-เบสในช่วงกว้าง สามารถเลือกบำบัดสารพิษได้ตามโครงสร้าง เป็นวิธีการที่สามารถนำไปบำบัดบริเวณพื้นที่ปนเปื้อนได้ (in-situ application) ไม่เกิดกากสารพิษที่ต้องนำไปบำบัดต่ออีกทั้งยังเป็นวิธีการที่ถูกต้องตามมาตรฐานสิ่งแวดล้อมและไม่เกิดอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและผู้อยู่อาศัยในบริเวณใกล้เคียง (Aitken, 1993; Karam และ Nicell, 1997; Vidali, 2001; Samanta และคณะ, 2002; Jansson, 2003)

จากการศึกษาความสามารถของเชื้อราหลายชนิดพบว่าราในคลาส Basidiomycetes มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน โดยสร้างเอนไซม์ที่หลั่งออกมาออกเซลล์ ได้แก่ แลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และลิกนินเพอร์ออกซิเดส ที่มีกลไกพิเศษคือเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของอิเล็กตรอนอิสระ จากนั้นอิเล็กตรอนอิสระเกิดออกซิเดชันต่อกับสาร

ที่มารับอิเล็กตรอน ทำให้เกิดการออกซิไดส์สารแบบไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารที่มีโครงสร้างทั้งแบบเส้นตรงและโครงสร้างแบบวงแหวนได้ (Reddy และ Mathew, 2001; Law และคณะ, 2003; Pointing, 2001)

ตัวอย่างราในคลาส Basidiomycetes ที่สามารถย่อย PAH ได้ เช่น *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus* และ *Lentinus tigrinus* ที่มีความสามารถสูงในการย่อย PAH ที่ปนเปื้อนในดินที่มีความเค็มและดินที่ไม่มีความเค็ม (Valentin และคณะ, 2006) *Phanerochete chrysosporium* สามารถย่อยเนพธาซีนความเข้มข้นสูงที่ปนเปื้อนในดินได้เป็นอย่างดี (Mollea และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ในคลาส Basidiomycetes ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลาย PAH ดังนั้นการคัดแยกและศึกษาสมบัติของราที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลาย PAH อาจนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อน PAH โดยวิธีการทางชีวภาพเพื่อแก้ปัญหาในสิ่งแวดล้อมได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

คัดแยกและศึกษาสมบัติของราที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลาย PAH ตรวจสอบสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลาย PAH ที่คัดเลือก ตรวจสอบแอกติวิตีและการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลาย PAH ของราที่คัดเลือก ทดสอบความสามารถในการย่อยในแบบจำลองดิน รวมทั้งพิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่คัดเลือก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ราที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลาย PAH และทราบถึงสมบัติของราที่คัดแยกได้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้บำบัดการปนเปื้อนของ PAH ในน้ำและในดินได้ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

สารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons หรือ PAH) เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกเบนซีนมากกว่าหนึ่งวงมารวมกัน มีประมาณ 10,000 ชนิด PAH สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ มักพบเป็นส่วนประกอบน้ำมันปิโตรเลียม ถ่านหิน และมักพบ PAH เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของไม้ ถ่านหิน น้ำมันเชื้อเพลิง แก๊ส ชยะ หรือสารอินทรีย์อื่น ๆ (Alloway และ Ayres, 1993) PAH จัดเป็นกลุ่มมลพิษที่สำคัญต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสมบัติของสารประกอบในกลุ่ม PAH ที่มีความเป็นพิษ มีอัตราการระเหยต่ำ มีการสลายตัวช้า และถูกดูดซับในตะกอนดินได้ง่าย (Coates และคณะ, 1997) มีรายงานหลายฉบับแสดงให้เห็นว่า PAH เป็นสารที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อสุขภาพของมนุษย์ PAH หลายชนิดมีความเป็นพิษ เป็นสารก่อมะเร็งและหากมีการสะสมไว้มากเกินค่ากำหนดจะเป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (Malachova, 1999) และเนื่องจากลักษณะของ PAH ที่มีความไม่ชอบน้ำสูงจึงทำให้เกิดการสะสมของ PAH ทั้งในอากาศ แหล่งดิน น้ำ และตะกอน (International Agency for Research on Cancer (Iarc), 1983; Fernandez และคณะ, 1992) ทำให้สิ่งมีชีวิตมีโอกาสนำ PAH เข้าสู่เซลล์และเกิดการสะสมในห่วงโซ่อาหาร (Boonchan และคณะ, 2000) และในปัจจุบันพบว่า PAH มีการแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น จึงทำให้สารประกอบกลุ่มนี้เป็นที่น่าสนใจมากขึ้น

แหล่งกำเนิด PAH

1. เกิดขึ้นตามธรรมชาติ จากกระบวนการต่างๆ คือ

กระบวนการไพโรลิซิส (pyrolysis) และไพโรซินทีซิส (pyrosynthesis) ของสารที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นภายใต้พื้นโลกหรือในที่ที่ไม่มีออกซิเจนเพียงพอที่จะทำให้เกิดการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์ ปกติแล้วที่อุณหภูมิสูงประมาณ 500–800 °C สามารถสลายพันธะต่างๆ รวมทั้ง C-C และ C-H ได้ แต่เมื่อเกิดการเย็นตัว จะเกิดปฏิกิริยาไพโรลิซิสอย่างช้าๆ ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของอะตอมคาร์บอนใหม่ ได้สารประกอบที่มีโครงสร้างลักษณะเป็นวงเบนซีนและมีการเรียงตัวเป็นวงต่อกันเพิ่มเรื่อยๆ (Connell และคณะ, 1999)

การเกิดปฏิกิริยาของสารอินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำหรืออุณหภูมิต่ำปานกลาง ประมาณ 100–150 °C ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของโมเลกุลคาร์บอน เช่น การเกิด ถ่านหิน น้ำมันดิบ หรือ ถ่านกัมมันต์ หรือการสลายสารในกลุ่มนี้ กระบวนการนี้มักทำให้เกิด PAH ที่มีหมู่แอลคิลรวมอยู่ในโครงสร้าง (National Research Council of Canada (Nrc), 1983) นอกจากนี้ PAH ยังเกิดขึ้นจากการสังเคราะห์โดยตรงจากจุลินทรีย์และพืช (Neff, 1979)

2. กิจกรรมของมนุษย์

PAH ที่พบอยู่ในสิ่งแวดล้อมส่วนมากเกิดขึ้นจากกระบวนการเผาไหม้ที่อุณหภูมิต่ำ เช่นการเผาไม้ หรือการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ที่มีคาร์บอนเป็นส่วนประกอบ โดยเฉพาะน้ำมันดิบ เชื้อเพลิงฟอสซิล การกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม (Rao และคณะ, 2008) และผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ได้จากน้ำมันดิบที่ถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงหลักของโลกปัจจุบัน เช่น โคลทาร์ คาร์บอนแบล็ค ส่งผลให้มีการแพร่กระจายของ PAH จากระบบขนส่งหรือจากไอเสียรถยนต์ (Totsche, 2008) ปฏิกิริยาไพโรลิซิสของน้ำมันสังเคราะห์ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงเครื่องบินทำให้เกิด benzo[cd]naphthol[1,2,3-*lm*]perylene (Jorge และ Mary, 2007) กระบวนการเตรียมยางมะตอยด้วยวิธีผสมร้อน (Anne และคณะ, 2007) นอกจากนี้การเผาไหม้วัสดุต่างๆ เช่น ฐูป บุหรี่ ชิการ์ ยาสูบ โดยเกิดจากการเผาไหม้ของกรดอะมิโนฟีนอลอะลานีนที่เป็นองค์ประกอบหลักในบุหรี่ยาสูบ (Lin และคณะ, 2001; Wang และคณะ, 2004) แม้กระทั่งการเผาขยะก็เป็นแหล่งกำเนิด PAH อนุภาคเล็ก ๆ จากนั้น PAH จะเกิดการรวมตัวกับเถ้าทำให้เสถียรมากขึ้นและสามารถแพร่กระจายในอากาศไปได้ในระยะไกล (Mastral และ Callen, 2000)

3. กิจกรรมต่างๆ ของโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตหรือกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ เช่น กระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ การผลิตถ่านโค้ก การผลิตพลังงานจากน้ำมันดิบ การกำจัดสารที่มี PAH เป็นส่วนประกอบ การจัดเก็บน้ำมันดิบ กระบวนการเร่งปฏิกิริยาด้วยสารเคมีบางชนิด หรือการใช้น้ำมันเคลือบรักษาเนื้อไม้ เป็นต้น (Wilson และ Jones, 1993) นอกจากนี้ PAH บางชนิดยังใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอุปกรณ์ต่างๆ เช่น ผสมในพลาสติกสำหรับใช้ทำหน้าจอแสดงผลที่ใช้เทคโนโลยีแบบ LCD (Liquid crystal Display) เช่น หน้าจอโทรศัพท์มือถือ

สมบัติทางกายภาพ และเคมีของสาร PAH

PAH เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยวงเบนซีนเชื่อมต่อกันตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป บางครั้งพบว่าโมเลกุลของสารประกอบกลุ่มนี้อาจมีอะตอมของไนโตรเจน ออกซิเจน และซัลเฟอร์เข้ามาแทรกในวงเบนซีน เรียกว่าเฮเทอโรไซคลิก แอแมติก (Blumer, 1976) เป็นสารที่ไม่มีขั้ว (non-polar) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic compound) บางชนิดอาจจะละลายน้ำได้เล็กน้อย สมบัติของ PAH แต่ละชนิดแตกต่างกันไปตามโครงสร้างทางเคมีและน้ำหนักโมเลกุล จากสมบัติทางกายภาพและเคมีสามารถแบ่ง PAH ออกเป็น 2 กลุ่ม (Kanaly และ Harayama, 2000) ได้แก่

1. PAH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight PAH) โมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2-3 วง เช่น แนพทาซีน ฟลูออรีน อะซีแนฟทีน ฟีนแอนทริน แอนทราซีน เป็นต้น PAH ในกลุ่มนี้มีแก๊สออกฤทธิ์แบบเฉียบพลัน

2. PAH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight PAH) โมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีนเรียงต่อกันมากกว่า 4 วงขึ้นไป เช่น ไพรีน ไครซีน เบนโซ[เอ]แอนทราซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน โครโรนีน เป็นต้น

การจัดเรียงตัวของวงเบนซีนในโครงสร้างทางเคมีของ PAH มีหลายรูปแบบทั้งเรียงกันเป็นแนวตรง (linear) เป็นมุม (angular) หรือเกาะกันเป็นกลุ่ม (cluster) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โครงสร้างดังกล่าวมีส่วนทำให้สารประกอบแต่ละชนิดมีความเสถียรแตกต่างกันไป PAH ที่มีการเรียงตัวเป็นเส้นตรง จะมีความเสถียรน้อยกว่าสาร PAH ที่เรียงตัวเป็นมุมหรือกลุ่มก้อน (Blumer, 1976) สมบัติทั่วไปของ PAH มีดังนี้

1. ความสามารถในการละลายน้ำ

ความสามารถในการละลายหรือรวมตัวกับน้ำ (solubility) ของ PAH จะเกิดได้น้อยมาก โดยความสามารถในการละลายจะลดลงเมื่อมีจำนวนวงแหวนที่เชื่อมต่อกันเพิ่มขึ้นหรือมีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น (Sims และ Overcash, 1983)

การที่มีหมู่ แอลคิล ($-CH_2$) แทนที่อยู่ในวงแหวนของ PAH ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำลดลง ยกเว้นใน PAH บางชนิด เช่น เบนโซ[เอ]แอนทราซีน

โมเลกุลของ PAH ที่มีการจัดเรียงตัวแบบเส้นตรง มีแนวโน้มที่จะละลายน้ำได้น้อยกว่าการจัดเรียงตัวแบบมุม เช่น แอนทราซีนละลายน้ำได้น้อยกว่าฟิแนนทรีน

นอกจากนี้ความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้น 3-4 เท่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจาก $5^{\circ}C$ เป็น $30^{\circ}C$ (Neff, 1979)

2. การกลายเป็นไอ (Vapor pressure)

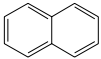
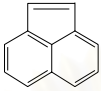
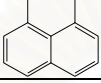
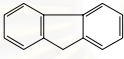
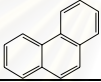
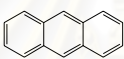
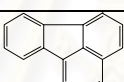
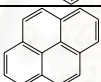
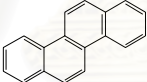
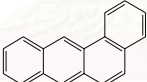
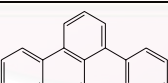
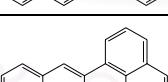
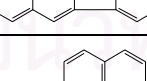
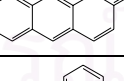
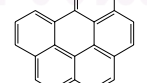
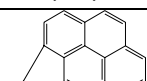
PAH มีอัตราการระเหยช้าลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น PAH ที่มีวงแหวนประกอบ 2-3 วง จะสามารถระเหยได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่ PAH ที่มีวงแหวนประกอบตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป จะมีอัตราการระเหยลดลงอย่างเห็นได้ชัด (Moore และ Ramamoorthy, 1984)

นอกจากนี้ PAH ยังถูกออกซิไดส์ได้ยากขึ้นและมีอัตราการระเหยช้าลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น

3. การยึดเกาะกับอนุภาค

เนื่องจาก PAH เป็นสารกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำและมีความสามารถที่จะถูกดูดซับหรือยึดเกาะกับอนุภาคต่างๆได้ง่าย เช่น ตะกอนดินในสิ่งแวดล้อมและมีความคงทนสูง ดังนั้นความเข้มข้นของ PAH ในน้ำจึงมีน้อยมาก แต่จะเกิดการสะสมของ PAH ในตะกอนดิน ทำให้มีความเข้มข้นสูงในส่วนตะกอนดิน (Moore และ Ramamoorthy, 1984)

ตารางที่ 2.1 โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของสาร PAH ที่ US-EPA จัดเป็นสารอันตรายที่ควรให้ความสำคัญในลำดับต้น (ดัดแปลงจาก (Neff, 1979; Schirmer และคณะ, 1998))

ชนิดของ PAH	โครงสร้าง	น้ำหนักโมเลกุล	การละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 25 ^o ซ (มก.ต่อลิตร)	ความดันไอ (Pa)
แนพทาซีน		128.18	31	10
อะซีแนพทีซีน		152.20	4.3	0.9
อะซีแนพทีน		154.22	3.9	0.3
ฟลูออรีน		166.23	1.9	0.09
ฟิแนนทริน		178.24	1.1	0.02
แอนทราซีน		178.24	0.05	1x10 ⁻³
ฟลูออแรนทีน		178.24	0.26	1.2x10 ⁻³
ไพรีน		202.26	0.13	6x10 ⁻⁴
โครซีน		228.30	0.002	5.7x10 ⁻⁷
เบนซ์[เอ]แอนทราซีน		228.30	0.002	2.8x10 ⁻⁵
เบนซ์[บี]ฟลูออแรนทีน		252.32	0.0015	ไม่มีข้อมูล
เบนซ์[เค]ฟลูออแรนทีน		252.32	0.0008	5.2x10 ⁻⁸
เบนโซ[เอ]ไพรีน		252.32	0.003	7x10 ⁻⁷
เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอร์ลิซีน		276.34	0.0003	1x10 ⁻⁸
อินดีโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน		276.34	0.062	ไม่มีข้อมูล
ไดเบนซ์[เอ,เอช]แอนทราซีน		278.36	0.0003	3.7x10 ⁻¹⁰

4. การสลายหรือถูกเปลี่ยนโครงสร้าง (Photo-chemical transformations)

ปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยแสง (photooxidation) ทำให้ PAH สลายตัวได้ โดยที่แสงจะชักนำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารออกซิเดนต์อื่น ๆ เช่น ออกซิเจน โอโซน อนุมูล OH (OH-radical) ทำให้โมเลกุลของ PAH เปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะแอนทราซีน พีแนนทรีน และเบนโซ[เอ]แอนทราซีน เป็นสารที่ไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยแสง ในขณะที่ ไครซีน ฟลูออรีน ไพรีน และ เบนโซ[เอ]ไพรีน ทนต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยแสง (Neff, 1979) นอกจากนี้ PAH ยังเกิดปฏิกิริยากับสารชนิดอื่น ๆ เช่น แก๊สไนโตรเจนไดออกไซด์ หรือ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ทำให้เกิดสารประกอบ dione nitro- dinitro-PAH หรือกรดซัลโฟนิก (sulfonic acids) ซึ่งอาจมีความเป็นพิษมากกว่าสารเดิม (World Health Organization Regional Office for Europe, 2000)

PAH ถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ยากหรือเกิดขึ้นได้ในอัตราที่ต่ำมาก เนื่องจากถูกจำกัดโดยปริมาณของสาร PAH ที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้หรือย่อยสลายได้ (bioavailability) ดังนั้นเมื่อสารเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จึงทำให้เกิดการตกค้างหรือสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน (Rockne และคณะ, 2002) US-EPA ได้กำหนดให้ PAH 16 ชนิด ตามตารางที่ 2.1 เป็นสารที่ควรให้ความสำคัญในลำดับต้น

ความเป็นพิษของสาร PAH

สาร PAH กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นสารที่มีความคงทนสูง ดังนั้นเมื่อปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมจึงเกิดปัญหาต่าง ๆ ตามมา PAH กลุ่มนี้ยังสามารถละลายน้ำได้บางส่วนและระเหยได้เร็ว จึงก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (Sims และ Overcash, 1983) เช่น การได้รับ PAH โดยการสูดดมทำให้เกิดการระคายเคืองปอด หรือเกิดการระคายเคืองเนื่องจากการสัมผัส เป็นผื่นแดง สำหรับสาร PAH กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะละลายน้ำได้น้อยและมีความสามารถในการระเหยต่ำ ส่วนใหญ่ก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเรื้อรัง โดยมีรายงานพบการเปลี่ยนแปลงของ 18S rRNA gene ของจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่อาศัยอยู่ในดินปนเปื้อน PAH ความเข้มข้น 4.5 กรัมต่อกิโลกรัม (Enrique และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า PAH หลายชนิดอาจเป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (teratogen) (Alexander, 1999) นอกจากนี้สารประกอบกลุ่มนี้ยังมีการสะสม (bioaccumulation) และเพิ่มปริมาณ (biomagnification) ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะเพิ่มขึ้นเป็นลำดับขั้นของผู้บริโภคในห่วงโซ่อาหาร (Boonchan และคณะ, 2000)

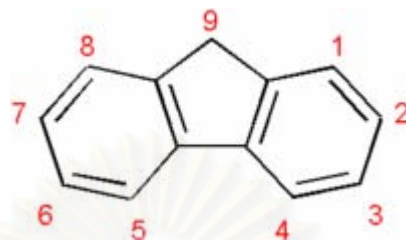
สำนักงานวิจัยมะเร็งนานาชาติ (The International Agency for Research Cancer; IARC) ได้แบ่งกลุ่มสาร PAH ออกเป็น 3 กลุ่มตามการออกฤทธิ์ในการก่อมะเร็ง (Sul และคณะ, 2003) ดังนี้

- กลุ่ม 1 สารที่น่าจะก่อมะเร็งในมนุษย์ได้สูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ มี 3 ชนิด ได้แก่
 เบนโซ[เอ]แอนทราซีน
 เบนโซ[เอ]ไพรีน
 ไดเบนซ์[เอ,เอช]แอนทราซีน
- กลุ่ม 2 สารที่อาจจะก่อมะเร็งในมนุษย์มี 11 ชนิด ได้แก่
 แนพทาลีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน
 เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน เบนโซ[เจ]ฟลูออแรนทีน
 ไดเบนโซ[เอ,เอช]ไพรีน ไดเบนโซ[เอ,แอล]ไพรีน
 ไดเบนโซ[เอ,อี]ไพรีน ไดเบนโซ[เอ,ไอ]ไพรีน
 ไดเบนโซ[เอ,เอช]อะครีดีน ไดเบนโซ[เอ,เจ]อะครีดีน
 อินดิโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน
- กลุ่ม 3 สารที่ไม่ก่อมะเร็งในมนุษย์มี 23 ชนิด ได้แก่
 ไทรฟีนีลีน ฟิแนนทริน
 แอนทราซีน ฟลูออรีน
 ฟลูออแรนทีน ไพรีน
 ไครซีน ไครนีน
 เพอริลีน เบนโซ[เอ]อะครีดีน
 เบนโซ [ซี]อะครีดีน เบนโซ [จี,เอช,ไอ]ฟลูออแรนทีน
 เบนโซ [เอ]ฟลูออรีน เบนโซ [บี]ฟลูออรีน
 เบนโซ [ซี]ฟลูออรีน เบนโซ [จี,เอช,ไอ]เพอริลีน
 เบนโซ [ซี]ฟิแนนทริน เบนโซ[อี]ไพรีน
 โซโคลเพนทะ[ซี,ดี]ไพรีน ไดเบนซ์[เอ,ซี]แอนทราซีน
 ไดเบนโซ[เอ,เจ]แอนทราซีน ไดเบนโซ[เอ,อี]ฟลูออแรนทีน
 ไดเบนโซ[เอช,อาร์,เอส,ที]เพนทะฟิน

นอกจากนี้ที่รัฐ Wisconsin ประเทศสหรัฐอเมริกา ยังมีการกำหนดค่ามาตรฐานที่ยอมรับ ได้จากการปนเปื้อนของ PAH หลายชนิด เช่นในน้ำดื่มต้องพบแอนทราซีน ไม่เกิน 3000 ส่วนในสิบล้านส่วน เบนโซ[เอ]ไพรีน ไม่เกิน 0.2 ส่วนในสิบล้านส่วน เบนโซ[เอ]ฟลูออแรนทีน ไม่เกิน 0.2 ส่วนในสิบล้านส่วน ฟลูออแรนทีนไม่เกิน 400 ส่วนในพันล้านส่วนและฟลูออรีนไม่เกิน 400 ส่วนในสิบล้านส่วน (<http://dhfs.wisconsin.gov/eh>) และ กลุ่มสหภาพยุโรป (EU) ได้มีการ กำหนดการปนเปื้อนของ PAH ในน้ำดื่มเช่นกันโดย PAH ที่กำหนดได้แก่ ฟลูออแรนทีน เบนโซ[เอ]ไพรีน เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน อินดิโนล [1,2,3-ซี,ดี]ไพรีน และเบนโซ[จี,เอช,ไอ]ไพรีน (Hennion และคณะ, 1994)

ฟลูออรีน

สำหรับ PAH ที่ใช้เป็นแบบในการศึกษาครั้งนี้ คือฟลูออรีน หรือ 9H-fluorene มีชื่อทางเคมีว่า *ortho*-Biphenylenemethane โครงสร้างประกอบด้วยวง เบนซีน 2 วงตั้งแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของฟลูออรีน

ฟลูออรีนเป็น PAH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีสมบัติทางเคมีดังนี้ (Budavari, 1989; Lide และ Frederikse, 1993)

สูตรเคมี	$C_{13}H_{10}$
น้ำหนักโมเลกุล	166.21
สีและลักษณะ	เป็นผลึกขนาดเล็ก แบน สีขาว เมื่อเผาไฟจะเกิดการเรืองแสงสีม่วง (violet fluorescence)
จุดเดือด	295°C
จุดหลอมเหลว	$116-117^{\circ}\text{C}$
ความถ่วงจำเพาะ	1.203 ที่ 0°C หรือ 4°C
ความสามารถในการละลาย	ละลายได้ดีในกรดอะซิติก ละลายได้ในคาร์บอนไดซัลไฟด์, อีเทอร์, เบนซีน, แอลกอฮอล์ร้อนและโทลูอีน ไม่ละลายในน้ำ

ในปัจจุบันนี้ ได้มีการนำเอาฟลูออรีนมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น มีการเติมฟลูออรีนเพื่อเพิ่มจุดเดือดในกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ และมักพบในอุตสาหกรรมการผลิต สี ย้อม พลาสติก อุตสาหกรรมยาและยาฆ่าแมลง และใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตฟลูออรีน และฟลูออรีน-9-เมทานอล นอกจากนี้ยังพบฟลูออรีนในไอเสียเครื่องยนต์ อนุพันธ์ของฟลูออรีนยังใช้ในการผลิตไดโอดกำเนิดแสง (organic light-emitting diodes) และใช้เป็นส่วนประกอบสำหรับผลิตโซลาร์เซลล์ (International Agency for Research on Cancer, 1983-1985)

การได้รับ PAH เข้าสู่ร่างกายมนุษย์

1. โดยการรับประทานอาหารหรือบริโภคน้ำที่ปนเปื้อนด้วย PAH

ปัจจุบันพบว่าการปนเปื้อนของ PAH ในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะอาหารประเภทเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (Fontcuberta และคณะ, 2006; Duedahl-Olesen และคณะ, 2006 ; Reinik และคณะ, 2007) พบว่าการปนเปื้อนของ PAH ถึง 12 ชนิดในจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ โดยพบว่ามี เบนโซ[เอ]ไพรีน สูงกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้คือ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3.4% ของตัวอย่างที่นำมาทดสอบทั้งหมด 334 ตัวอย่าง ตัวอย่างอาหารที่พบการปนเปื้อนของเบนโซ[เอ]ไพรีน ความเข้มข้นสูงที่สุดคือ หมูย่าง และตัวอย่างอาหารที่พบการปนเปื้อนของสารกลุ่ม PAH หลายชนิดความเข้มข้นสูงที่สุดคือ 19 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบในตัวอย่างไส้กรอกรมควัน รองลงมาได้แก่ เนื้อและแฮมพบว่ามี PAH ปนเปื้อน 16 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และไกร้มควันมี PAH ปนเปื้อน 6.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แสดงให้เห็นว่าการรับประทานผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ร่างกายได้รับ PAH อย่างมีนัยสำคัญ (Reinik และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบ PAH ได้ในอาหารรมควัน เช่น แชลมอลรมควัน โดยพบว่าการปนเปื้อนของ เบนโซ[เอ]ไพรีน สูงกว่ามาตรฐานที่กำหนด (Vincent และคณะ, 2007) และมีรายงานการสำรวจอาหารในประเทศเดนมาร์คพบ PAH ความเข้มข้นสูงถึง 1327 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในปลาแฮร์ริงรมควัน พบการปนเปื้อน 64 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมในเบคอนและ 24 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ใน samali และจากการคำนวณพบว่า ผู้บริโภคในประเทศเดนมาร์คได้รับ เบนโซ[เอ]ไพรีน เข้าในร่างกาย จากการรับประทานอาหารประเภท ปิ้ง ย่าง โดยเฉลี่ย 2-4 นาโนกรัมต่อคนต่อวัน (Duedahl-Olesen และคณะ, 2006) และมีรายงานการปนเปื้อนของ เบนโซ[เอ]ไพรีน ในน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารและอาหารทานเล่นชนิดทอด (fried snacks) (Purcaro และคณะ, 2006) นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของ PAH ในอาหารชนิดอื่น ๆ เช่น 94% ของตัวอย่างชาพบการปนเปื้อนของ PAH หลายชนิด เช่น เบนโซ[อี]ไพรีน และ เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทริน (Fontcuberta และคณะ, 2006)

2. จากการหายใจ

ได้รับจากการสูดดมควัน ไอจากท่อไอเสียเครื่องยนต์ ไอร์เอเชีย แก๊สจากโรงงานอุตสาหกรรม ผู้ที่ได้รับ PAH จากการหายใจมากกว่ากลุ่มคนปกติ ได้แก่ ผู้ที่สูบบุหรี่ ผู้ที่อยู่อาศัยในบริเวณที่มีหมอกควันสูง ใกล้บริเวณถนนที่มีการจราจรหนาแน่นหรือบริเวณที่มีการสร้างถนนหรือพักอาศัยใกล้บริเวณโรงงาน (<http://dhfs.wisconsin.gov/eh>)

3. จากการสัมผัส

PAH อาจถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายมนุษย์จากการสัมผัสโดยตรงจากการใช้สารเคมีที่มี PAH เป็นส่วนประกอบ เช่น ลูกเหม็นหรือการใช้ครีมหรือแชมพูที่มี PAH หรืออนุพันธ์ของ PAH เป็นองค์ประกอบหรือจากการสัมผัสดินที่ปนเปื้อน PAH (International Agency for Research on Cancer, 1983-1985)

การปนเปื้อน PAH ในประเทศไทย

การปนเปื้อน PAH ในสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย 91% เกิดจากกระบวนการสันดาปของน้ำมันเชื้อเพลิงที่ไม่สมบูรณ์ สาร PAH กระจายอยู่ในอากาศได้โดยสามารถรวมตัวกับฝุ่นละออง เขม่าควัน และสะสมอยู่ในอนุภาคดิน โดยเฉพาะบริเวณที่มีการจราจรหนาแน่น ย่านธุรกิจการค้าและอุตสาหกรรม จากการศึกษาตัวอย่างดินบริเวณริมถนนในตัวเมืองจังหวัดเชียงใหม่ ในปี 1999 สามารถตรวจวัดปริมาณไพรีนได้ที่มีความเข้มข้น 168 นาโนกรัมในดิน 1 กรัม นอกจากนี้ยังพบฟลูออแรนทีน เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอริลีน และโครีเนน ได้ที่มีความเข้มข้น 146 97.7 และ 93.8 นาโนกรัมในดิน 1 กรัม ตามลำดับ แต่ปริมาณสาร PAH ในดินที่พบแตกต่างจากที่พบในอากาศ กล่าวคือ ปริมาณฟลูออแรนทีน ไพรีน ไครซีนและโครีเนนที่พบในดินมีสูงกว่าในอากาศ ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างในการเกิด photochemical reactivity และแหล่งกำเนิดของสาร PAH (Amagai และคณะ, 1999)

Thongsanit (2002) ได้เก็บตัวอย่างอากาศในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ดินแดง สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม โรงเรียนสิงหราช และมหาวิทยาลัยกรุงเทพ พบว่าค่าเฉลี่ย 24 ชั่วโมงของฝุ่นขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนในบรรยากาศทั่วไป มีค่าสูงสุด 160 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เมตร โดยพบสูงสุดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สำหรับค่าเฉลี่ยของปริมาณรวม PAH 20 ชนิด จากฝุ่นบรรยากาศทั่วไป เท่ากับ 60 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร โดยมี เบนโซ[อี]ไพรีน อินดีโน[1,2,3-ซี,ดี]ไพรีน และเบนโซ[จี,เอช,ไอ]ไพรีน เป็นองค์ประกอบหลัก PAH มากกว่าร้อยละ 97 พบในฝุ่นขนาดเล็กกว่า 0.95 ไมครอน PAH โมเลกุลเล็กพบในตัวอย่างฝุ่นจากรถยนต์ดีเซล ตัวอย่างรถยนต์เบนซินมีเบนโซ[จี,เอช,ไอ]ไพรีน เป็นองค์ประกอบหลัก และพบว่า เบนโซ[อี]ไพรีน และ ไพรีน เป็นองค์ประกอบหลักของตัวอย่างจากปล่องโรงงานอุตสาหกรรม ผลการวิเคราะห์ฝุ่นจากบรรยากาศเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากแหล่งกำเนิด พบว่าแหล่งกำเนิดหลักของ PAH คือ ไอเสียรถยนต์

Garivait และคณะ (2002) พบว่าสาร PAH น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 252 ดาลตัน เช่น ไพรีน เบนโซ[อี]ไพรีน และ เบนโซ[เอ]ไพรีน จะอยู่ในรูปของแก๊สเป็นส่วนใหญ่ คิดเป็น 80 40 และ 24% โดยน้ำหนักตามลำดับ ในขณะที่สาร PAH น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า จะอยู่ในรูปของฝุ่นละอองเกือบทั้งหมด ซึ่ง 30–60 % โดยน้ำหนักของสาร คณะผู้วิจัยคิดว่าแหล่งที่มาของสาร PAH ในบรรยากาศนั้นเกิดจากควันที่ปล่อยออกมาจากเครื่องยนต์บนเส้นทางจราจร

Wilcke และคณะ (1999) พบสาร PAH จำนวน 20 ชนิดในตัวอย่างดินบริเวณถนนในกรุงเทพมหานคร ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 12–380 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม โดยพบเนฟธาซีนในปริมาณสูงสุด (145.2 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม) รองลงมาได้แก่ เพอริลีน (136.4 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม) เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอริลีน (58.9

ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม) ฟีนแอนทริน (60.8 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม) และไพรีน (48.3 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม)

กิติโรจน์ หวันตาหลา (2546) ได้ศึกษาปริมาณ PAH ในบรรยากาศ ณ บริเวณสถานีขนส่งสายใต้ จังหวัดกรุงเทพมหานคร พบการปนเปื้อนของ PAH ชนิดต่างๆ ในอากาศ โดยพบไพรีนมากที่สุด ปริมาณ 99.45% โดยน้ำหนัก รองลงมาได้แก่ ฟีนแอนทริน เบนโซ[เอ]แอนทราซีน เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทริน และ ไครซีนตามลำดับ โดยพบว่ามี การปนเปื้อนสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานของ US-EPA ที่กำหนดไว้ที่ 65 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร และพบว่ามี การปนเปื้อนสูงในช่วงวันอาทิตย์-อังคาร และต่ำสุดในวันศุกร์ ปริมาณ PAH สูงสุดที่พบคือ 354 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร และต่ำสุดที่ 91 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร

Boonyatumanond และคณะ (2006) ได้เก็บตัวอย่างตะกอนดินเพื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของ PAH ซึ่งพบว่ามี การปนเปื้อนของ PAH อยู่ในตะกอนดินบริเวณคลองสูงที่สุดคือ 2,290 นาโนกรัมต่อกรัม(น้ำหนักกรัมแห้ง) รองลงมาคือบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยา ปากแม่น้ำ และชายฝั่งทะเล ความเข้มข้น 251 178 และ 50 นาโนกรัมต่อกรัม(น้ำหนักกรัมแห้ง) ตามลำดับ วิเคราะห์แหล่งกำเนิดของ PAH พบว่าฝุ่นจากถนน เขม่ารถยนต์และดิน เป็นแหล่งที่มาของ PAH เนื่องจากมีองค์ประกอบที่เหมือนกัน PAH จากแหล่งกำเนิดต่างๆ ถูกพัดพาลงสู่แหล่งน้ำจนเกิดการสะสมในตะกอนดิน จากการเปรียบเทียบปริมาณ PAH ที่พบในตะกอนดินของประเทศไทยกับบริเวณอ่าวโตเกียว ประเทศญี่ปุ่นซึ่งเป็นประเทศอุตสาหกรรม พบว่ามี การปนเปื้อนของ PAH ที่ประเทศญี่ปุ่นสูงกว่าประเทศไทย ซึ่งมีปริมาณ PAH สูงถึง 65-2010 นาโนกรัมต่อกรัม(น้ำหนักกรัมแห้ง)

Kangsadalampai และคณะ (1996) รายงานการปนเปื้อน PAH ในอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ ปลารมควัน ได้แก่ ปลาเนื้ออ่อน (*Kyopterus apogon*), ปลาสร้อย (*Crossocheilus reba*) และหนังปลาตุ๊ก (*Clarias batrachus*) อาหารปิ้งย่าง ซึ่งทำให้สูงในระดับปานกลาง (medium) และกรอบไหม้เกรียม (well-done) คือ ปีกไก่, ไส้กรอกหมูปนข้าว, หมูไม่ติดมัน (lean meat), หมูติดมัน (medium fat) และเมื่อสกัด PAH ที่ปนเปื้อนในอาหาร มาทำปฏิกิริยากับเกลื่อนิโตรทในภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดเพื่อจำลองภาวะในกระเพาะอาหาร (pH 3.0-3.5) ผลลัพธ์ที่ได้มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ชนิดตรงทั้งแบบ frameshift และ base-pair substitution ในลักษณะที่มีความสัมพันธ์ระหว่างขนาดกับการตอบสนอง (dose-response relationship) สำหรับส่วนสกัดของ PAH ที่ได้จากหมูไม่ติดมันปิ้งที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ชนิดตรงเฉพาะ base-pair substitution และส่วนสกัดที่ได้จากเนื้อปลาตุ๊กไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ชนิดตรงทั้งแบบ frameshift และ base-pair substitution ซึ่งตรงกันข้ามกับหนังปลาตุ๊กซึ่งมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ทั้งสองแบบหลังทำปฏิกิริยากับเกลื่อนิโตรท และสรุปว่าการบริโภคอาหารปิ้งย่าง ร่มควันอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงที่จะรับสารก่อกลายพันธุ์ชนิดตรงได้ถ้ามีเกลื่อนิโตรทอยู่ในกระเพาะอาหาร

Tuntawiroon และคณะ (2007) ได้ศึกษาความเสี่ยงด้านสุขภาพของเด็กที่อาศัยอยู่ในกรุงเทพมหานครจากการได้รับ PAH ที่มาจากการจราจร พบว่า บริเวณถนนในกรุงเทพมหานคร มีปริมาณ PAH ประมาณ 30.39 ± 5.80 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ซึ่งสูงกว่าต่างจังหวัดถึง 30 เท่า PAH ที่ตรวจพบการปนเปื้อนมากที่สุดคือ เบนโซ[จี,เอช,ไอ]ไพรีน ซึ่งมีแหล่งกำเนิดมาจากเครื่องยนต์ เด็กที่อาศัยในกรุงเทพมหานครมีการสัมผัสกับ เบนโซ[เอ]ไพรีนเฉลี่ยวันละ 4.13 ± 0.21 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตรซึ่งสูงกว่าต่างจังหวัดถึง 3-5 เท่า และพบว่าความสามารถในการซ่อมแซม DNA ของเด็กที่อาศัยในกรุงเทพมหานครมีน้อยกว่าเด็กที่อาศัยในต่างจังหวัด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เด็กที่อาศัยในกรุงเทพมหานครมีการสัมผัสกับมลพิษที่ส่งผลต่อพันธุกรรม (genotoxic pollutants) มากกว่าและอาจพัฒนาไปสู่ความเสี่ยงต่อการป่วยด้วยโรคมะเร็งมากกว่าเด็กที่อาศัยในต่างจังหวัด

จากที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า PAH เป็นมลพิษที่สำคัญในสิ่งแวดล้อม และมีการกระจายตัวในวงกว้าง นอกจากนี้ยังมีรายงานหลายฉบับที่ชี้ให้เห็นว่า PAH หลายชนิดมีความเป็นพิษสูง อาจเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้สารประกอบกลุ่มนี้ยังมีการสะสมและเพิ่มปริมาณในสิ่งแวดล้อม และจะมีการสะสมเพิ่มขึ้นเป็นลำดับขั้นของผู้บริโภคในห่วงโซ่อาหาร ปัญหาดังกล่าวนี้ ทำให้มีผู้ศึกษาแนวทางบำบัดสารประกอบในกลุ่มนี้ เพื่อลดการปนเปื้อนของ PAH ในสิ่งแวดล้อม วิธีที่ใช้ในการบำบัด PAH แบ่งออกเป็น 3 วิธี คือ การบำบัดด้วยวิธีทางกายภาพ (physical treatment) การบำบัดด้วยวิธีทางเคมี (chemical treatment) และการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ (biological treatment) การบำบัดด้วยวิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมี เป็นการบำบัดโดยอาศัยสมบัติทางกายภาพของสารปนเปื้อน หรือทำลายโครงสร้างของสารปนเปื้อน ตัวอย่างวิธีการบำบัดด้วยวิธีการทางกายภาพและทางเคมี เช่น

การบำบัดด้วยวิธีทางกายภาพ

ให้ผลการบำบัดในระยะเวลาสั้นเมื่อเทียบกับการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ เช่น

การให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำ (Low-Temperature Thermal Desorption) โดยการให้ความร้อนกับน้ำหรือสารอินทรีย์ที่ต้องการบำบัดให้มีอุณหภูมิสูงถึง $93-315^{\circ}\text{C}$ จากนั้นนำไอระเหยไปบำบัดด้วยวิธีการบำบัดแก๊สต่อไป (Uyesugi และ Kovalick, 1994)

การให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง (High-Temperature Thermal Desorption) ให้ความร้อนกับสารที่ต้องการบำบัด ให้มีอุณหภูมิสูงถึง $315-538^{\circ}\text{C}$ เพื่อให้สารอินทรีย์ระเหยออก จากนั้นนำไอระเหยไปบำบัดด้วยวิธีการบำบัดแก๊สต่อไป (Antizar-Ladislao และคณะ, 2004)

การเผาในพื้นที่เปิด (Open Burn/Open Detonation) วิธีการนี้จะไปทำลายสารพิษที่สลายได้ง่าย เป็นวิธีการที่สะดวกแต่ต้องระวังความปลอดภัย เช่น เปลวไฟ การจุดติดของสารที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียง ความร้อนที่เกิดขึ้นอาจจะส่งผลต่อสารอื่นๆ (Uyesugi และ Kovalick, 1994)

การเผาในพื้นที่ปิด (Incineration) เป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการทำลาย PAH โดยเฉพาะ halogenated hydrocarbons เช่น ไดออกซิน, พอลิคลอโรไบฟีนิล (PCBs), ไตรคลอโรเอธิลีน และ ไทโบรโมอีเธนออกจากสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี (Iimura และคณะ, 2002) โดยการเผาที่อุณหภูมิ 871-1,204°C วิธีนี้สามารถกำจัดสารพิษได้ดี

การสกัดสารปนเปื้อนในดินด้วยวิธีการระเหย (Soil Vapor Extraction)

นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่น ๆ เช่นการใช้ไอน้ำร้อนเติมเข้าไปในดิน เพื่อให้สารที่ปนเปื้อนอยู่ในดินระเหยออกมาและนำไอรระเหยไปบำบัดต่อไป การอัดอากาศที่มีความดันสูงเข้าด้านล่างของพื้นที่บำบัด เพื่อชักนำให้เกิดการตกตะกอนของสารปนเปื้อน เมื่อสารปนเปื้อนตกตะกอนจะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถแยกตะกอนออกมาบำบัดต่อไปได้ การใช้คลื่นเสียงเพื่อให้เกิดการสั่นสะเทือนเพิ่มความสามารถในสกัด การออกซิไดส์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ การกรอง เป็นต้น (Alloway และ Ayres, 1993)

การบำบัดด้วยวิธีทางกายภาพมีข้อเสียคือเป็นวิธีที่มีต้นทุนสูง เนื่องจากต้องใช้แหล่งให้กำเนิดความร้อน และต้องทำในเตาปฏิกรณ์หรือถังปฏิกิริยาที่กันความร้อน จึงไม่เหมาะกับการบำบัดพื้นที่ที่ปนเปื้อนด้วยสาร PAH ความเข้มข้นต่ำและทำให้ดินที่บำบัดเสื่อมสภาพด้วย (GAO/RCED-96-13, 1996) นอกจากนี้เมื่อสิ้นสุดกระบวนการยังเกิดกากสารพิษและแก๊สพิษที่ต้องนำมาบำบัดต่อ

การบำบัดด้วยวิธีทางเคมี

วิธีการนี้เป็นการบำบัดโดยพิจารณาสมบัติทางเคมีของสารปนเปื้อน เช่น ความสามารถในการละลาย การตกตะกอนนำมาใช้ในการบำบัด และให้ผลรวดเร็วกว่าการบำบัดทางชีวภาพ ตัวอย่างการบำบัดด้วยวิธีทางเคมี เช่น

การเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (catalytic oxidation) ด้วยสารที่ความสามารถในการออกซิไดส์สูง โดยการเติมสารเคมีหรือแก๊ส เช่น โอโซน ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ คลอรีน คลอรีนไดออกไซด์ เพื่อไปออกซิไดส์สารปนเปื้อนที่มีพิษให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่มีพิษน้อยลง หรือไม่มีพิษ วิธีการนี้ต้องทำในถังบำบัดเฉพาะ (Uyesugi และ Kovalick, 1994)

การตกตะกอน (Precipitation) เป็นกระบวนการเปลี่ยนรูปของสารที่ปนเปื้อนที่ของเหลวให้อยู่ในรูปของตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ โดยการใช้การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส หรือการเติมสารเคมีที่ช่วยให้เกิดการตกตะกอน จากนั้นทำให้ตะกอนเกิดการรวมตัวหรือเอาตะกอนออกโดยการกรอง (Blumer, 1976)

การเติมน้ำเพื่อชะสารปนเปื้อนออกมาหรือเติมสารเคมีที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ ให้กับสารปนเปื้อน เช่น สารลดแรงตึงผิว (Uyesugi และ Kovalick, 1994)

การใช้เบสเร่งการสลายปนเปื้อน (Base/Glycolate Catalyzed Decomposition Dehalogenation) วิธีการนี้ทำในถังปฏิกิริยา โดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโพลิเอทิลีนไกลคอลลงไปในปริมาณที่เหมาะสมกับการปนเปื้อนในพื้นที่ จากนั้นให้ความร้อนและหมุนเหวี่ยง

ถ้ารีแอกเตอร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์จะชักนำให้เกิดปฏิกิริยาดีฮาโลจิเนชัน (dehalogenation) และอาจเกิดการระเหยของสารปนเปื้อน โดยปกติแล้วพอลิเอทิลีนไกลคอล จะไปแทนที่โมเลกุลของสารฮาโลเจน วิธีการนี้จะช่วยให้ความเป็นพิษลดลง (Myers และคณะ, 2007)

การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction) สกัดสารปนเปื้อนออกจากดินหรือน้ำที่ต้องการบำบัดโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นนำตัวทำละลายไปบำบัดต่อไป นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นๆ เช่น การสลายด้วย photochemical decomposition, supercritical water decomposition, vapor-phase hydrogenation reduction การออกซิเดชันด้วยความร้อน (thermal oxidation) การแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange) (Uyesugi และ Kovalick, 1994)

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากวิธีบำบัดทางเคมีเป็นปฏิกิริยารุนแรงและไม่สามารถคาดเดาสารพิษตกค้างที่จะเกิดขึ้นได้ (Imura และคณะ, 2002) นอกจากนี้บางวิธี เช่น การเติมน้ำเพื่อชะสารปนเปื้อนยังเป็นการทำให้สารพิษกระจายตัวและยังเพิ่มปริมาณสารพิษที่ต้องบำบัด

การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ

เป็นการใช้ระบบทางชีวภาพช่วยลดสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ข้อดีคือค่าใช้จ่ายต่ำกว่าการบำบัดด้วยการเผา ซึ่งอาจถูกกว่าถึง 65-85% แต่อาจใช้เวลาบำบัดนานกว่าวิธีการอื่น (Zechendorf, 1999) การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพใช้ความสามารถของสิ่งมีชีวิตในการย่อยสลายสารอินทรีย์และความสามารถในการปรับตัวให้ดำรงอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารพิษ ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตมีการสร้างวิธีที่ช่วยในการสลายสารพิษที่มีโครงสร้างแบบต่างๆ ได้ (Jansson, 2003) การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพให้มีประสิทธิภาพสูงต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เช่น ภาวะแวดล้อมของพื้นที่บำบัด โครงสร้างและสมบัติของสารพิษที่ต้องการบำบัดและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัด ซึ่งต้องมีความสัมพันธ์กัน ดังแสดงในรูปที่ 2.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.2 สามเหลี่ยมของการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ (ที่มา Suthersan, 1999)

เช่นเดียวกับกระบวนการบำบัดโดยวิธีอื่น ๆ การบำบัดด้วยวิธีการทางชีวภาพก็มีข้อจำกัดคือไม่สามารถใช้วิธีการบำบัดนี้กับสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนหรือสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ในขั้นตอนการเริ่มบำบัดต้องใช้ความรู้ด้านการค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ขั้นตอนการบำบัดต้องมีการติดตามอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เซลล์จุลินทรีย์เป็นไบโอเซนเซอร์ เพื่อช่วยในการติดตามผลการบำบัด (Jansson, 2003) การบำบัดทางชีวภาพมี 2 วิธีคือ

1. Biostimulation

เป็นการเติมสารอาหารหรือปรับภาวะให้เหมาะสมเพื่อให้จุลินทรีย์ท้องถิ่นสามารถย่อยสลายสารพิษได้ วิธีการนี้ต้องมีการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพื้นที่ ที่ต้องการบำบัดก่อน ปัจจัยที่ใช้ในการพิจารณาได้แก่

ปริมาณออกซิเจน เป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการย่อยสลายแบบใช้อากาศ (Adriaens และ Vogel, 1995) เช่นการบำบัดคราบน้ำมัน การเพิ่มออกซิเจนอาจทำได้โดยการเติมอากาศลงในพื้นที่ที่ต้องการบำบัดโดยตรง หรือเติมสารเคมีที่ให้ออกซิเจน เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น (Adriaens และ Vogel, 1995; Atlas และ Unterman, 1999)

การเติมสารอาหารที่จำเป็น เพื่อให้พื้นที่บำบัดมีความอุดมสมบูรณ์ ตัวอย่างเช่นการบำบัดน้ำมันของบริษัท Exxon Valdez ที่ชายหาด Alaskan มีการเติมไนโตรเจน และฟอสฟอรัสช่วยในการบำบัด (Atlas และ Unterman, 1999; Head และ Swannell, 1999; Romantschuk และคณะ, 2000)

การปรับค่าความเป็นกรด-เบสเนื่องจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบสเหมาะสมในช่วง 6.5-8.5 แต่จากการสำรวจพื้นที่ปนเปื้อน PAH มักมีค่าความเป็นกรด-เบสประมาณ 2.0 จึงจำเป็นต้องเติมสารที่ช่วยในการปรับภาวะของพื้นที่บำบัด เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต หรือ แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นต้น (Bowlen และ Kosson, 1995)

การเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย เช่น การเติมสารลดแรงตึงผิว (Romantschuk และคณะ, 2000)

2. Bioaugmentation

ในกรณีที่จุลินทรีย์ท้องถิ่นไม่สามารถย่อยสลาย PAH ที่ปนเปื้อนในพื้นที่ที่ต้องการบำบัดได้ จำเป็นต้องใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นหรือหลายสายพันธุ์เพื่อช่วยในการบำบัดสารปนเปื้อน วิธีนี้เป็นการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสลาย PAH ลงในพื้นที่ที่ต้องการบำบัด โดยปกติแล้วจะใช้ร่วมกับวิธี Biostimulation เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัด (Vogel, 1996) จุลินทรีย์ที่เลือกใช้ในกระบวนการ Bioaugmentation ต้องมีความสามารถในการสลายสารปนเปื้อนได้เป็นอย่างดี เนื่องจากจุลินทรีย์ท้องถิ่นยังไม่สามารถบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อนในบริเวณนั้นได้ ต้องอยู่รอดในพื้นที่บำบัด เช่น ดินที่ลึกลับ ชายฝั่งที่มีความเค็ม หรือมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงกว้าง เช่น *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 ซึ่งสามารถย่อยสลาย 4-คลอโรฟีนอลที่ปนเปื้อนในดินที่อุณหภูมิต่ำและมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วง 5-28°C (Backman และ Jansson, 2004a; Backman และ Jansson, 2004b) นอกจากนี้ยังต้องทนต่อการถูกยับยั้งการทำงานจากจุลินทรีย์ท้องถิ่น (Habe และคณะ, 2001)

Bioaugmentation สามารถทำได้โดยการเติมจุลินทรีย์ลงในพื้นที่ที่ต้องการบำบัดโดยตรง เรียกว่า *in situ* treatment ซึ่งเสียค่าใช้จ่ายน้อย แต่ประสิทธิภาพในการบำบัดอาจลดลงและยังต้องมีการควบคุมการแพร่กระจายของจุลินทรีย์หรือสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้น อีกวิธีหนึ่งเป็นการนำเอาดินที่ปนเปื้อนมลพิษมาบำบัดในไบโอรีแอกเตอร์เรียกว่า *ex situ* treatment วิธีการนี้มีประสิทธิภาพในการบำบัดสูงกว่า เนื่องจากสามารถควบคุมปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการบำบัดได้ง่ายกว่า แต่มีค่าใช้จ่ายในการต้องขนย้ายดินมาบำบัดและขนย้ายกลับไปเมื่อบำบัดเสร็จแล้ว (Vogel, 1996) โดยปกติแล้วจะนิยมการบำบัดแบบ *in situ* treatment มากกว่า (Romantschuk และคณะ, 2000)

และเนื่องจากโครงสร้างของ PAH แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน และสมบัติทางเคมีของ PAH ที่ละลายน้ำได้น้อย สลายตัวช้าและถูกดูดซับในธรรมชาติได้เป็นอย่างดี ทำให้มีการพัฒนาวิธีการบำบัดสารพิษให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นเรื่อยๆ (Mohan และคณะ, 2006)

จากข้อมูลที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่าวิธีการบำบัดสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมีหลายวิธี การเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมต้องพิจารณาจากหลายปัจจัย เช่น พื้นที่บำบัด สมบัติของสารที่ต้องการบำบัด ค่าใช้จ่าย เป็นต้น และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการบำบัดโดยวิธีทางกายภาพ เคมี และวิธีทางชีวภาพ จะเห็นได้ว่ากระบวนการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพมีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถ

ประยุกต์ใช้ในพื้นที่ที่มีความเป็นกรด-เบสในช่วงกว้าง หรือแม้กระทั่งพื้นที่ที่มีความเค็ม สามารถเลือกบำบัดสารได้ตามโครงสร้าง อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง ไม่เกิดสารตกค้างและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นง่ายต่อการควบคุม เป็นวิธีการที่สามารถนำไปบำบัดบริเวณพื้นที่ปนเปื้อนได้ (in situ application) ไม่เกิดกากสารพิษที่ต้องนำไปบำบัดต่อ เป็นวิธีการที่ถูกต้องตามมาตรฐานสิ่งแวดล้อมและไม่เกิดอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและผู้อยู่อาศัยในบริเวณใกล้เคียง (Aitken, 1993; Karam และ Nicell, 1997; Vidali, 2001; Samanta และคณะ, 2002)

การบำบัดทางชีวภาพด้วยรา

ราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในธรรมชาติ เนื่องจากสามารถทนความเข้มข้นของมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าแบคทีเรีย และยังสามารถทนต่อภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดีกว่า เช่น ในที่มีอาหารจำกัด อุณหภูมิสูง ความเป็นกรด-เบสสูง ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์สูง ในดินที่มีความเค็ม เป็นต้น จึงมีผู้สนใจศึกษาความสามารถของราในกระบวนการบำบัดสารพิษ ซึ่งพบว่ามีราหลายชนิดที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสารพิษชนิดต่างๆ ได้ดี (Evans และ Hedger, 2001) ดังตัวอย่างที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างราที่สามารถย่อย PAH ได้ (ดัดแปลงจาก Cerniglia, 1997; Zhang และคณะ, 2006)

PAH	ชนิดเชื้อรา
แนพธาลีน	<i>Absidia glauca</i> , <i>Aspergillus niger</i> <i>Basidiobolus ranarum</i> <i>Candida utilis</i> , <i>Choanephora campincta</i> , <i>Circinella</i> sp. <i>Claviceps paspali</i> , <i>Cokeromyces poitrassi</i> , <i>Conidiobolus gonimodes</i> <i>Cunninghamella bainieri</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Camellia japonica</i> <i>Emericellopsis</i> sp., <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Gilbertella persicaria</i> , <i>Gliocladium</i> sp. <i>Helicostylum piriforme</i> , <i>Hyphochytrium catenoides</i> <i>Linderina pennisporea</i> <i>Mucor hiemalis</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Panaeolus cambodginensis</i> , <i>Panaeolus subbalteatus</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Pestalotia</i> sp., <i>Phlyctochytrium reinboldtae</i> <i>Phycomyces blakesleanus</i> , <i>Phytophthora cinnamomi</i> , <i>Psilocybe cubensis</i> , <i>Psilocybe strictipes</i> , <i>Psilocybe stuntzii</i> <i>Psilocybe subaeruginascens</i> <i>Rhizophlyctis harderi</i> , <i>Rhizophlyctis rosea</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Saccharomyces cervisiae</i> , <i>Saprolegnia parasitica</i> , <i>Smittium culicis</i> <i>Smittium culisetiae</i> , <i>Smittium simulii</i> , <i>Sordaria micola</i> <i>Syncephalastrum racemosum</i> <i>Thamnidium anomalum</i> <i>Zygorhynchus moelleri</i>

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) ตัวอย่างราที่สามารถย่อย PAH ได้ (ดัดแปลงจาก Cerniglia, 1997; Zhang, 2006)

PAH	ชนิดเชื้อรา
อะซีแนพธีน	<i>Cunninghamella elegans</i> <i>Trametes versicolor</i>
พีแนทรีน	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Agrocybe aegerita</i> <i>Bjerkandera adjusta</i> <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Cylindrocladium simplex</i> , <i>Curvularia lunata</i> <i>Curvularia tuberculata</i> , <i>Cylindrocladium simplex</i> <i>Daedaela quercina</i> <i>Flamulina velutipes</i> <i>Kuehneromyces mutabilis</i> <i>Laetiporus sulphureus</i> <i>Monosporium olivaceum</i> <i>Naematoloma frowardii</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pleurotus laevis</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Syncephalastrum racemosum</i> <i>Trametes versicolor</i>
แอนทราซีน	<i>Bjerkandera</i> sp., <i>Bjerkandera adjusta</i> <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Corioloropsis polyzona</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Curvularia tuberculata</i> <i>Cryphonectria parasitica</i> <i>Cylindrocladium simplex</i> <i>Cunninghamella elegans</i> <i>Daedaela quercina</i> , <i>Drechslera spicifera</i> <i>Flamulina velutipes</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Marasmiellus</i> sp., <i>Monosporium olivaceum</i> <i>Naematoloma frowardii</i> <i>Oxysporus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp., <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Phanerochaete laevis</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> <i>Ramaria</i> sp., <i>Rhizopus arrizus</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Verticillium lecanii</i>
ฟลูออรีน	<i>Cunninghamella elegans</i> <i>Laetiporus sulphureus</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Trametes versicolor</i>

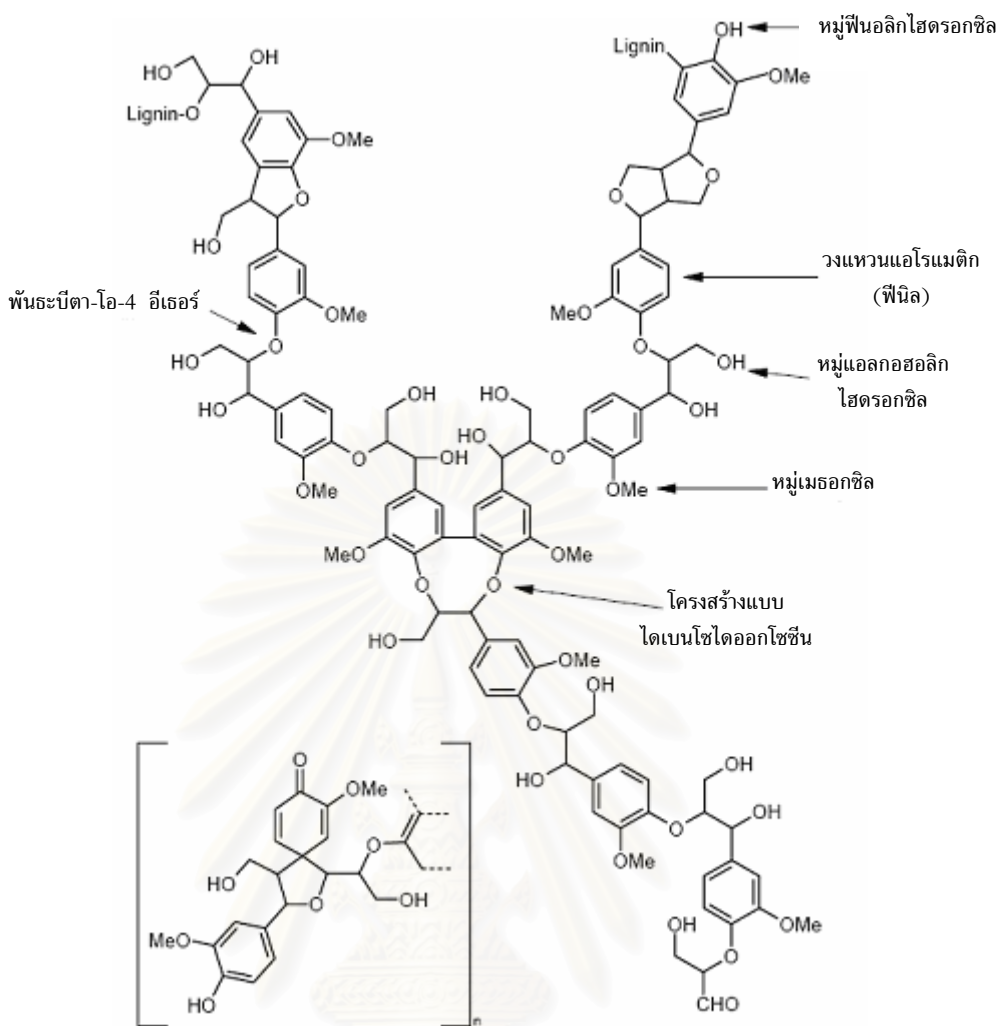
ตารางที่ 2.2 (ต่อ) ตัวอย่างราที่สามารถย่อย PAH ได้ (ดัดแปลงจาก Cerniglia, 1997; Zhang, 2006)

PAH	ชนิดเชื้อรา
ฟลูออแรนทริน	<p><i>Aspergillus terreus</i> <i>Bjerkandera adjusta</i>, <i>Beauveria alba</i> <i>Cunninghamella elegans</i>, <i>Cunninghamella blackesleeana</i> <i>Cunninghamella echinulata</i> <i>Cryptococcus albidus</i>, <i>Cicinobolus cesatii</i> <i>Daedaea quercina</i> <i>Flamulina velutipes</i> <i>Laetiporus sulphureus</i> <i>Naematoloma frowardii</i> <i>Mortierella ramanniana</i>, <i>Marasmiellus</i> sp. <i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>Pestalotia palmarum</i>, <i>Penicillium</i> sp. <i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Sporormiella australis</i></p>
ไพรีน	<p><i>Agrocybe aegerita</i>, <i>Aspergillus niger</i> <i>Bjerkandera adjusta</i> <i>Cunninghamella elegans</i>, <i>Candida parapsilopsis</i>, <i>Crinipellis maxima</i> <i>Crinipellis perniciososa</i>, <i>Crinipellis stipitaria</i>, <i>Crinipellis zonata</i> <i>Dichomitus squalens</i> <i>Flammulina velutipe</i>, <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Kuehneromyces mutabilis</i> <i>Laetiporus sulphureus</i> <i>Marasmiellus ramealis</i>, <i>Marasmius rotula</i>, <i>Mucor</i> sp. <i>Naematoloma frowardii</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i>, <i>Penicillium</i> sp. <i>Penicillium janthinellum</i>, <i>Pittosporum glabrum</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>Pleurotus</i> sp., <i>Penicillium janczewskii</i> <i>Syncephalastrum racemosum</i> <i>Trametes versicolor</i>, <i>Trichoderma harzianum</i></p>
เบนโซ[เอ]แอนทราซีน	<p><i>Candida krusei</i>, <i>Cunninghamella elegans</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i>, <i>Phanerochaete laevis</i> <i>Penicillium janthinellum</i>, <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Rhodotorula minuta</i> <i>Syncephalastrum racemosum</i> <i>Trametes versicolor</i></p>

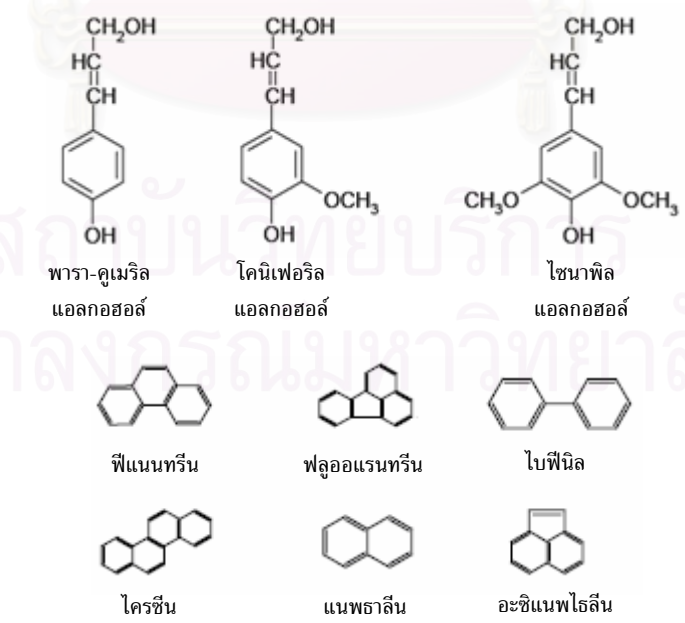
ตารางที่ 2.2 (ต่อ) ตัวอย่างราที่สามารถย่อย PAH ได้ (ดัดแปลงจาก Cerniglia, 1997; Zhang, 2006)

PAH	ชนิดเชื้อรา
เบนโซ[เอ]ไพรีน	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Bjerkandera</i> sp. <i>Candida maltosa</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Candida maltosa</i> <i>Candida tropicalis</i> , <i>Chrysosporium pannorum</i> <i>Cunninghamella elegans</i> <i>Mortierella verrucosa</i> <i>Naematoloma frowardii</i> , <i>Neurospora crassa</i> <i>Penicillium janczewskii</i> , <i>Penicillium janthinellum</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phanerochaete laevis</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Ramaria</i> sp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> <i>Trametes versicolor</i> , <i>Trichoderma</i> sp., <i>Trichoderma viride</i>
เบนโซ[อี]ไพรีน	<i>Cunninghamella elegans</i>
โครซีน	<i>Cunninghamella elegans</i> <i>Penicillium janthinellum</i> <i>Syncephalastrum racemosum</i>
ไดเบนโซ[เอ,เอช]แอนทราซีน	<i>Penicillium janthinellum</i> <i>Trametes versicolor</i>

จากการศึกษาความสามารถของรากลหลายชนิดพบว่าราในกลุ่มไวท์รอต (white rot fungi) ซึ่งเป็นราในคลาส Basidiomycetes ที่เจริญบนไม้แล้วสามารถเปลี่ยนสีเนื้อไม้ให้เป็นสีขาวได้ และมีการรายงานว่ารากลุ่มนี้มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไม้ซึ่งมีโครงสร้างซับซ้อน โดยสร้างเอนไซม์ที่หลั่งออกมาออกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อสลายโครงสร้างหลักของเนื้อไม้ก่อนนำเอาเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสมาใช้ในการเจริญ (Steffen และคณะ, 2003) เมื่อพิจารณาโครงสร้างหลักของเนื้อไม้จะเห็นว่ามีส่วนประกอบหลักคือลิกนิน โดยมีมากถึง 20-30% ลิกนินเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นโพลีเมอร์ลักษณะวงแหวนเชื่อมต่อกันหลายๆวงจนเป็นโพลีเมอร์ใหญ่ (heterogeneous polyphenolic polymer) ดังแสดงในรูปที่ 2.3ก (Buswell และ Odier, 1987; Tien และ Kirk, 1988)



ข

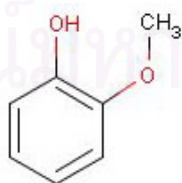


รูปที่ 2.3 โครงสร้างของลิกนิน (ก) และ เปรียบเทียบหน่วยย่อยของลิกนินกับโครงสร้างของ PAH (ข) (ดัดแปลงจาก Brunow, 2001; Pointing, 2001)

เมื่อพิจารณาจากรูป 2.3ก จะเห็นได้ว่าโครงสร้างของลิกนินประกอบด้วยอนุพันธ์ของวงแหวนเชื่อมต่อกันจนเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ และในรูป 2.3ข จะเห็นได้ว่าหน่วยย่อยของลิกนินทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ โคนิเฟอรอล แอลกอฮอล์ โซนาฟิลา แอลกอฮอล์ และพารา-คูเมรอลแอลกอฮอล์ มีลักษณะเป็นวงเบนซีน คล้ายกับโครงสร้างของ PAH ดังนั้นจึงมีการนำเอนไซม์ที่สร้างจากรากลุ่มไวรัลหรือทาคาซึกาความสามารถในการสลายสารที่มีโครงสร้างแบบวงแหวนคล้ายกับลิกนิน เช่น สารในกลุ่ม PAH (Field และคณะ, 1992; Bogan และ Lamar, 1996; Rabinovich และคณะ, 2004; Svobodova และคณะ, 2006)

มีรายงานหลายฉบับแสดงให้เห็นว่าความสามารถของราไวรัลหรือทาคาซึกาในการเปลี่ยนสีสังเคราะห์มักเกี่ยวข้องกับความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน เช่น แลคเคสแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสและลิกนินเพอร์ออกซิเดส (Chivukula และคณะ, 1995; Heinfling และคณะ, 1998; Schliephake และคณะ, 2000; Saparrat และ Guillen, 2005) ดังนั้นการคัดเลือกหาที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน (ligninolytic enzyme) เพื่อประยุกต์ใช้ในการย่อยสลาย PAH จึงเริ่มจากการทดสอบความสามารถของราในการฟอกสีหรือการเปลี่ยนสีพอลิแอนทราควิโนน เช่น poly R-478 poly B-411 rhemazol brilliant blue R (RBBR) หรือการเปลี่ยนสีย้อม (polymeric dyes) ชนิดต่าง ๆ เช่น azure-B หรือ phenol red เป็นต้น หรือการเปลี่ยนสีสารสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ เช่น syringaldazine หรือ ไกวเอคอลล (Gold และคณะ, 1988; Nishida และคณะ, 1988; Boominathan และคณะ, 1990; Archibald, 1992; Field และคณะ, 1992; De Jong และคณะ, 1994; Doerge และคณะ, 1997; Okino และคณะ, 2000; Trupkin และคณะ, 2003; Kiiskinen และคณะ, 2004)

ไกวเอคอลล หรือ 2- เมธอซิลฟีโนล มีสูตรทางเคมี $C_7H_8O_2$ เป็นสารสังเคราะห์ที่มีหมู่ฟีโนลเป็นองค์ประกอบ (synthetic phenolic reagents) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ปัจจุบันได้มีการนำไกวเอคอลล มาใช้เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับคัดแยกราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์แลคเคส (Nishida และคณะ, 1988; Addleman และคณะ, 1995; Koker และคณะ, 2000; Okino และคณะ, 2000; Kiiskinen และคณะ, 2004)

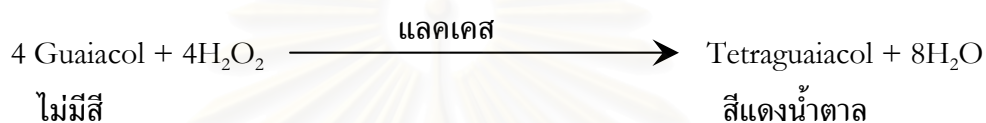


รูปที่ 2.4 โครงสร้างของไกวเอคอลล

Kiiskinen และคณะ (2004) ได้ศึกษาการใช้สีทดสอบชนิดต่าง ๆ เป็นอินดิเคเตอร์ในการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตแลคเคส โดยนำราที่ผลิตแลคเคสได้ 24 สายพันธุ์

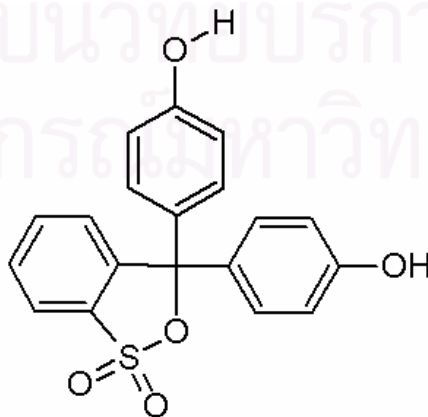
มาทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนสีทดสอบจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ไกวเอคอลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีแดงน้ำตาล (reddish-brown halo) RBBR และ poly R-478 สังเกตจากการเปลี่ยนฟอกสีจากสีชมพูเป็นไม่มีสี (colourless halo) และสำหรับแทนนิน สังเกตจากการเปลี่ยนสีจากน้ำตาลอ่อนเป็นสีน้ำตาลเข้ม พบว่า การทดสอบโดยใช้ RBBR Poly R-478 และ ไกวเอคอลให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกัน มีความแตกต่างกันเพียง 1 สายพันธุ์ จากผลการทดลองดังกล่าวผู้วิจัยเสนอแนะว่าการใช้ RBBR Poly R-478 และ ไกวเอคอลในการตรวจสอบและคัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างแลคเคส เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และเชื่อถือได้

Bergmeyer (1974) อธิบายปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการเปลี่ยนสีของไกวเอคอล ดังนี้



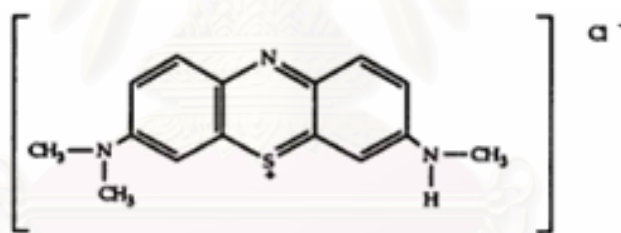
เมื่อไกวเอคอล ถูกออกซิไดส์โดยแลคเคสในภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ร่วมด้วย ไกวเอคอลซึ่งไม่มีสีจะถูกเปลี่ยนเป็น tetraguaiacol ซึ่งมีสีแดงน้ำตาล นอกจากแลคเคสที่ให้ผลบวกกับไกวเอคอลแล้ว บางครั้งยังพบว่ามีเอนไซม์ในกลุ่มเพอร์ออกซิเดส เช่น ลิกนินเพอร์ออกซิเดสสามารถออกซิไดส์ไกวเอคอลในภาวะที่มีเวอรทริลแอลกอฮอล์เป็นเมดิเอเตอร์ได้เช่นกัน (Koduri และ Tien, 1995)

Phenol Red หรือ phenolsulfonphthalein (PS) มีสูตรทางเคมี $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$ มักถูกใช้เป็น pH indicator เมื่อโมเลกุลของ phenol red ซึ่งมีสีส้มแดงสูญเสียโปรตอนทำให้อยู่ในรูปของ phenol red ที่มีประจุลบซึ่งมีสีเหลืองและหากเกิดการสูญเสียโปรตอนอีกครั้งจะทำให้เกิดเป็นสีแดง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเอนไซม์ที่มีเอนไซม์รับส่งอิเล็กตรอน สูตรโครงสร้างของ phenol red ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ phenol red

Azure B เป็นสารสังเคราะห์สีน้ำเงินเข้มอยู่ในกลุ่มสีอะโซ โมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 3 วงเชื่อมต่อกันดังแสดงในรูปที่ 2.6 โดยปกติแล้วสีกลุ่มนี้จะไม่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ในภาวะแบบใช้ออกซิเจน (aerobic condition) แต่มักถูกย่อยสลายในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) แต่ผลผลิตที่ได้อาจมีความเป็นพิษและอาจมีความสามารถในการก่อมะเร็ง (Michaels และ Lewis, 1985, 1986) ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นที่พันธะอะโซ ซึ่งจะถูกรีดิวซ์แล้วเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็นแอมโรแมติกเอมีน เกิดเป็นสารประกอบไม่มีสีหรือโดยทั่วไปเรียกว่าเกิดการฟอกสี (Michaels และ Lewis, 1986) มีรายงานว่าราในกลุ่มไวท์รอตบางสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินที่มีแอกติวิตีสูงเท่านั้น จึงสามารถย่อยสลายสีอะโซในภาวะแบบใช้ออกซิเจนได้ เช่น *P. chrysosporium* (Bumpus และ Aust., 1986; Asamudo และคณะ, 2005) *Pleurotus* sp. (Espindola และคณะ, 2007) หรืออาจต้องอาศัยการทำงานของราไวท์รอต 2 สายพันธุ์ร่วมกัน เช่น *Trametes villosa* กับ *Pycnoporus sanguineus* (Machado และคณะ, 2006) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการฟอกสี อะโซของราในกลุ่มไวท์รอตแต่ละสายพันธุ์ จะแตกต่างกันไป โดยส่วนใหญ่ มักเกิดจากการทำงานของลิกนินเพอร้ออกซิเดส เช่น *P. chrysosporium* แต่สำหรับราที่ไม่สร้างลิกนินเพอร้ออกซิเดส เช่น *P. sajorcaju* พบว่าการสลายสีอะโซเกิดขึ้นโดยแลคเคส (Chagasa และ Durrant, 2001) หรือบางครั้งอาจพบว่าการสลายสีอะโซของราไวท์รอตเกิดจากแมงกานีสเพอร้ออกซิเดส เช่น *Irpex lacteus* (Susla และ Svobodova, 2008) หรือใน *P. chrysosporium* บางสายพันธุ์ (Chagasa และ Durrant, 2001)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ azure B

มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตัดแยกธาตที่สามารถสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน โดยอาศัยการเปลี่ยนสีของสารทดสอบ เช่น Okino และคณะ (2000) ได้ตัดแยกราในกลุ่ม basidiomycetes ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน (ligninolytic enzyme) จำนวน 116 สายพันธุ์ โดยพิจารณาความสามารถในการออกซิไดส์ RBBR และ ไกวเอคอลล พบว่าราที่สามารถออกซิไดส์ RBBR และไกวเอคอลล มีจำนวน 96.6% และ 87.1% ตามลำดับ และเมื่อนำราเหล่านี้มาตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ พบว่าสามารถผลิตแลคเคส 96.6% และเพอร้ออกซิเดส 92.2% ตามลำดับ และได้สรุปว่าวิธีการคัดเลือกราโดยพิจารณาความสามารถในการออกซิไดส์ RBBR และไกวเอคอลล เป็นวิธีการคัดเลือกที่สามารถสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินได้อย่างรวดเร็ว

Koker และคณะ (2000) ได้คัดแยกรากุ่มไวท์รอตและศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ ตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินเบื้องต้นโดยใช้ Poly R-478 จากนั้นนำสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับ Poly R-478 มาตรวจสอบความสามารถในการสร้างแลคเคส ลิกนินเพอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของไกวเอคคอล azure-B และ phenol red ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้มีการตรวจสอบหาการผลิตเซลลูเลส ไทชีเดส ไชลานเนส และเพอร์ออกซิเดส จากการคัดเลือกราด้วยวิธีการที่กล่าวมาทำให้ได้ราหลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงในการประยุกต์ใช้ในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษ

ราที่สร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน สามารถแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม ตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์ดังนี้ (Hatakka, 2001)

กลุ่มที่ 1 สามารถสร้างเอนไซม์ ลิกนินเพอร์ออกซิเดส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และแลคเคส

กลุ่มที่ 2 สามารถสร้างเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส และแลคเคส

กลุ่มที่ 3 สามารถสร้างเอนไซม์ แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และแลคเคสซึ่งเป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด (Hatakka, 2001)

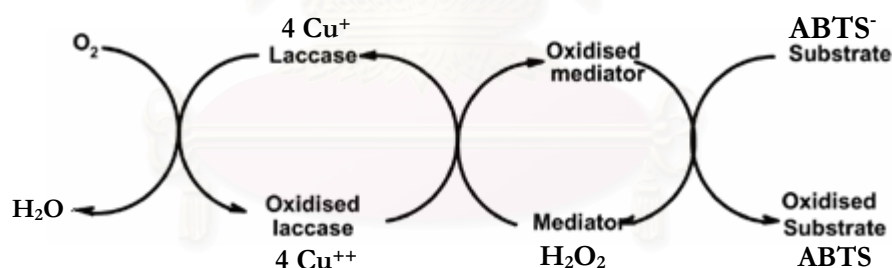
ยกเว้น *P. chrysosporium* ที่มีรายงานว่าสามารถสร้างเอนไซม์ ลิกนินเพอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสแต่ไม่สามารถสร้างแลคเคส (Farrell และคณะ, 1989; Stewart และ Cullen, 1999)

จากข้อมูลที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่าราไวท์รอตผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสลายลิกนินที่สำคัญคือ แลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสและลิกนินเพอร์ออกซิเดส เอนไซม์เหล่านี้นอกจากสามารถย่อยลิกนินที่มีโครงสร้างซับซ้อนแล้วมีสามารถย่อยสลายหรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารชนิดอื่นๆ ที่มีโครงสร้างทั้งแบบเส้นตรงและโครงสร้างแบบวงแหวนได้อีก เช่น สีย้อมไบโอฟิล์ม PAH หรือสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ (Wu และคณะ, 2005) โดยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดสามารถออกซิไดส์สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compound) ให้เป็นอนุมูลฟีนอกซี ในขณะที่สารกลุ่มที่ไม่ใช่ฟีนอลิกจะถูกออกซิไดส์เป็นอนุมูลแคทไอออน (Srinivasan และคณะ, 1995) เนื่องจากเอนไซม์กลุ่มนี้มีกลไกพิเศษคือเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของอิเล็กตรอนอิสระ จากนั้นอิเล็กตรอนอิสระเกิดออกซิเดชันต่อกับสารที่มารับอิเล็กตรอน ทำให้เกิดการออกซิไดส์สารแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Reddy และ Mathew, 2001; Law และคณะ, 2003; Pointing, 2001) จึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาสมบัติและการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด

แลคเคส

แลคเคส (Benzenediol: oxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.2) หรือ blue-copper oxidase เนื่องจากประกอบด้วยอะตอมของคอปเปอร์บริเวณเร่งปฏิกิริยาจำนวน 4 อะตอม แลคเคสเป็นเอนไซม์ที่พบมากในราไวท์รอตและมีหลายไอโซฟอร์ม (Hatakka, 2001) สามารถออกซิไดส์สารประกอบที่มีหมู่ฟินอลิกเป็นองค์ประกอบและยังสามารถออกซิไดส์สารประกอบที่ไม่มีหมู่ฟินอลิกเป็นองค์ประกอบที่มีค่าไอออนไนเซชันโพเทนเชียลต่ำได้ด้วยเช่นกัน (Mester และ Tien, 2000; Reddy และ Mathew, 2001; Aust และคณะ, 2003) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (รูปที่ 2.7) ทำให้สารเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่ฟินอลไปเป็นควิโนน ในการย่อยสลายลิกนินนั้นแลคเคสจะออกซิไดส์วงเบนซีนบริเวณตำแหน่ง C_α-C_β ของสายย่อย (สายข้าง) เป็นอันดับแรก หรืออาจออกซิไดส์พันธะที่เชื่อมระหว่างหมู่ แอลคิล-ฟีนิล และสามารถเร่งปฏิกิริยาดีเมธอกซิเลชันทำให้โครงสร้างของลิกนินมีขนาดเล็กลง ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการสลายลิกนิน (Kawai และคณะ, 1988; Mayer และ Staples, 2002; Gianna และคณะ, 2003; Hamman, 2004)

กระบวนการทำงานของแลคเคสต้องอาศัยสารที่ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอนที่เรียกว่า เมดิเอเตอร์ทำให้แลคเคสมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในสารอินทรีย์ได้หลายชนิด สารที่ใช้เป็นซับสเตรทในการตรวจสอบแอกติวิตีของแลคเคส ได้แก่ syringaldehyde HBT และ ABTS (Majcherczyk และคณะ, 1998; Wells และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.7 กลไกการออกซิเดชันโดยแลคเคส (ดัดแปลงจาก Wells และคณะ, 2006)

Wells และคณะ (2006) ได้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแลคเคสในภาวะที่มีเมดิเอเตอร์ พบว่าแลคเคสประกอบด้วยอะตอมของคอปเปอร์บริเวณเร่งปฏิกิริยา จำนวน 4 อะตอม แลคเคสจะออกซิไดส์สารประกอบที่มีอิเล็กตรอนสูง (electron-rich compounds) เช่น สารที่มีหมู่ฟินอลเป็นองค์ประกอบ อย่างไรก็ตามค่ารีดอกซ์โพเทนเชียล (รีดอกซ์ potential) ของแลคเคสไม่สูงพอที่จะสลายพันธะ C-C ที่อยู่ในรูปพันธะอะลิฟาติกได้ ต้องอาศัยเมดิเอเตอร์ที่มีค่ารีดอกซ์สูงช่วยในการทำปฏิกิริยาจึงจะสามารถสลายพันธะ C-C ที่อยู่ในรูปพันธะอะลิฟาติกได้ เมดิเอเตอร์ที่พบได้ในธรรมชาติ เช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ซึ่งจะทำหน้าที่ดึงอิเล็กตรอนออกจากซับสเตรท เช่น ABTS, PAH หน่วยย่อยของลิกนินหรือสารอินทรีย์อื่น ๆ จากนั้นจะส่งอิเล็กตรอนต่อไปยังโมเลกุลคอปเปอร์ของแลคเคส ซึ่งจะปรีดิวิชันไดออกซิเจนและได้ผลิตภัณฑ์

สุดท้ายเป็นน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 2.7 การเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ออกซิโดสเมติเอเตอร์แตกต่างจากเอนไซม์ออกซิโดสสับสเตรต เนื่องจากเมติเอเตอร์ที่อยู่ในภาวะรีดิวซ์ ยังสามารถกลับมาหมุนเวียนในกระบวนการเร่งปฏิกิริยาได้อีก ความสามารถในการรับส่งอิเล็กตรอนของแลคเคสจะเปลี่ยนไปเมื่อค่าความเป็นกรด-เบสเปลี่ยนแปลง โดยปกติแลคเคสทำงานได้ดีในภาวะที่เป็นกรดและไม่มี chelating agent แลคเคสพบได้ในราหลายสายพันธุ์ เช่น *T. versicolor* *T. troglia* *P. ostreatus* *P. laevis* *L. edodes* *C. gallica* (Bogan และคณะ, 1996b; Bressler และคณะ, 2000; Colao และคณะ, 2003; Okamoto และคณะ, 2003; Zhao และคณะ, 2003; Kim และคณะ, 2004)

แลคเคสจากที่สร้างจากราแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือแลคเคสจากราคลาส Basidiomycetes และแลคเคสจากราคลาส Ascomycetes ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันและข้อมูลการจัดกลุ่มโดยแผนภูมิต้นไม้พบว่ามีความแตกต่างกัน (Hoegger และคณะ, 2006) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลคเคสในรามีความเหมือนกันค่อนข้างต่ำ ยกเว้นบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ไว้สูง (Salony และคณะ, 2008) รายงานของ Karahanian และคณะ (1998) พบว่ายีนแลคเคสของราไทรอธ *Ceriporiopsis subvermispora* ประกอบด้วย open reading frame (ORF) จำนวน 2215 คู่เบส ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 419 หมู่ มีอินทรอน 11 ตำแหน่ง ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือน 63-68% กับแลคเคสของราคลาส Basidiomycetes บริเวณเร่งปฏิกิริยาประกอบด้วยคอปเปอร์อยู่ตรงกลางและมีฮิสติดีน 10 หมู่ และซิสเทอีน 1 หมูล้อมรอบ เช่นเดียวกับราในคลาส Basidiomycetes สายพันธุ์อื่น ๆ Chen และคณะ (2004) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลคเคสจาก cDNA ของ *Volvariella volvacea* มี ORF จำนวน 1557 คู่เบส ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 519 โมเลกุล สำหรับยีนแลคเคสของ *Pleurotus ostreatus* ประกอบด้วย 2929 คู่เบสและมีอินทรอน 19 ตำแหน่ง และเมื่อตรวจสอบแลคเคสจาก cDNA พบว่ามี ORF จำนวน 1599 คู่เบส ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 533 โมเลกุล (Okamoto และคณะ, 2003)

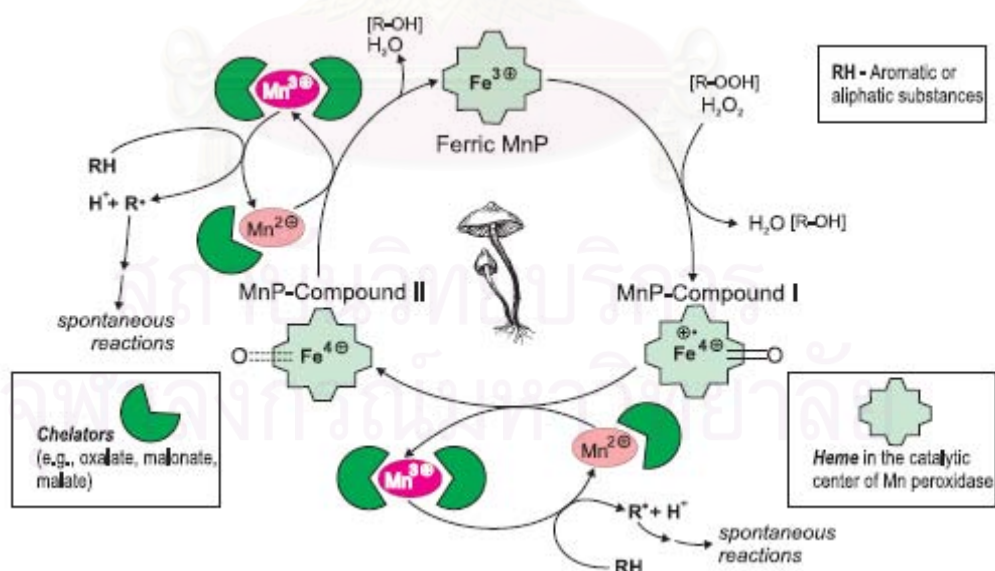
แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส

แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.13) โครงสร้างประกอบด้วยเฟอร์ริก ฮีม (ferric heme) พบได้ในราไทรอธหลายสายพันธุ์เช่นเดียวกับแลคเคส (Hatakka, 2001) แต่แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสสามารถออกซิโดสสารอินทรีย์ชนิด nonphenolics ที่มีค่าไอออนไนเซชันโพเทนเชียลสูงได้ ในขณะที่แลคเคสไม่สามารถออกซิโดสได้ (Cullen, 2002)



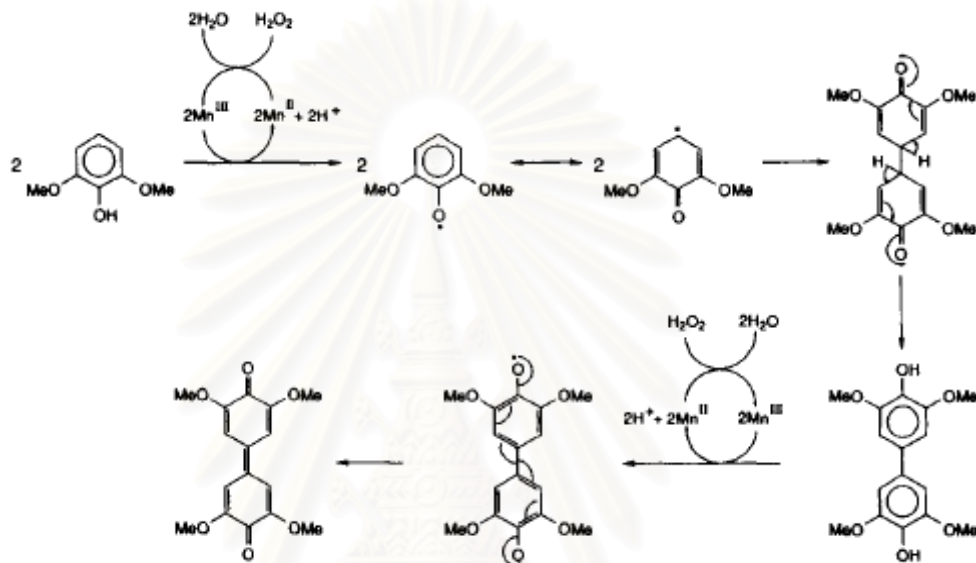
รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นโดยแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส

ปฏิกิริยาการออกซิเดชันสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นวงเบนซีนโดยแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (MnP) เกิดขึ้นโดยอาศัยอิเล็กตรอนของแมงกานีสอิสระช่วยในการรับส่งอิเล็กตรอน (เมดิเอเตอร์) และต้องการไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และแมงกานีสอิสระ (Mn^{2+}) ซึ่งได้มาจากกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ เช่น ออกซาเลตหรือมาโลเนต ช่วยในการทำปฏิกิริยา (Mester และ Tien, 2000) รูปที่ 2.7 และ 2.8 อธิบายปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เริ่มต้นโดยแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสในภาวะปกติถูกออกซิไดส์โดยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ทำให้อยู่ในรูป two-electron oxidized ferric enzyme หรือเรียกว่า MnP compound I ซึ่งถูกออกซิไดส์ด้วย 2 อิเล็กตรอน การที่จะกลับเข้าสู่สถานะเดิมได้ต้องปล่อยอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอนออกจาก oxidized ferric enzyme โดยส่งอิเล็กตรอนให้กับแมงกานีสอิสระ Mn^{2+} ครั้งละ 1 อิเล็กตรอน หลังจากให้อิเล็กตรอนแล้ว MnP compound I จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ MnP compound II ซึ่งถูกออกซิไดส์ด้วย 1 อิเล็กตรอน เมื่อแมงกานีสอิสระ Mn^{2+} ได้รับอิเล็กตรอนจะเปลี่ยนสภาพเป็น Mn^{3+} ซึ่งอยู่ในสภาพออกไซด์ จากนั้น Mn^{3+} จะส่งอิเล็กตรอนให้กับสารอื่น เช่น หมูฟีนอล ทำให้สารนั้นเกิดการออกซิไดส์ในที่สุด (Cullen, 2002) สำหรับ MnP compound II จะให้อิเล็กตรอนกับ Mn^{2+} โมเลกุลใหม่และกลับไปอยู่ภาวะปกติ สำหรับ Mn^{3+} ที่เกิดขึ้นมีความสามารถในการออกซิไดส์สารอินทรีย์ที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ เช่น ลิกนิน PAH กรดคาร์บอกซิลิก ไรออลหรือกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (Steffen และคณะ, 2003) ปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้เกิดขึ้นบริเวณพื้นระของวงแหวนอะโรแมติกที่เชื่อมกับ C_{α} (Wariishi และคณะ, 1991; Tuor และคณะ, 1992) แต่ไม่สามารถออกซิไดส์หน่วยย่อยที่ไม่มีหมูฟีนอลหรือสารอินทรีย์ที่มีค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลน้อยกว่า 1.12 V/SCE ได้ เอนไซม์นี้ทำงานได้ดีในภาวะที่เป็นกรดเช่นเดียวกับแลคเคส (Matsubara และคณะ, 1996)



รูปที่ 2.9 การเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (Steffen และคณะ, 2003)

ในการวัดแอกติวิตีของแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสด้วย 2,6-ไดเมธอกซิลฟีโนล (2,6-DMP) ในภาวะที่มีมาโลเนตบัพเฟอร์และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ปฏิกริยาการออกซิไดส์ 2,6-DMP ที่เกิดขึ้นคล้ายกับการออกซิไดส์ลิกนินและ PAH โดย 2,6-DMP จำนวน 2 โมเลกุลจะถูกออกซิไดส์ด้วย Mn^{3+} ที่รับอิเล็กตรอนมาจาก MnP ที่ถูกออกซิไดส์โดยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ จากนั้น 2,6-DMP ที่ถูกออกซิไดส์จำนวน 2 โมเลกุลจะสร้างพันธะเชื่อมกันเกิดเป็นไดเมอร์ เมื่อไดเมอร์นี้ถูกออกซิไดส์อีกครั้งด้วย Mn^{3+} ทำให้กลายเป็นควิโนนไดเมอร์ในที่สุด (Wariishi และคณะ, 1992) ปฏิกริยาที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.10



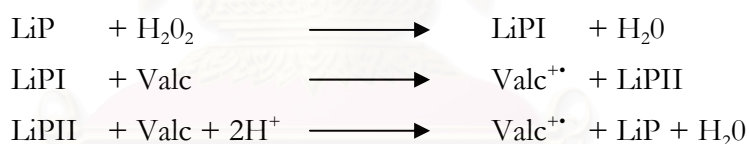
รูปที่ 2.10 ปฏิกริยาการสลาย 2,6 DMP โดยแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (Wariishi และคณะ, 1992)

แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสพบได้ในราหลายสายพันธุ์เช่น *Stropharia rugosoannulata* *P. eryngii* *P. ostreatus* *Phlebia radiata* *B. adusta* *T. versicolor* และ *P. chrysosporium* (Ruiz-Duenas และคณะ, 1999; Steffen และคณะ, 2002; Kamitsuji และคณะ, 2004; Kim และคณะ, 2004; Martinez และคณะ, 2004; Mohorcic และคณะ, 2004; Hildén และคณะ, 2005)

ลำดับกรดอะมิโนของแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสของราในคลาส Basidiomycetes มีความแตกต่างกันเช่นเดียวกับยีนแลคเคส หรือแม้กระทั่งในจีโนมเดียวกันยังมีความแตกต่างกัน ดังรายงานของ Maijala และคณะ (2003) พบว่าลำดับกรดอะมิโนของแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสของ *Heterobasidion* จำนวน 47 ไอโซเลตแตกต่างกันถึง 131-132 ตำแหน่ง สำหรับแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสจาก *C. versicolor* ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 1098 คู่เบส และบริเวณเร่งปฏิกริยามีอาร์จินีนและฮีสตีดีนเป็นส่วนประกอบ (Iimura และคณะ, 2002)

ลิกนินเพอร์ออกซิเดส

ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.14) โครงสร้างประกอบด้วยเฟอร์ริกฮีม (heme-containing peroxidases) เช่นเดียวกับแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส เอนไซม์นี้พบครั้งแรกในการสลายพันธะระหว่าง $C_\alpha - C_\beta$ ในแบบจำลองลิกนิน ด้วย *P. chrysosporium* (Cullen, 2002) เอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันสารประกอบที่ไม่มีหมู่ฟีนอลิกทำให้เกิดอนุมูลแคตไอออนซึ่งจะไปออกซิไดส์สารอื่น ๆ ต่อไป (Conesa และคณะ, 2002; Martínez, 2002) ลิกนินเพอร์ออกซิเดสมีค่าออกซิเดชันโพเทนเชียลที่สูงกว่าเพอร์ออกซิเดสชนิดอื่น คือ $-1.35V$ ในขณะที่เพอร์ออกซิเดสชนิดอื่นมีค่าออกซิเดชันโพเทนเชียลประมาณ $-0.8V$ จึงเป็นตัวออกซิไดส์ที่ดี (Guillen และ Evans, 1994; Aust, 1995) ลิกนินเพอร์ออกซิเดสสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้หลายตำแหน่ง เช่นบริเวณ $C_\alpha - C_\beta$ บริเวณสายข้างของลิกนิน เร่งปฏิกิริยาของเบนซิลแอลกอฮอล์ไปเป็นแอลดีไฮด์หรือคีโตน ฟีนอลออกซิเดชันเปิดวงแหวนอะโรมาติกและยังสามารถออกซิไดส์โครงสร้างที่ไม่ได้เป็นวงแหวน เช่น พันธะระหว่างคาร์บอนเชื่อมกับคาร์บอน (C-C) หรือพันธะที่เชื่อมระหว่างคาร์บอนออกซิเจนคาร์บอน (C-O-C) (Tien และ Kirk, 1988; Hammel, 1995; Martinez และคณะ, 2005) การเร่งปฏิกิริยาของลิกนินเพอร์ออกซิเดส คล้ายกับแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส แตกต่างกันตรงที่ลิกนินเพอร์ออกซิเดสจะใช้เวราทริลแอลกอฮอล์เป็นเมดิเอเตอร์ ส่วนแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสใช้แมงกานีสอิสระ (Mn^{2+}) เป็นเมดิเอเตอร์ (Evans และ Hedger, 2001)

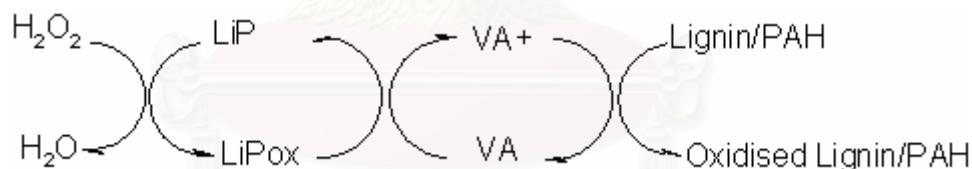


รูปที่ 2.11 สมการออกซิเดชันที่เกิดขึ้นโดยลิกนินเพอร์ออกซิเดส (Schoemaker และ Piontek, 1996)

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิกนินเพอร์ออกซิเดสเกิดขึ้นโดยรูปเฟอร์ริก (ferric form) ของเอนไซม์ที่อยู่ในภาวะ resting enzyme ถูกออกซิไดส์โดยอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอนจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นบริเวณรูปเฟอร์ริกของลิกนินเพอร์ออกซิเดส ส่งผลให้ลิกนินเพอร์ออกซิเดสอยู่ในภาวะออกซิไดส์ด้วย 2 อิเล็กตรอน (two-electron oxidized ferric enzyme) เกิดเป็น oxyferryl center และอนุมูลแคตไอออนพอร์ไฟริน (porphyrin cation radical) หรือเรียกว่า LiP compound 1 (LiP1) จากนั้น LiP1 จะส่งอิเล็กตรอนจำนวน 1 อิเล็กตรอนให้กับสารที่มีค่ารีดักชันโพเทนเชียลที่เหมาะสม คือเวราทริลแอลกอฮอล์ หลังจากนั้นลิกนินเพอร์ออกซิเดสที่อยู่ในภาวะออกซิไดส์ 1 อิเล็กตรอนหรือเรียกว่า LiP compound 2 (LiP2) จะส่งอิเล็กตรอนต่อให้กับเวราทริลแอลกอฮอล์โมเลกุลใหม่ หรืออาจจะส่งอิเล็กตรอนให้กับสารอินทรีย์โดยตรง หลังจากนั้น LiP2 จะกลับไปสู่ภาวะ resting enzyme เช่นเดิม โดยปกติ

แล้วคาร์ดิคชันโพเทนเชียลของ LiP2 จะต่ำกว่า LiP1 (Cullen, 2002) สำหรับเวราทริล แอลกอฮอล์ หลังจากได้รับอิเล็กตรอนจาก LiP1 ทำให้อยู่ในภาวะออกซิเดชันเป็น Valc⁺ ซึ่งมีความสามารถสูงในการออกซิไดส์ Valc⁺ จะส่งอิเล็กตรอนต่อให้กับสารอินทรีย์ทำให้สารที่ได้รับอิเล็กตรอนอยู่ในสถานะออกซิเดชัน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง สารอินทรีย์ที่รับอิเล็กตรอนจาก Valc⁺ เช่น C_α-C_β บริเวณสายข้างของลิกนิน (Cullen, 2002) ปกติแล้วเวราทริลแอลกอฮอล์จะถูกผลิตและหลั่งออกมานอกเซลล์โดยพบเป็นเมแทบอลิต์ทุติยภูมิของราหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตลิกนินเพอร้ออกซิเดสซึ่งอาจจะถูกผลิตออกมาเพื่อป้องกันลิกนินเพอร้ออกซิเดสเสียหายจากปริมาณไฮโดรเจนเพอร้ออกไซด์ที่มากเกินไป (Evans และ Hedger, 2001)

ลิกนินเพอร้ออกซิเดสสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันสารอินทรีย์หลายชนิดโดยกระบวนการรับส่งอิเล็กตรอนผ่านเวราทริลแอลกอฮอล์ เมื่อลิกนินเพอร้ออกซิเดสรับอิเล็กตรอนมาจากไฮโดรเจนเพอร้ออกไซด์ และเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในภาวะออกซิไดส์ จากนั้นจะส่งอิเล็กตรอนผ่านเวราทริลแอลกอฮอล์ เมื่อเวราทริลแอลกอฮอล์ได้รับอิเล็กตรอนจะอยู่ในภาวะออกซิไดส์เป็นอนุโมลที่มีความสามารถในการออกซิไดส์สูง สามารถไปออกซิไดส์สารอินทรีย์ทำให้สารอินทรีย์เปลี่ยนโครงสร้าง เช่น ถูกดึงเอาหมู่คาร์บอกซิลออก เป็นต้น หรือบางครั้งสารอินทรีย์บางชนิดอาจถูกรีดิวซ์มาก่อน จึงต้องใช้เอนไซม์หรือสารที่มีค่าออกซิเดชันโพเทนเชียลสูงจึงจะสามารถออกซิไดส์สารเหล่านั้นได้ กระบวนการเหล่านี้จะนำไปสู่การสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralize) คือได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นโดยลิกนินเพอร้ออกซิเดส

(ที่มา www.world-of-fungi.org/Mostly_Mycology/Lucy_Goodeve-Docker_bioremediation_website/whiterotfungi)

ลิกนินเพอร้ออกซิเดสพบได้ในราหลายสายพันธุ์ เช่น *P. chrysosporium* *P. eryngii* *B. adusta* *T. versicolor* (Gold และ Alic, 1993; Ruiz-Duenas และคณะ, 1999; Steffen และคณะ, 2002; Kim และคณะ, 2004; Martinez และคณะ, 2004; Mohorcic และคณะ, 2004; Asamudo และคณะ, 2005; Wymelenberg และคณะ, 2006) ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบสต่ำมาก (ประมาณ 2.5) ในภาวะที่ไม่มี chelating agent เช่นเดียวกับแมงกานีสเพอร้ออกซิเดสและเสถียรในภาวะที่เป็นกรด (Tien และ Kirk, 1988; Gold และ Alic, 1993) แอคติวิตีของลิกนินเพอร้ออกซิเดสสามารถตรวจสอบได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

จากการออกซิไดส์เวราทรอัลแอลกอฮอล์ซึ่งใช้เป็นซับสเตรทได้ผลิตภัณฑ์เป็นเวราทรอัลดีไฮด์ (veratraldehyde) ในภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Tien และ Kirk, 1988)

มีรายงานว่าลิกนินเพอร์ออกซิเดสเป็นไอโซไซม์ ใน *P. chrysosporium* มีกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของลิกนินเพอร์ออกซิเดสอย่างน้อย 10 ยีนคือ *lipA* ถึง *lipJ* และมีกลไกการแสดงออกที่ซับซ้อน (Bogan และคณะ, 1996b)

จะเห็นได้ว่าการทำงานของแลคเคส ลิกนินเพอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส มีความสามารถในการออกซิไดส์สารที่ต่างกัน ดังสรุปในตารางที่ 2.3 อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดต้องอาศัยเมดิเอเตอร์ คือไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ช่วยในการทำงาน ในราไวท์รอตที่มีเอนไซม์ที่ช่วยในการผลิตและหลั่งไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ออกมาออกเซลล์ (H_2O_2 -producing enzymes) หลายชนิด เช่น ไกลออกซอลออกซิเดส (glyoxal oxidase) กลูโคสออกซิเดส เวราทรอัลแอลกอฮอล์ออกซิเดส หรือเมทานอลออกซิเดส (Lankinen, 2004)

ตารางที่ 2.3 สรุปการทำงานของเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน (ดัดแปลงจาก Lankinen, 2004)

เอนไซม์	ชนิดของเอนไซม์	โคแฟกเตอร์	เมดิเอเตอร์	ปฏิกิริยา
LiP	เพอร์ออกซิเดส	ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	เวราทรอัลแอลกอฮอล์	วงแหวนแอโรแมติกถูกออกซิไดส์เป็นอนุมูลแคตไอออนและสามารถย่อยสลายหน่วยย่อยที่ไม่มีหมู่ฟีนอลิก
MnP	เพอร์ออกซิเดส	ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	แมงกานีส	Mn^{2+} ถูกออกซิไดส์เป็น Mn^{3+} Mn^{2+} ไปออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลิกให้เป็นอนุมูลฟีนอกซิล
แลคเคส	ฟีนอลออกซิเดส	ออกซิเจน	ไฮดรอกซิลเบนโซไทโรอะโซนหรือ ABTS	ฟีนอลถูกออกซิไดส์ไปเป็นอนุมูลฟีนอกซิลและออกซิไดส์สารที่ไม่มีหมู่ฟีนอลเมื่อเกิดปฏิกิริยาร่วมกับเมดิเอเตอร์บางชนิด

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าราไวท์รอตสามารถผลิตแลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และลิกนินเพอร์ออกซิเดสได้ดีในภาวะที่มีสารอาหารจำกัดโดยเฉพาะไนโตรเจน โดยปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ชักนำให้สร้างเอนไซม์มีอัตราส่วน 200:1 ถึง 1000:1 เช่นเดียวกับอัตราส่วนกับคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่พบในเนื้อไม้ (Swift, 1982; Leatham และคณะ, 1991; Aust และคณะ, 2003; Mansur และคณะ, 2003)

การใช้รากลุ่มไทรอทในการบำบัด PAH

จากที่ได้กล่าวมาเบื้องต้นว่าราไทรอทมีความสามารถในการผลิตแลคเคส แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส และลิกนินเพอร์ออกซิเดส ที่สามารถสลายสารที่มีโครงสร้างลักษณะเป็นวงเบนซีน จึงได้มีผู้วิจัยศึกษาความสามารถของราไทรอทในการสลาย PAH เช่น

Tekere และคณะ (2007) ศึกษาความสามารถของราไทรอทที่ตรึงไว้ใน packed bed ในการย่อยสลาย PAH พบว่าราไทรอทไอโซเลต DSPM95 ที่ตรึงไว้ใน pack bed ในถังหมัก สามารถย่อยสลายฟลูออรีน, พีแนนทริน, แอนทราซีน, ไพรีนและ เบนโซ[เอ]แอนทราซีน ความเข้มข้น 1 มก.ต่อลิตร ได้ถึง 50-96% ในระยะเวลา 31 วัน และตรวจพบแอกติวิตีของแลคเคสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสในระหว่างการสลาย PAH และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนจำกัด ไม่สามารถทำให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น

Valentin และคณะ (2006) คัดแยกรากลุ่มไทรอทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินโดยทดสอบการเปลี่ยนสีกลุ่มแอนทราควิโนน เช่น Poly R-487 เพื่อประยุกต์ใช้ในการย่อยสลาย PAH พบว่า *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus* และ *Lentinus tigrinus* มีความสามารถสูงในการย่อย PAH ที่ปนเปื้อนในดินที่มีความเค็มและดินที่ไม่มี ความเค็ม และพบว่าความเค็มในระดับเทียบเท่ากับน้ำทะเลมีผลเล็กน้อยต่อการสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินของ *I. lacteus* และ *L. tigrinus* ในขณะที่เอนไซม์จาก *B. adusta* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ความเค็ม 32% และเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถสลาย PAH ความเข้มข้น น้อยกว่า 10 มก.ต่อลิตรได้

Villemain และคณะ (2006) พบว่า *Absidia fusca* ที่แยกมาจากพื้นที่ปนเปื้อนยาฆ่าแมลง สามารถสลาย PAH ได้หลายชนิด *A. fusca* ที่แยกมาจากพื้นที่ปนเปื้อน สามารถในการสลายแอนทราซีนได้ 90% ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความสามารถสูงกว่า *A. fusca* ที่แยกมาจากพื้นที่ที่ไม่มีการปนเปื้อน ซึ่งสามารถสลายได้เพียง 45% ภายในระยะเวลาเท่ากัน แต่ความสามารถในการสลายฟลูออแรนทรินของทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกันมากนักคือ เชื้อที่แยกมาจากพื้นที่ปนเปื้อนสลายฟลูออแรนทรินได้ 94% ในขณะที่เชื้อที่แยกมาจากพื้นที่ไม่ปนเปื้อนสลายได้ 89% จึงอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีกลไกในการสลาย PAH ที่แตกต่างกัน

Clemente และคณะ (2001) คัดแยกรากที่สร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินเพื่อใช้ในการย่อยสลาย PAH โดยเติม PAH ที่ต้องการทดสอบลงไปในวันแรกหรือวันที่ 3 ของการทดสอบ จากนั้นคัดเลือกราโดยพิจารณาจากความสามารถในการสลาย PAH ได้เร็วและการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน พบว่าราไอโซเลต 984 สามารถย่อยสลายแนพธาซีนได้สูงที่สุดคือ 69% และพบว่าการผลิตแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสในระหว่างการสลายแนพธาซีน รองลงมาคือสายพันธุ์ 870 ย่อยแนพธาซีนได้ 17% ซึ่งมีการผลิตลิกนินเพอร์ออกซิเดสและแลคเคสในระหว่างการสลายแนพธาซีน ราไอโซเลต 870 มีความสามารถในการสลายพีแนนทรินมากที่สุดคือ 12% และพบว่า

มีการผลิตแมงกานีสเพอร์ออกไซด์และแลคเคส สำหรับราที่มีความสามารถในการสลาย แอนทราซีนได้ดีที่สุดถึง 65% คือราไอโซเลต 710 จะเห็นได้ว่าเชื้อทุกสายพันธุ์มีการผลิตเอนไซม์ กลุ่มย่อยสลายลิกนินเพื่อใช้ในการย่อยสลาย PAH

Han และคณะ (2004) ศึกษาการย่อยสลายฟีนแธทรินโดย *Trametes versicolor* 951022 พบว่าไวทอร์ทสายพันธุ์นี้สามารถสลายฟีนแธทรินความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ได้ 46% ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 6 และเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 30°C ความเข้มข้นของฟีนแธทรินมีผลต่อความสามารถในการย่อยของ *T. versicolor* โดยเชื้อสามารถย่อยฟีนแธทรินความเข้มข้น 10 มก.ต่อลิตรได้ดีที่สุดโดยฟีนแธทรินลดลง 76.7% และมีอัตราการย่อยสูงสุด 0.82 มก.ต่อชั่วโมงเมื่อใช้ฟีนแธทรินเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เมื่อนำ แลคเคสที่ผลิตจาก *T. versicolor* 951022 มาทำให้บริสุทธิ์มาใช้ในการสลายฟีนแธทริน พบว่า แลคเคสบริสุทธิ์ไม่สามารถสลายฟีนแธทรินได้ แต่เมื่อเติม ABTS หรือ 1-ไฮดรอกซีเบนโซ ไทระโซล (HBT) ลงในหลอดปฏิกิริยา พบว่าแลคเคสบริสุทธิ์สามารถย่อยสลายฟีนแธทรินได้ 40% และ 30% ตามลำดับ

Steffen และคณะ (2003) พบว่า *S. coronilla* สามารถย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนที่อยู่ใน อาหารเหลว basal medium ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ได้อย่างสมบูรณ์ (mineralized) การเติมแมงกานีสความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ลงใน basal medium สามารถ ชักนำให้เกิดการย่อยและการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralized) เบนโซ[เอ]ไพรีนสูงกว่าใน basal medium สูตรปกติถึง 4 และ 12 เท่าตามลำดับ และยังมีผลทำให้เชื้อผลิตแมงกานีสเพอร์ ออกไซด์เพิ่มขึ้นด้วย สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนโดย *S. coronilla* คือ เบนโซ[เอ]ไพรีน-1,6-ควิโนน ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงแรกของการย่อยสลายและหายไปเมื่อระยะเวลา การย่อยเพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนของเอนไซม์หยาบ จาก *S. coronilla* และแมงกานีสเพอร์ออกไซด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีความสามารถในการ ย่อยเบนโซ[เอ]ไพรีนที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรได้ โดยต้องเติม Tween 80 เพื่อช่วยใน การย่อยสลาย นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทดลองใช้แมงกานีสเพอร์ออกไซด์ จาก *S. coronilla* ที่ ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในการสลาย PAH แบบผสม 16 ชนิด (ตามรายการที่ US-EPA กำหนดให้ มี การติดตามอย่างใกล้ชิด) ความเข้มข้น PAH รวม 320 มก.ต่อลิตรและเติม Tween 80 ลงใน หลอดปฏิกิริยา พบว่าความเข้มข้นของ PAH แต่ละชนิดลดลง 10-100%

Garon และคณะ (2004) แยกราไวทอร์ท 47 สายพันธุ์ จากพื้นที่ปนเปื้อนฟลูออรีนและ พบว่า *Absidia cylindrospora* มีความสามารถในการสลายฟลูออรีนมากที่สุดและมี ประสิทธิภาพในการย่อยมากกว่า *A. cylindrospora* ที่แยกมาจากพื้นที่ที่ไม่มีการปนเปื้อน จากนั้นได้ศึกษาผลของการเติมมอลโทซิล-ไซโคลเดกซ์ทริน ซึ่งเป็นไซโคลเดกซ์ทรินชนิดที่มี ก้านเพื่อเร่งกระบวนการสลายฟลูออรีนโดย *A. cylindrospora* ในดินสเลอรี พบว่าฟลูออรีนถูก

ย่อย 90% ใน 288 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม *A. cylindrospora* และมอลโทซิล-ไฮโคลเดกซ์ทรินใช้เวลา 576 ชั่วโมง

Mollea และคณะ (2005) เปรียบเทียบความสามารถของรา 2 สายพันธุ์ในการย่อยสลายแนพธาลินความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตรที่ปนเปื้อนในดิน ราที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ *P. chrysosporium* ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินกับ *T. harzianum* ที่ตัดแยกมาจากดินปนเปื้อน PAH แต่เป็นราที่ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน (non-ligninolytic fungi) ผลการทดลองพบว่า *T. harzianum* ไม่สามารถย่อยสลายแนพธาลินในขณะที่ *P. chrysosporium* ย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วในภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด

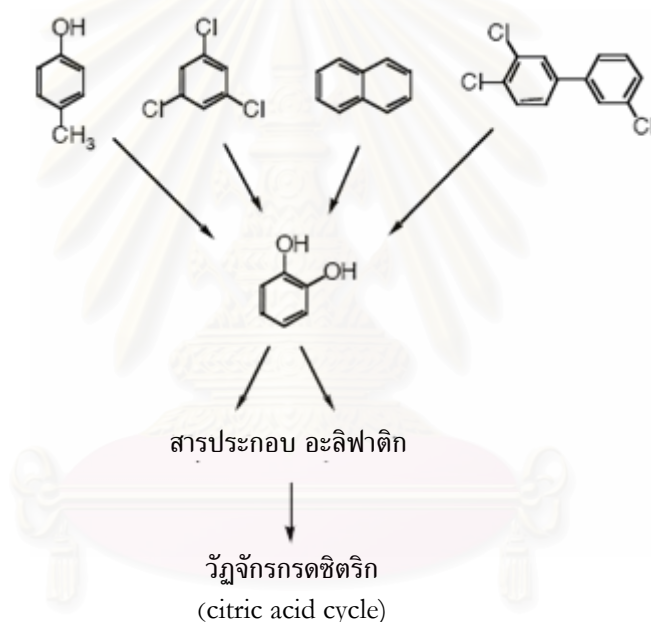
Zheng และ Obbard (2002) ศึกษาความสามารถของ *P. chrysosporium* ในการสลาย PAH ที่ปนเปื้อนในดินโดยใช้สารลดแรงตึงผิวเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ โดยเติม PAH ชนิดต่างๆลงในตัวอย่างดิน จากนั้นบ่มไว้นาน 11 เดือน PAH ที่ใช้ในการทดลองมีทั้งชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ได้แก่ อะซิแนพธิน ฟลูออรีน พีแนนทริน ฟลูออแรนทริน และไพรีน สำหรับ PAH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ ไครซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน ไดเบนโซ[เอ,เอช]แอนทราซีน เบนโซ[เอ,เอช,ไอ]ไพรีน หลังจาก 11 เดือนพบว่า PAH ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเหลืออยู่ในดิน 86% ในขณะที่ PAH ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเหลือเพียง 19% จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ปนเปื้อน PAH บำบัดโดยวิธีการ soil washing ในถังหมักที่มีการเติม *P. chrysosporium* และสารลดแรงตึงผิว พบว่า PAH ลดลงกว่า 90% เมื่อทดสอบการย่อยแบบ batch operation และลดลง 76% เมื่อทดสอบด้วยระบบต่อเนื่อง

Sasek และคณะ(2003) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อนคราบน้ำมันโดยใช้ราไวท์รอก 2 สายพันธุ์ คือ *Irpex lacteus* และ/หรือ *P. ostreatus* ร่วมกับ *Pseudomonas putida* ภายหลังจากบำบัด 10 สัปดาห์พบว่าปริมาณพีแนนทริน แอนทราซีน ฟลูออแรนทรินและไพรีน ลดลง 66% โดยที่ *P. putida* ช่วยในการบำบัด PAH เพียงเล็กน้อย พื้นที่หลังการบำบัดไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่บริเวณนั้น (ในการทดลองใช้ *Daphnia magna* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตในคลาส crustacean) แต่มีผลต่อการงอกของเมล็ด *Brassica alba* ต่อเนื่องนาน 5 สัปดาห์ภายหลังจากการบำบัด

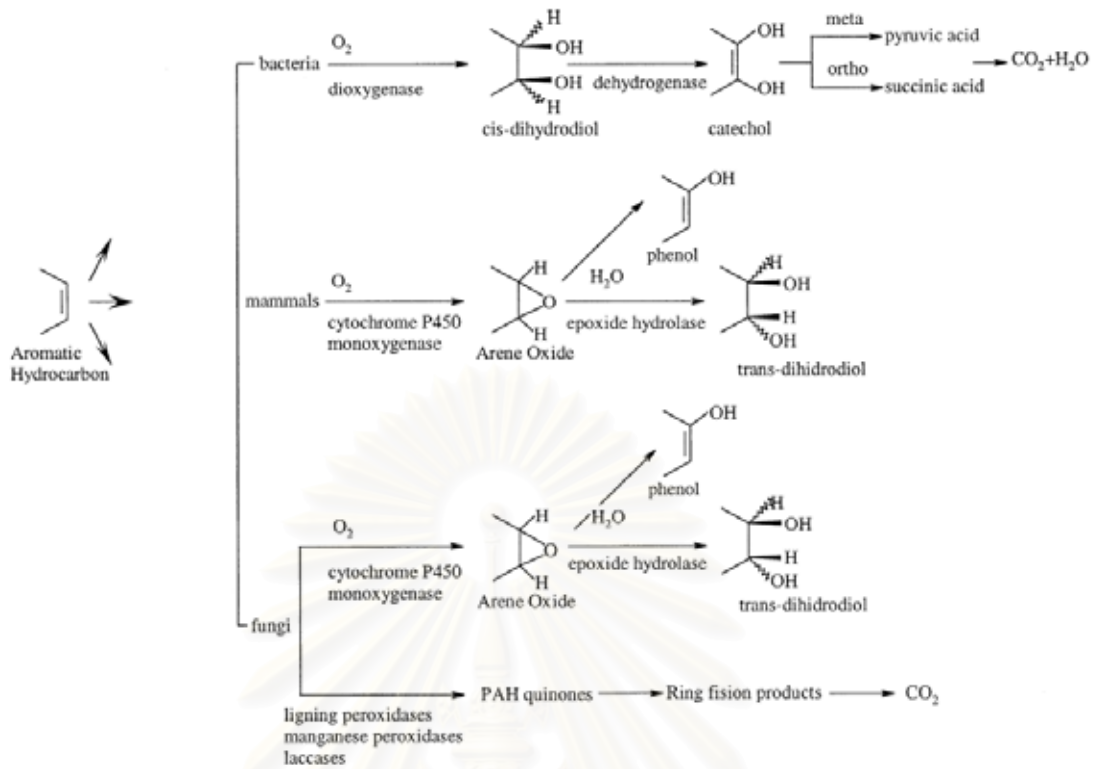
นอกจากนี้ยังมีรายงานความสามารถของรากลุ่มอื่นๆที่ไม่ใช่ไวท์รอกในการย่อยสลาย PAH เช่น *Fusarium* sp. E033 สามารถอยู่รอดในภาวะที่มีเบนโซ[เอ]ไพรีน ความเข้มข้นสูงถึง 300 มก.ต่อลิตร และสามารถย่อยเบนโซ[เอ]ไพรีนเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรได้ 63-70% ในระยะเวลา 30 วัน และพบว่ามีสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นคือ ไดไฮดรอกซี ไดไฮโดร-เบนโซ[เอ]ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน-ควิโนน และพบว่าการเติมอากาศช่วยในประสิทธิภาพการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนเกิดได้ดีขึ้น ความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้นจาก 5 มิลลิโมลาร์ เป็น 50 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลต่อการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน การเติมเอทานอลและเมทานอลความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

ทำให้เบนโซ[เอ]ไพรีนละลายน้ำได้มากขึ้นและช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ แต่ไม่มีผลต่อการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน (Chulalaksananukul และคณะ, 2006)

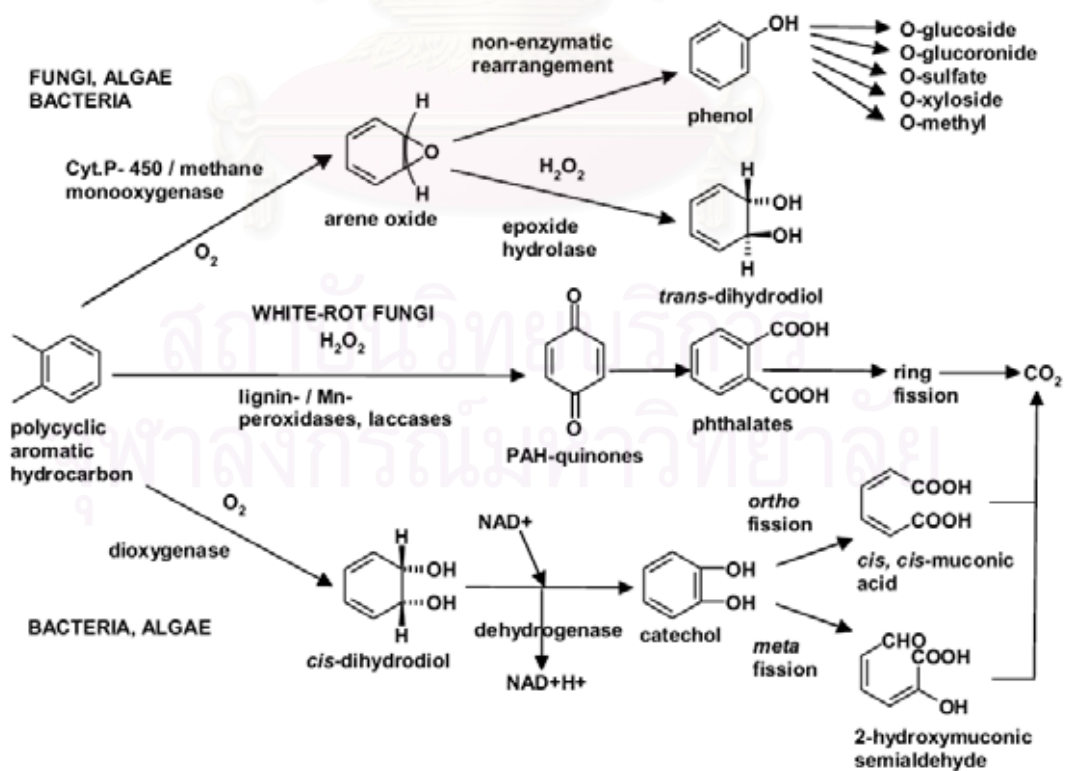
จากหลายรายงานที่กล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินมีบทบาทสำคัญในการบำบัด PAH ที่ปนเปื้อนในพื้นที่ต่าง ๆ เนื่องจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของเอนไซม์แต่ละชนิด รวมถึงโครงสร้างของ PAH ที่แตกต่างกัน ทำให้วิถีการย่อยสลาย PAH โดยราแต่ละชนิดและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจึงมีความแตกต่างกันทั่วไป รูปที่ 2.13 แสดงรูปแบบทั่วไปของการสลาย PAH โดยจุลินทรีย์ แสดงให้เห็นว่า PAH จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในลักษณะที่มีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 2 ตำแหน่งก่อนที่วงเบนซีนจะถูกเปิด (Pieper และ Reineke, 2000) การที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโครงสร้างทำให้เอนไซม์สามารถเข้ามาจับได้ง่ายขึ้นหรือมีโอกาสเกิดปฏิกิริยาอื่น ๆ ที่เป็นจุดเริ่มกระบวนการย่อยสลายดังตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 2.13-2.15



รูปที่ 2.13 รูปแบบทั่วไปของการสลาย PAH แบบใช้อากาศ (ดัดแปลงจาก Nordin, 2004)



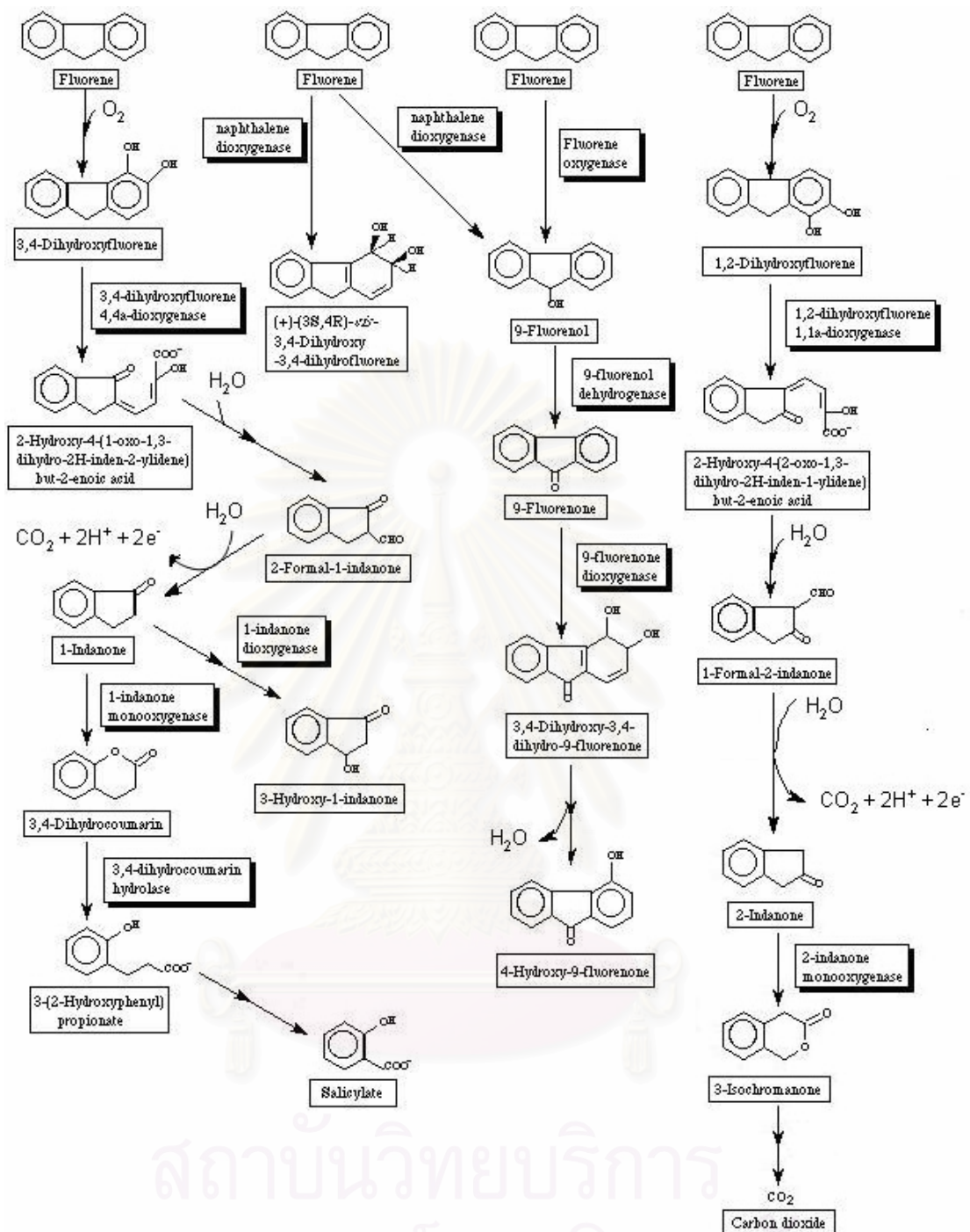
รูปที่ 2.14 วิธีการย่อยสลาย PAH โดยแบคทีเรีย สัตว์และรา (ที่มา Antizar-Ladislao และคณะ, 2006)



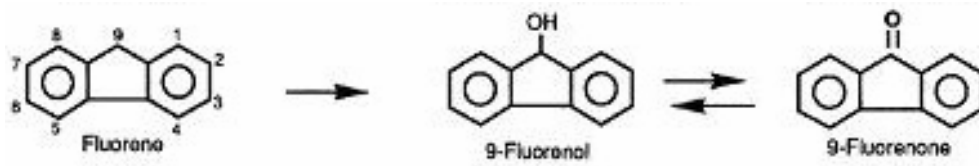
รูปที่ 2.15 วิธีการย่อยสลาย PAH โดยจุลินทรีย์ (Steffen และคณะ, 2003)

จากรูปที่ 2.15 จะเห็นได้ว่าราแต่ละสายพันธุ์มีวิธีการย่อยสลาย PAH ที่แตกต่างกัน เช่น ใช้กระบวนการออกซิเดชันในการย่อยสลาย PAH ราไวท์รอตซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินได้ จะใช้แลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส ลิกนินเพอร์ออกซิเดส ช่วยในกระบวนการย่อยสลาย PAH โดยใช้เอนไซม์ชนิดใดนั้น ขึ้นกับความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของราไวท์รอตแต่ละสายพันธุ์และยังขึ้นกับชนิดของ PAH ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าราไวท์รอตบางชนิดใช้ทั้งการออกซิเดชัน cytochrome P-450 monooxygenase ร่วมกับการทำงานของเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินในการย่อยสลาย PAH (Pothuluri และคณะ, 1993) cytochrome P-450 monooxygenase สลาย PAH โดยเติมอะตอมของออกซิเจนที่โมเลกุลของ PAH (ออกซิไดส์) เกิดเป็นอะรีนออกไซด์ซึ่งเป็นสารไม่เสถียร สามารถถูกจัดเรียงโครงสร้างใหม่ (rearrangement) โดยกระบวนการที่ไม่ใช้เอนไซม์ อะรีนออกไซด์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นฟีนอล ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซ์ต่อ เกิดเป็นสารกลุ่ม *trans*-dihydrodiols (Antizar-Ladislao และคณะ, 2004) สำหรับแบคทีเรียและสาหร่ายใช้เอนไซม์กลุ่มไดออกซีจีเนส ซึ่งออกซิไดส์ PAH แล้วเกิดเป็น *cis*-dihydrodiols ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาการขจัดน้ำ (dehydration) เกิดเป็นไดไฮดรอกซิล-PAH ซึ่งสามารถถูกเปิดวงแหวนและถูกย่อยสลายต่อด้วยวิธีการย่อยสลายสารอินทรีย์ เช่น ซัคซินิค ไพรูวิก ฟูมาริก ซึ่งนำไปสู่การสลายอย่างสมบูรณ์คือได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (Wilson และ Jones, 1993)

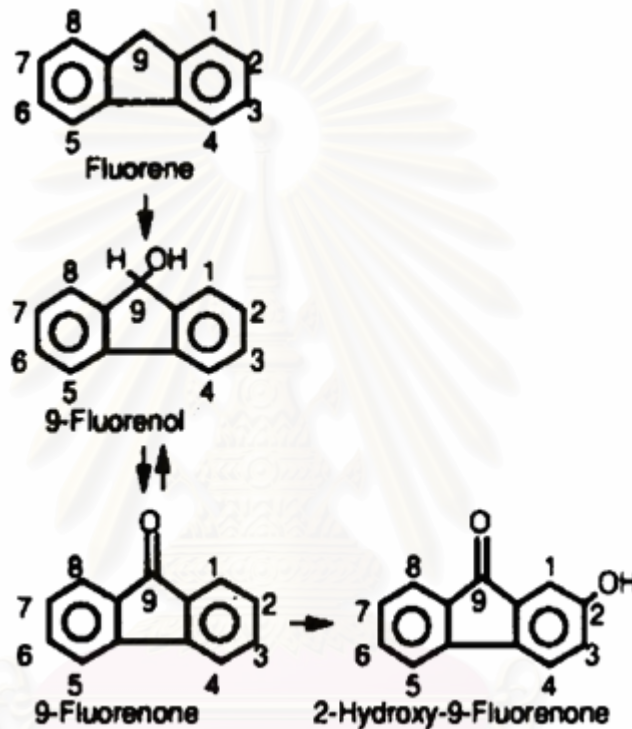
กระบวนการในการย่อยสลายของราที่แตกต่างกันนี้ ทำให้สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายแตกต่างกัน ดังแสดงตัวอย่างวิธีการย่อยสลายฟลูออรีนและสารมัธยันตร์ชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นไว้ในรูปที่ 2.16-2.18



รูปที่ 2.16 วิธีการเมแทบอลิซึมฟลูออรีนโดยจุลินทรีย์
(ที่มา http://umbbd.msi.umn.edu/flu/flu_image_map2.html)



รูปที่ 2.17 กระบวนการออกซิเดชันฟลูออรีนโดยรากลุ่มไวท์รอต เช่น *P. ostreatus* (ที่มา Bezalel และคณะ, 1996; Cerniglia, 1997)



รูปที่ 2.18 วิธีการเมแทบอลิซึมฟลูออรีนโดย *Cunninghamella elegans*
(รากลุ่ม non-ligninolytic fungi) (ที่มา Pothuluri และคณะ, 1993)

จากรูปที่ 2.16-2.18 จะเห็นว่าราแต่ละสายพันธุ์มีวิธีการย่อยสลายฟลูออรีนที่แตกต่างกัน และได้สารมัธยันตร์ที่แตกต่างกันไปในแต่ละขั้นตอนของการย่อยสลาย โดยสารมัธยันตร์สำคัญที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายฟลูออรีนจากราหลายชนิด คือ 9-ฟลูออรีนอล และ 9-ฟลูออรีโนน (Garon และคณะ, 2000) ตัวอย่างเช่น การย่อยสลายฟลูออรีนโดย *P. ostreatus* ได้สารมัธยันตร์คือ 9-ฟลูออรีนอล ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น 9-ฟลูออรีโนน สำหรับการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *C. elegans* ได้สารมัธยันตร์คือ 9-ฟลูออรีนอลซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น 9-ฟลูออรีโนนและ 2-ไฮดรอกซิล-9-ฟลูออรีโนน และในกระบวนการย่อยสลายฟลูออรีนโดยราทั้ง 2 สายพันธุ์จะเห็นว่า 9-ฟลูออรีโนนก็สามารถเกิดปฏิกิริยาและถูกเปลี่ยนกลับมาเป็น 9-ฟลูออรีนอลได้เช่นกัน หรืออาจเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนไปเป็นสารมัธยันตร์ชนิดอื่น ๆ ต่อไป

Bogan และคณะ (1996a,b) ได้รายงานการย่อยสลายฟลูออรีนด้วย *P. chrysosporium* ความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร โดยเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส พบว่า ปริมาณฟลูออรีนลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 30 มก.ต่อลิตร ใน 6 วันแรกของการทดลอง หลังจากนั้นฟลูออรีนลดลงอย่างต่อเนื่อง และพบสารมัธยันตร์คือ 9-ฟลูออรีโนนเป็นสารมัธยันตร์หลัก โดยมีการสะสมมากถึง 50% ของฟลูออรีนเริ่มต้นในวันที่ 12 ของการทดลอง หลังจากนั้นปริมาณ 9-ฟลูออรีโนนจะลดลงและพบสารมัธยันตร์ชนิดใหม่เกิดขึ้นคือ 9-ไฮดรอกซีฟลูออรีน

Pothuluri และคณะ (1993) ศึกษาการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 ซึ่งเป็นรากกลุ่ม non-ligninolytic โดยพบว่าสารมัธยันตร์หลักที่เกิดขึ้นคือ 9-ฟลูออรีโนนซึ่งสะสมมากถึง 62% และยังพบสารมัธยันตร์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ 9-ฟลูออรีนอล และ 2-ไฮดรอกซี-9-ฟลูออรีโนน ความเข้มข้นของทั้ง 2 ชนิดรวมกัน 7.0%

Bezalel และคณะ (1996) พบว่า *Pleurotus ostreatus* สามารถย่อยสลายฟลูออรีนในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด ได้สารมัธยันตร์คือ 9-ฟลูออรีโนนและ 9-ฟลูออรีนอล ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์สุดท้าย (dead-end products) ของเอนไซม์ cytochrome P-450 monooxygenases แม้ว่า *P. ostreatus* เป็นราที่สามารถสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน แต่กระบวนการย่อยสลายฟลูออรีนในการทดลองช่วงต้นอาจเกิดขึ้นโดย cytochrome P-450 monooxygenases หลังจากนั้นจะเป็นการย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน

นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ 9-ฟลูออรีนอล และ 9-ฟลูออรีโนนจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยราคลาสต่างๆ (Bogan และ Lamar, 1996; Garon และคณะ, 2000) เช่น คลาส Ascomycetes ได้แก่ *Cryphonectria parasitica*, *Dichotomomyces cejprii* และ *Sporormiella australis*

คลาส Basidiomycetes ได้แก่ *Agaricus bitorquis*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coniophora arida*, *Oxysporus* sp., *Phanerochaete chrysosporium* (CMPG 1198) และ *Phanerochaete laevis* HHB-1625

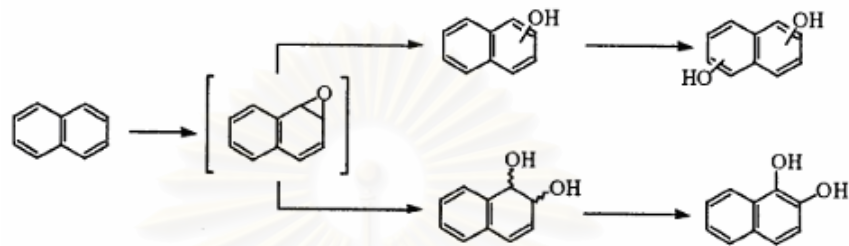
คลาส Deuteromycetes ได้แก่ *Aspergillus terreus*, *Beauveria alba*, *Cladosporium herbarum*, *Colletotrichum dematium*, *Coniothyrium sporulosum*, *Cryptococcus albidus*, *Cylindrocarpon destructans*, *Doratomyces stemonitis*, *Drechslera spicifera*, *Embellisia annulata*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium italicum*, *Rhizoctonia solani* และ *Verticillium lecanii*

คลาส Zygomycetes ได้แก่ *Cunninghamella blakesleeana*, *C. echinulata* และ *C. elegans*

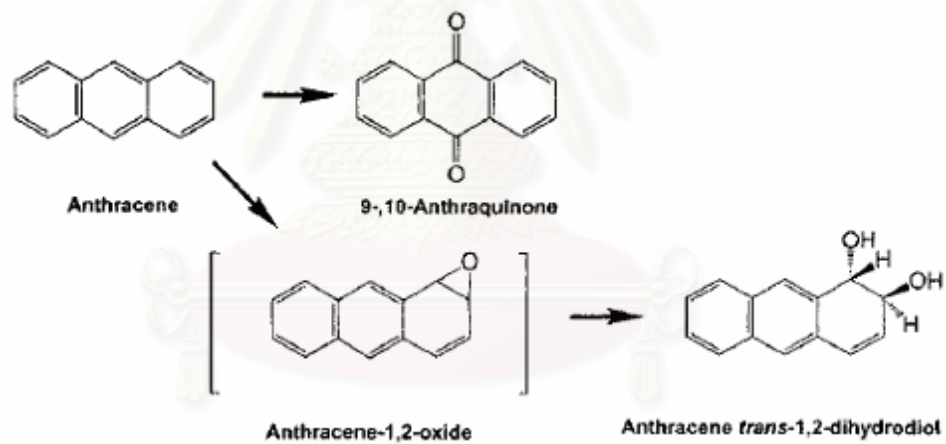
และยังพบว่าราบางสายพันธุ์ย่อยฟลูออรีนแล้วเกิดสารมัธยันตร์เพียงชนิดเดียว เช่น *Phanerochaete chrysosporium* สายพันธุ์ CMPG 763 โดยสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นคือ 9-

ฟลูออรีนอล และ *P. chrysosporium* สายพันธุ์ CMPG 638 ซึ่งพบสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นเพียงชนิดเดียวคือ 9-ฟลูออรีนิน (Garon และคณะ, 2000)

สำหรับตัวอย่างวิธีการย่อยสลาย PAH ชนิดอื่น ๆ และสารมัธยันตร์ชนิดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.19-2.34

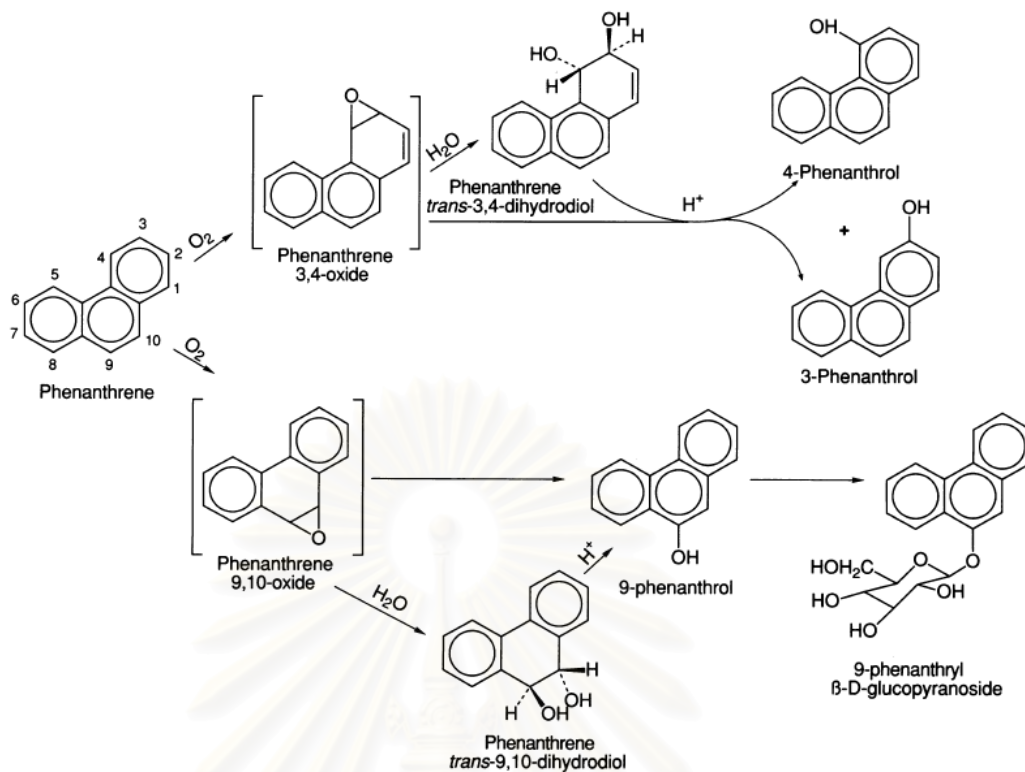


รูปที่.2.19 วิธีการเมแทบอลิซึมของแอนทราซีนโดย *Phlebia lindtneri* (ที่มา Mori และคณะ, 2003)

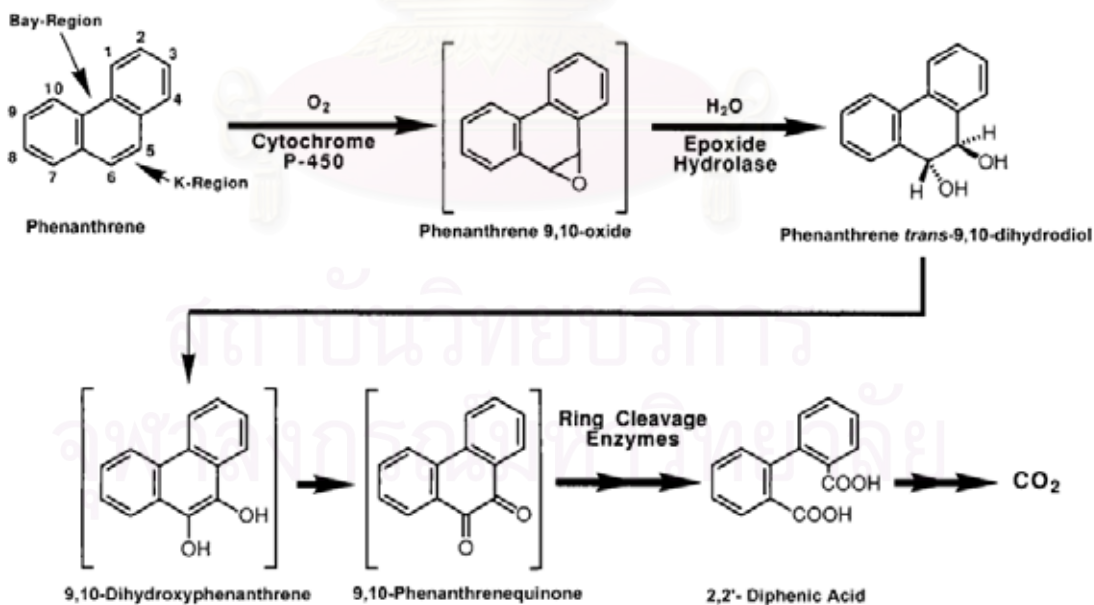


รูปที่ 2.20 วิธีการสลายแอนทราซีนโดย *P. ostreatus* (ที่มา Bezalel, 1996)

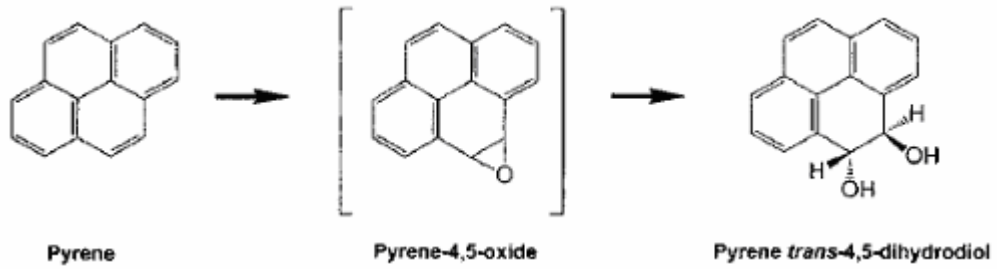
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



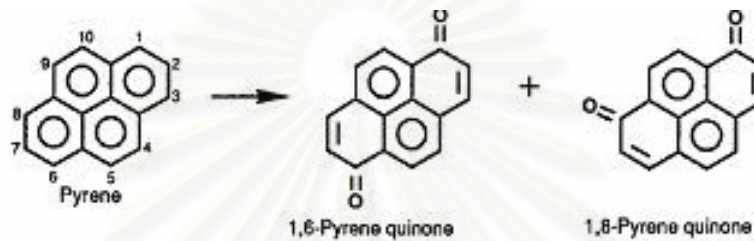
รูปที่ 2.21 วิธีการเมแทบอลิซึมของฟีนแอนทรินโดย *P. chrysosporium* (ที่มา Sutherland และคณะ, 1991)



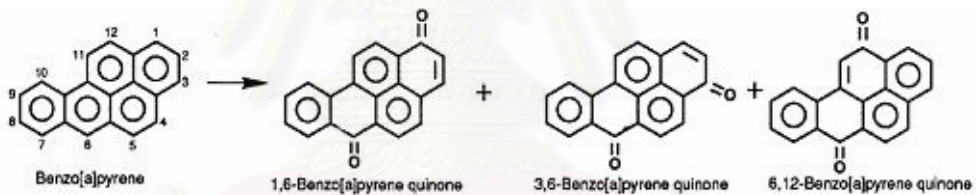
รูปที่ 2.22 วิธีการเมแทบอลิซึมของฟีนแอนทรินโดย cytochrome P-450 โดย *P. ostreatus* (ที่มา Bezalel, 1997)



รูปที่ 2.23 วิธีการสลายไพรีน โดย *P. ostreatus* (ที่มา Bezael, 1996)

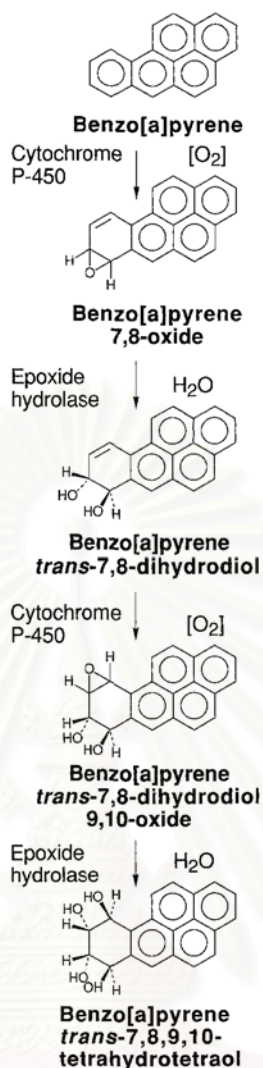


รูปที่ 2.24 กระบวนการออกซิไดซ์ไพรีนโดยรากกลุ่มไวท์รอต (ที่มา Cerniglia, 1997)



รูปที่ 2.25 กระบวนการออกซิไดซ์เบนโซ[เอ]ไพรีนโดยรากกลุ่มไวท์รอต (ที่มา Cerniglia, 1997)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.26 วิธีกรเกิดปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสเบนโซ[เอ]ไพรีนด้วย cytochrome P-450 โดย *C. elegans* (จากลุ่ม non-ligninolytic fungi) (ที่มา Sutherland, 1992).



รูปที่ 2.27 วิธีกรเมแทบอลิซึมไดเบนโซ-พารา-ไดออกซินโดย *Phlebia lindtneri* (ที่มา Mori, 2003)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท KoKusan ประเทศญี่ปุ่น
4. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400 ของบริษัท Decan Ultrasonics ประเทศอังกฤษ
5. เครื่องคัดกรองขนาดดิน ขนาดความกว้างของรู 1.18 มม. รุ่น O.S.K. 119 standard Sieve ของบริษัท Okawa Seiki ประเทศญี่ปุ่น
6. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น Innova 2300 ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hettich Zentrifugen ประเทศเยอรมัน
10. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-100 ของบริษัท Eyela ประเทศญี่ปุ่น
11. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบสุญญากาศ (Speed vacuum) รุ่น Centrivap Eppendorf Concentration 5301 ของบริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมัน
12. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylab Thermo-block SLTDB-120 ของบริษัท Seoulin Bioscience ประเทศเกาหลี
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 ของบริษัท Eyela ประเทศญี่ปุ่น
14. เครื่องทำความเย็น (cooler) รุ่น CCA-1110 ของบริษัท Eyela ประเทศญี่ปุ่น
15. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (Maxima ultrapure water) ของบริษัท Elga ประเทศอังกฤษ
17. เครื่อง Freeze Dryer รุ่น FD-1 ของบริษัท Eyela ประเทศญี่ปุ่น

18. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys20 ของบริษัท Thermo spectronic ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรเฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) ประกอบด้วย
 - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance ประเทศญี่ปุ่น
 - Mini Sub-cell GT agarose gel electrophoresis system ของบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา
20. ชุดเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิดโครมาโทกราฟี (High performance liquid chromatography, HPLC) ประกอบด้วย
 - ชุดควบคุม (system controller) รุ่น SCL10AVP ของบริษัท Shimadzu Corp., Kyoto ประเทศญี่ปุ่น
 - ปั๊มเฟสเคลื่อนที่ รุ่น SCL10AVP pumps ของบริษัท Shimadzu Corp., Kyoto ประเทศญี่ปุ่น
 - เครื่องฉีดตัวอย่าง (automatic injector) รุ่น SIL 10ADVP ของบริษัท Shimadzu Corp., Kyoto ประเทศญี่ปุ่น
 - เครื่องตรวจวัด (detector) ด้วยระบบ UV รุ่น SPD10APV ของบริษัท Shimadzu Corp., Kyoto ประเทศญี่ปุ่น
 - เครื่องบันทึก (recorder) รุ่น C-RIA ของบริษัท Shimadzu Corp., Kyoto ประเทศญี่ปุ่น
 - คอลัมน์ (column) ชนิด Inertsil[®] ODS-3 C18 เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 5 ไมโครเมตร ขนาด 4.6x150 มม. ของบริษัท GL Science Inc. ประเทศญี่ปุ่น
21. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO Laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientefic Supply ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น Clean model V4 ของบริษัท Lab Service, ประเทศไทย
23. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น Hereaus type B 5050 E ของบริษัท Hereaus, ประเทศเยอรมัน
24. ตู้อบแห้งของบริษัท Contherm Scientific, ประเทศนิวซีแลนด์
25. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -20°C ของบริษัท Sanyo Electric, ประเทศญี่ปุ่น
26. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -70°C ของบริษัท Forma Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
27. ตู้ดูดอากาศ (Filtration Fume Cupboard) รุ่น Airone 1200-GS ของบริษัท Safelab Systems, ประเทศอังกฤษ
28. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 10 20 100 200 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, ประเทศเยอรมัน

29. ครอบกึ่งพลาสติก ขนาด 1 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, ประเทศญี่ปุ่น
30. หัวกรองสำหรับหลอดฉีดยา (syringe filter) ชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.20 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มม. ของบริษัท Restex, ประเทศสหรัฐอเมริกา
31. กระดาษกรอง (filter paper) ชนิด PTFE และ nylon ขนาดความกว้างของรู 0.20 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มม. ของบริษัท ของ Whatmann ประเทศสหรัฐอเมริกา



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS ของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. 2,6-ไดเมทอกซี ฟีนอล (dimethoxy phenol หรือ 2,6-DMP) ของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. AzureB ของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Phenol Red ของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. ไกวเอคอลล (guaiacol) ของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Benomyl ของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) high purity grade ของบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. ฟลูออรีน (fluorene) high purity grade ของบริษัท Kanto Chemical ประเทศญี่ปุ่น
9. ไพรีน (pyrene) high purity grade ของบริษัท Kanto Chemical ประเทศญี่ปุ่น
10. แอนทราซีน (anthracene) high purity grade ของบริษัท Kanto Chemical ประเทศญี่ปุ่น
11. ฟลูออแรนทรีน (fluoranthrene) high purity grade ของบริษัท Kanto Chemical ประเทศญี่ปุ่น
12. 9-fluorenol ของบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. 9-fluorenone ของบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. กลูโคส
15. ผงสกัดจากมอลต์ (malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. เพปโตน (peptone) ของบริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
19. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
20. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรส์ (Anhydrous Na₂SO₄) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
21. โซเดียมทาร์เตรต (Na₂C₄H₄O₆) ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
22. โซเดียมมาโลเนต C₃H₂Na₂O₄ ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
23. อะลูมิเนียม โพแทสเซียมซัลเฟต AlK(SO₄)₂·2H₂O ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
24. กรดบอริก (H₃BO₃) ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
25. โซเดียมโมลิบเดต (Na₂MO₄·2H₂O) ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
26. ไนโตรโลอะซิติคแอซิด (C₆H₉NO₆) ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
27. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂·2H₂O) ของบริษัท AJEX Chemicals ประเทศออสเตรเลีย

28. โคบอลต์คลอไรด์ (CoCl_2) ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
29. คอปเปอร์ซัลเฟต CuSO_4 ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
30. แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
31. แมงกานีสซัลเฟต (MnSO_4) ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
32. เฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท May & Baker ประเทศอังกฤษ
33. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Carlo ERBA ประเทศฝรั่งเศส
34. ไตคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
35. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals ประเทศออสเตรเลีย
36. ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
37. เมทานอล (CH_3OH - HPLC grade) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
38. เอทิลอะซิเตต ($\text{CH}_3\text{COO}_2\text{H}_3$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
39. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide (CH_3)₂SO หรือ DMSO) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
40. อะกาโรสเจล (Agarose Gel) ของบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา
41. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา
42. GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา
43. GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา
44. Taq DNA polymerase ของบริษัท New England BioLabs Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
45. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท SibbsEnzyme ประเทศรัสเซีย
46. RibonucleaseA (RNase A) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
47. Veratryl alcohol ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
48. Veratraldehyde ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
49. ชุดสกัด DNA จากอะกาโรสเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) ของบริษัท Qiagen ประเทศเยอรมัน
50. ชุดสกัด Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit ของบริษัท Bio-Rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
51. ชุด PCR clean-up Gel Extraction ของบริษัท Macherey-Nagel GmbH & Co. ประเทศเยอรมัน
52. ชุด Universal RiboClone® cDNA Synthesis System ของบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา

53. ชุด GeneJET™ PCR cloning Kit ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (Analytical Grade) ยกเว้นสารเคมีที่ระบุเกรดเฉพาะ เช่น PAHs High purity grade และ Methanol – HPLC Grade

3.3 แบคทีเรีย

ในงานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α (Hanahan, 1983)
 จีโนม ϕ 80*lacZ* Δ M15, *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi-1*,
hsdR17, *relA1*, *supE44*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*)U169

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

ในงานวิจัยนี้มีการใช้พลาสมิด คือ pJET1/blunt cloning vector ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา (ภาคผนวก จ5)

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'----->3'	Tm ($^{\circ}$ ซ)	เอกสารอ้างอิง
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	56	Garden และ Bruns, 1993
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	56	White และคณะ, 1990
<i>Plac</i> -F	CATTGGCATGGCTTCTTTCA	55	Soden และ Dobson, 2001
<i>Plac</i> -R	GCGCGAATCCAGTAATTGCGAC	59	Soden และ Dobson, 2001
<i>gdp</i> - F	CGTATCGTCCTCCGTAATGC	56	Gettemy และคณะ, 1998
<i>gdp</i> -R	ACTCGTTGTCGTACCAGGAG	56	Gettemy และคณะ, 1998
<i>lacAg</i> -F1	TCTACGACGATAATGACC	52	สร้างในการทดลองนี้
<i>lacAg</i> -R1	AGAGAAAATGAAATGGGGTC	55	สร้างในการทดลองนี้
<i>lac</i> F-1	ACCTGCATCGGACGCGACTTTGATCAAC	67	สร้างในการทดลองนี้
<i>lac</i> R-2	CTTTTAGTTTTCGTACTACGCGGATTCTAG	67	สร้างในการทดลองนี้
<i>gdp</i> Aaege474-F	CAAGGGTGGTGTCTAAGAAGGT	58	สร้างในการทดลองนี้
<i>gdp</i> Aaege755-R	TGGCGGTGGTAGCGTGGACAGT	60	สร้างในการทดลองนี้

3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

3.5.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อในการทดลองนี้ เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งต่างๆ หลายภาคในประเทศไทย สำหรับภาคกลางเก็บตัวอย่างที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร นนทบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ภาคตะวันตกเก็บตัวอย่างที่จังหวัดกาญจนบุรี ภาคตะวันออก ที่จังหวัดระยอง และภาคใต้เก็บตัวอย่างที่จังหวัดสงขลา สถานที่เก็บตัวอย่างแบ่งเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติ เช่น ดอกเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติ (fungal fruiting body) หรือกิ่งไม้ เศษไม้ผุ โดยเลือกเก็บดอกเห็ดที่ขึ้นบริเวณไม้และทำให้ไม่มีลักษณะสีขาวซึ่งเป็นกลุ่มที่ความสามารถในการย่อยเนื้อไม้ พิจารณาจากดอกเห็ดที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีการฉีกขาด ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างดอกเห็ดต้องระมัดระวังอย่าให้ดอกเห็ดฉีกขาด เพราะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายนอก สำหรับกิ่งไม้ คัดเลือกจากกิ่งไม้ที่ผุหรือมีเนื้อไม้เป็นสีขาว ซึ่งอาจมีจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้ซึ่งเป็นสีน้ำตาลออกไป ทำให้เนื้อไม้เปลี่ยนเป็นสีขาว

กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างที่ซื้อจากแหล่งจำหน่ายหรือแหล่งเพาะพันธุ์เห็ด เช่น ตลาดสด ฟาร์มเพาะเห็ด เป็นต้น โดยเลือกตัวอย่างที่มีลักษณะสด ดอกเห็ดมีสภาพสมบูรณ์ ไม่ฉีกขาด

การเก็บรักษาตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างที่ได้แต่ละตัวอย่างในถุงพลาสติกสะอาด นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ทันทีหรือเก็บที่อุณหภูมิ 4°C นำมาแยกเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างที่ได้มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยตัดเนื้อเยื่อสีขาวด้านในตรงกลางโคนเห็ด หรือเนื้อไม้ด้านในที่สัมผัสกับอากาศ วางเนื้อเยื่อเห็ดหรือเนื้อไม้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA) (ภาคผนวก ข1) ที่ผสมเพนนิซิลลิน จี (Penicillin G) 0.03 มก.ต่อลิตร เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย และ Benomyl 7 มก.ต่อลิตร เพื่อยับยั้งราที่โตเร็ว (Chiocchio และคณะ, 2000) เช่น รากลุ่ม Ascomycetes เป็นต้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง 7-10 วัน หรือจนกว่าจะสังเกตเห็นการเจริญของเส้นใย นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ซ้ำจนกว่าจะได้เส้นใยบริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อในอาหารแข็งเอียงที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้เป็น stock culture และถ่ายลงอาหารใหม่ทุก ๆ 30 วัน

3.5.2 การคัดกรองราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน

คัดกรองเบื้องต้นเพื่อหาหาที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน โดยอาศัยการเปลี่ยนสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.5.1 มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน ตัดชิ้นวุ้นที่มีสายใยราด้วยแกนโลหะสำหรับเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 ซม. วางชิ้นวุ้นบนอาหาร Basal Medium (ภาคผนวก ข3) จำนวน 3 จานที่มีสีทดสอบ 3 ชนิดแตกต่างกัน ได้แก่ Basal Medium ผสม 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไกวเอคอลลสำหรับใช้คัดกรองราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์แลคเคส (Kiiskinen และคณะ, 2004) Basal Medium ผสม 0.0025% (น้ำหนักต่อปริมาตร) phenol red สำหรับใช้คัดกรองราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (Kuwahara และคณะ, 1984) และ Basal Medium ผสม 0.0025% (น้ำหนักต่อปริมาตร) azure B สำหรับใช้คัดกรองราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (Archibald, 1992) บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 3 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีของสารทดสอบ โดย ไกวเอคอลลจะเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีแดงเข้ม phenol red จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มแดง และ azure B จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง (Alcalde และคณะ, 2002; Kiiskinen และคณะ, 2004)

3.5.3 การคัดกรองราที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม PAH

คัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีสารทดสอบตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปจากข้อ 3.5.2 มาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี PAH แต่ละชนิด โดยนำเส้นใยที่เจริญบน MEA มาวางบน Basal medium ที่มี PAH ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ผสมอยู่ในแต่ละจาน สำหรับ PAH ที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ ฟลูออรีน แอนทราซีน พีแนนทริน และ PAH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น ฟลูออแรนทริน และไพรีน บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 7 วัน บันทึกการเจริญของเส้นใย

เชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินได้หลายชนิดและสามารถเจริญบน Basal medium ที่ผสม PAH ได้ดีที่สุด จะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.5.4 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAH ในอาหารเหลว

นำตัวอย่างราที่ให้ผลบวกในการทดสอบกับสีทดสอบทั้ง 3 ชนิดในข้อ 3.5.2 และ สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ผสม PAH ในข้อ 3.5.3 มาทดสอบความสามารถในการย่อย PAH ชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยนำเชื้อจาก stock culture มาเพาะลงบน MEA บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วันเพื่อให้ได้เส้นใยจำนวนมาก นำเส้นใยเชื้อทั้งจานเพาะเชื้อถ่ายลงบนอาหารเหลว modified Glucose Peptone Yeast extract medium (mGPY) (ภาคผนวก ข4) ปริมาตร 100 มล. ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีลูกแก้ว 5 ลูก

นำไปบ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28°ซ อัตราการเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นเพิ่มปริมาณเชื้อโดยถ่ายหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมอยู่ 200 มล. บ่มเขย่าในภาวะเดิมอีก 15 วัน เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 10000 xg นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85% เซลล์ที่ได้จะใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป

นำเซลล์ที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการย่อย PAH โดยเติมหัวเชื้อ 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด (Nitrogen-limiting medium หรือ N-limiting medium) ที่มีกลูโคส 1% เป็นแหล่งอาหารตามสูตรของ Kirk และคณะ (1978) (ภาคผนวก ข5) ปริมาตร 90 มล. ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติม PAH แต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ ฟลูออรีน แอนทราซีน พีแนนทรีน ฟลูออแรนทรีน หรือไพรีน ลงในขวดรูปชมพู่แต่ละขวด ให้ได้ PAH ความเข้มข้นสุดท้าย 100 มก.ต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 28°ซ ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในที่มืด แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มล. ทุกสัปดาห์ต่อเนื่องนาน 4 สัปดาห์ ตัวอย่างทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ปริมาณ PAH ที่เหลือเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ

3.5.5 การสกัด PAH จากอาหารเหลวและการวัดปริมาณ PAH

ขั้นตอนการสกัด PAH ทุกขั้นตอนทำในตู้ดูดอากาศ (Filtration fume cupboard) เพื่อป้องกันอันตรายจากไอระเหยของสารเคมี เติมไพรีนที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนลงในหลอดที่ต้องการสกัดฟลูออรีน แอนทราซีน พีแนนทรีน ฟลูออแรนทรีน เพื่อใช้เปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการสกัด และเติมเบนโซ[เอ]ไพรีนสำหรับตัวอย่างที่ต้องการสกัดไพรีน

สกัด PAH จากอาหารเหลวโดยนำตัวอย่างในชุดทดลองและชุดควบคุมจากข้อ 3.5.4 ตัวอย่างละ 5 มล. มาเติมกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้นจนมีความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 2.0–3.0 จากนั้นนำไปโซนิเคตนาน 15 นาที จากนั้นเติมเอทิลเอซีเตต 1 เท่าของปริมาณตัวอย่าง ปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมที่ความเร็วสูงสุดต่อเนื่องนาน 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงนาน 5 นาทีเพื่อแยกเซลล์ออกจากเอทิลเอซีเตต ดูดชั้นเอทิลเอซีเตตซึ่งเป็นส่วนใสด้านบนสุดออกใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ สกัดด้วยเอทิลเอซีเตตซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมชั้นเอทิลเอซีเตตทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วจึงนำชั้นเอทิลเอซีเตตมากำจัดน้ำออกโดยเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำเอทิลเอซีเตตที่ปราศจากน้ำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) ควบคุมอุณหภูมิที่ 40°ซ จนได้ตะกอนแห้ง เติมเมทานอล (HPLC-grade) ปริมาตร 1 มล. นำไป sonicate นาน 15 นาที หรือจนกว่าตะกอนจะละลายจนหมด กรองสารละลายด้วย หัวกรอง PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ลงในหลอดแก้วสำหรับวิเคราะห์ HPLC เก็บตัวอย่างที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะวิเคราะห์ปริมาณ PAH ที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป โดยกำหนดภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

คอลัมน์ (column)	Inertsil® ODS-3 C18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 5 ไมโครเมตร ขนาด 4.6x150 มม.
ตัวชะสาร (เฟสเคลื่อนที่)	80% เมทานอล (HPLC grade)
อัตราการไหล (flow rate)	1 มล.ต่อนาที
อุณหภูมิคอลัมน์	40°ซ
ระบบตรวจวัด (detector)	UV detector ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร
ปริมาณสารที่ฉีด	10 ไมโครลิตร

บันทึกค่า retention time และพื้นที่ใต้กราฟของ PAH ที่ต้องการตรวจวัด นำค่าพื้นที่ใต้กราฟมาคำนวณปริมาณ PAH ที่เหลือ เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟในวันที่ 0 ของ PAH แต่ละชนิดในชุดควบคุม

คัดเลือกกราฟที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAH ได้หลายชนิดใช้เวลาให้น้อยที่สุดและสามารถย่อยฟลูออรีนได้ดีที่สุด เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยฟลูออรีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อไป

3.5.6 การวิเคราะห์สารมัยันตร์

สำหรับตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์สารมัยันตร์ ใช้ภาวะในการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.5.5 ยกเว้นระบบตัวชะสาร (เฟสเคลื่อนที่) ด้วยเกรเดียนต์เชิงเส้นของเมทานอล ความเข้มข้น 40-80% ระยะเวลาเกรเดียนต์นาน 45 นาที จากนั้นเปลี่ยนเป็นเมทานอล 80% นาน 15 นาที เปรียบเทียบค่า retention time ของสารมัยันตร์ที่ต้องการตรวจสอบกับสารมาตรฐาน

3.5.7 การตรวจสอบความสามารถในการย่อย 9-ฟลูออรีนอล

เพื่อพิสูจน์ว่าสารมัยันตร์หลักเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยฟลูออรีน โดยเชื้อที่คัดเลือกหรือไม่ จึงได้ทดสอบความสามารถของเชื้อที่คัดเลือกต่อการสลาย 9-ฟลูออรีนอล โดยเลี้ยงเชื้อในภาวะเดียวกับข้อ 3.5.4 ผสมสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอลความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรลงในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด (ภาคผนวก ข5) แทนการเติมฟลูออรีน บ่มเชื้อนาน 1 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ 9-ฟลูออรีนอลที่เหลืออยู่ ด้วย HPLC ตามรายละเอียดในข้อ 3.5.5 บันทึกค่า retention time และพื้นที่ใต้กราฟของ 9-ฟลูออรีนอล นำค่าพื้นที่ใต้กราฟมาคำนวณปริมาณ 9-ฟลูออรีนอลที่เหลือโดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟในวันที่ 0 ของชุดควบคุม

3.5.8 รูปแบบการย่อยฟลูออรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยரசายพันธุ์ที่คัดเลือก

นาราคัดเลือกซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แสดงความสามารถในการย่อยสลาย PAH ได้หลายชนิดโดยใช้เวลาน้อยที่สุด มาศึกษารูปแบบการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้นต่างๆ โดยเตรียมหัวเชื้อตามข้อ 3.5.4 ถ่ายหัวเชื้อ 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด (ภาคผนวก ข5) ปริมาตร 90 มล. ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมฟลูออรีนให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 250, 500, 750 และ 1000 มก.ต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 28°C ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีในที่มืด แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มล. ทุกสัปดาห์ ต่อเนื่องนาน 4 สัปดาห์ ตัวอย่างทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ปริมาณ PAH ที่เหลือด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีข้อ 3.5.5 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ

3.5.9 การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิพิดในระหว่างการย่อยฟลูออรีนของราที่คัดเลือก

เก็บตัวอย่างจากข้อ 3.5.4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมฟลูออรีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร ปริมาตร 5 มล. แยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 10000 xg นาน 15 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสใส่หลอดทดลองหลอดใหม่เพื่อใช้วิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสและลิพิดเพอร์ออกซิเดส เก็บตะกอนเซลล์ไว้สำหรับวิเคราะห์การเจริญต่อไป

3.5.9.1 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคส

วิเคราะห์ที่อุณหภูมิห้อง ตามวิธีของ Bourbonnais และ Paice (1990) ในหลอดปฏิบัติการประกอบด้วย

500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมแอซิเตต บัฟเฟอร์ (pH 4.5)	250	ไมโครลิตร
10 มิลลิโมลาร์ ABTS	250	ไมโครลิตร
น้ำเลี้ยงเชื้อ		เปลี่ยนแปลงตามความเหมาะสม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น	2500	ไมโครลิตร

บันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ทุก 15 วินาทีต่อเนื่องนาน 300 วินาที

ปฏิกิริยาที่เกิดคือ



1 หน่วยของแลคเคส หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ออกซิไดส์ ABTS ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ($\epsilon_{420} = 36,000 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ภายใต้ภาวะมาตรฐาน

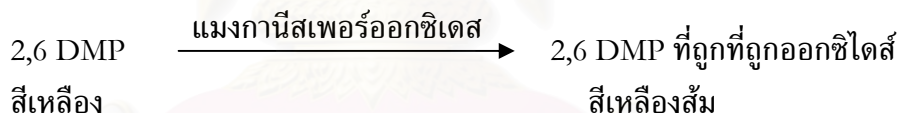
3.5.9.2 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส

วิเคราะห์ที่อุณหภูมิห้อง ตามวิธีของ Wariishi และคณะ (1922) ในหลอดปฏิบัติการประกอบด้วย

500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมมาโลเนต บัฟเฟอร์ (pH 4.5)	250	ไมโครลิตร
10 มิลลิโมลาร์ แมงกานีสซัลเฟต	250	ไมโครลิตร
10 มิลลิโมลาร์ 2,6-DMP	250	ไมโครลิตร
1 มิลลิโมลาร์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	250	ไมโครลิตร
น้ำเลี้ยงเชื้อ		เปลี่ยนแปลงตามความเหมาะสม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น	2500	ไมโครลิตร

บันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 469 นาโนเมตร ทุก 15 วินาทีต่อเนื่องนาน 300 วินาที

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ



1 หน่วยของแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ออกซิไดส์ 2,6 DMP ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ($\epsilon_{420} = 49,600 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ภายใต้ภาวะมาตรฐาน

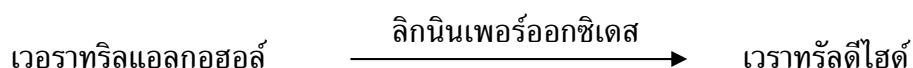
3.5.9.3 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส

วิเคราะห์ที่อุณหภูมิห้อง ตามวิธีของ Tien และ Kirk (1988) ในหลอดปฏิบัติการประกอบด้วย

500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมทาร์เตรต บัฟเฟอร์ (pH 4.5)	250	ไมโครลิตร
5 มิลลิโมลาร์ เวอรทริลแอลกอฮอล์	250	ไมโครลิตร
1 มิลลิโมลาร์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	250	ไมโครลิตร
น้ำเลี้ยงเชื้อ		เปลี่ยนแปลงตามความเหมาะสม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น	2500	ไมโครลิตร

บันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ทุก 15 วินาทีต่อเนื่องนาน 300 วินาที

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ



1 หน่วยของลิกนินเพอร์ออกซิเดส หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ออกซิไดส์เวราทริลแอลกอฮอล์แล้วทำให้เกิดเวราทรัลดีไฮด์ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ($\epsilon_{420} = 9,300 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ภายใต้ภาวะมาตรฐาน

3.5.10 การตรวจสอบการเจริญของราสายพันธุ์ที่คัดเลือกในระหว่างการย่อยฟลูออรีน

ติดตามรูปแบบการเจริญของราที่คัดเลือกในระหว่างการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร โดยการหาน้ำหนักแห้งตามวิธีการของ Peterson และ Bridge (1994) นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.5.4 มาล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 10,000 xg นาน 10 นาที ถ่ายเซลล์ลงในถ้วยสแตนเลสที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักถ้วยแล้ว อบเซลล์ที่อุณหภูมิ 105°C นาน 18 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) จนน้ำหนักคงที่ ซึ่งน้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์อยู่หักลบกับน้ำหนักถ้วยเปล่าเพื่อคำนวณหา น้ำหนักของเซลล์แห้ง

3.5.11 การศึกษารูปแบบการย่อยสลายฟลูออรีนในแบบจำลองดินของราที่คัดเลือก

นักรวซึ่งแสดงความสามารถในการย่อยสลายฟลูออรีนในอาหารเหลวได้ดีในระยะเวลาสั้น มาศึกษารูปแบบการย่อยสลายฟลูออรีนในแบบจำลองดิน โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.5.11.1 การเตรียมดิน ศึกษาลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน

เก็บตัวอย่างดินที่อุดมภายในบริเวณสวนผลไม้ ตำบลทุ่งขวาง อำเภอ กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยเก็บตัวอย่างลึกจากผิวดิน 15 ซม. เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสารเคมี แยกเศษใบไม้และหินออก นำตัวอย่างดินส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างดิน ที่ฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีรายละเอียดในการวิเคราะห์ดังนี้ วิเคราะห์ลักษณะเนื้อดิน ค่าความเป็นกรด-เบส ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัส สารอินทรีย์ (organic matter) ความชื้น อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (maximum water holding capacity) ตัวอย่างดินที่เหลือนำมาคัดกรอง โดยใช้เครื่องคัดกรองขนาดดินเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.18 มม. (16 mesh) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะใช้ในการทดลอง และนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

3.5.11.2 การเตรียมหัวเชื้อและเตรียมดินสำหรับแบบจำลองดิน

การเตรียมหัวเชื้อ

เนื่องจากราส่วนใหญ่เจริญได้ดีบนเมล็ดข้าวฟ่างซึ่งเป็นวัสดุที่นิยมใช้ทำหัวเชื้อมากที่สุด (ปรีชา รัตนัง, 2546) ขั้นตอนนี้จึงเลือกเตรียมหัวเชื้อบนเมล็ดข้าวฟ่าง เตรียมเมล็ดข้าวฟ่างปลอดเชื้อ โดยใส่เมล็ดข้าวฟ่างจำนวน 20 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 45 นาที นำราที่คัดเลือก จาก stock culture มาเพาะลงบน MEA บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน เพื่อให้ได้เส้นใยจำนวนมาก ตัดชิ้นรุ้นที่มีสายใยราด้วยแกนโลหะสำหรับเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 ซม. จำนวน 10 ชิ้น วางชิ้นรุ้นบนเมล็ดข้าวฟ่างที่ปลอดเชื้อ เติม อาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด 10 มล. บ่มเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 2 สัปดาห์ เพื่อให้เชื้อสร้างเส้นใยคลุมเมล็ดข้าวฟ่างจนสมบูรณ์ (ศรานนท์ เจริญสุข, 2537)

การเตรียมดิน

นำซีลีเยสำเร็จรูป (ภาคผนวก ฉ1) มาผสมกับตัวอย่างดินในอัตราส่วน 10% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ซึ่งตัวอย่างดินที่ผสมซีลีเยน้ำหนัก 5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 23×85 มม. ปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.5.11.3 การทดสอบการย่อยสลายฟลูออรีนในแบบจำลองดิน

ทดสอบการย่อยฟลูออรีนโดยราที่คัดเลือกในแบบจำลองดินโดยแบ่งชุดทดลองออกเป็น 4 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำดังนี้

ชุดที่	ดิน	เชื้อ	วัตถุประสงค์
1	ปลอดเชื้อ	ไม่ใส่เชื้อ	เพื่อทดสอบ abiotic factor
2	ปลอดเชื้อ	ใส่เชื้อ	เพื่อทดสอบการย่อยฟลูออรีนโดยรา
3	ไม่ปลอดเชื้อ	ไม่ใส่เชื้อ	เพื่อทดสอบ indigenous biotic factor
4	ไม่ปลอดเชื้อ	ใส่เชื้อ	เพื่อทดสอบการย่อยฟลูออรีนโดยรา ร่วมกับเชื้อในดิน (indigenous biotic factor)

สำหรับชุดทดลองที่ปลอดเชื้อ นำตัวอย่างดินที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.5.11.2 ไป หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ 45 นาที ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 3 วัน นำตัวอย่างดินทุกชุดทดลองมา เติมฟลูออรีนที่ละลายในอะซิโตน กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.2

ไมโครเมตร โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของฟลูออรีน 250 ไมโครกรัมต่อดินแห้ง 1 กรัม เขย่า หลอดทดลองเพื่อให้ฟลูออรีนกระจายทั่วหลอด คลายฝาตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อให้ อะซีโตนระเหยจนหมด (Brinch และคณะ, 2002) นำทุกชุดทดลองมาปรับความชื้นให้ได้ 60-65% ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนจำกัด นำชุดทดลองที่ 2 และ 4 มาเติมเมล็ดข้าวฟ่างที่มีราเจริญอยู่ประมาณ 20 เมล็ดซึ่งจะเต็มบนผิวน้ำดินในหลอดทดลองพอดี บ่มหลอดทดลองทุกชุดที่อุณหภูมิห้องในที่มืด ปรับความชื้นให้คงที่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนจำกัด ทุก 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 สัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ต่อเนื่อง โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด นำไปสกัด และวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลือตามวิธีข้อ 3.5.11.4 ต่อไป

3.5.11.4 การสกัดฟลูออรีนจากตัวอย่างดิน

ขั้นตอนการสกัด PAH ออกจากดินทุกขั้นตอนทำในตู้ดูดอากาศ เพื่อป้องกัน อันตรายจากไอระเหยของสารเคมี เติมน้ำมันที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนเพื่อใช้เปรียบเทียบ ประสิทธิภาพในการสกัด

สกัด PAH จากดินโดยนำตัวอย่างในชุดทดลองและชุดควบคุมจากข้อ 3.5.11.3 ทั้งหมด กำจัดน้ำออกจากตัวอย่างดินโดยเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 2 กรัม ผสม โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสให้เข้ากับดิน เติมน้ำมัน 10 มล. ปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง ปั่นผสมที่ความเร็วสูงสุดต่อเนื่องนาน 2 นาที จากนั้นนำไป sonicate นาน 15 นาที นำไปปั่น เหยี่ยานาน 5 นาที เพื่อแยกตะกอนดินออกจากไดคลอโรมีเทน ดูดชั้นไดคลอโรมีเทนซึ่งเป็นส่วน ใสด้านบนสุดออกใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมชั้นได คลอโรมีเทนทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไดคลอโรมีเทนไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบ สูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) ควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C จนได้ตะกอนแห้ง เติมนเมทา นอล (HPLC-grade) ปริมาตร 1 มล. นำไปโซนิเคต นาน 15 นาที หรือจนกว่าตะกอนจะละลายจน หมด กรองสารละลายด้วยหัวกรอง PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตรลงในหลอดแก้วสำหรับ วิเคราะห์ HPLC เก็บตัวอย่างที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะวิเคราะห์ปริมาณ PAH ที่ เหลืออยู่ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

3.5.12 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา

พิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่แสดงประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลาย PAH โดย เปรียบเทียบลำดับเบสระหว่างบริเวณ ITS1 และ ITS2 บนบริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของ โครโมโซมอดีเอ็นเอตามขั้นตอนต่อไปนี้

3.5.12.1 การเลี้ยงราเพื่อเตรียมสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

นำ stock culture ตัวอย่างราที่คัดเลือกมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามรายละเอียดในข้อ 3.5.4 เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 10,000 xg นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำเส้นใยทั้งหมดไปไลโอไฟไลซ์ (Lyophilization) เพื่อให้เส้นใยแห้งสนิท เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

3.5.12.2 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Reader และ Broda (1985) ดังนี้ นำเส้นใยที่ผ่านการไลโอไฟไลซ์แล้วจากข้อ 3.5.12.1 ประมาณ 0.5 กรัม ใส่ในโถงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมไนโตรเจนเหลวลงในโถง บดเส้นใยราให้เป็นผงละเอียด จากนั้นถ่ายใส่หลอดพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 20 มล. เติม Extraction buffer (ภาคผนวก ค3) 5 มล. ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ จนเกิดสารผสมลักษณะหนืด แบ่งใส่หลอดไมโครพิวจ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ค6) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ จนสารในหลอดเกิดเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง ถ่ายเฉพาะส่วนใสที่อยู่เหนือตะกอนเหนือชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม ใส่หลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ ระวังอย่าให้ติดส่วนที่เป็นตะกอน จากนั้นเติม Ribonuclease A ความเข้มข้น 20 มก.ต่อมล. (ภาคผนวก ค7) ปริมาตร 0.05 เท่าของส่วนใส นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาทีเมื่อครบตามเวลา เติม ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม โดยเติมเท่ากับปริมาตรของสารในหลอดไมโครพิวจ์ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ จนสารในหลอดเกิดเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนใสที่อยู่เหนือตะกอนเหนือชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม ใส่หลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ สกัดซ้ำด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม ซ้ำอีก 1 ครั้ง ตามวิธีของ (Sambrook และ Russel, 2001) นำส่วนใสที่อยู่ในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่มาตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมสารละลายโซเดียมแอสซิเตต ความเป็นกรด-เบส 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ค8) ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส และเอทานอลสัมบูรณ์ที่เย็นจัด ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมาจนสังเกตเห็นตะกอนขาวของดีเอ็นเอ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เทส่วนใสของโซเดียมแอสซิเตตและเอทานอลสัมบูรณ์ทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอลเย็น ปริมาตร 1 มล. ปั่นล้างตะกอนที่ความเร็ว 9700 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาทีค่อย ๆ เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง กำจัดเอทานอลที่ตกค้างโดยนำตะกอนดีเอ็นเอไประเหยจนแห้งสนิท จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ค9) ในปริมาตรที่เหมาะสมโดยขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้

3.5.12.3 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.5.12.2 มาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตร คำนวณค่า A_{260}/A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 หากค่า A_{260}/A_{280} น้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามี การปนเปื้อนจากโปรตีนสูง หากค่า A_{260}/A_{280} มากกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

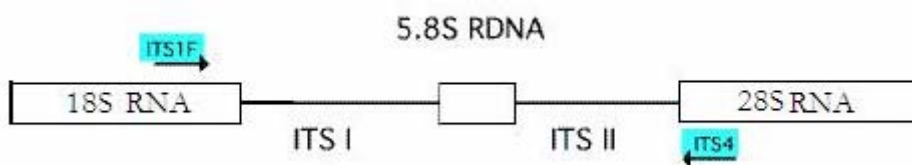
$$\text{ปริมาณดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมล.)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.5.12.4 การวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.5.12.2 มาตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยหลอมอะกาโรสเข้มข้น 1% ในบัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า (ภาคผนวก ค10) ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่น จากนั้นเทลงในแบบพิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มี ฟองอากาศเกิดขึ้น ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 30 นาที นำอะกาโรสเจลที่พร้อมใช้งานใส่ ใน chamber ของเครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เท TAE บัฟเฟอร์ให้สูงกว่าเจลเล็กน้อย ผสม สารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ค11) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ความเข้มข้น ของสีติดตามเป็น 1 เท่า หยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp DNA ladder และดีเอ็นเอที่ต้องการ ตรวจสอบลงในช่องวิ่ง จากนั้นประกอบชุดเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส Mupid-2 รันเจลโดยใช้ความต่าง ศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนลงมาจนเกือบสุดขอบเจลอีกด้าน หนึ่ง ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมล.(ภาคผนวก ค12) นาน 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation โปรแกรม Quality One เวอร์ชัน 4.4.1 (Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.5.12.5 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

นำโครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.5.12.2 มาเป็นแม่แบบในการเพิ่ม ปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ universal internal transcribed spacer ได้แก่ คู่ ITS1-F (ฟอร์เวิร์ด) และ ITS4 (รีเวิร์ส) ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนที่แสดงบริเวณ 5.8 S RDNA และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา (ปรับปรุงจาก http://www.lutzonilab.net/image/p_LSU-SSU-ITS_primers.gif)

ส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นดังนี้

- 10x Taq DNA polymerase buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1x Taq DNA polymerase buffer)	5 ไมโครลิตร
- สารละลาย ITS1-F (ฟอร์เวิร์ด) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- สารละลาย ITS4 (รีเวิร์ส) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้นแต่ละชนิด 10 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.8 มิลลิโมลาร์)	4 ไมโครลิตร
- สารละลาย MgCl ₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์	ความเข้มข้นที่เหมาะสม
- เอนไซม์ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 หน่วย)	0.5 ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.5.10.2 (ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 50 นาโนกรัม)	2 ไมโครลิตร
- น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

Hot Start	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ	เป็นเวลา	5 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ	เป็นเวลา	1 นาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 50 °ซ	เป็นเวลา	1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา	2 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา	10 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal cycle, Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 3.5.12.4 แต่ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานเป็น 1kb ladder

3.5.12.6 การทำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR clean-up Gel Extraction

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในข้อ 3.5.12.5 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR clean-up Gel Extraction ของบริษัท Macherey-Nagel GmbH & Co., ประเทศเยอรมัน (ภาคผนวก จ1) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ เติมน้ำบัฟเฟอร์ NT ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรตัวอย่างที่นำมาทำให้บริสุทธิ์ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับลดไปมา จากนั้นถ่ายลงใน NucleoSpin® Extract II column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11000 xg ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11000 xg ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง หมุนเหวี่ยงนาน 2 นาทีซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ NT ที่ตกค้าง จากนั้นย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 25-50 ไมโครลิตร ตรงบริเวณกลางแผ่นเมมเบรน ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11000 xg ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำส่วนน้ำใสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสบริสุทธิ์มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ

3.5.12.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่คัดเลือก

นำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่คัดเลือก

3.5.13 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแลคเคสในระหว่างการย่อยฟลูออรีน โดยราที่คัดเลือกด้วยวิธี RT-PCR

3.5.13.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อเตรียมสกัดอาร์เอ็นเอ

เลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมฟลูออรีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร ตามวิธีข้อ 3.5.4 เก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์ต่อเนื่องนาน 4 สัปดาห์ ปริมาตร 50 มล.นำตัวอย่างมาแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 10000 xg นาน 15 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง นำตะกอนเซลล์ไปแช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วนำไปไลโอไฟล์เพื่อให้เส้นใยแห้งสนิท เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ

3.5.13.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ

นำเซลล์แห้งจากข้อ 3.5.13.1 มาสกัดด้วยชุดสกัด Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา (ภาคผนวก จ2) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ นำเส้นใยที่ผ่านการไลโอไฟไลซ์แล้วจากข้อ 3.5.13.1 ประมาณ 100 มก. ใส่ในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติมนิโตรเจนเหลวลงในโกร่ง บดเส้นใยราให้เป็นผงละเอียด ถ่ายเส้นใยละเอียดใส่หลอดไมโครพิวจ์ขนาด 2 มล. เติม PureZOL ปริมาตร 1 มล. ปั่นผสมสารละลายกับเซลล์ด้วยเครื่องปั่นผสมนาน 30-60 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาทีก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เพื่อช่วยกำจัดเศษเซลล์ที่ไม่ละลายออกไป ถ่ายส่วนใสลงในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ เติมหอโรฟอร์ม 0.2 มล. เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน 15 วินาที (ขั้นตอนนี้ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาทีก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงสารจะแยกออกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นบนสุดมีลักษณะใส ไม่มีสี ซึ่งเป็นชั้นที่มีอาร์เอ็นเออยู่ ส่วนชั้นกลางมีลักษณะสีขาวและชั้นล่างสุดมีลักษณะเป็นของเหลวสีแดงซึ่งมีดีเอ็นเอและโปรตีนอยู่ ถ่ายส่วนใสชั้นบนสุดใส่หลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ทันที เติม 70% เอทานอล ปริมาตรเท่ากับปริมาตรส่วนใสที่ดูดออกมา (ประมาณ 600 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง จากนั้นถ่ายลงใน RNA Binding column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 xg ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง ล้างเมมเบรนด้วย Low-stringency wash solution 700 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14000 xg ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วินาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง กำจัดดีเอ็นเอที่ตกค้างอยู่โดยการเติม DNase I ปริมาตร 80 ไมโครลิตร (ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต) ลงไปที่กึ่งกลางแผ่นเมมเบรน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาทีก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 30 วินาที ล้างเมมเบรนด้วย High stringency wash solution 700 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 xg ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วินาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง หมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งนาน 2 นาทีเพื่อกำจัด High-stringency wash solution ที่เหลืออยู่ออกให้หมด จากนั้นย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ เติมหอโรฟอร์ม ปริมาตร 30-40 ไมโครลิตร ตรงบริเวณกึ่งกลางแผ่นเมมเบรน ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 xg ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที เพื่อชะอาร์เอ็นเอออกจากแผ่นเมมเบรน นำส่วนน้ำใสซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 °C เพื่อใช้สังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อไป

3.5.13.3 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ

นำสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.5.11.2 มาตรวจสอบปริมาณอาร์เอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตร คำนวณค่า A_{260}/A_{280}

คำนวณหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอจากสมการ

$$\text{ปริมาณอาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมล.)} = A_{260} \times 40 \times \text{dilution factor}$$

3.5.13.4 การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธีฟอร์มาลดีไฮด์ อะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.5.13.2 มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีฟอร์มาลดีไฮด์อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Formaldehyde Agarose Gel Electrophoresis) (Bryant และ Manning, 1988) โดยมีวิธีการดังนี้

3.5.13.4.1 การเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอสำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธีฟอร์มาลดีไฮด์ อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.5.13.2 ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม มาทำให้แห้งด้วยเครื่อง speed vacuum จนสารละลายอาร์เอ็นเอแห้ง เติม running buffer (ภาคผนวก ค20) 20 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด ผสมโดยการเคาะกันหลอด จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C ด้วยเครื่อง heat block นาน 10 นาที

3.5.13.4.2 การเตรียมฟอร์มาลดีไฮด์อะกาโรสเจล

ชั่งอะกาโรส 0.9 กรัม ใส่ในขวดฝาเกลียวขนาด 100 มล. เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่มี DEPC ผสมอยู่ (ภาคผนวก ค18) ปริมาตร 44.5 มล. บันทึกน้ำหนักขวดที่มีอะกาโรสและน้ำอยู่ หลอมอะกาโรสให้ละลายและชั่งน้ำหนักขวดซ้ำ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่มี DEPC ผสมอยู่ ให้น้ำหนักขวดรวมสารละลายเท่ากับน้ำหนักเดิมก่อนนำอะกาโรสไปหลอม ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสอุ่น ระหว่างนี้เตรียมส่วนผสมของ MOPS และฟอร์มาลดีไฮด์ โดยผสม 10x MOPS buffer (ภาคผนวก ค19) ปริมาตร 6 มล. กับฟอร์มาลดีไฮด์ปริมาตร 9.8 มล. เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำลงในอะกาโรสที่หลอมแล้ว จากนั้นเทลงในแบบพิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น ปล่อยให้ฟอร์มาลดีไฮด์อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง นำฟอร์มาลดีไฮด์อะกาโรสเจลที่พร้อมใช้งานใส่ใน chamber ของเครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เท MOPS buffer ความเข้มข้น 1 เท่าลงใน chamber ให้สูงกว่าเจลเล็กน้อย หยอดตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 3.5.11.4.1 ลงในช่องตัวอย่าง และหยอดน้ำกลั่นผสม loading dye ลงในช่องตัวอย่างอีก 1 ช่อง จากนั้นประกอบชุดเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส รันเจลโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนลงมาจนเกือบสุดขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ตรวจสอบแถบอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation (Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.5.13.5 การสังเคราะห์สาย cDNA

สังเคราะห์สาย cDNA จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.5.13.2 ด้วยชุดสำเร็จ Universal RiboClone® cDNA Synthesis System ของบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา (ภาคผนวก จ3) ตามวิธีที่แนะนำโดยผู้ผลิตดังนี้

3.5.13.5.1 การสังเคราะห์ cDNA สายแรก

นำอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม มาเติม Oligo(dT) Primer ความเข้มข้น 0.5 มก.ต่อมล. ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 15 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปลอดนิวคลีเอส บ่มที่อุณหภูมิ 70°ซ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ นาน 5-10 นาที จากนั้นทำให้เย็นบนน้ำแข็งนาน 5 นาที เติม First Strand 5X บัฟเฟอร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ RNasin® Ribonuclease Inhibitor 40 หน่วย บ่มที่อุณหภูมิ 42°ซ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ นาน 3-5 นาที จากนั้นเติมโซเดียมไพโรฟอสเฟตความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และ AMV Reverse Transcriptase 30 หน่วย ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 25 ไมโครลิตรด้วยน้ำปลอดนิวคลีเอส บ่มหลอดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42°ซ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ นาน 60 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำหลอดปฏิกิริยาวางบนน้ำแข็ง เติม EDTA 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 95 ไมโครลิตร เก็บรักษาที่เย็นเพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายที่สองต่อไป

3.5.13.5.2 การสังเคราะห์ cDNA เส้นที่สอง

นำสาย cDNA เส้นแรกที่ได้จากการสังเคราะห์ในข้อ 3.5.13.5.1 มาสังเคราะห์สาย cDNA เส้นที่สองด้วยชุดสำเร็จตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตโดยในหลอดปฏิกิริยาประกอบด้วย

cDNA เส้นแรก	20	ไมโครลิตร
Second Strand 2.5X บัฟเฟอร์	40	ไมโครลิตร
Acetylated BSA ความเข้มข้น 1 มก.ต่อมล.	5	ไมโครลิตร
DNA Polymerase I	23	หน่วย
RNaseH	0.8	หน่วย
ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดนิวคลีเอสให้ได้	100	ไมโครลิตร

บ่มหลอดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 14°ซ นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วย้ายหลอดปฏิกิริยามาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70°ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำหลอดปฏิกิริยามาแช่บนน้ำแข็ง เติม T4 DNA Polymerase ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2 หน่วยต่อไมโครกรัมของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 200 มิลลิโมลาร์ EDTA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และนำหลอดปฏิกิริยามาแช่บนน้ำแข็ง จากนั้นสกัด

cDNA โดยเติมฟีนอล:คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ปริมาตรเท่ากับปริมาตรสารในหลอดปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ที่ความเร็วสูงสุด นาน 2 นาที ถ่ายส่วนใสชั้นบนสุดใส่หลอดไมโครพิวเจอร์หลอดใหม่ เติม 2.5 โมลาร์ โซเดียมแอสซิเตต ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารทั้งหมด และเอทานอลสัมบูรณ์ที่เย็นจัด ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ผสมสารให้เข้ากัน โดยกลับหลอดไป จากนั้นนำหลอดไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -70°C นาน 30 นาที ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 $\times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที เทส่วนใสของโซเดียมแอสซิเตตและเอทานอลสัมบูรณ์ทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเย็น 70% ปริมาตร 1 มล. ปั่นล้างตะกอนที่ความเร็ว 9700 $\times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที ค่อย ๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง กำจัดเอทานอลที่ตกค้างโดยนำตะกอนดีเอ็นเอไประเหยจนแห้งสนิท จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ค9) ในปริมาตรที่เหมาะสม โดยขึ้นอยู่กับปริมาณ cDNA ที่สกัดได้ เก็บรักษา cDNA ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้

3.5.13.6 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแลคเคสและยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (*gdp*) เพื่อใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR

3.5.13.6.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแลคเคส

จากการวิเคราะห์ลำดับของแลคเคสยีนของราทั้งหมดที่มีรายงานไว้ พบว่ายีนแลคเคสในกลุ่มของรามีความเหมือนกันของลำดับค่อนข้างต่ำ ยกเว้นบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ไว้สูง (Salony และคณะ, 2008) หนึ่งในไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณที่อนุรักษ์สูงนี้คือไพรเมอร์ *Plac-F* และ *Plac-R* ที่จำเพาะต่อยีนแลคเคสของ *Pleurotus* (Soden และ Dobson, 2001) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในตารางที่ 3.1 ได้ถูกเลือกเพื่อนำมาใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีนแลคเคสจากราในการทดลองนี้

3.5.13.6.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gdp*

สำหรับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gdp* นั้นเลือกใช้ไพรเมอร์ *gdp-F* และ *gdp-R* ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อราหลายชนิด เช่น *P. chrysosporium* ตามรายงานของ Bogan และคณะ (1996) และรายงานของ Gettemy และคณะ (1998) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 มาใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป

3.5.13.6.3 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนแลคเคสและ *gdp* ของราที่คัดเลือก

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของราที่คัดเลือกมาเป็นแม่แบบเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนแลคเคส และยีน *gdp* ของราที่คัดเลือก โดยใช้คู่มือตามข้อ 3.5.13.6.1 และ 3.5.13.6.2 ส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีดังนี้

- 10x Taq DNA polymerase buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1x Taq DNA polymerase buffer)	5 ไมโครลิตร
- สารละลายฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- สารละลายรีเวิร์สไพรเมอร์ ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้นแต่ละชนิด 10 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.8 มิลลิโมลาร์)	4 ไมโครลิตร
- สารละลาย MgCl ₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 4.5 มิลลิโมลาร์)	9 ไมโครลิตร
- เอนไซม์ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 หน่วย)	0.5 ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.5.10.2 (ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 50 นาโนกรัม)	2 ไมโครลิตร
- น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	27.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

Hot Start	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ	เป็นเวลา	5 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ	เป็นเวลา	1 นาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิเหมาะสม	เป็นเวลา	1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา	2 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา	10 นาที	

อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับแอลนีลด้วยไพรเมอร์คู่ *Plac-F* และ *Plac-R* คือที่อุณหภูมิ 51°ซ และอุณหภูมิ 55°ซ สำหรับไพรเมอร์คู่ *gdp-F* และ *gdp-R*

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal cycle, Perkin Elmer, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 3.5.12.7 เนื่องจากผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในขั้นตอนนี้มีหลายแบบ จึงต้องนำจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล

3.5.13.7 การทำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit

สกัดผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์ของชิ้นยืนแลคเคส และ ยีน *gdp* ออกจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (ของบริษัท Qiagen ประเทศเยอรมัน) (ภาคผนวก จ4) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดชิ้นอะกาโรส เจลให้ครอบคลุมแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักร้อยละของอะกาโรส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°ซ นาน 10 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด จากนั้นเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักร้อยละของอะกาโรส เจล ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา จากนั้นถ่ายสารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 17900 xg นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง ล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 17900 xg นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง ก่อนหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ PE ที่ตกค้าง จากนั้นย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 25-50 ไมโครลิตร ตรงบริเวณกลางแผ่นเมมเบรน ตั้งทิ้งไว้ นาน 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 17900 xg ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำส่วนน้ำใส่ทิ้ง เป็นผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์บริสุทธิ์มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ

3.5.13.8 การโคลนผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์

3.5.13.8.1 การไลเกต (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์จากข้อ 3.5.13.7 มีบริเวณปลายยื่นเป็น A-overhang จึงต้องทำให้ปลายของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เป็นปลายทู่ (blunt end) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ DNA blunting enzyme (GeneJET™ PCR cloning Kit ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา) (ภาคผนวก จ5) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

2x Reaction buffer	10 ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์ จากข้อ 3.5.11.6	2 ไมโครลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น	17 ไมโครลิตร
DNA blunting enzyme	1 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	18 ไมโครลิตร

นำหลอดปฏิกิริยาไปปั่นผสมเบา ๆ ด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 3-5 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 70°ซ นาน 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำหลอดปฏิกิริยาไปแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 1 นาที ไลเกตชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pJET1/blunt Cloning Vector

(GeneJET™ PCR cloning Kit ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา) (ภาคผนวก จ5) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

ซินดีเอ็นเอที่เตรียมได้	18 ไมโครลิตร
pJET1/blunt Cloning Vector ประมาณ 50 นาโนกรัม	1 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	20 ไมโครลิตร

นำหลอดปฏิกิริยาไปปั่นผสมเบาๆ ด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 3-5 วินาที บ่มที่ อุณหภูมิ 22 °ซ เป็นเวลา 30 นาที

3.5.13.8.2 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell) ของ *E. coli* DH5 α

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ด้วยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook และ Russel (2001) โดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5 α ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ข6) ปริมาตร 5 มล. นำไปบ่มเขย่าข้ามคืน (16 -18 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 37°ซ เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อไปยัง Arm flask ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 มล. นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่ง OD₅₅₀ เท่ากับ 0.5

ระหว่างที่รอการเจริญของเชื้อ ให้เตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (เตรียมก่อนใช้และทุกขั้นตอนทำในอ่างน้ำแข็ง) ดังนี้ ผสมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็น ปริมาตร 450 มล. เข้ากับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข16) ปริมาตร 50 มล. ในพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แช่ในอ่างน้ำแข็งก่อนจะใช้ จากนั้นเตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ผสมกลีเซอรอล 80% โดยแบ่งสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 44.4 มล. เดิมกลีเซอรอลปลอดเชื้อความเข้มข้น 80% ปริมาตร 5.6 มล. เขย่าผสมสารให้เข้ากัน แช่ในอ่างน้ำแข็งก่อนใช้งาน

เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า OD₅₅₀ ที่ต้องการแล้ว นำพลาสติกไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนติฟิวจ์ปลอดเชื้อปริมาตร 250 มล. ที่แช่เย็น 2 หลอด นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 4000 xg เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง ตั้งแต่ขั้นตอนนี้เป็นต้นไปต้องทำที่อุณหภูมิ 4°ซ โดยนำตะกอนเซลล์ไปปั่นผสมโดยใช้เครื่องปั่นผสมเพื่อกระจายตะกอนเซลล์ที่ติดอยู่ที่ก้นหลอดเซนติฟิวจ์ รวมตะกอนเซลล์จากหลอดเซนติฟิวจ์ 2 หลอดเข้าด้วยกัน เดิมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เย็น ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 125 มล. แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 4 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 4000 xg เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง นำตะกอนเซลล์ไปปั่นผสมโดยใช้เครื่องปั่นผสม

เพื่อกระจายตะกอนเซลล์ที่ติดอยู่ที่ก้นหลอดเซนติฟิวจ์ จากนั้นเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่ผสมกลีเซอรอล 80% ปริมาตร 15 มล. ผสมให้เข้ากันเบาๆ แบ่งคอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมได้ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่แช่เย็น หลอดละ 200 มล. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70°C

3.5.13.8.3 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าคอมพีเทนต์เซลล์

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.5.13.8.1 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock (Sambrooke และ Russell, 2001) ดังนี้ นำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 α ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C มาแช่ในอ่างน้ำแข็ง ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกตไว้ในข้อ 3.5.11.8.1 ทั้งหมดลงในหลอดคอมพีเทนต์เซลล์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปบ่มที่ในอ่างน้ำแข็งอย่างน้อย 30 นาที จากนั้น heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลาย้ายหลอดปฏิกิริยาลงในอ่างน้ำแข็งทันที บ่มในอ่างน้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 1 มล. ลงในหลอดปฏิกิริยา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง นำไปหมუნเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 4000 $\times\text{g}$ เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อเต็มทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ใหม่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดปฏิกิริยา

3.5.13.8.4 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนต์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

เนื่องจากในพลาสมิด pJET1 มีบริเวณ *eco47IR* ที่เป็น lethal gene มีความสามารถในการสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ หาก *E. coli* DH5 α ได้รับพลาสมิด pJET1 ที่ไม่มีชิ้นสอดแทรกซึ่งจะมีการแสดงออกของ *eco47IR* ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญได้นอกจากนี้ ใน pJET1 ยังมีบริเวณ *bla*(Ap^R) ซึ่งเป็น β -lactamase gene ที่ช่วยให้เซลล์ *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด pJET1 สามารถทนต่อแอมพิซิลลินที่ผสมใน LB ได้ ส่วนเซลล์ *E. coli* DH5 α ที่ไม่มีพลาสมิด pJET1 ไม่สามารถทนต่อแอมพิซิลลิน สมบัติของพลาสมิด pJET1 ทั้งหมดแสดงไว้ในภาคผนวกที่ จ5

คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนต์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการโดยนำสารแขวนลอยของ *E. coli* DH5 α ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ตามข้อ 3.5.13.8.3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมล. (ภาคผนวก ค15) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C สังเกตการเจริญของเชื้อภายใน 16-18 ชั่วโมง แยกโคโลนีที่เจริญมาทำให้บริสุทธิ์โดยขีดเชื้อลงในอาหารชนิดเดิมบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวแล้ว นำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มล. ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเซลล์ 1 มล. ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ หมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 97000 $\times\text{g}$ นาน 2

นาที่ ที่อุณหภูมิ ห้องเทส่วนน้ำใสออก เติมเซลล์เพิ่มในหลอดเดิมอีก 1 มล. ปั่นเก็บเซลล์อีกครั้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปใช้ในการสกัดพลาสมิด

3.5.13.8.5 การสกัดพลาสมิด

นำเซลล์จากข้อ 3.5.13.8.4 มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Miniprep Kit (ของบริษัท Qiagen ประเทศเยอรมัน) (ภาคผนวก จ6) ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ เติมบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตรลงในหลอดปฏิกิริยาผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนเกิดตะกอนขาว นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 17900 xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 17900 xg ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 17900 xg ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 17900 xg ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งและหมุนเหวี่ยงในภาวะเดิมซ้ำอีกครั้ง เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ PE ที่ตกค้าง ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 30-50 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที นำสารละลายพลาสมิดที่อยู่ในส่วนน้ำใสมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ

3.5.13.8.6 การยืนยันผลของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

นำพลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 3.5.13.8.5 มาเป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ เพื่อยืนยันผล โดยมีส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ดังนี้

- | | |
|---|-------------|
| - 10x Taq DNA polymerase buffer
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1x Taq DNA polymerase buffer) | 5 ไมโครลิตร |
| - สารละลายฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์) | 1 ไมโครลิตร |
| - สารละลายรีเวิร์สไพรเมอร์ ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์) | 1 ไมโครลิตร |
| - สารละลาย dNTP ความเข้มข้นแต่ละชนิด 10 มิลลิโมลาร์
(ความเข้มข้นสุดท้าย 0.8 มิลลิโมลาร์) | 4 ไมโครลิตร |
| - สารละลาย MgCl ₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์
(ความเข้มข้นสุดท้าย 4.5 มิลลิโมลาร์) | 9 ไมโครลิตร |

- เอนไซม์ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร 0.5 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 หน่วย)
- ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.5.10.2 2 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 50 นาโนกรัม)
- น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 27.5 ไมโครลิตร
- ปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาสำหรับตรวจสอบยีนแลคเคส ได้แก่คู่มือที่ 1-3 และสำหรับยีน *gdp* ได้แก่คู่มือที่ 4-6

คู่มือที่ 1

- สารละลาย *Plac-F* (ฟอร์เวิร์ด) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)
- สารละลาย *Plac-R* (รีเวิร์ส) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)

คู่มือที่ 2

- สารละลาย *Plac-F* (ฟอร์เวิร์ด) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)
- สารละลาย *pJET-R* (รีเวิร์ส) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)

คู่มือที่ 3

- สารละลาย *pJET-F* (ฟอร์เวิร์ด) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)
- สารละลาย *Plac-R* (รีเวิร์ส) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)

คู่มือที่ 4

- สารละลาย *gdp-F* (ฟอร์เวิร์ด) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)
- สารละลาย *gdp-R* (รีเวิร์ส) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)

คู่มือที่ 5

- สารละลาย *gdp-F* (ฟอร์เวิร์ด) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)
- สารละลาย *pJET-R* (รีเวิร์ส) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)

คู่มือ 6

- สารละลาย pJET-F (ฟอร์เวิร์ด) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)
- สารละลาย *gdp*-R (รีเวิร์ส) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

Hot Start	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ	เป็นเวลา	5 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ	เป็นเวลา	1 นาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิเหมาะสม	เป็นเวลา	1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา	2 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา	10 นาที	

อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับการแอลนีย์ลด้วยไพรเมอร์คู่มือที่ 1-3 คือที่อุณหภูมิ 51°ซ และอุณหภูมิ 55°ซ สำหรับไพรเมอร์คู่มือที่ 4-6 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ตามวิธีในข้อ 3.5.12.4

3.5.13.8.7 การตรวจสอบทิศทางการเข้าของชิ้นดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้ในข้อ 3.5.13.8.5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *SaI* (Fermentas, ประเทศสหรัฐอเมริกา) อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้

- ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.5.13.8.5 5 ไมโครลิตร
- 10x บัฟเฟอร์ O 1.5 ไมโครลิตร
- เอนไซม์ *SaI* 1 ไมโครลิตร
- น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 7.5 ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมในหลอดปฏิกิริยาให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ตรวจสอบรูปแบบพลาสมิดที่ตัดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ตามวิธีในข้อ 3.5.12.4

3.5.13.8.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนแลคเคสและยีน *gdp* ที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นแลคเคสและยีน *gdp* ที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในข้อ 3.5.13.8.5 โดยใช้บริการของบริษัท 1st Base (ประเทศมาเลเซีย) นำ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของชิ้นส่วนยีนทั้ง 2 ยีน ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN และ BlastX เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

3.5.13.9 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแลคเคสและยีน *gdp* ของราที่คัดเลือกสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR

ออกแบบนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแลคเคสและยีน *gdp* ของราที่คัดเลือกโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 3.5.13.8.8 ตั้งชื่อว่า *lacF-1* และ *lacR-2* สำหรับยีนแลคเคสและ *gdpAaege474-F* และ *gdpAaege755-R* สำหรับยีน *gdp*

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของราจากข้อ 3.5.12.2 มาเป็นแม่แบบในปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์คู่ *lac F-1* และ *lac R-2* สำหรับยีนแลคเคส และ *gdp Aaege474-F* และ *gdpAaege755-R* สำหรับยีน *gdp* โดยใช้ส่วนผสมและภาวะในการทดสอบตั้งข้อ 3.5.13.8.6 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีในข้อ 3.5.12.4 ทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 3.5.13.7 และส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามรายละเอียดในข้อ 3.5.13.8.8 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของชิ้นส่วนยีนที่ได้ทั้ง 2 ยีนไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN จากการทดสอบพบว่าไพรเมอร์คู่ *lac F-1* และ *lac R-2* มีความจำเพาะต่อยีนแลคเคสและคู่ *gdpAaege474-F* *gdpAaege755-R* มีความจำเพาะต่อยีน *gdp* ของราที่คัดเลือก จึงใช้ไพรเมอร์ 2 คู่นี้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ต่อไป

3.5.13.10 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR

นำ cDNA ของราที่คัดเลือกในแต่ละช่วงของการย่อยฟลูออรีน จากข้อ 3.5.13.5.2 มาเป็นแม่แบบในปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์คู่ *lacF-1* และ *lacR-2* สำหรับยีนแลคเคส และไพรเมอร์คู่ *gdpAaege474-F* *gdpAaege755-R* สำหรับยีน *gdp* โดยใช้ส่วนผสมตั้งข้อ 3.5.13.8.6

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับยีน *gdp* เป็นดังนี้

Hot Start	ที่อุณหภูมิ 94°ซ	เป็นเวลา	5 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°ซ	เป็นเวลา	1 นาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55°ซ	เป็นเวลา	1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72°ซ	เป็นเวลา	2 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72°ซ	เป็นเวลา	10 นาที	

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันสำหรับยีนแลคเคส เป็นดังนี้

Hot Start	ที่อุณหภูมิ 94°ซ	เป็นเวลา	1	นาที
7 รอบ ที่	อุณหภูมิ 94°ซ	เป็นเวลา	2	วินาที
	อุณหภูมิ 70°ซ	เป็นเวลา	3	นาที
32 รอบ ที่	อุณหภูมิ 94°ซ	เป็นเวลา	2	วินาที
	อุณหภูมิ 69°ซ	เป็นเวลา	3	นาที
Final extension	ที่อุณหภูมิ 67°ซ	เป็นเวลา	4	นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 3.5.12.4 ทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากไพรเมอร์ *lacF-1* และ *lacR-2* ให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 3.5.13.7 และส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามรายละเอียดในข้อ 3.5.13.8.8 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของชิ้นส่วนยีนที่ได้ทั้ง 2 ยีนไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN และ BlastX

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

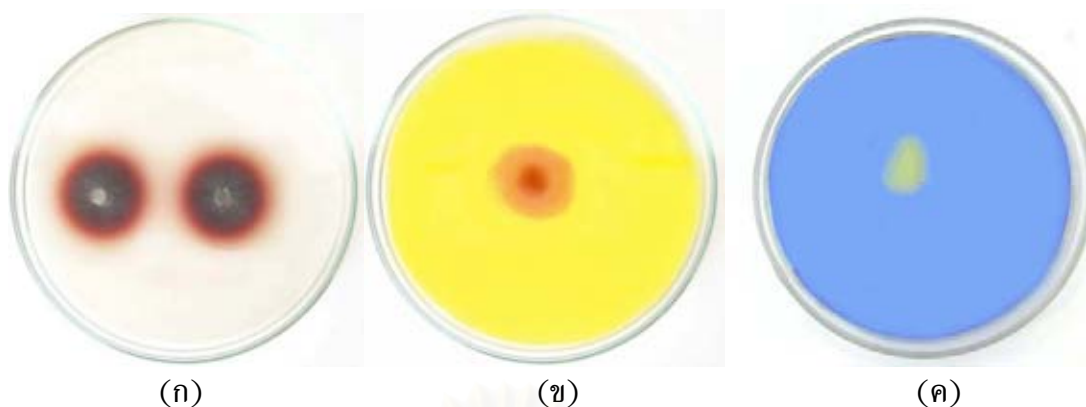
ผลการวิจัย

4.1 ตัวอย่างราและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

จากการเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย โดยภาคกลางเก็บตัวอย่างที่ จังหวัดกรุงเทพมหานคร นนทบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ส่วนภาค ตะวันตกเก็บตัวอย่างที่จังหวัดกาญจนบุรี ภาคตะวันออก เก็บตัวอย่างที่จังหวัดระยอง ชลบุรี ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ เก็บตัวอย่างที่จังหวัดนครราชสีมา และภาคใต้เก็บตัวอย่างที่จังหวัดสงขลา ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง แบ่งเป็นประเภทต่าง ๆ ดังนี้ ดอกเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติ (fungal fruiting body) จำนวน 87 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากกิ่งไม้ เศษไม้ผุ จำนวน 27 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ซื้อจาก แหล่งจำหน่ายหรือแหล่งเพาะพันธุ์เห็ด จำนวน 37 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีการ เพาะเลี้ยงเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA พบว่าเส้นใยราส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิห้อง สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 153 ไอโซเลต

4.2 การคัดกรองราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน

เมื่อนำไอโซเลตทั้งหมดจากข้อ 4.1 มาเพาะบนอาหาร Basal Medium ที่ผสมสี ทดสอบชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ไกวเคอลสำหรับใช้คัดกรองราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ แลคเคส (Kiiskinen และคณะ, 2004) phenol red สำหรับใช้คัดกรองราที่มีความสามารถในการ สร้างเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (Kuwahara และคณะ, 1984) และ azure B สำหรับใช้คัด กรองราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (Archibald, 1992) พบว่า หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน พบการเปลี่ยนแปลงของสีทดสอบได้ตามรูปที่ 4.1 และ ให้ผลการทดสอบของเชื้อทั้ง 153 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางแสดงความกว้างของการเปลี่ยนสี รอบโคโลนีภาคผนวกที่ ก1



รูปที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสีทดสอบชนิดต่างๆ
(ก) ไกวเอคอลล (ข) phenol red และ (ค) azure B

จากตารางแสดงความกว้างของการเปลี่ยนสีรอบโคโลนี (ภาคผนวกที่ ก1) ในการเปลี่ยนสีทดสอบไกวเอคอลล phenol red และ azure B สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อออกเป็น 5 กลุ่มตามตารางที่ 4.1 ซึ่งแสดงความสามารถของเชื้อที่เกิดปฏิกิริยากับสีทดสอบ จากตารางที่ 4.1 จะเห็นว่าวาระที่แยกได้ส่วนใหญ่ไม่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีทดสอบหรือเปลี่ยนสีทดสอบได้เพียง 1 ชนิดเท่านั้น มีเพียง 14 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีของสารทดสอบตั้งแต่ 2 ชนิดหรือมากกว่า ซึ่งเป็นกลุ่มที่อาจจะผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินได้มากกว่า 1 ชนิด ได้แก่ ไอโซเลตในกลุ่มที่ 3 4 และ 5 หรือคิดเป็น 9.2% ของไอโซเลตทั้งหมด จึงนำเอาไอโซเลตทั้ง 3 กลุ่ม มาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี PAH ผสมอยู่ต่อไป สำหรับแนวโน้มในการผลิตเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และลิกนินเพอร์ออกซิเดสของราไอโซเลตต่างๆ แสดงในตารางที่ 4.2 และรูปของ 14 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีของสารทดสอบตั้งแต่ 2 ชนิดหรือมากกว่าแสดงในรูปที่ ก1 (ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 4.1 กลุ่มความสามารถของเชื้อที่เกิดปฏิกิริยากับสีทดสอบ

กลุ่ม	ผลต่อชนิดของสีทดสอบ			จำนวนไอโซเลต	
	ไกวเอคอลล	azure B	phenol red	จำนวน	(%)
1	-	-	-	76	49.7%
2	+	-	-	63	41.1%
3	+	-	+	7	4.6%
4	+	+	-	4	2.6%
5	+	+	+	3	2.0%

ตารางที่ 4.2 แนวโน้มในการผลิตเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกไซด์(MnP) และ ลิกนินเพอร์ออกไซด์(LiP) ของราไอโซเลตต่าง ๆ

ไอโซเลต	ชื่อสามัญ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	แนวโน้มในการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ ¹		
			แลคเคส	MnP	LiP
CU-1		กิ่งไม้จากเขาใหญ่ จ.นครราชสีมา	+ ²	+	+
CU-6	เห็ดเป่าฮื้อ	ตลาดสามย่าน กทม.	+	- ³	+
CU-8	เห็ดขอนขาว	ศูนย์รวมเห็ด บ้านอรัญญิก จ. นครปฐม	+	+	-
CU-29		ตัวอย่างดอกเห็ด จาก กทม.	+	+	-
CU-43	เห็ดยานาหิ	ศูนย์รวมเห็ด บ้านอรัญญิก จ. นครปฐม	+	+	+
CU-62	เห็ดหอมจีน	ตลาดสามย่าน กทม.	+	+	+
CU-86		กิ่งไม้ จาก กทม.	+	+	-
CU-99	เห็ดตีนแรด	ศูนย์รวมเห็ด บ้านอรัญญิก จ. นครปฐม	+	-	+
CU-102		ตัวอย่างดอกเห็ดจาก จ. สงขลา	+	-	+
CU-112		ตัวอย่างกิ่งไม้จาก จ.สงขลา	+	+	-
CU-113		ตัวอย่างดอกเห็ดจาก กทม.	+	+	-
CU-116	เห็ดนางฟ้า	ศูนย์รวมเห็ด บ้านอรัญญิก จ. นครปฐม	+	+	-
CU-118	เห็ดภูฐาน	ศูนย์รวมเห็ด บ้านอรัญญิก จ. นครปฐม	+	+	-
CU-120		ตัวอย่างดอกเห็ดจาก กทม.	+	-	+

หมายเหตุ

1. แนวโน้มในการผลิตเอนไซม์ที่ตรวจหา ทดสอบโดยได้โดยแลคเคสทดสอบกับไกวเอคอลล แมงกานีสเพอร์ออกไซด์ทดสอบกับ phenol red และลิกนินเพอร์ออกไซด์ทดสอบกับ azure B
2. + หมายถึง แสดงความสามารถในการผลิตเอนไซม์
3. - หมายถึง ไม่แสดงความสามารถในการผลิตเอนไซม์

4.3 การทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม PAH

แม้ว่าไอโซเลตที่นำมาทดสอบในขั้นตอนนี้ จะแสดงความสามารถในการผลิต เอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินได้มากกว่า 1 เอนไซม์ แต่ PAH ก็อาจจะมีผลต่อการเจริญหรือเป็น พิษต่อเซลล์ จึงต้องทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี PAH ชนิด ต่าง ๆ ผสมอยู่ในแต่ละจานที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร โดยทดสอบทั้งตัวแทนของ PAH ทั้ง ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ ฟลูออรีน แอนทราซีน พีแนนทริน และตัวแทนของ PAH ที่มี น้ำหนักโมเลกุลสูง ได้แก่ ฟลูออแรนทริน และไพรีน จากการทดลองกับ 14 ไอโซเลต ได้ผลดัง

แสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2 ซึ่งพบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลตที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี PAH แต่ละชนิดผสมอยู่ ได้แก่ ไอโซเลต CU-1 CU-43 และ CU-62 แต่เนื่องจากไอโซเลต CU-62 มีการเจริญดีมาก จึงคัดเลือกเฉพาะไอโซเลต CU-1 และ CU-43 ซึ่งแสดงความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินได้หลายชนิดและสามารถเจริญบน Basal medium ที่ผสม PAH ได้ดีที่สุด ไปทดสอบการย่อย PAH ในอาหารเหลวต่อไป

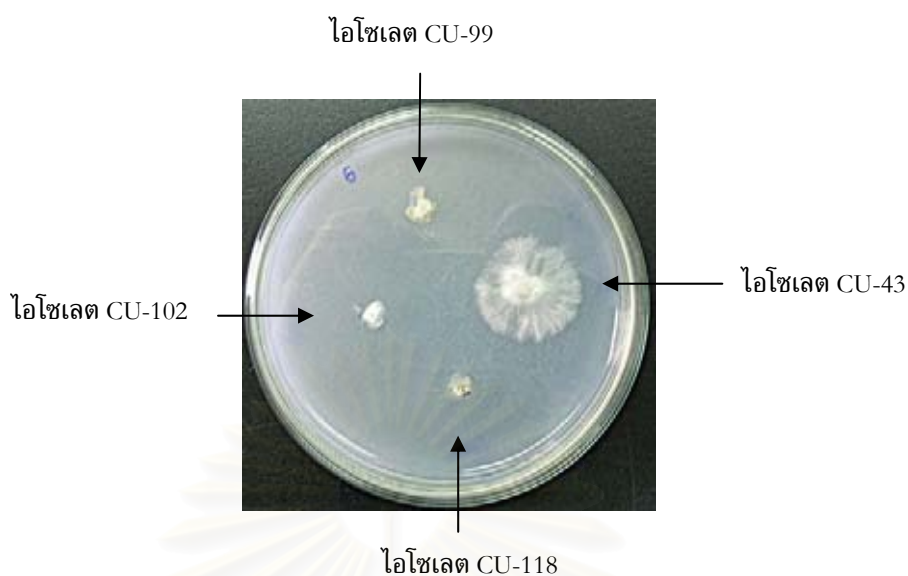
ตารางที่ 4.3 ความสามารถของเชื้อในการเจริญบนอาหารที่มี PAH เป็นส่วนประกอบ

ไอโซเลต	ความสามารถในการเจริญบน Basal medium ผสม PAH ¹				
	ฟลูออรีน	แอนทราซีน	พีแนนทริน	ฟลูออแรนทริน	ไพรีน
CU-1	+ ²	+	+	+	+
CU-6	+	+	- ²	-	-
CU-8	+	+	+	+	-
CU-29	+	+	-	+	-
CU-43	+	+	+	+	+
CU-62	+	+	+	+	+
CU-86	+	+	-	+	-
CU-99	-	-	-	-	-
CU-102	+	-	-	-	-
CU-112	+	-	-	-	-
CU-113	+	-	-	-	-
CU-116	+	-	-	-	+
CU-118	+	+	-	-	-
CU-120	+	+	+	+	-

หมายเหตุ

1. การทดสอบทำบน Basal medium ที่เติม PAH ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน
2. + หมายถึง มีการเจริญ - หมายถึง ไม่มีการเจริญ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



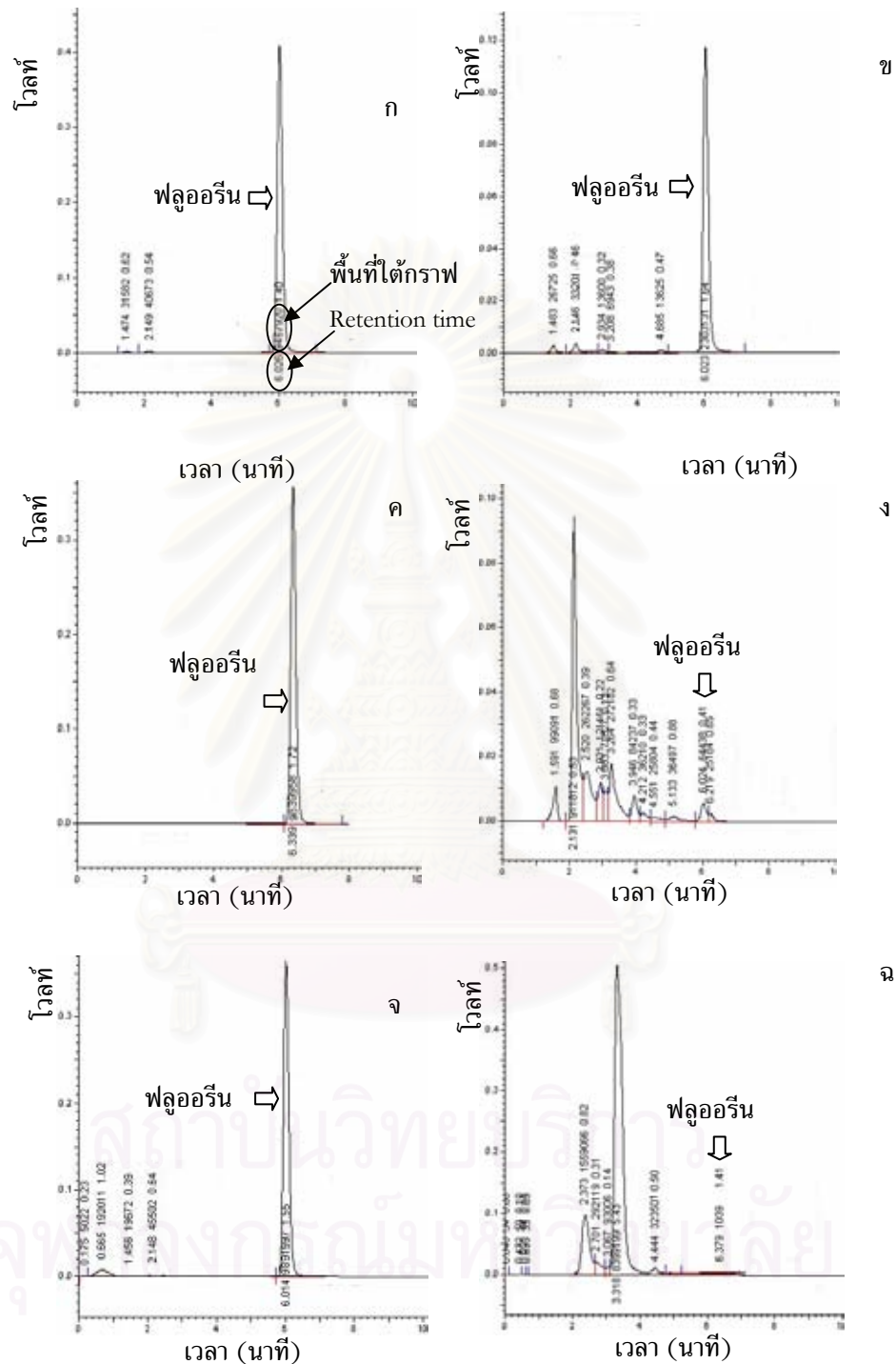
รูปที่ 4.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญของราที่คัดแยกในอาหาร Basal medium ที่มีฟิแนนทรินความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรเป็นส่วนประกอบ

4.4 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAH ในอาหารเหลว

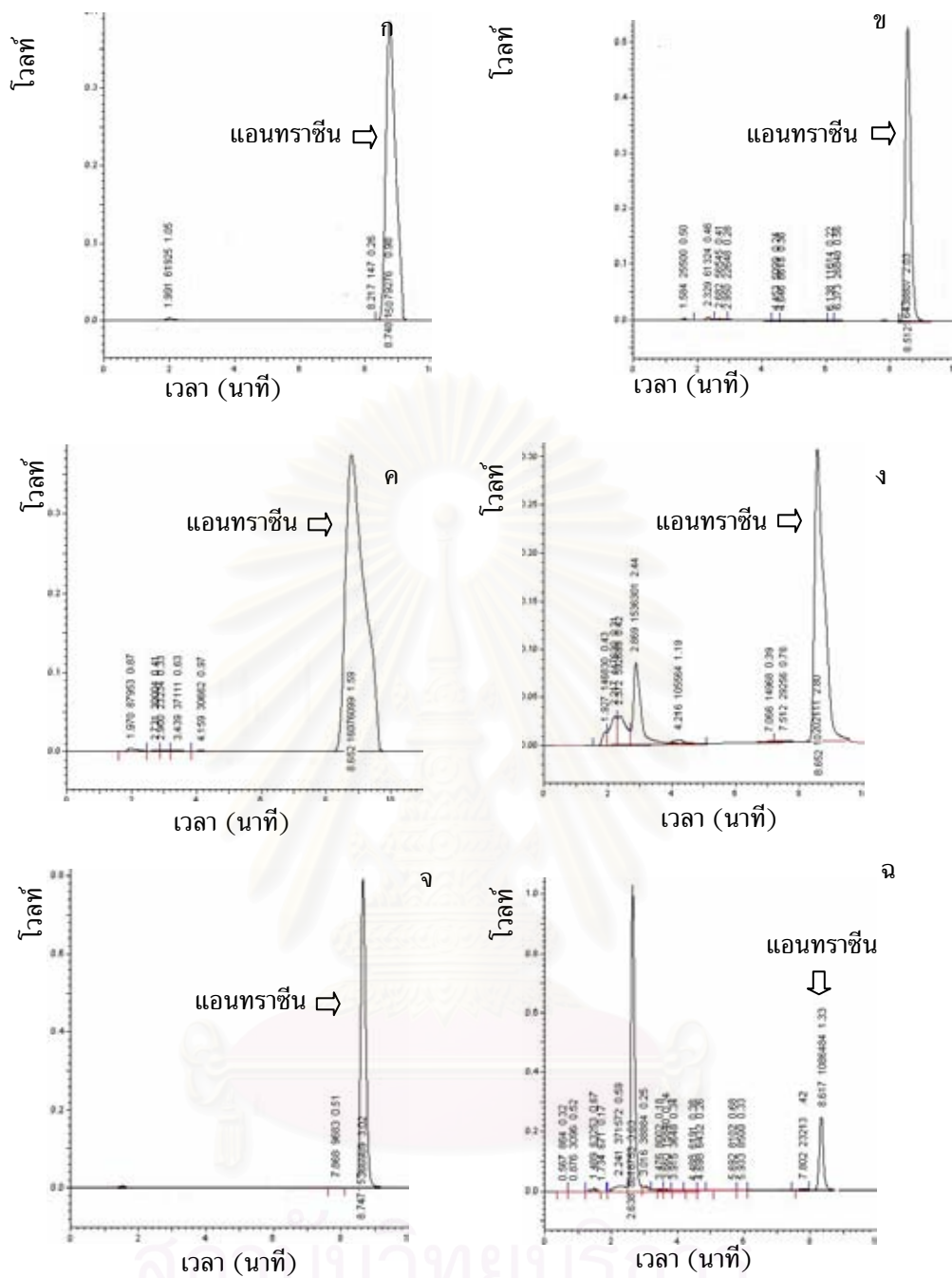
นำราไอโซเลต CU-1 และ CU-43 มาทดสอบความสามารถในการย่อย PAH ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไนโตรเจนจำกัด (อาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด) และมีกลูโคสผสมอยู่ 1% เป็นแหล่งอาหารตามสูตรของ Kirk และคณะ (1978) โดยทดสอบทั้ง PAH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ ฟลูออรีน แอนทราซีน ฟิแนนทริน และ PAH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ได้แก่ ฟลูออแรนทริน และไพรีน เก็บตัวอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 4 สัปดาห์โดยเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์หรือทุก 3 วันสำหรับการวิเคราะห์ฟลูออรีน นำตัวอย่างมาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณ PAH ที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง HPLC ในขั้นตอนการสกัด PAH ออกจากอาหารเหลว มีการเติมไพรีนที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในหลอดที่ต้องการสกัดฟลูออรีน แอนทราซีน ฟิแนนทริน ฟลูออแรนทริน เพื่อใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัด และเติมเบนโซ[เอ]ไพรีนสำหรับตัวอย่างที่ต้องการสกัดไพรีน ผลการทดลองที่นำมาใช้ในการคำนวณต้องมีประสิทธิภาพในการสกัดไม่ต่ำกว่า 80% ผลการทดลองดังโครมาโทแกรมที่แสดงในรูปที่ 4.3 – 4.7 และวิเคราะห์ความสามารถในการย่อย PAH ของราทั้ง 2 ไอโซเลตเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยวิธีทางสถิติ

จากการเปรียบเทียบค่า retention time และพื้นที่ใต้กราฟของ PAH ที่ต้องการตรวจวัดกับสารมาตรฐาน พบว่าไอโซเลต CU-1 มีความสามารถในการย่อยฟลูออรีนได้ดีที่สุด โดยปริมาณฟลูออรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง 94.5% ภายใน 6 วัน ในขณะที่ปริมาณฟลูออรีนในชุดควบคุมลดลง 42.7% และสามารถย่อยแอนทราซีนและฟิแนนทรินได้ภายใน 21 วัน โดยปริมาณแอนทราซีนและฟิแนนทรินในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง 68.0% และ 71.0% ตามลำดับ

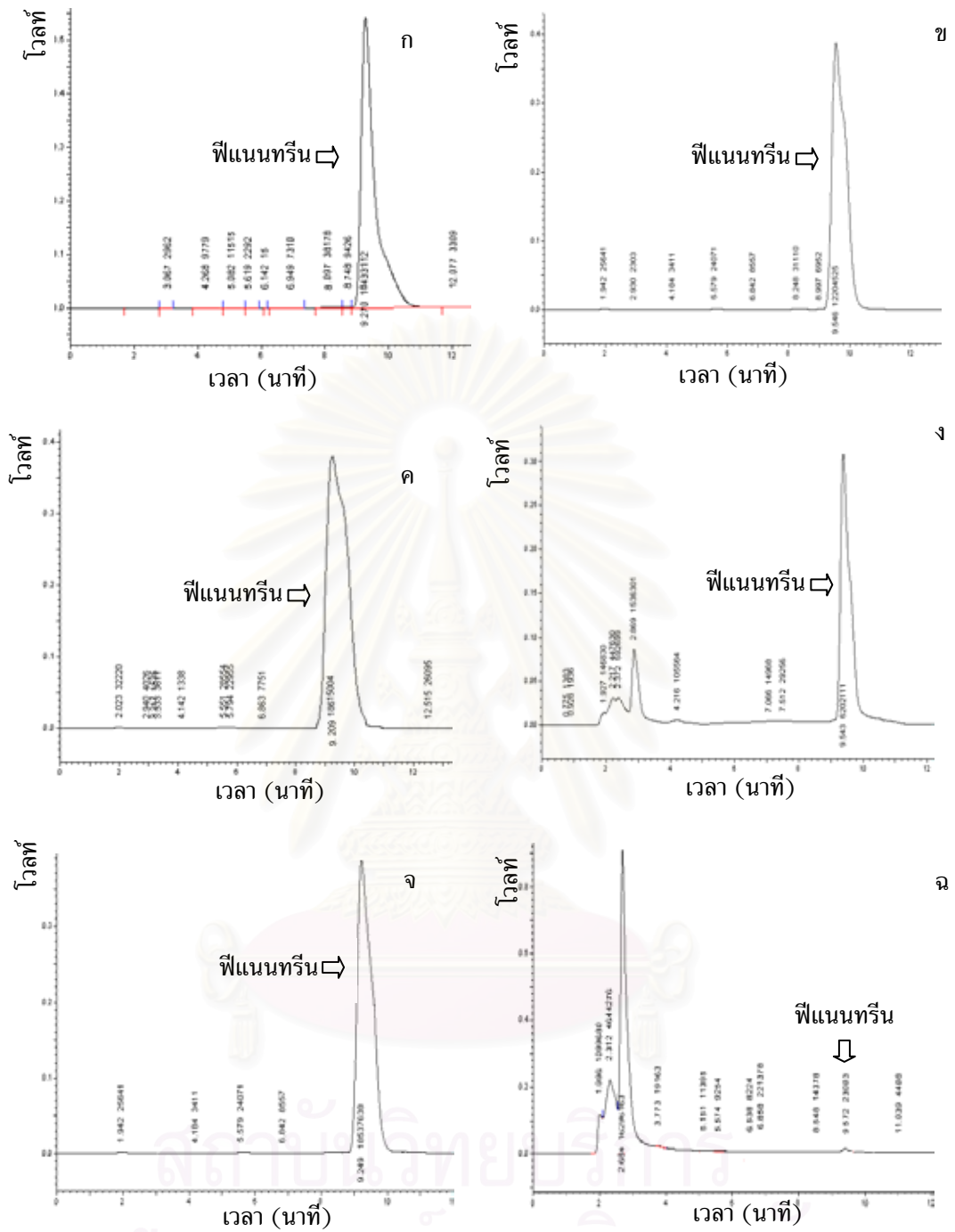
ในขณะที่ปริมาณแอนทราซีนและฟีนแอนทรินในชุดควบคุมลดลง 24.5% และ 25.6% ตามลำดับ แต่ไม่สามารถย่อยฟลูออแรนทรินและไพรีนภายในระยะเวลา 30 วัน



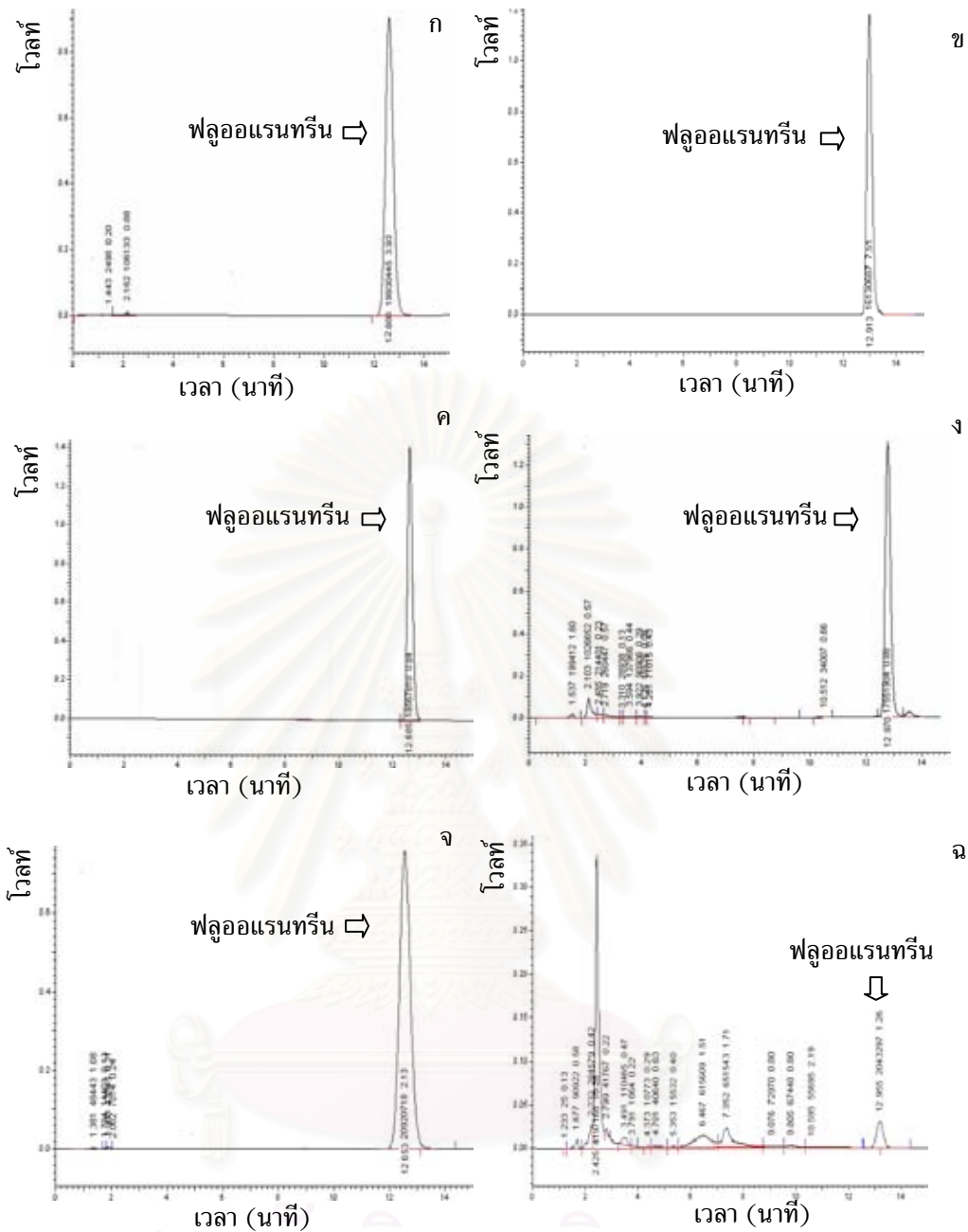
รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงปริมาณฟลูออแรนทรินในชุดควบคุมในวันที่ 0 (ก) และวันที่ 6 (ข) ชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-1 ในวันที่ 0 (ค) และวันที่ 6 (ง) และชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-43 ในวันที่ 0 (จ) และวันที่ 6 (ฉ) บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 28°ซ ความเร็ว 120 รอบต่อนาที



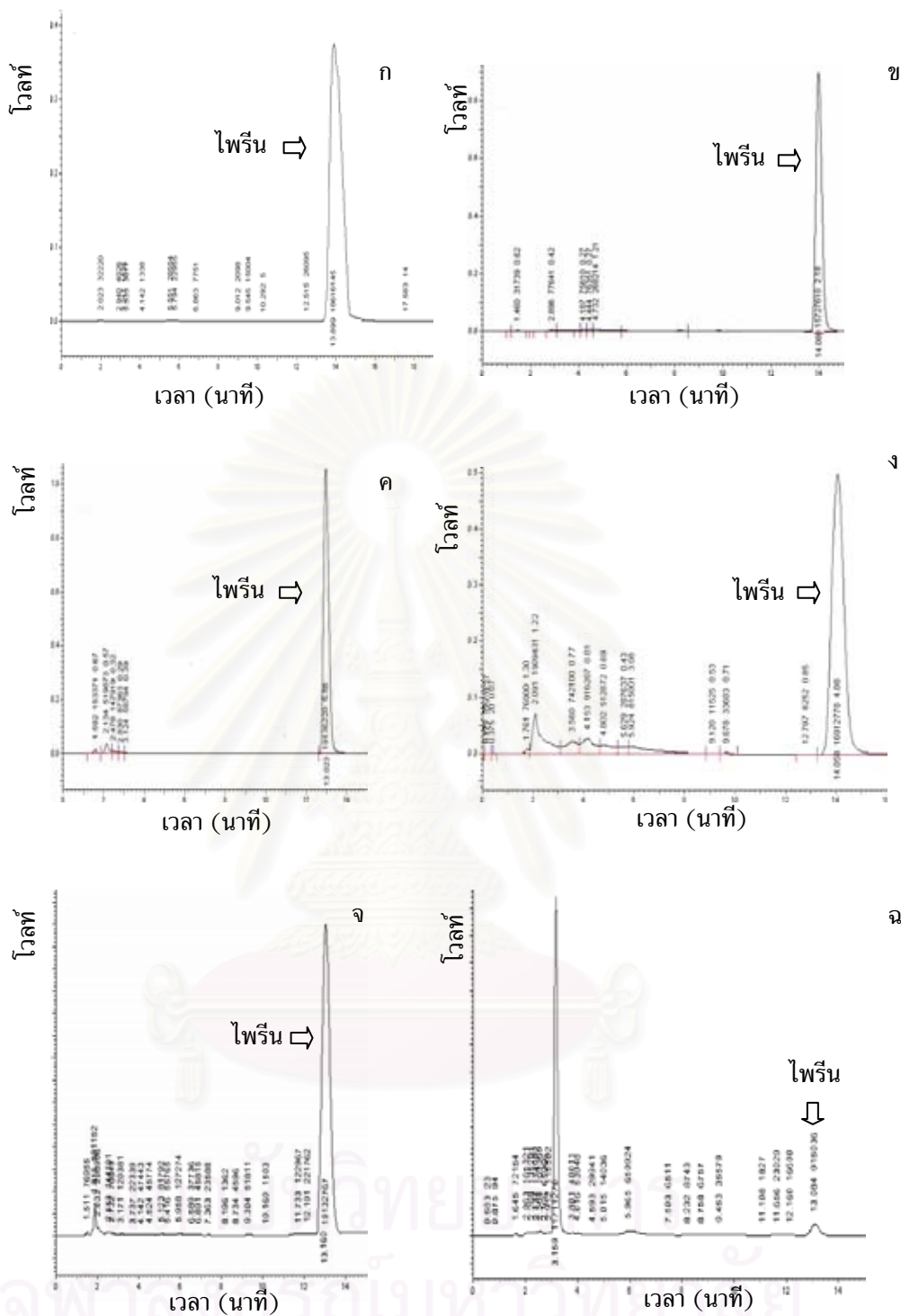
รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงปริมาณแอนทรราซีนในชุดควบคุมในวันที่ 0 (ก) และวันที่ 21 (ข) ชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-1 ในวันที่ 0 (ค) และวันที่ 21 (ง) และชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-43 ในวันที่ 0 (จ) และวันที่ 21 (ฉ) บ่มเขย่าที่ อุณหภูมิ 28°C ความเร็ว 120 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงปริมาณพีแนนทรินในชุดควบคุมในวันที่ 0 (ก) และวันที่ 21 (ข) ชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-1 ในวันที่ 0 (ค) และวันที่ 21 (ง) และชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-43 ในวันที่ 0 (จ) และวันที่ 21 (ฉ) บ่มเขย่าที่ อุณหภูมิ 28°ซ ความเร็ว 120 รอบต่อนาที



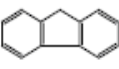
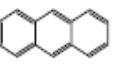
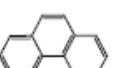
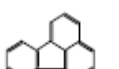

รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงปริมาณฟลูออแรนทรินในชุดควบคุมในวันที่ 0 (ก) และวันที่ 30 (ข) ชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-1 ในวันที่ 0 (ค) และวันที่ 30 (ง) และชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-43 ในวันที่ 0 (จ) และวันที่ 30 (ฉ) บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 28°C ความเร็ว 120 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงปริมาณพาริตามอลในชุดควบคุมในวันที่ 0 (ก) และวันที่ 30 (ข) ชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-1 ในวันที่ 0 (ค) และวันที่ 30 (ง) และชุดทดลองที่เติมราไอโซเลต CU-43 ในวันที่ 0 (จ) และวันที่ 30 (ฉ) บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 28°ซ ความเร็ว 120 รอบต่อนาที

สำหรับไอโซเลต CU-43 พบว่าสามารถย่อย PAH ที่นำมาใช้ทดสอบได้ทุกชนิด โดยสามารถย่อยฟลูออรีนได้ดีกว่า PAH ชนิดอื่น โดยฟลูออรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกย่อยจนหมดภายใน 6 วัน และสามารถย่อยแอนทราซีนและฟิแนนทรีนได้ดีภายใน 21 วัน โดยปริมาณแอนทราซีนและฟิแนนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง 91.2% และ 99.2% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถย่อยฟลูออแรนทรีนและไพรีนภายใน 30 วัน โดยปริมาณฟลูออแรนทรีนและไพรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง 67.9% และ 81.2% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ความสามารถของราไอโซเลต CU-1 และ CU-43 ในการย่อย PAH ชนิดต่าง ๆ ในอาหารเหลวอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด

PAHs	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)	% PAH ที่ลดลง		
		ชุดควบคุม	ไอโซเลต CU-1	ไอโซเลต CU-43
 ฟลูออรีน	6	42.7 ± 2.4	94.5 ± 0.0	100.0 ± 0.0
 แอนทราซีน	21	24.5 ± 2.0	68.0 ± 3.0	91.2 ± 3.6
 ฟิแนนทรีน	21	25.6 ± 1.7	71.0 ± 4.2	99.2 ± 0.1
 ฟลูออแรนทรีน	30	17.5 ± 2.0	24.3 ± 1.4	67.9 ± 1.3
 ไพรีน	30	25.0 ± 0.1	25.4 ± 2.4	81.2 ± 0.8

หมายเหตุ ใช้ตัวอย่างทดสอบจำนวน 3 ตัวอย่าง ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบน (mean ± SD)

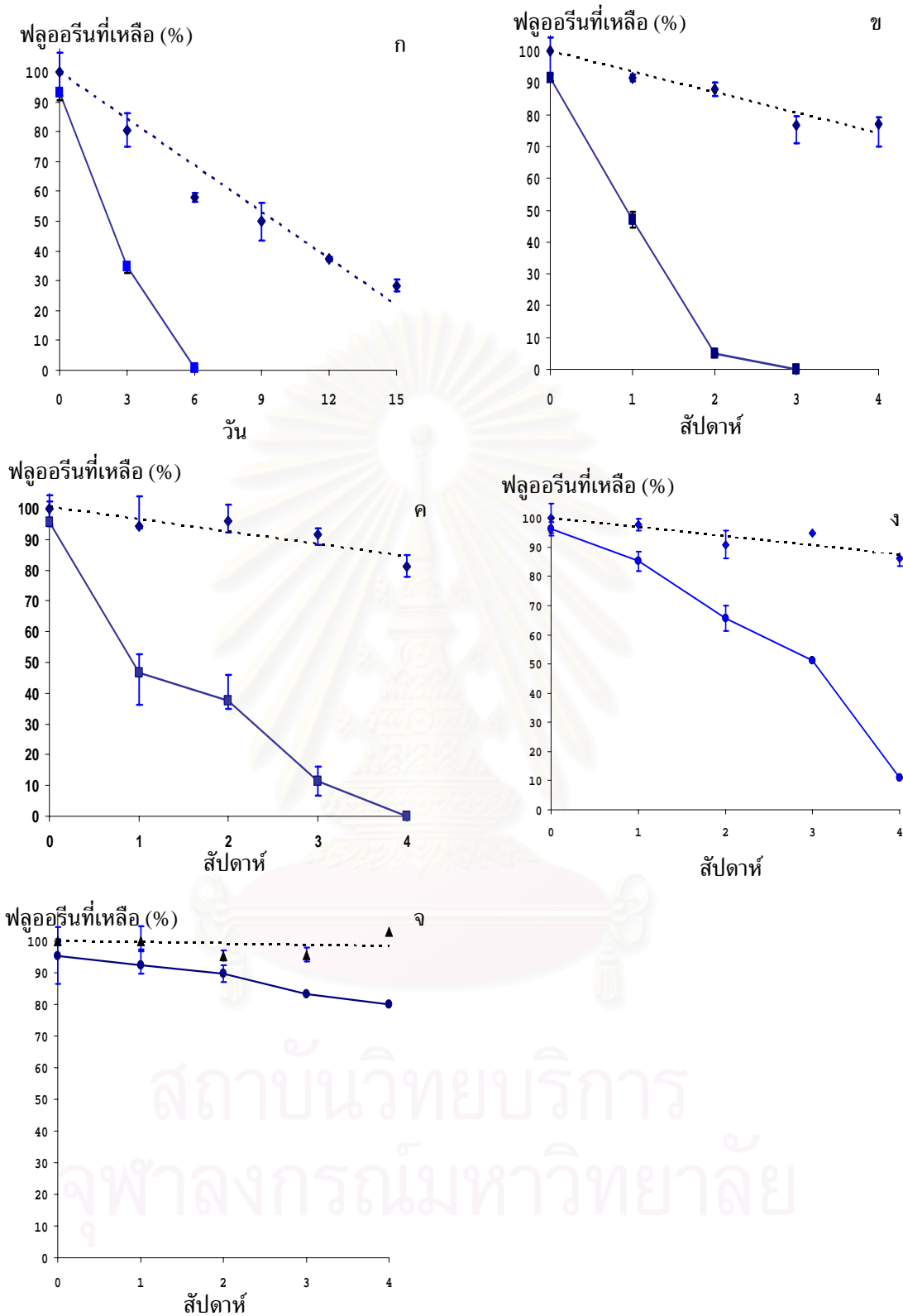
เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลาย PAH ชนิดต่างๆ แล้ว พบว่าไอโซเลต CU-43 มีความสามารถในการย่อยสลาย PAH หลายชนิดได้ดีกว่าไอโซเลต CU-1 ดังแสดงในตารางที่ 4.4 จึงเลือกไอโซเลต CU-43 เพื่อศึกษาสมบัติในการย่อย PAH โดยเลือกศึกษาที่ฟลูออรีนซึ่งไอโซเลต CU-43 สามารถย่อยได้ดีที่สุดนั่นคือ 100%

4.5 รูปแบบการย่อยฟลูออรีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยราไอโซเลต CU-43

ศึกษาความสามารถของราไอโซเลต CU-43 ในการย่อยสลายฟลูออรีนในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัดที่มีฟลูออรีนผสมอยู่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 100, 250, 500, 750 และ 1000 มก.ต่อลิตร

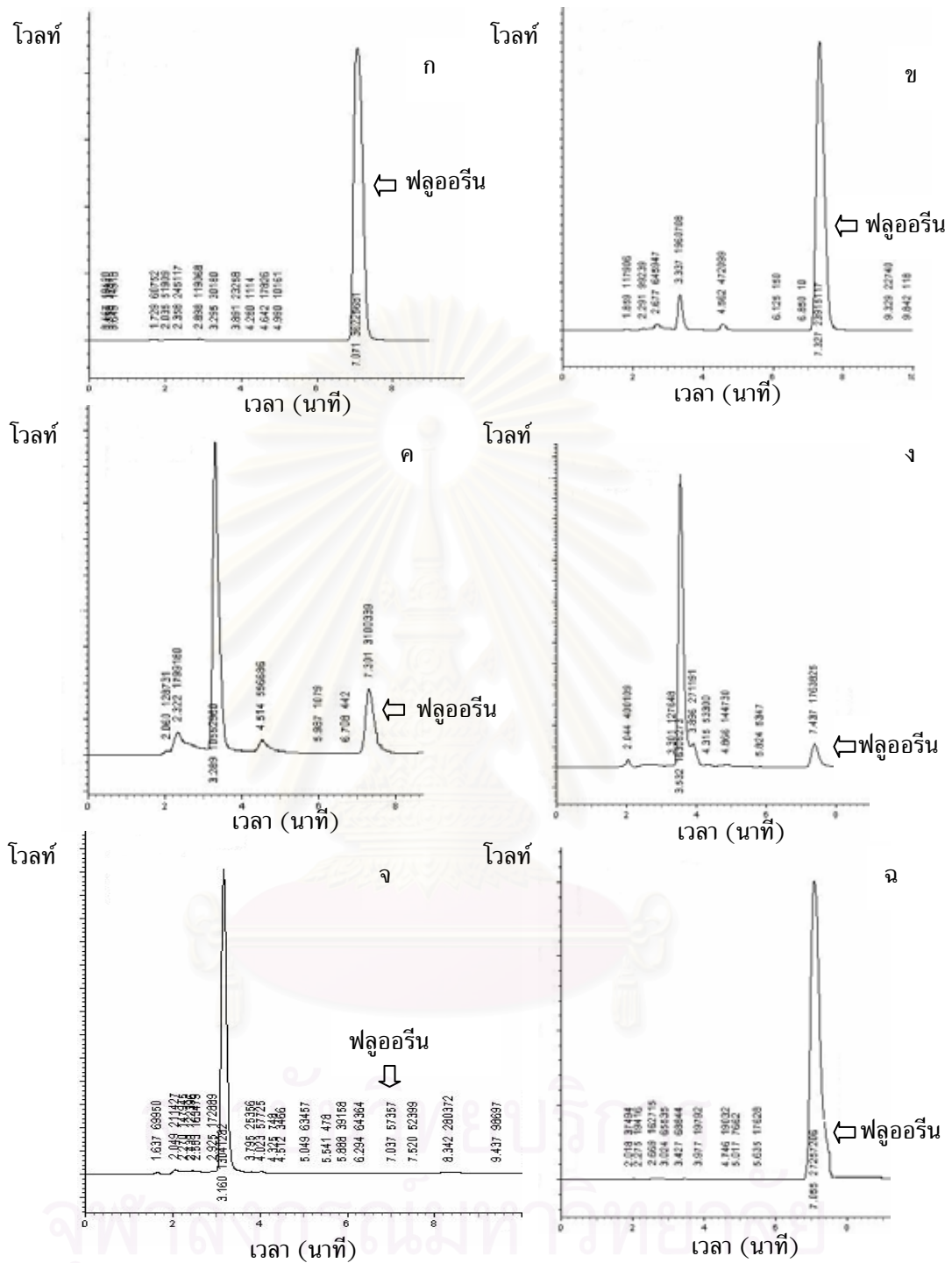
โดยชุดการทดลองที่ความเข้มข้นฟลูออรีนเท่ากับ 100 มก.ต่อลิตรซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุด ราไอโซเลต CU-43 สามารถย่อยฟลูออรีนหมดภายใน 6 วัน ในขณะที่เหลือฟลูออรีนในชุดควบคุม 57.3% ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ก เมื่อความเข้มข้นของฟลูออรีนเพิ่มขึ้นเป็น 250 และ 500 มก.ต่อลิตร ระยะเวลาในการย่อยฟลูออรีนจนสมบูรณ์เพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 3 สัปดาห์ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณฟลูออรีนในชุดควบคุมเหลืออยู่ 74.8% และ 81.4% ตามลำดับ (รูปที่ 4.8 ข และ ค) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟลูออรีนถึง 750 และ 1000 มก.ต่อลิตร พบว่าราไอโซเลต CU-43 ไม่สามารถย่อยฟลูออรีนได้หมดภายใน 4 สัปดาห์ โดยที่ความเข้มข้น 750 มก.ต่อมล. จะเหลือฟลูออรีนอยู่ 11.0% และเหลืออยู่ 80.0% ที่ความเข้มข้น 1000 มก.ต่อมล. ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่ 86.3% และ 94.4% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ง และ จ สำหรับตัวอย่างโครมาโทแกรมการสลายฟลูออรีนที่ความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร โดยราไอโซเลต CU-43 ในเวลาต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 4.9

จากข้อมูลทั้งหมดพบว่าความเข้มข้นของฟลูออรีนมีผลต่อความสามารถในการย่อยของราไอโซเลต CU-43 โดยความเข้มข้นของฟลูออรีนที่เพิ่มขึ้น ทำให้การย่อยฟลูออรีนช้าลง อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 750 มก.ต่อลิตร ไอโซเลต CU-43 ก็ยังสามารถลดฟลูออรีนได้ประมาณ 95% ในเวลา 4 สัปดาห์



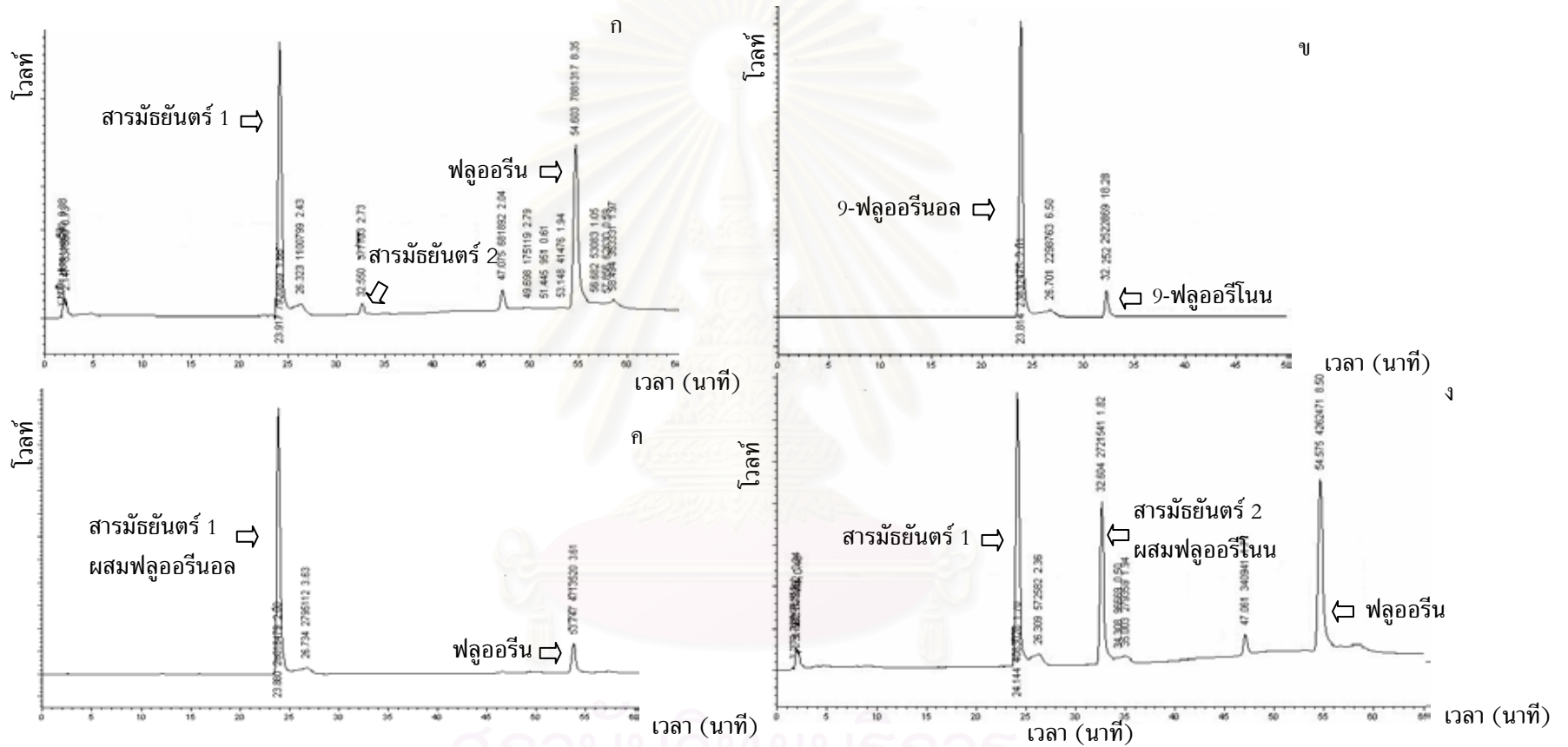
รูปที่ 4.8 รูปแบบการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้นต่าง ๆ โดยราไอโซเลต CU-43 ในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัดความเข้มข้นฟลูออรีนที่ใช้ทดสอบได้แก่ 100 มก.ต่อลิตร (ก), 250 มก.ต่อลิตร (ข), 500 มก.ต่อลิตร (ค), 750 มก.ต่อลิตร (ง), และ 1000 มก.ต่อลิตร (จ)

— ชุดทดลอง ชุดควบคุม



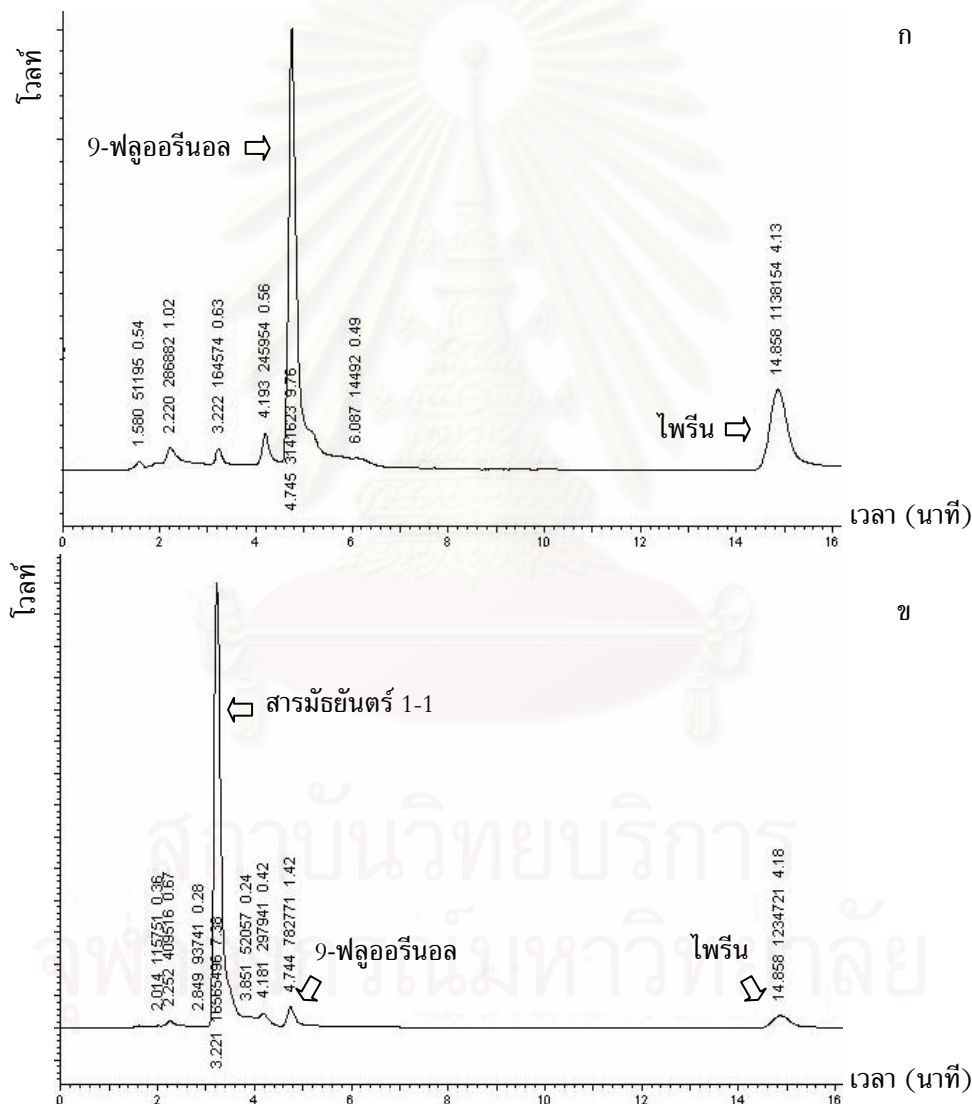
รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงปริมาณฟูออรีนที่เหลือจากการย่อยฟูออรีน ความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร ด้วยราโอโซเลต CU-43 ในอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารที่มี ไนโตรเจนจำกัดบ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ ในเวลาต่างๆ ได้แก่ สัปดาห์ที่ 0 (ก), สัปดาห์ที่ 1 (ข), สัปดาห์ที่ 2 (ค), สัปดาห์ที่ 3 (ง), สัปดาห์ที่ 4 (จ), และชุดควบคุมสัปดาห์ที่ 4 (ฉ)

เมื่อพิจารณาโครมาโทแกรมจาก HPLC พบว่าการสลายฟลูออรีนโดยราไอโซเลต CU-43 ในรูปที่ 4.9 พบว่ามีสารมัธยันตร์หลายชนิดเกิดขึ้นในระหว่างการย่อยฟลูออรีน โดยมีสารมัธยันตร์หลักเกิดขึ้นในนาที่ที่ 3.53 (รูปที่ 4.9 ง และ รูปที่ 4.9 จ) ซึ่งเกิดขึ้นตั้งแต่สัปดาห์แรกของการสลายฟลูออรีน และมีการสะสมมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในสัปดาห์ที่ 2 จนกระทั่งเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 เพื่อตรวจสอบว่าพีคที่เกิดขึ้นในนาที่ที่ 3.53 ประกอบด้วยสารมัธยันตร์หลายชนิดหรือไม่ จึงนำตัวอย่างมาฉีดยาวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยเกรเดียนต์เมทานอล และจาก HPLC โครมาโทแกรม พบว่ามีสารมัธยันตร์หลักเพียงชนิดเดียว โดยมีพีคเกิดขึ้นในนาที่ที่ 23.79 คือสารมัธยันตร์ 1 (รูปที่ 4.10 ก) และสารมัธยันตร์อีกชนิดที่น่าสนใจเนื่องจากสังเกตเห็นได้ชัดในการย่อยฟลูออรีนในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 2 คือสารมัธยันตร์ 2 และเมื่อเปรียบเทียบค่า HPLC retention time กับสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอลและสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีโนน ซึ่งมีรายงานว่าเป็นสารมัธยันตร์ในการย่อยสลายฟลูออรีนโดยราหลายชนิด (Bezalel และคณะ, 1996; Garon และคณะ, 2000) พบว่า retention time ของสารมัธยันตร์ 1 มีค่าเท่ากับ retention time ของสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอล (รูปที่ 4.10 ข) และ retention time ของสารมัธยันตร์ 2 มีค่าเท่ากับ retention time ของสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีโนน (รูปที่ 4.10 ข) เมื่อผสมสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอลหรือ 9-ฟลูออรีโนนลงในตัวอย่างที่สกัดได้จากราไอโซเลต CU-43 แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเกรเดียนต์เมทานอล พบว่าพีคของสารมัธยันตร์ 1 และสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอลเป็นพีคเดียวกัน (รูปที่ 4.10 ค) และ สารมัธยันตร์ 2 และสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีโนน เป็นพีค เดียวกัน (รูปที่ 4.10 ง) จากผลการทดลองทั้งหมดสันนิษฐานได้ว่าสารมัธยันตร์ 1 คือ 9-ฟลูออรีนอลและสารมัธยันตร์ 2 คือ 9-ฟลูออรีโนนซึ่งเกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยราไอโซเลต CU-43



รูปที่ 4.10 โครมาโทแกรมจาก HPLC จากการตรวจสอบด้วยเกรเดียนต์เมทานอลของสารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยฟลูออรีนโดยราไอโซเลต CU-43 (ก) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอล และ 9-ฟลูออรีนोन (ข) และเมื่อผสมสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอล (ค) และสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนोन (ง) ลงในตัวอย่าง

เพื่อพิสูจน์ว่า 9-ฟลูออรีนอลซึ่งเป็นสารมัธยันตร์หลักที่ได้จากการย่อยฟลูออรีนโดยราไอโซเลต CU-43 เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายหรือไม่ จึงได้ทดสอบความสามารถของราไอโซเลต CU-43 ต่อการย่อย 9-ฟลูออรีนอล โดยเลี้ยงราไอโซเลต CU-43 ในภาวะเดียวกับข้อ 3.5.5 โดยผสมสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอลความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรลงในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด แทนการเติมฟลูออรีน บ่มเชื้อนาน 1 สัปดาห์และเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ 9-ฟลูออรีนอลที่เหลืออยู่ด้วย HPLC ผลการทดลองพบว่าราไอโซเลต CU-43 สามารถย่อย 9-ฟลูออรีนอลได้ โดยมีปริมาณ 9-ฟลูออรีนอลเหลือเพียง 25.8% และมีสารมัธยันตร์ชนิดใหม่เกิดขึ้นในนาที่ที่ 3.22 ให้ชื่อว่าสารมัธยันตร์ 1-1 ดังแสดงในรูปที่ 4.11



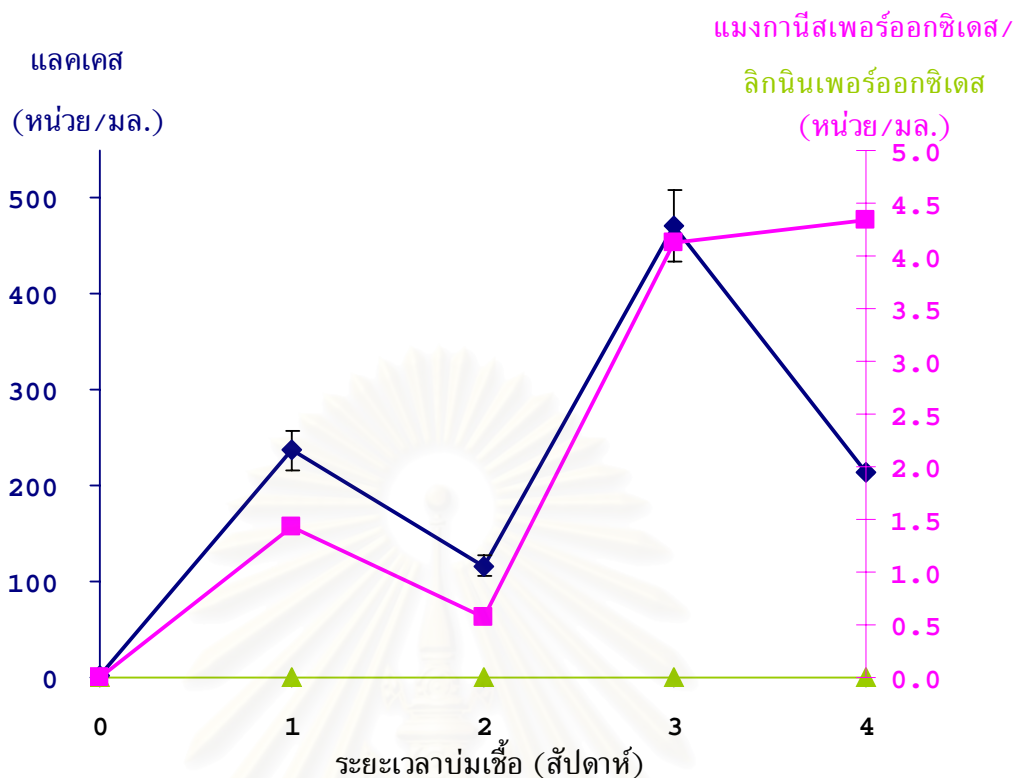
รูปที่ 4.11 โครมาโทแกรมจาก HPLC ซึ่งแสดงการย่อย 9-ฟลูออรีนอลความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด โดยราไอโซเลต CU-43 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°ซ ในเวลาต่างๆ ได้แก่ สัปดาห์ที่ 0 (ก) และสัปดาห์ที่ 1 (ข) และเติมไพรีนเพื่อเป็น internal standard

4.6 การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินในระหว่างการย่อยฟลูออรีนของราไอโซเลต CU-43

ตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายลิกนิน ได้แก่ แลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสและลิกนินเพอร์ออกซิเดสที่สร้างขึ้นในระหว่างการย่อยฟลูออรีนด้วยราไอโซเลต CU-43 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัดที่มีฟลูออรีนผสมอยู่ 500 มก.ต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28°C. โดยตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS สำหรับการตรวจสอบแอกติวิตีแลคเคส 2,6-dimethoxyphenol หรือ 2,6-DMP สำหรับการตรวจสอบแอกติวิตีของแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสและเวอราทริลแอลกอฮอล์สำหรับการตรวจสอบแอกติวิตีของลิกนินเพอร์ออกซิเดส

นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลว mGPY มาตรวจสอบแอกติวิตีแลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และลิกนินเพอร์ออกซิเดส เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารสมบูรณ์ พบว่าไม่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด จากนั้นตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ระหว่างการย่อยฟลูออรีนในช่วงเวลาต่างๆ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่าราไอโซเลต CU-43 มีการผลิตแลคเคสสูงสุด โดยพบแอกติวิตีตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และพบแอกติวิตีตลอดช่วงเวลาของการย่อยสลายฟลูออรีนทั้ง 4 สัปดาห์ โดยมีแอกติวิตีสูงเท่ากับ 237 หน่วยต่อมล. และลดลงในสัปดาห์ที่ 2 เป็น 116 หน่วยต่อมล. จากนั้นเพิ่มสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 เท่ากับ 470 หน่วยต่อมล. และลดลงเป็น 213 หน่วยต่อมล. ในสัปดาห์ที่ 4

นอกจากนี้ยังพบแอกติวิตีของแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสทุกช่วงของการย่อยสลายฟลูออรีน โดยมีรูปแบบการผลิตเอนไซม์เช่นเดียวกับแลคเคสในสัปดาห์ที่ 1-3 แต่มีแอกติวิตีน้อยกว่า คือในสัปดาห์ที่ 1 มีแอกติวิตีเท่ากับ 1.42 หน่วยต่อมล. และลดลงในสัปดาห์ที่ 2 เป็น 0.53 หน่วยต่อมล. จากนั้นเพิ่มสูงอย่างเห็นได้ชัดในสัปดาห์ที่ 3 เท่ากับ 4.13 หน่วยต่อมล. รูปแบบแอกติวิตีของแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสแตกต่างจากแลคเคสในสัปดาห์ที่ 4 โดยแอกติวิตีของแลคเคสจะสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 และลดลงในสัปดาห์ที่ 4 แต่แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสยังมีแอกติวิตีเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 และเป็นช่วงที่มีแอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 4.34 หน่วยต่อมล. ในการทดลองนี้ไม่พบแอกติวิตีของลิกนินเพอร์ออกซิเดสตลอดการทดลอง รูปแบบการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินในระหว่างการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตรของราไอโซเลต CU-43 แสดงในรูปที่ 4.12

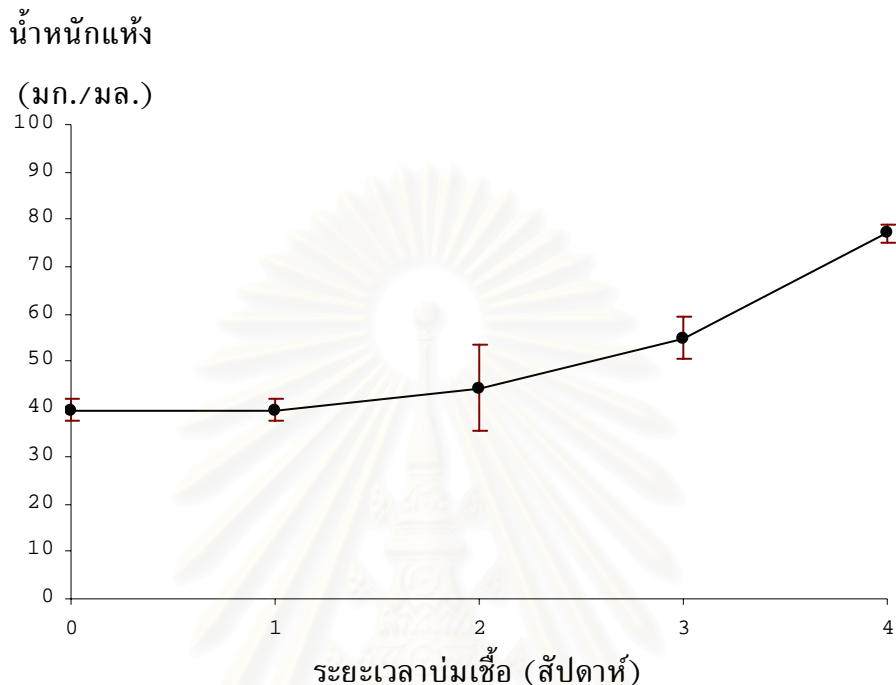


รูปที่ 4.12 รูปแบบการผลิตเอนไซม์แลคเตส (◆) แอมโมเนียเพอร์ออกซิเดส (■) และลิกนินเพอร์ออกซิเดส (▲) ในระหว่างการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร โดยราไอโซเลต CU-43

4.7 การตรวจสอบการเจริญของราสายพันธุ์ที่คัดเลือกในระหว่างการย่อยฟลูออรีน

ตรวจสอบการเจริญของราไอโซเลต CU-43 ตลอดช่วงเวลาของการย่อยฟลูออรีน โดยการวัดน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัดซึ่งผสมฟลูออรีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีในที่มืด ติดตามการเจริญทุกสัปดาห์ต่อเนื่อง 4 สัปดาห์ พบว่าในสัปดาห์แรกของการย่อยฟลูออรีนการเจริญของเชื้อคองที่ 40 มก.ต่อมล. (รูปที่ 4.13) ในขณะที่ฟลูออรีนเหลืออยู่ 46.5% (รูปที่ 4.8) หลังจากนั้นเมื่อเชื้อย่อยฟลูออรีนจนปริมาณฟลูออรีนเหลือเพียง 36% ในสัปดาห์ที่ 2 (รูปที่ 4.8) จึงเริ่มสังเกตเห็นการเจริญของเชื้อแต่ยังมีการเจริญไม่มาก การเจริญของเชื้อสังเกตได้ชัดเจนในสัปดาห์ที่ 3 ซึ่งปริมาณฟลูออรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลืออยู่ 11% (รูปที่ 4.8) และการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 (รูปที่ 4.13) เมื่อฟลูออรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกย่อยจนสมบูรณ์แล้ว จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่าความเข้มข้นของฟลูออรีนที่สูงมีผลต่อการเจริญของเชื้อ โดยปริมาณฟลูออรีนที่ความเข้มข้นสูงกว่าปริมาณฟลูออรีนที่เหลือในสัปดาห์ที่ 1 หรือประมาณ 230 มก.ต่อลิตร ทำให้ราไอโซเลต CU-43 ไม่สามารถเจริญได้ ต่อมาในสัปดาห์ที่ 2 ของการย่อย เมื่อราไอโซเลต CU-43

ย่อยฟลูออรีนจนเหลือเพียง 36% หรือประมาณ 180 มก.ต่อลิตร พบว่าการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและพบว่าการเจริญสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 เมื่อฟลูออรีนในอาหารถูกย่อยจนสมบูรณ์แล้ว



รูปที่ 4.13 การเจริญของราไอโซเลต CU-43 ในระหว่างการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร

4.8 การศึกษารูปแบบการย่อยสลายฟลูออรีนในแบบจำลองดินของราที่คัดเลือก

เตรียมหัวเชื้อและตัวอย่างดินสำหรับศึกษาการย่อยสลายฟลูออรีนในแบบจำลองดินด้วยราไอโซเลต CU-43 โดยเก็บตัวอย่างลึกจากผิวน้ำดิน 15 ซม. เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสารเคมีและวิเคราะห์การปนเปื้อนก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

4.8.1 ผลการเตรียมดิน ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดิน

ดินที่นำมาใช้ในการทดลองเก็บจากบริเวณสวนผลไม้ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม เป็นดินร่วน ที่มีความอุดมสมบูรณ์และไม่มีการปนเปื้อนสารเคมี โดยเมื่อนำไปสกัดและวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าไม่มีการปนเปื้อนสารดังกล่าว จากนั้นส่งดินไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดินที่ฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้ผลวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน

สมบัติ	ค่าการวิเคราะห์
ลักษณะเนื้อดิน	ดินร่วน
ค่าความเป็นกรด เบส	8.1
ค่าความจุการอุ้มน้ำ (%)	42.20
ปริมาณสารอินทรีย์ (%)	2.99
ปริมาณคาร์บอน (%)	1.734
ปริมาณไนโตรเจน (%)	0.150
ปริมาณฟอสฟอรัส (ส่วนในล้านส่วน)	341
ปริมาณโพแทสเซียม (ส่วนในล้านส่วน)	640
ปริมาณแคลเซียม (ส่วนในล้านส่วน)	3655
ปริมาณแมกนีเซียม (ส่วนในล้านส่วน)	675
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	11.56

4.8.2 การทดสอบการย่อยฟลูออรีนโดยราไอโซเลต CU-43 ในแบบจำลองดิน

เมื่อเลี้ยงราไอโซเลต CU-43 จาก stock culture ลงบน MEA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อมาเพาะลงบนเมล็ดข้าวฟ่างและบ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิห้อง พบว่าราไอโซเลต CU-43 สร้างเส้นใยสีขาว มีการเจริญอย่างรวดเร็วและปกคลุมเมล็ดข้าวฟ่างจนสมบูรณ์ภายใน 10 วัน

จากการทดลองเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเจริญของราไอโซเลต CU-43 บนตัวอย่างดิน โดยการถ่ายเชื้อที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างลงบนตัวอย่างดิน ปรับความชื้นด้วยอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัดให้มีความชื้น 60-65% บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน พบว่าราไอโซเลต CU-43 เจริญบนดินได้น้อยมาก (ไม่ได้แสดงข้อมูล) จึงได้ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติม พบว่าราไอโซเลต CU-43 สามารถเจริญได้ดีบนขี้เลื่อยสำเร็จรูป (ศรานนท์ เจริญสุข, 2537) จึงนำตัวอย่างดินที่ผ่านการร่อนเพื่อคัดขนาดดินแล้วมาผสมขี้เลื่อยสำเร็จรูป (ภาคผนวก ฉ1) ในอัตราส่วน 10% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เพื่อปรับสภาพดินและเพิ่มปริมาณสารอาหารในดิน รวมทั้งช่วยเพิ่มรูพรุนให้กับดิน ทำให้อากาศถ่ายเทได้มากขึ้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะช่วยให้ราไอโซเลต CU-43 สามารถเจริญได้ดีขึ้น (ศรานนท์ เจริญสุข, 2537) จากนั้นปรับความชื้นด้วยอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัดให้มีความชื้นประมาณ 60-65% (ปรีชา รัตนัง, 2546) ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญราไอโซเลต CU-43

ทดสอบการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อดิน 1 กรัม ด้วยราไอโซเลต CU-43 ในแบบจำลองดิน เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ในดินทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยมีรายละเอียดของชุดทดลองดังนี้

- ชุดที่ 1 ดินปลอดเชื้อและไม่มีการเติมเชื้อและใช้เป็นชุดควบคุม เพื่อศึกษาการลดลงของฟลูออรีนในดินเนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ
- ชุดที่ 2 ดินปลอดเชื้อและเติมราไอโซเลต CU-43 เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยฟลูออรีนด้วยราไอโซเลต CU-43 เพียงชนิดเดียว
- ชุดที่ 3 ดินไม่ปลอดเชื้อและไม่มีการเติมเชื้อ เพื่อศึกษาการลดลงของฟลูออรีนโดยเชื้อธรรมชาติที่อยู่ในดิน
- ชุดที่ 4 ดินไม่ปลอดเชื้อและเติมราไอโซเลต CU-43 เพื่อศึกษาการลดลงของฟลูออรีนโดยราไอโซเลต CU-43 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติที่อยู่ในดิน

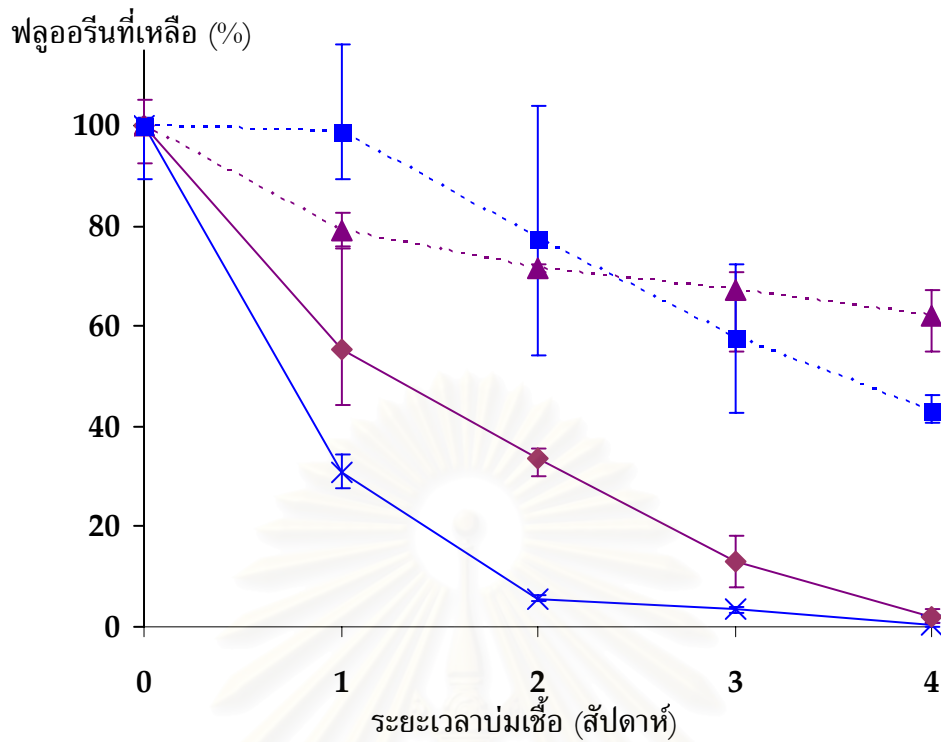
จากการทดลองพบว่าในชุดทดลองที่ 1 ตัวอย่างดินปลอดเชื้อซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม ฟลูออรีนลดลงอย่างเห็นได้ชัดในสัปดาห์แรก และเริ่มลดลงช้า ๆ ในสัปดาห์ที่ 2 ด้วยอัตราคงที่ ฟลูออรีนที่ลดลงอาจเนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ เช่น การสลายตัว การระเหย หรือบางส่วนยังติดอยู่กับอนุภาคของดินและไม่สามารถสกัดออกได้หมด โดยมีฟลูออรีนเหลืออยู่ 62% ในสัปดาห์ที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ 3 ซึ่งเป็นตัวอย่างดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อพบว่ามีความแตกต่างกับชุดทดลองที่ 1 คือ ในชุดทดลองที่ 3 มีปริมาณฟลูออรีนคงที่ในสัปดาห์แรก เริ่มสังเกตการลดลงของฟลูออรีนได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และมีการลดลงอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราเร็วกว่าในภาวะปลอดเชื้อ โดยมีฟลูออรีนเหลือน้อยกว่าในภาวะปลอดเชื้อ โดยเหลืออยู่ 43% ในสัปดาห์ที่ 4 จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเชื้อธรรมชาติที่มีอยู่ในดินมีผลช่วยในการสลายฟลูออรีน ดังแสดงในรูปที่ 4.14

ในชุดทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาความสามารถในการย่อยฟลูออรีนด้วยราไอโซเลต CU-43 เพียงชนิดเดียว ในชุดทดลองนี้สังเกตเห็นการเจริญของเส้นใยราตั้งแต่สัปดาห์แรกและเจริญอย่างรวดเร็วจนปกคลุมทั้งตัวอย่างในสัปดาห์ที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 4.15 สำหรับการย่อยสลายฟลูออรีนพบว่าปริมาณฟลูออรีนลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์แรก โดยมีฟลูออรีนเหลืออยู่ในตัวอย่างดินเพียง 30% และลดลงอย่างต่อเนื่อง ฟลูออรีนถูกย่อยจนเกือบสมบูรณ์ในสัปดาห์ที่ 2 โดยมีฟลูออรีนเหลืออยู่เพียง 5.5% หลังจากนั้นอัตราการย่อยลดลงและฟลูออรีนถูกย่อยจนสมบูรณ์ในสัปดาห์ที่ 4 ในขณะที่ชุดควบคุม (ชุดทดลองที่ 1) ยังมีฟลูออรีนเหลืออยู่ 62% ดังแสดงในรูปที่ 4.14

ในชุดทดลองที่ 4 เป็นการศึกษาความสามารถในการย่อยฟลูออรีนด้วยราไอโซเลต CU-43 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ ในชุดทดลองนี้สังเกตเห็นการเจริญของเส้นใยราตั้งแต่สัปดาห์แรก เช่นเดียวกับชุดทดลองที่ 2 แต่เส้นใยมีจำนวนน้อยกว่าและสั้นกว่า รูปแบบการลดลงของฟลูออรีน

คล้ายกับชุดการทดลองที่ 2 (ดินปลอดเชื้อและเติมราไอโซเลต CU-43) แต่อัตราการลดลงช้ากว่า ความแตกต่างของฟลูออรีนที่เหลืออยู่ในชุดทดลองที่ 2 และชุดทดลองที่ 4 เห็นได้ชัดในสัปดาห์ที่ 2 โดยชุดทดลองที่ 2 ฟลูออรีนถูกย่อยจนเกือบสมบูรณ์ ปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่เพียง 5.5% ในขณะที่ชุดทดลองที่ 4 มีฟลูออรีนเหลืออยู่ 33% และเมื่อครบ 4 สัปดาห์ชุดทดลองที่ 4 มีฟลูออรีนเหลืออยู่ 2% ในขณะที่ชุดทดลองที่ 4 ฟลูออรีนถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ 3 ซึ่งเป็นการย่อยฟลูออรีนโดยเชื้อธรรมชาติที่อยู่ในดิน พบว่าฟลูออรีนในชุดทดลองที่ 4 ถูกย่อยไปมากกว่า โดยสังเกตเห็นได้อย่างเด่นชัดในสัปดาห์ที่ 4 ฟลูออรีนในชุดทดลองที่ 4 เหลืออยู่ 2% ในขณะที่ชุดทดลองที่ 3 มีฟลูออรีนเหลืออยู่ 43%

ข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าราไอโซเลต CU-43 สามารถย่อยฟลูออรีนความเข้มข้น 250 มก.ต่อลิตรที่ปนเปื้อนในดินได้โดยผสมเชื้อ 10% ลงในดินเพื่อช่วยให้ราไอโซเลต CU-43 เจริญได้ดีขึ้น ประสิทธิภาพในการย่อยฟลูออรีนดีที่สุดที่สุดในภาวะปลอดเชื้อ นอกจากนี้ราไอโซเลต CU-43 สามารถทำงานร่วมกับเชื้อธรรมชาติที่อยู่ในดินทำให้ฟลูออรีนถูกสลายได้เร็วกว่าการย่อยด้วยเชื้อธรรมชาติที่อยู่ในดินเพียงอย่างเดียว ตัวอย่างโครมาโทแกรมการสลายฟลูออรีนในแบบจำลองดิน แสดงในรูปที่ 4.16 และ 4.17 จากโครมาโทแกรมรูป 4.16 การสลายฟลูออรีนโดยราไอโซเลต CU-43 ในภาวะปลอดเชื้อ เห็นได้ว่าปริมาณฟลูออรีนลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 สังเกตได้จากพื้นที่ใต้กราฟในรูปที่ 4.16ค นาทที่ 9.547 เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟในรูปที่ 4.16ก นาทที่ 9.92 ซึ่งเป็นชุดควบคุมและมีปริมาณฟลูออรีนเหลือน้อยมากในสัปดาห์ที่ 4 (รูปที่ 4.16ฉ นาทที่ 9.55) เทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุมในรูปที่ 4.16ข สำหรับการสลายฟลูออรีนโดยราไอโซเลต CU-43 ในภาวะไม่ปลอดเชื้อในรูปที่ 4.17 พบว่าฟลูออรีนของชุดทดลองลดลงตั้งแต่สัปดาห์แรก และลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งมีฟลูออรีนเหลือน้อยมากในสัปดาห์ที่ 4 (รูปที่ 4.17ฉ นาทที่ 9.565) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ยังมีฟลูออรีนเหลืออยู่ (รูปที่ 4.17 นาทที่ 9.567)

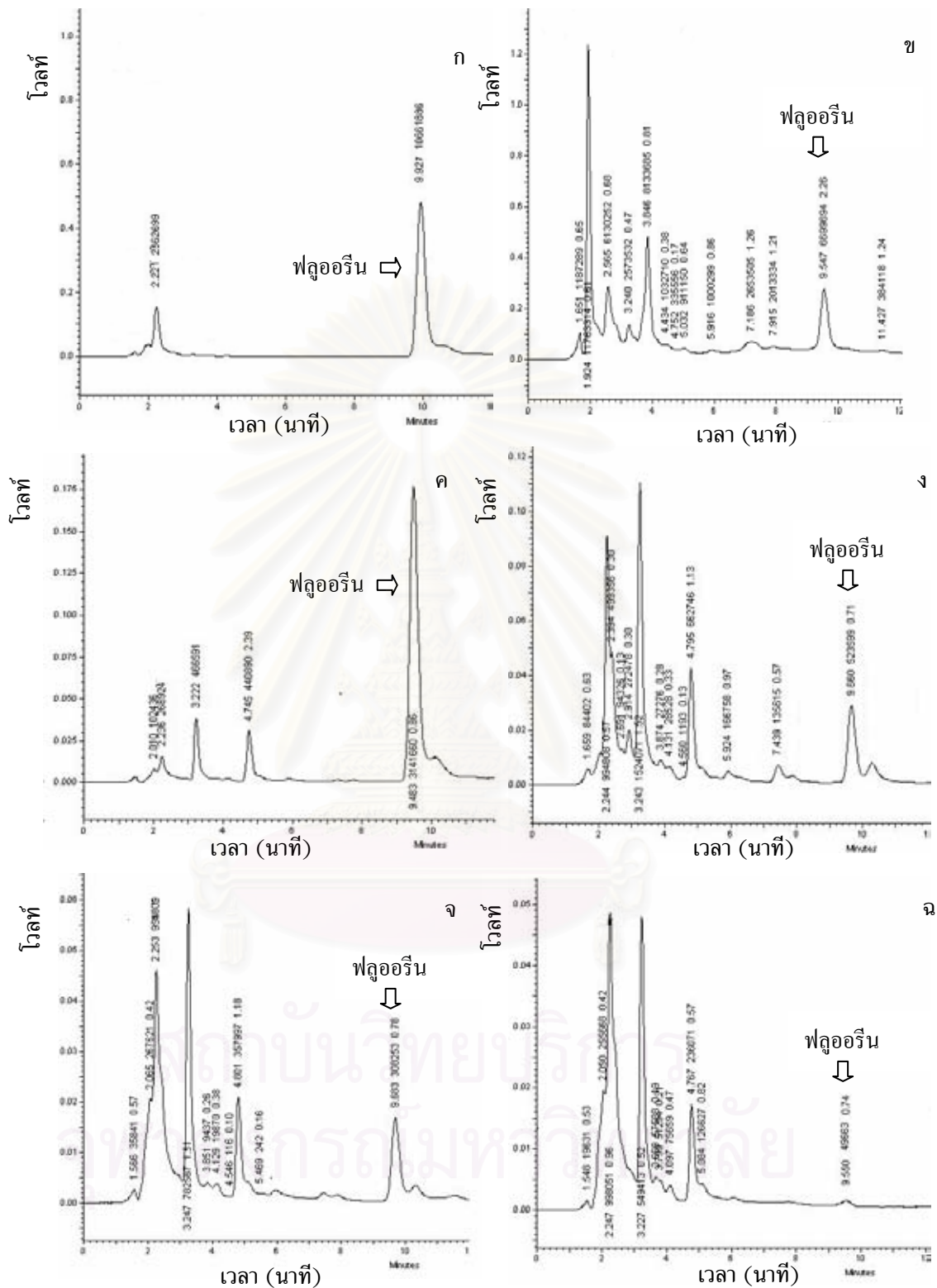


รูปที่ 4.14 รูปแบบการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้น 250 มก.ต่อลิตรด้วยราไอโซเลต CU-43 ในแบบจำลองดินในภาวะต่างๆ คือชุดควบคุมปลอดเชื้อ (▲) ชุดทดลองปลอดเชื้อ (×) ชุดควบคุมไม่ปลอดเชื้อ (■) และชุดทดลองไม่ปลอดเชื้อ (◆) บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มีดินนาน 4 สัปดาห์

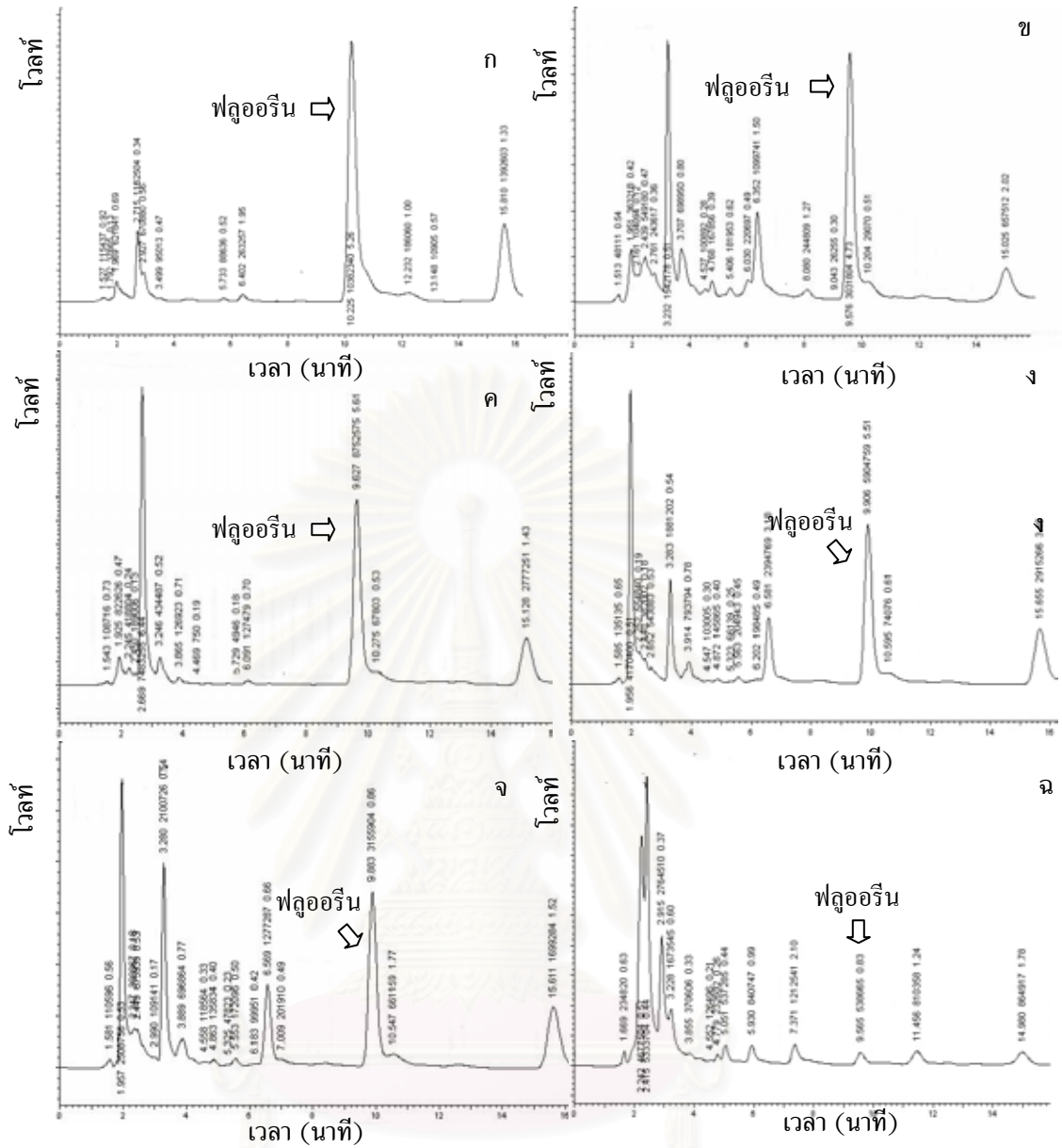


สัปดาห์ที่ 0 1 2 3 4

รูปที่ 4.15 การเจริญของราไอโซเลต CU-43 ในแบบจำลองดิน



รูปที่ 4.16 โครมาโทแกรมการสลายฟลูออรีนด้วยราไอโซเลต CU-43 ในแบบจำลองดินในภาวะปลอดเชื้อ ชุดควบคุมสัปดาห์ที่ 0 (ก) และสัปดาห์ที่ 4 (ข) ชุดทดลองสัปดาห์ที่ 1 (ค) และสัปดาห์ที่ 2 (ง) สัปดาห์ที่ 3(จ) และสัปดาห์ที่ 4 (ฉ) บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มีดินนาน 4 สัปดาห์



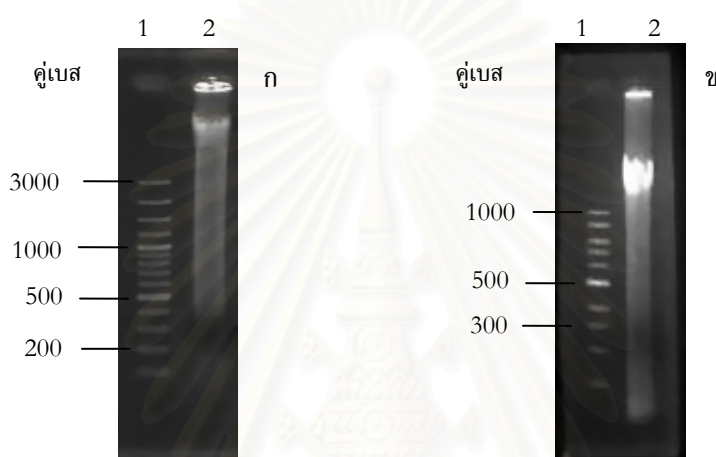
รูปที่ 4.17 โครมาโทแกรมการสลายฟลูออรีนด้วยราไอโซเลต CU-43 ในแบบจำลองดินในภาวะไม่ปลอดเชื้อ ชุดควบคุมสัปดาห์ที่ 0 (ก) และสัปดาห์ที่ 4 (ข) ชุดทดลองสัปดาห์ที่ 1 (ค) และสัปดาห์ที่ 2 (ง) สัปดาห์ที่ 3 (จ) และสัปดาห์ที่ 4 (ฉ) บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 4 สัปดาห์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.9 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่คัดเลือก

4.9.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

นำราสายพันธุ์ที่แสดงประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลาย PAH ได้แก่ ราไอโซเลต CU-1 และ ไอโซเลต CU-43 มาสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ตามวิธีในข้อ 3.5.12.2 ตรวจสอบโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี ดังรูปที่ 4.18

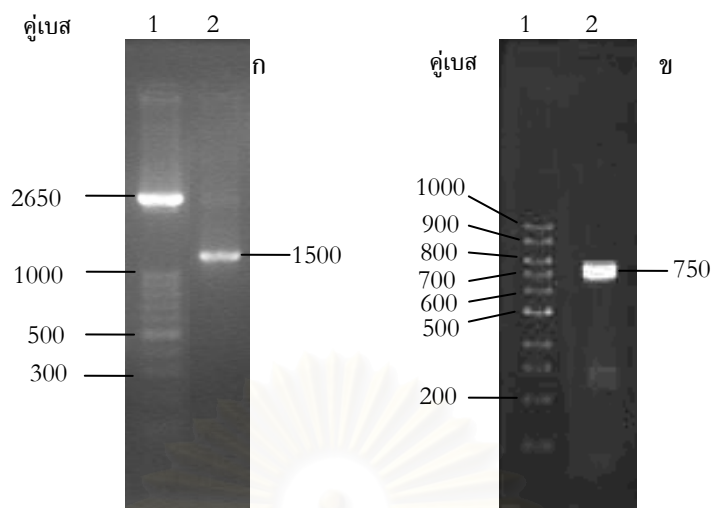


รูปที่ 4.18 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไอโซเลต CU-1(ก) และไอโซเลต CU-43(ข)

- ช่องที่ 1 100 bp plus DNA ladder (1ก) และ 100 bp plus DNA ladder และของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา (1ข)
- ช่องที่ 2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอ

4.9.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนบริเวณ ITS และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของราทั้ง 2 ไอโซเลตมาพิสูจน์เอกลักษณ์ของราโดยเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่างบริเวณ ITS1 และ ITS2 บนบริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์คู่ ITS1-F (ฟอร์เวิร์ด) และ ITS4 (รีเวิร์ส) ตามวิธีการในข้อ 3.5.12.5 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าสำหรับราไอโซเลต CU-1 ได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาดประมาณ 1500 คู่เบส ดังรูปที่ 4.19 ก และสำหรับราไอโซเลต CU-43 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาดประมาณ 700 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.19 ข



รูปที่ 4.19 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของราไอโซเลต CU-1 (ก) และไอโซเลต CU-43 (ข) เป็นแม่แบบและใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1-F (ฟอร์เวิร์ด) และ ITS4 (รีเวิร์ส)

ช่องที่ 1 100 bp DNA ladder ของบริษัท BioExcellence ประเทศไทย (1ก) และของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา (1ข)

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ตามรูปที่ 4.19 ก และ 4.19 ข มาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีข้อ 3.5.13.7 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างบริเวณ ITS1 และ ITS2 บน บริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของไอโซเลต CU-1 และ CU-43 แสดงในภาคผนวกที่ ข1 และภาคผนวกที่ ข2 ตามลำดับ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองได้เก็บไว้ในฐานข้อมูล Genbank ภายใต้หมายเลขเข้าถึง EU593767.1 และ EU487011.1 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของราไอโซเลต CU-1 กับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่านิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวมีความเหมือน 99% กับราในจีนัส *Xylaria* หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Xylaria* sp. F4 หมายเลขเข้าถึงของ Genbenk AY315415.1 *Xylaria hypoxylon* isolate AFTOL-ID 51 หมายเลขเข้าถึงของ Genbenk AY544692 *Xylaria carpophila* หมายเลขเข้าถึงของ Genbenk Z49785.1 และ *Xylaria* sp. F1 หมายเลขเข้าถึงของ Genbenk AY315412 จากข้อมูลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าราไอโซเลต CU-1 อยู่ในจีนัส *Xylaria* มีลำดับตามอนุกรมวิธานดังนี้

คิงดอม (kingdom) Fungi
 ไฟลัม (phylum) Ascomycota
 คลาส (class) Sordariomycetes
 ชั้นย่อย (subclass) Xylariomycetidae
 อันดับ (order) Xylariales
 วงศ์ (family) Xylariaceae
 จีนัส (genus) *Xylaria*

สำหรับราไอโซเลต CU-43 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่านิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวมีความเหมือน 100% กับ *Agrocybe aegerita* strain SM981204 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AY763671.1 และมีความเหมือน 99% กับ *Agrocybe chaxingu* strain HB-91 strain ASI 19023 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AY168833.1 นอกจากนี้ยังมีความเหมือน 98% กับเชื้อ 2 สายพันธุ์คือ *Agrocybe chaxingu* strain ASI 19022 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AY168832.1 และ *Agrocybe aegerita* strain SM981201 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AY763670.1 จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าราไอโซเลต CU-43 มีความเหมือนสูงมากกับรา 2 สปีชีส์ในจีนัส *Agrocybe* ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าราไอโซเลต CU-43 อยู่ใน จีนัส *Agrocybe* ให้ชื่อว่า *Agrocybe* sp. CU-43 มีลำดับตามอนุกรมวิธานดังนี้

คิงดอม (kingdom) Fungi
 ไฟลัม (phylum) Basidiomycota
 คลาส (class) Basidiomycetes
 ชั้นย่อย (subclass) Agaricomycetidae
 อันดับ (order) Agaricales
 วงศ์ (family) Bolbitiaceae
 จีนัส (genus) *Agrocybe*

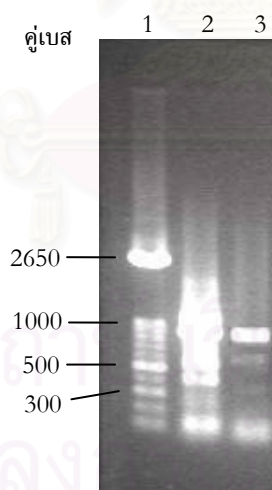
4.10 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแลคเคสในระหว่างการย่อยฟลูออรีนโดย *Agrocybe* sp. CU-43

จากการผลการทดลองในข้อ 4.6 รูปที่ 4.12 มีการตรวจพบแอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคสสูงในระหว่างการย่อยฟลูออรีนโดย *Agrocybe* sp. CU-43 การทดลองนี้จึงตรวจสอบการแสดงออกของยีนแลคเคสในระหว่างการย่อยฟลูออรีน

4.10.1 การเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีนแลคเคสของ *Agrocybe* sp. CU-43 โดย ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เมื่อนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ *Plac-F* และ *Plac-R* เพื่อเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีนแลคเคสในบริเวณที่มีการอนุรักษ์สูง โดยทำปฏิกิริยาแอนนีลที่ 48°C และ 51°C ได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสหลายขนาด ดังแสดงในรูปที่ 4.20

นำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ ขนาดประมาณ 850 คู่เบสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้อุณหภูมิในการแอนนีลที่ 51°C มาทำให้บริสุทธิ์ ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลแสดงในรูปที่ 4.21 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX พบว่าประมวลรหัสให้โปรตีนแลคเคสที่มีความเหมือนกับแลคเคสที่ผลิตจากเชื้อหลายสายพันธุ์ เช่น มีความเหมือน 84% ด้วยค่า e-value 2e-11 กับ แลคเคส B จาก *Trametes* sp. 420 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAW28937.1 และมีความเหมือน 35% ด้วยค่า e-value 1e-10 กับ แลคเคส 4 จาก *Pleurotus pulmonarius* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAY41064.1 และมีความเหมือน 72% ด้วยค่า e-value 1e-10 กับแลคเคส 3 จาก *Pleurotus sajor-caju* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAG27435.1 จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลคเคส



รูปที่ 4.20 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คู่ไพรเมอร์ *Plac-F* และ *Plac-R*

ช่องที่ 1 100 bp DNA ladder ของบริษัท BioExcellence ประเทศไทย

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้อุณหภูมิในการแอนนีลที่ 48°C

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้อุณหภูมิในการแอนนีลที่ 51°C

```

5'      1 CNGANTCTCA AGGTGTGGGT TCCTNCNTCG GAGATTCTTC CCAAAAATTC CGACGTCTAC TCTGGCTAGC
61      AACTCAATAC TGTGATGGCC TCAGAGGAGC ACTCTGGGTC TACGACGATA ATGACCCGCA CGCGCACTTG
                                     lacAg-F1  —————>

121     TGAGTTGAGC TATTTTCGAC TGTATAGAAC TTATTTTAA ACGCAATGTC TTGGCAGATA TGACTTCGAC
181     GACAGTACGT GCATGTCAGA TCCAGGAGGC CCGTAAAACG CGACTGATTT GACTCACTA TTTCCAGAGA
241     GCACCATCAT CACTCTGGCG GACTGGTAAG TCTCGATCGT TCGTATTTGT TTCATTTGCT GAAAATTCGT
301     GCTTAGGTAC CATACGGTTG CTCCGTCTGC TGGGTTGGTA CCTGCATCGG GACGCGACTT TGATCAACGG
361     TGTCGGCCGC TTTGCTGGCG GACCGCCGTC GACCTGGGCG GGTATCAACG TGTGGCCCAA CAAGAGGTAC
421     GGGTCCGCTT GATTTCGTC TCTTGC GACC CCATTTTATT TTCTCTATCG ATGGGGCACA ACATGGGAAA
                                     <———— lacAg-R1

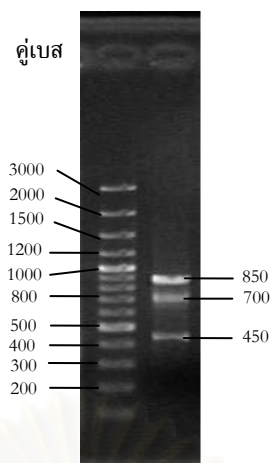
481     GGTCACTAGA ATCCCGCGTA GGTACGAAAC TTAAAGNGCT GGTTCGTAN TATANAACNA TCATCGANGG
541     GCGACTCCGT TCAACNGTCG AAACCCTCAN CGGTCNATCC ANTTCAAAT NTTCGCCGCC CAACGGGNNC
601     TCCCTNCNNG NTNNAANGCC AACAAAGCCNG NCNCAATTAC TNGGAATNCC CGCANNTTGT TGAAAAACCC
661     GGCTNNCCCC GNAAAGGGAN TTGGGGTTCA NGGCCAAGG GTTTAAACNA GTTGAATT 3'

```

รูปที่ 4.21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกใช้พอลิเมอร์ขนาด 850 คู่เบส เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คู่ไพรเมอร์ *Plac-F* และ *Plac-R* ตำแหน่งไพรเมอร์ lacAg-F1 และ lacAg-R1 แสดงด้วยอักษรหนาสำหรับลูกศร (—>) แสดงทิศทางของไพรเมอร์

นำข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบเบื้องต้นมาออกแบบนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแลคเคสของ *Agrocybe* sp. CU-43 ให้ชื่อว่าไพรเมอร์ lacAg-F1 และ lacAg-R1 โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ดังกล่าวแสดงในรูปที่ 4.21 และทำปฏิกิริยาลูกใช้พอลิเมอร์อีกครั้งตามวิธีการในข้อ 3.5.13.8.6 โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นแม่แบบร่วมกับคู่ไพรเมอร์ lacAg-F1 และ lacAg-R1 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกใช้พอลิเมอร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามข้อ 3.5.12.4 พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ 3 ขนาด ได้แก่ 850 700 และ 450 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.22 และนำผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 450 คู่เบสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ควรจะได้จากไพรเมอร์คู่นี้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit ดังรายละเอียดในข้อ 3.5.13.7 และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.22 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คูไพรเมอร์ lacAg-F1 และ lacAg-R1

ช่องที่ 1 100 bp plus DNA ladder ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากผลิตภัณฑ์ขนาด 850 คู่เบสมีลักษณะและปริมาณที่เข้มข้นและชัดเจน จึงนำผลิตภัณฑ์ถูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ขนาดประมาณ 850 คู่เบสมาทำให้บริสุทธิ์และเชื่อมเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pJET1 ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.13.8.1 ทรานสฟอร์มเข้า *E.coli* DH5 α และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน โคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจะสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน คัดเลือกโคลนดังกล่าวมาสกัดพลาสมิดตามวิธีการในข้อ 3.5.13.8.5 นำพลาสมิดที่สกัดได้มาเป็นแม่แบบในปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คูไพรเมอร์ pJET-F และ pJET-R ที่เป็นไพรเมอร์ของลำดับบนเวกเตอร์ (ภาคผนวก จ5) โคลนที่ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเท่ากับขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกคือประมาณ 850 คู่เบส ถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 4.23 ซึ่งเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX พบว่าประมวลรหัสให้โปรตีนแลคเคส ที่มีความเหมือนกับแลคเคสที่ผลิตจากเชื้อต่างๆ เช่น มีความเหมือน 51% ด้วยค่า e-value $2e-45$ กับแลคเคส 1 ของ *Pleurotus sajor-caju* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank CAD45377.1 มีความเหมือน 53% ด้วยค่า e-value $3e-47$ กับแลคเคส C จาก *Trametes* sp. 420 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAW28938.1 และมีความเหมือน 50% ด้วยค่า e-value $3e-43$ กับแลคเคสของ *Pleurotus ostreatus* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAR21094.1


```

5'      1 TCTCATTATT GTGGGTGTAA TTCATCGGAG ATTCTTCCCA AAAATTCCGA CGTCTACTCT
61 GGCTAGCAAC TCAATACTGT GATGGCCTCA GAGGAGCACT CGTGGTCTAC GACGATAATG
121 ACCCGCACGC GCACTTGTGA GTTGAGCTAT TTTCGACTGT ATAGAACTTA TTTTAAACG
181 CAATGTCTTG GCAGATATGA CTTCGACGAC AGTACGTGCA TGTCAGATCC AGGAGGCCCC
241 TAAACGCGA CTGATTGTA CTCACTATT CCAGAGAGCA CCATCATCAC TCTGGCGGAC
301 TGGTAAGTCT CGATCGTTCG TATTTGTTTC ATTGCTGAA AATTCGTGCT TAGGTACCAT
361 ACGGTGCTC CGTCTGCTGG GTTGGTACCT GCATCGGACG CGACTTTGAT CAACGGTGTC
421 GGCCGCTTTG CTGGCGGACC CGCCGTCGAC CTGGCGGTTA TCAACGTGTT GCCCAACAAG
481 AGGTACCGGT TCCGCTTGAT TTCGCTCTCT TCGCACCCCA ATTTCAATTT CTCTATCGAT
541 GGGACAACA TGGTAAGTCC ACTAGAATCC CGCGTAGTAC GAAACTAAAA GTGCTGTTTC
601 G TACTATAGA CGATCATCGA GGTCGACTCC GTCAACGTCG AACCCCTCAC CGTCGATTCC
661 ATTACGATCT TCGCCGCCA GCGGTACTCC TTCGTGCTGA ACGCCAACCA GCCGATCGAC
721 AACTACTGGA TTCGCGCCCT C      3'

```

รูปที่ 4.23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาด 850 คู่เบส เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คูไพรเมอร์ pJET-F และ pJET-R อักษรขีดเส้นใต้แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 450 คู่เบส

สำหรับผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาด 450 คู่เบส เมื่อส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ lacAg-R1 และ lacAg-F1 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังรูปที่ 4.24 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX พบว่าประมวลผลให้โปรตีนแลคเคส ที่มีความเหมือนกับแลคเคสที่ผลิตจากเชื้อต่าง ๆ เช่น มีความเหมือน 53% ด้วยค่า e-value $2e-21$ กับแลคเคส C ของ *Trametes* sp. 420 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAW28938.1 และมีความเหมือน 51% ด้วยค่า e-value $7e-20$ กับแลคเคส 2 ของ *Lentinula edodes* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAT99290.1 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 450 คู่เบส พบอยู่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 850 คู่เบสด้วย ดังแสดงด้วยอักษรหนาขีดเส้นใต้ในรูปที่ 4.23

ใช้ไพรเมอร์ lacAg-F1

```

5'      1 TGAGCTATTT TCGACTGTAT AGAACTTATT TTTAAACGCA ATGTCCTGGC AGATATGACT
61 TCGACGACAG TACGTGCATG TCAGATCCAG GAGGCCCGTA AAACCGCGAT GATTTGTACT
121 CACTATTTCC AGAGAGCACC ATCATCACTC TGGCGGACTG GTAAGTCTCG ATCGTTGCGA
181 TTTGTTTCAT TTGCTGAAAA TTCGTGCTTA GGTACCATAC GGTGCTCCG TCTGCTGGGT
241 TGGTACCTGC ATCGGACGCG ACTTTGATCA ACGGTGTCGG CCGCTTTGCT GGCGGACCCG
301 CCGTCGACCT GCGGTTATC AACGTGTTGC CCAACAAGAG GTACCGGTTT CGCTTGATTT
361 CCGTCTCTTG CGACCCCAAT TTCATTTTCT CTA      3'

```

ใช้ไพรเมอร์ lacAg-R1

```

5'      1 AATGACCCGC ACGCGCACTT GTGAGTTGAG CTATTTTCGA CTGTATAGAA CTTATTTTTA
61 AACGCAATGT CTTGGCAGAT ATGACTTCGA CGACAGTACG TGCATGTCAG ATCCAGGAGG
121 CCCGTA AAC GCGACTGATT TGFACCTACT ATTTCCAGAG AGCACCATCA TCACTCTGGC
181 G GACTGGTAA GTCTCGATCG TTCGTATTG TTTCAATTGC TGAAAAATTCG TGCTTAGGTA
241 CCATACGGTT GCTCCGTCG CTGGGTTGGT ACCTGCATCG GACGCGACTT TGATCAACGG
301 TGTGCGCCG TTTGCTGGCG GACCCGCCGT CGACCTGGCG GTTATCAACG TGTTGCCCAA
361 CAAGAGGTAC CGGTTCCG      3'

```

รูปที่ 4.24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาด 450 คู่เบส เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คูไพรเมอร์ lacAg-F1 และ lacAg-R1

เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนแลคเคสและให้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เพียงผลิตภัณฑ์เดียว ได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลคเคสใน *Agrocybe* sp CU-43 ที่ทราบทั้งหมด 741 คู่เบส มาออกแบบไพรเมอร์อีกครั้งสำหรับใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า lac F-1 และ lac R-2 ดังแสดงในรูปที่ 4.25

```

5'      1 TCTCATTATT GTGGGTGTAA TTCATCGGAG ATTCTTCCCA AAAATTCCGA CGTCTACTCT
        61 GGCTAGCAAC TCAATACTGT GATGGCCTCA GAGGAGCACT CGTGGTCTAC GACGATAATG
      121 ACCCGCACGC GCACTTGTGA GTTGAGCTAT TTTCGACTGT ATAGAACTTA TTTTAAACG
      181 CAATGTCTTG GCAGATATGA CTTCGACGAC AGTACGTGCA TGTCAGATCC AGGAGGCCCCG
      241 TAAAACGCGA CTGATTTGTA CTCACTATTT CCAGAGAGCA CCATCATCAC TCTGGCGGAC
      301 TGGTAAGTCT CGATCGTTCG TATTTGTTTC ATTTGCTGAA AATTCGTGCT TAGGTACCAT
      361 ACGGTTGCTC CGTCTGCTGG GTTGGTACCT GCATCGGACG CGACTTTGAT CAACCGGTGTC
                                     lac F-1  —————>

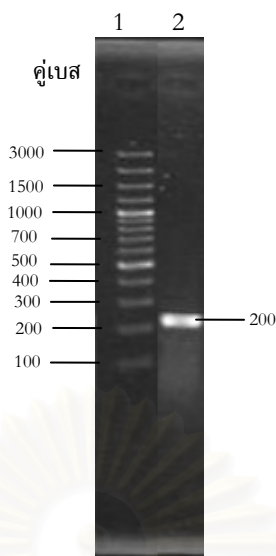
      421 GGCCGCTTTG CTGGCGGACC CGCCGTCGAC CTGGCGGTTA TCAACGTGTT GCCCAACAAG
      481 AGGTACCGGT TCCGCTTGAT TTCCGTCTCT TCGGACCCCA ATTTTCATTTT CTCTATCGAT
      541 GGGCACAACA TGGTAAGTCC ACTAGAATCC CGCGTAGTAC GAAACTAAAA GTGCTGTTTC
                                     <———— lac R-2

      601 GTA CTATAGA CGATCATCGA GGTGACTCC GTCAACGTCG AACCCCTCAC CGTCGATTCC
      661 ATTCAGATCT TCGCCGCCA GCGGTACTCC TTCGTGCTGA ACGCCAACCA GCCGATCGAC
      721 AACTACTGGA TTCGCGCCCT C 3'
  
```

รูปที่ 4.25 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแลคเคสจาก *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ทราบทั้งหมด และตำแหน่งคู่ไพรเมอร์ lac F-1 และ lac R-2 แสดงด้วยอักษรขีดเส้นใต้ สำหรับลูกศร (—>) แสดงทิศทางของไพรเมอร์

เมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์อีกครั้งตามวิธีการในข้อ 3.5.13.10 โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นแม่แบบร่วมกับคู่ไพรเมอร์ lac F-1 และ lac R-2 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามข้อ 3.5.12.4 พบว่าไพรเมอร์คู่ lac F-1 และ lac R-2 มีความจำเพาะสูง โดยให้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์ 1 แถบ มีขนาดประมาณ 200 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.26

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.26 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ lacF-1 และ lacR-2

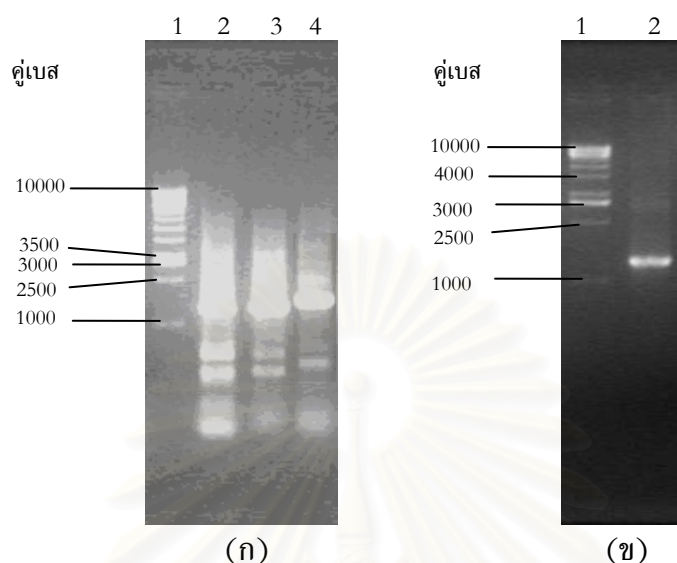
ช่องที่ 1 100 bp plus DNA ladder ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

4.10.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสของ *Agrocybe* sp. CU-43 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สำหรับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gdp* นั้น ได้เลือกใช้ไพรเมอร์ *gdp-F* และ *gdp-R* ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อราหลายจีนิส เช่น *P. chrysosporium* ตามรายงานของ Bogan และคณะ (1996) และรายงานของ (Gettemy และคณะ, 1998) มาใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นแม่แบบ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gdp* ในเชื้อ *Agrocybe* sp. CU-43 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการแอนนิลตั้งแต่ 48°C 51°C และ 55°C เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 48°C มีแถบที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นหลายแถบและลดลงเมื่ออุณหภูมิในการแอนนิลเพิ่มขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 55°C มีแถบที่ไม่จำเพาะน้อยที่สุด โดยมีแบนผลิตภัณฑ์หลักสังเกตได้ชัดเจนขนาดประมาณ 1500 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.27(ก) นำแถบผลิตภัณฑ์หลักไปทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ขนาดประมาณ 1500 คู่เบสที่บริสุทธิ์แล้ว ดังรูปที่ 4.28 มาเชื่อมเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pJET1 ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.13.8 ทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* DH5α และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจะสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน คัดเลือกโคลนดังกล่าวมาสกัดพลาสมิด ตามวิธีการในข้อ 3.5.13.8.5 นำพลาสมิดที่สกัดได้มาเป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อ

ยืนยันการมียีน *gdp* แทรกอยู่ โดยใช้คูไพรเมอร์ *gdp-F* และ *gdp-R* รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ให้ผลบวกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



รูปที่ 4.27 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้คูไพรเมอร์ *gdp-F* และ *gdp-R*

(ก)

- ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา
 ช่องที่ 2 -4 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแอนนีลที่อุณหภูมิ 48°ซ 51°ซ และ 55°ซ ตามลำดับ

(ข)

- ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา
 ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแอนนีลที่อุณหภูมิ 55°ซ หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จำนวน 824 เบส (แสดงในรูปที่ 4.28) มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX พบว่าประมวลรหัสให้โปรตีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (Gdp) ที่มีความเหมือนกับ Gdp ที่ผลิตจากราหลายสายพันธุ์ เช่น มีความเหมือน 59% ด้วยค่า e-value 3e-51 กับ Gdp จาก *Phanerochaete chrysosporium* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank BAF31128.1 มีความเหมือน 56% ด้วยค่า e-value 7e-50 กับ Gdp จาก *Phanerochaete sordida* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank BAF75837.1

```

5'      1 NNNNGCTGNT CGTTTGCCAT CACGAGTGAG TCCTTTCTCA TGGGATCCCC TCCAATGATC
      61 TCATAACCGC GTCAGTCCCT TCATCGATCT TGAATACATG GTATATCGTT GGCAGGTCTA
      121 TTTGGGCATT TTTGGGTCTC TCTAACACTC TAACGTGCCG CATGTTCAAG TACGACTCCG
      181 TCCACGGACG TTTCAAGGGA ACTGTGCGAGT CCAAGGATGG CAAGCTCGTC ATCAATGGCA
      241 AGCCTGTGAC CGTCTACGCC GAGCGCGACC CAGCTGCTAT CCAATGGGGA GCTGTGGTG
      301 CCGAGTACAT CATCGAGGCG ACTGTGAGTA TATCTTTGTG CATTTACCCCT GTACCCCGG
      361 TGCTAATCGC TTTGCAGGGT GTCTTACCA CAACCGAAAA GTAAATCCCTC CGTACGCATG

                                         gdpAaege 474-F
      421 TCTCAGAAGC TAAGCTTACC GGCACCTTTC TCTACCCAGG GCCTCTGCTC ACCTCAAGGG

gdpAaege 474-F →
      481 TGGTGCTAAG AAGGTCGTTA TCTCCGCCCC CTCTGTGAC GCCCCCATGT TCGTCTGTGG
      541 TGTGAAC TTG GAGAGCTACG ACCCAAATA CAAAGTTGTG CGTGTGCGCA CCACATCCTC
      601 ACGCTTATCG CGTTGCTCAT CGAGTTGGTT ATCGCCGATG ATTANATCTC GAACGCGTCT
      661 TGCACAACCA ACTGCCTTGC GCCACTCGCT AAGATCATCA ACGACAACCT CGGTATCGTC
      721 GAGGGTCTGA TGACCACTGT CCACGCTACC ACCGCCACCC ANAANACCGT CGATGGCCCT

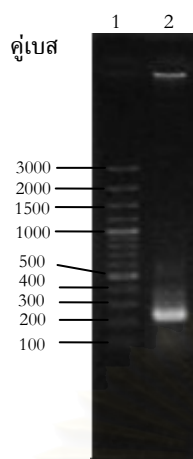
← gdp Aaege 755-R

      781 TCCNCAARAC TGGCGTGGTG TCGCTCCGT AANAAMAMAT CANC      3'

```

รูปที่ 4.28 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *gdp* จาก *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ได้จากการวิเคราะห์หรีดคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ให้ผลบวกโดยใช้คู่ไพรเมอร์ *gdp-F* และ *gdp-R* และตำแหน่งคู่ไพรเมอร์ *gdpAaege 474-F* และ *gdpAaege 755-R* แสดงด้วยอักษรขีดเส้นใต้ สำหรับลูกศร (→) แสดงทิศทางของไพรเมอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่ทราบมาออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *gdp* ของ *Agrocybe* sp. CU-43 สำหรับใช้เป็นชุดควบคุมในปฏิกิริยา RT-PCR ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า *gdpAaege474-F* และ *gdpAaege755-R* ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.1 เมื่อนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.5.12.2 มาใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์คู่ไพรเมอร์ *gdpAaege474-F* และ *gdpAaege755-R* ภาวะในการทำปฏิกิริยาดังข้อ 3.5.12.5 พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะ และได้ผลิตผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสเพียงผลิตภัณฑ์เดียวขนาด 200 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.30 จึงเลือกใช้คู่ไพรเมอร์ *gdpAaege474-F* และ *gdpAaege755-R* สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gdp* ของ *Agrocybe* sp. CU-43 ในระหว่างการย่อยฟลูออรีนในปฏิกิริยา RT-PCR ต่อไป

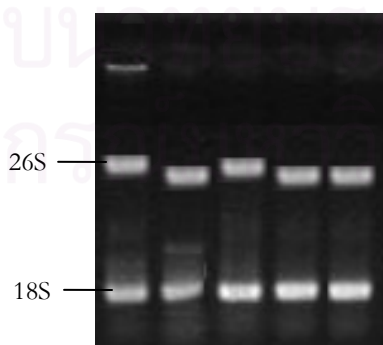


รูปที่ 4.29 ผลิตรหัสดีเอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ *gdp* Aaege474-F และ *gdp* Aaege755-R อุณหภูมิในการแอนนีลที่ 55°C

- ช่องที่ 1 100 bp plus DNA ladder ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา
 ช่องที่ 2 ผลิตรหัสดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ของ *Agrocybe* sp. CU-43

4.10.3 การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA

เมื่อสกัด total RNA จากเซลล์ในช่วงเวลาต่างๆ ของการย่อยฟลูออรีนตามวิธีในข้อ 3.5.13.2 ตรวจสอบผลโดยฟอร์มาลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังรูปที่ 4.30 พบว่ามีแถบ RNA เกิดขึ้นจำนวน 2 แถบคือ 26S และ 18S และ RNA ที่สกัดได้มีคุณภาพดี นำ RNA ทั้งหมดที่สกัดได้ มาสังเคราะห์เป็น cDNA ตามวิธีการในข้อ 3.5.13.5 เพื่อใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR ต่อไป



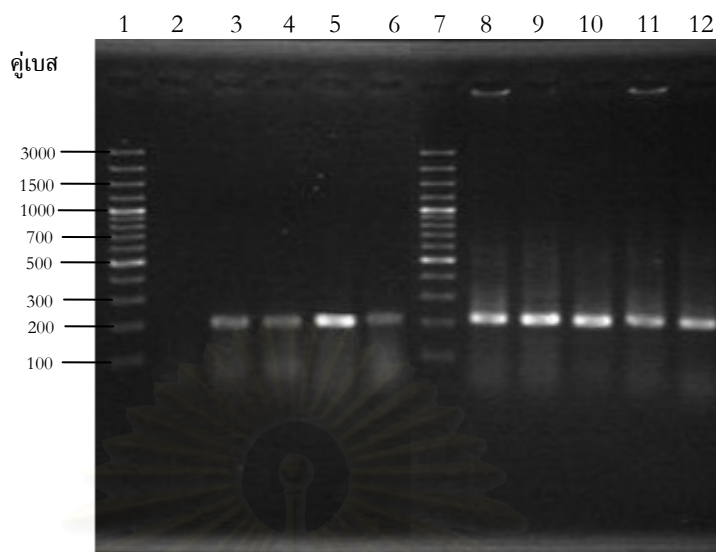
สัปดาห์ที่เก็บตัวอย่าง 0 1 2 3 4

รูปที่ 4.30 ฟอร์มาลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของอาร์เอ็นเอของ *Agrocybe* sp. CU-43 เก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์ของการย่อยฟลูออรีน

4.10.4 การแสดงออกของยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสและยีนแลคเคสของ *Agrocybe* sp. CU-43 ในระหว่างการย่อยฟลูออรีน

เมื่อนำตัวอย่าง cDNA ที่สกัดจากเซลล์แห้งซึ่งเก็บตัวอย่างในระยะเวลาต่าง ๆ ของการย่อยฟลูออรีน ตามรายละเอียดในข้อ 4.10.3 มาใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนแลคเคส โดยมีการแสดงออกของยีน *gdp* เป็นชุดควบคุม ใช้คูไพรเมอร์ *lacF-1* และ *lacR-2* สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนแลคเคสและคูไพรเมอร์ *gdpAaege 474-F* และ *gdpAaege 755-R* สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gdp* โดยใช้ภาวะในการทำปฏิกิริยาตามรายละเอียดในข้อ 3.5.13.10 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.31

สำหรับการแสดงออกของยีน *gdp* ที่ใช้เป็นชุดควบคุม พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์ขนาดประมาณ 200 คู่เบสเกิดขึ้นในปริมาณเท่ากันทุกสัปดาห์ ดังแสดงในรูปที่ 4.31 ช่องที่ 8-12 ส่วนในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนแลคเคสได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์ขนาดประมาณ 200 คู่เบสเกิดขึ้นทุกสัปดาห์ ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 0 (วันแรกที่เริ่มทดลอง) และมีการแสดงออกมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 3 หรือกล่าวได้ว่ามีการแสดงออกของเอนไซม์มากที่สุดในสัปดาห์ที่ 3 สำหรับในสัปดาห์ที่ 1 สัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์ที่ 4 ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์มีความเข้มของแบนใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคสในรูปที่ 4.12 พบว่าการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สอดคล้องกับแอกติวิตีของแลคเคสที่ตรวจพบในแต่ละสัปดาห์ของการย่อยสลายฟลูออรีน คือพบแอกติวิตีทุกช่วงของการย่อยสลายฟลูออรีนทั้ง 4 สัปดาห์ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 0 (สัปดาห์ที่เริ่มทดลอง) ที่ไม่มีการผลิตแลคเคส และเริ่มตรวจพบแอกติวิตีของแลคเคสในสัปดาห์ที่ 1 โดยมีแอกติวิตีสูงเท่ากับ 237 หน่วยต่อมล. และลดลงในสัปดาห์ที่ 2 เป็น 116 หน่วยต่อมล. จากนั้นเพิ่มสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 เท่ากับ 470 หน่วยต่อมล. และลดลงเป็น 213 หน่วยต่อมล. ในสัปดาห์ที่ 4



รูปที่ 4.31 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา RT-PCR จาก cDNA ที่สกัดจากเซลล์แห้งซึ่งเก็บตัวอย่างในระยะเวลาต่าง ๆ ของการย่อยฟลูออรีนเป็นแม่แบบร่วมกับคูไพรเมอร์ที่เฉพาะกับแลคเคสและ *gdp* ของ *Agrocybe* sp. CU-43

ช่องที่ 1 และ 7 100 bp plus DNA ladder ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา

ช่องที่ 2 -6 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีนแลคเคสจากตัวอย่างในสัปดาห์ที่ 0-4 ตามลำดับ โดยใช้คูไพรเมอร์ *lacF-1* และ *lacR-2*

ช่องที่ 8 -12 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *gdp* จากตัวอย่างในสัปดาห์ที่ 0-4 ตามลำดับ โดยใช้คูไพรเมอร์ *gdpAaege 474-F* และ *gdpAaege 755-R*

เพื่อยืนยันผล ได้เมื่อนำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนแลคเคสมาทำให้บริสุทธิ์ และส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการวิเคราะห์พบว่าผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา RT-PCR เป็นส่วนของยีนแลคเคสจริง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลาย PAH คัดกรองราเบื้องต้นโดยพิจารณาความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน มีรายงานว่าเอนไซม์กลุ่มนี้มีบทบาทในการย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน โดยเฉพาะลิกนินในเนื้อไม้ รวมทั้งสามารถสลายสารที่มีโครงสร้างลักษณะวงแหวนคล้ายโครงสร้างของลิกนิน เช่น สารในกลุ่ม PAHs ได้ (Rabinovich และคณะ, 2004; Svobodova และคณะ, 2006) และพิจารณาควบคู่กับความสามารถของเชื้อในการเจริญบนอาหารแข็งที่มี PAH ผสมอยู่ จากนั้นทดสอบความสามารถของราในการย่อย PAH แต่ละชนิดในอาหารเหลว เพื่อคัดเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถสูงสุดมาศึกษาแบบการย่อยสลายฟลูออรีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สารมัยันตร์หลักที่เกิดขึ้น รวมทั้งการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินในระหว่างกระบวนการย่อยสลายฟลูออรีน และการแสดงออกของยีนแลคเคสด้วยวิธี RT-PCR พิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่คัดเลือกโดยเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่างบริเวณ ITS1 และ ITS2 บนบริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอและศึกษาแบบการย่อยสลายฟลูออรีนในแบบจำลองดิน

จากการเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อบริสุทธิ์และคัดกรองราเบื้องต้น โดยอาศัยความสามารถในการเปลี่ยนสีสารสังเคราะห์ ได้แก่ ไกวาคอล phenol red และ azure B ซึ่งม้งงานวิจัยรายงานว่าราไทรอทที่สามารถย่อยสลายสีสังเคราะห์ดังกล่าว มักมีความสามารถเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และลิกนินเพอร์ออกซิเดส ตามลำดับ (Kuwahara และคณะ, 1984; Schliephake และคณะ, 2000; Saparrat และ Guillen, 2005) ในขั้นตอนการคัดเลือกภาพว่ามีบางไอโซเลตให้ผลบวกกับ AzureB แต่อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนสีของ AzureB โดยรากลุ่มไทรอทแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกันไป โดยปกติแล้วจะเกิดจากการทำงานของลิกนินเพอร์ออกซิเดส แต่สำหรับราที่ไม่ผลิตลิกนินเพอร์ออกซิเดสบางสายพันธุ์พบว่าการเปลี่ยนสี AzureB เกิดจากเอนไซม์แลคเคสได้ เช่น *P. sajor-caju* (Chagasa และ Durrant, 2001) หรือเกิดจากแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส เช่น *Irpex lacteus* (Susla และ Svobodova, 2008) ดังนั้นการเปลี่ยนสี Azure B ที่พบในการทดลองนี้จึงอาจเกิดจากแลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส หรือลิกนินเพอร์ออกซิเดส ขึ้นกับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของราแต่ละสายพันธุ์

สำหรับราที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 153 ไอโซเลต มีเพียง 2 ไอโซเลตหรือคิดเป็น 1.3% ของจำนวนไอโซเลตทั้งหมด ที่แสดงความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินได้หลายชนิดและสามารถเจริญบน PAH ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ราไอโซเลต CU-1 และไอโซเลต CU-43 จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราทั้ง 2 ไอโซเลต โดยเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่างบริเวณ ITS1 และ ITS2 บนบริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ พบว่าราไอโซเลต CU-

1 อยู่ในไฟลัม Ascomycota จินัส *Xylaria* และราไอโซเลต CU-43 อยู่ในไฟลัม Basidiomycota คลาส Basidiomycetes จินัส *Agrocybe* สำหรับราคลาส Basidiomycetes นี้มีงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานว่ามีศักยภาพและบทบาทในการสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ความสามารถของเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนินที่สร้างขึ้นโดย Basidiomycetes ยังมีกลไกพิเศษคือเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของอิเล็กตรอนอิสระ จากนั้นอิเล็กตรอนอิสระเกิดออกซิเดชันต่อกับสารที่มารับอิเล็กตรอน ทำให้เกิดการออกซิไดส์สารแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Reddy และ Mathew, 2001; Law และคณะ, 2003; Pointing, 2001)

เมื่อนำ *Xylaria* sp. CU-1 และ *Agrocybe* sp. CU-43 มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAH ชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร พบว่าราทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยสลาย PAH ได้หลายชนิดและมีประสิทธิภาพสูง โดยที่ *Agrocybe* sp. CU-43 มีความสามารถย่อย PAH ได้ดีกว่า *Xylaria* sp. CU-1 และจากการวิเคราะห์ปริมาณ PAH ที่เหลืออยู่ พบว่า *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถย่อยฟลูออรีนได้ดีที่สุดคือย่อยสลายฟลูออรีนได้สมบูรณ์ภายใน 6 วัน และยังสามารถย่อยแอนทราซีนและพีแนทรีนได้มากกว่า 90% ภายใน 21 วัน ย่อยฟลูออแรนทรีนและไพรีนได้ 67.9% และ 81.2% ภายใน 30 วัน อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า *Xylaria* sp. CU-1 จะมีความสามารถในการย่อยสลาย PAH ได้น้อยกว่า *Agrocybe* sp. CU-43 แต่ยังไม่มียุทธศาสตร์การพบความสามารถในการสลาย PAH โดยราในจินัส *Xylaria* มาก่อน มีเพียงรายงานที่พบว่าราในจินัส *Xylaria* มีความสามารถในการผลิตแลคเคสและมีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินเท่านั้น (Liers และคณะ, 2006; Liers และคณะ, 2007) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการย่อยสลาย PAH โดยราในจินัสนี้

สำหรับราในจินัส *Agrocybe* นั้น มีรายงานไว้ว่าราในจินัสนี้สามารถย่อยสลายแอนทราซีน พีแนทรีน ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีนได้ (Sack และคณะ, 1997b; Steffen และคณะ, 2003) แต่ยังไม่เคยมีรายงานความสามารถในการย่อยสลายฟลูออรีนและฟลูออแรนทรีนมาก่อน ดังได้แสดงไว้ในงานวิจัยนี้ งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แสดงว่า *A. aegerita* สามารถย่อยสลายไพรีนและพีแนทรีนที่ความเข้มข้น 50 มก.ต่อลิตรได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) ได้ 3-4% ในระยะเวลา 63 วัน (Sack และคณะ, 1997) แต่ *Agrocybe* sp. CU-43 ในงานวิจัยนี้สามารถสลายไพรีนได้ดีกว่าโดยสามารถสลายไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ได้ถึง 81.2% ภายในเวลา 30 วัน นอกจากนี้ *Agrocybe* sp. CU-43 ยังสามารถสลายพีแนทรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ได้ 99.2% ภายใน 21 วัน

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่ารา *Agrocybe* sp. CU-43 เป็นราที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลาย PAH และเมื่อศึกษาความสามารถของรา *Agrocybe* sp. CU-43 ในการย่อยสลายฟลูออรีนความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ารา *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถย่อยฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรหมดภายใน 6 วัน ความเข้มข้นของฟลูออรีนมีผลต่อความสามารถในการสลายฟลูออรีนโดย *Agrocybe* sp. CU-43 โดยความเข้มข้นของฟลูออรีนที่เพิ่มขึ้นเป็น 250 และ 500 มก.ต่อลิตร ทำให้ระยะเวลาในการย่อยฟลูออรีนจนสมบูรณ์เพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 3 สัปดาห์

ตามลำดับ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 750 และ 1000 มก.ต่อลิตร ไอโซเลต CU-43 ก็ยังสามารถลดปริมาณฟลูออรีนได้ถึงประมาณ 90.0% และ 13.7% ตามลำดับในเวลา 4 สัปดาห์ ความเข้มข้นของ PAH ที่เพิ่มขึ้น อาจทำให้เกิดภาวะเป็นพิษต่อราไวท์รอต ซึ่งมีผลต่ออัตราการย่อยสลาย PAH โดยตรง เช่นเดียวกับการย่อยสลายฟิแนนทรินโดย *T. versicolor* 951022 ซึ่งเกิดขึ้นได้ดีที่ความเข้มข้นของฟิแนนทริน เท่ากับ 10 มก.ต่อลิตร โดย *T. versicolor* 951022 สามารถย่อยฟิแนนทรินได้ 76.7% แต่เมื่อความเข้มข้นของฟิแนนทรินเพิ่มขึ้นเป็น 25 มก.ต่อลิตร และ 100 มก.ต่อลิตร *T. versicolor* 951022 สามารถย่อยฟิแนนทรินได้เพียง 69.9% และ 59.1% ตามลำดับ (Han และคณะ, 2004)

ดังกล่าวแล้วว่ารา *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถสลายฟลูออรีนความเข้มข้น 750 มก.ต่อลิตรได้และสามารถทนต่อฟลูออรีนความเข้มข้นสูงได้มากถึง 1,000 มก.ต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับราไวท์รอตที่มีรายงานว่ามีความทนทานสูง เช่น *P. chrysosporium* ที่สามารถย่อยสลายฟลูออรีน 20 มก.ต่อลิตรได้ 76% ภายในเวลา 30 วันแล้ว (Tekere และคณะ, 2005; Tekere และคณะ, 2007) พบว่า *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถสลายฟลูออรีน 100 มก.ต่อลิตรได้หมดภายในเวลาเพียง 6 วันเท่านั้น ซึ่งแสดงถึงศักยภาพที่สูงกว่าของราไอโซเลตนี้ นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างราสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีรายงานว่าสามารถสลายฟลูออรีนได้ดี เช่น *C. elegans* *P. ostreatus* *T. versicolor* *Bjerkandera* sp. *Drechslera spicifera* และ *Embellisia annulata* แต่อย่างไรก็ตามก็พบว่าการศึกษาของราเหล่านี้จะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของฟลูออรีนสูงขึ้น (Pothuluri และคณะ, 1993; Cerniglia, 1997; Garon และคณะ, 2000; Genney และคณะ, 2004 ; Zhang และคณะ, 2006)

ในระหว่างการย่อยฟลูออรีนในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด โดย *Agrocybe* sp. CU-43 พบว่ามีแอกติวิตีของแลคเคสสูงตลอดช่วงเวลาของการย่อยสลาย โดยมีแอกติวิตีสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 เท่ากับ 470 หน่วยต่อมล. และยังพบแอกติวิตีของแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสทุกช่วงของการย่อยสลายฟลูออรีนเช่นเดียวกับแลคเคส แต่มีแอกติวิตีน้อยกว่าแลคเคสอย่างเห็นได้ชัด โดยแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสมีแอกติวิตีสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 4.34 หน่วยต่อมล. แต่ไม่พบแอกติวิตีของลิกนินเพอร์ออกซิเดสตลอดการทดลอง จากข้อมูลดังกล่าวมาเห็นได้ว่าแลคเคสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสน่าจะถูกสร้างขึ้นเพื่อมีส่วนร่วมในการย่อยฟลูออรีนโดยรา *Agrocybe* sp. CU-43 เช่นเดียวกับการย่อยสลายฟลูออรีนโดยราไวท์รอตส่วนใหญ่ที่มีรายงานไว้ (Galliano และคณะ, 1991; Maltseva และคณะ, 1991; Nerud และคณะ, 1991; Ruttimann และคณะ, 1992; Ruttimann-Johnson และคณะ, 1993; Hammel, 1995)

จากงานวิจัยพบว่าแอกติวิตีของแลคเคสในระหว่างการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Agrocybe* sp. CU-43 นั้นมีลักษณะแบบเพิ่มขึ้นแล้วลดลงสลับกันไปตลอดระยะเวลาการทดสอบ ซึ่งน่าจะเป็นลักษณะเฉพาะของการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ เนื่องจากมีรายงานแอกติวิตีของแลคเคสที่ตรวจพบในระหว่างการย่อยสลายฟิแนนทรินโดย *P. ostreatus* ในแต่ละวันที่มีแอกติวิ

ดีแบบสลับเพิ่มขึ้นและลดลงเช่นกัน อย่างไรก็ตามพบว่าแลคเคสที่สูงขึ้นมีผลต่อการย่อยสลาย PAH ได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าแอกติวิตีของแลคเคสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสยังถูกยับยั้งได้โดยสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยสลายพีแนทรีน (Bezalel และคณะ, 1996c) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในช่วงที่มีแอกติวิตีของแลคเคสที่ลดลงนั้นเกิดจากสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้น

การแสดงออกของยีนแลคเคสในระหว่างการย่อยฟลูออรีนโดย *Agrocybe* sp. CU-43 ได้รับการยืนยันโดยการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลคเคสและยีน *gdp* ของ *Agrocybe* sp. CU-43 โดยใช้ยีน *gdp* ซึ่งจะมีการแสดงออกเท่ากันตลอดทุกช่วงของการย่อยฟลูออรีนเป็นชุดควบคุม ซึ่งจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนแลคเคสในระหว่างการย่อยฟลูออรีนมีความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกับแอกติวิตีของแลคเคสที่ตรวจพบในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด

อย่างไรก็ตามการย่อยสลาย PAH ของราไวท์รอตแต่ละชนิดเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ราไวท์รอตบางสายพันธุ์อาจสร้างแลคเคสและ/หรือแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสในการสลาย PAH เช่น *Pleurotus stratus* D1, *Coriolopsis gallica*, *Trametes versicolor* และ *Phanerochete laevis* (Bogan และ Lamar, 1996; Majcherczyk และคณะ, 1998; Bressler และคณะ, 2000; Pozdnyakova และคณะ, 2004) แต่สำหรับ *P. chrysosporium* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานความสามารถในการย่อยสลาย PAH ได้หลายชนิดนั้น ไม่พบการสร้างแลคเคส โดยที่การย่อยสลายฟลูออรีนและ PAH ชนิดอื่น ๆ โดยรา *P. chrysosporium* นั้นมักเกิดจากลิกนินเพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์หลักหรืออาจร่วมกับการทำงานของแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (Tien และ Kirk, 1988; Sutherland และคณะ, 1991; Vazquez-Duhalt และคณะ, 1994; Bogan และ Lamar, 1996; Bogan และคณะ, 1996a; Bogan และคณะ, 1996b) ซึ่งแตกต่างจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Agrocybe* sp. CU-43 ซึ่งน่าจะเกิดจากเอนไซม์แลคเคส นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแลคเคสสามารถออกซิไดส์ PAH ชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น แลคเคสที่สร้างโดย *T. versicolor* สามารถออกซิไดส์แอนทราซีนและเบนโซ[เอ]ไพรีนได้ (Han และคณะ, 2004) หรือการสลาย polychlorinated biphenyls โดย *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 ที่พบว่าเอนไซม์ที่บทบาทสำคัญคือแลคเคส และยังพบแอกติวิตีของแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสในระหว่างการสลาย polychlorinated biphenyls ด้วย (Pickard และคณะ, 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแลคเคสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสจะเข้าไปเกี่ยวข้องกับการสลาย PAH โดย *P. ostreatus* และ *T. versicolor* โดยช่วยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันผ่านเมดิเอเตอร์ (Johannes และ Majcherczyk, 2000) ทำให้ *P. ostreatus* สามารถย่อย PAH ที่มีโครงสร้าง 3 วงถูกย่อยสลายได้ 89% ภายในระยะเวลา 7 สัปดาห์ (Eggen, 1999) ซึ่งยังช้ากว่าการย่อยสลายโดย *Agrocybe* sp. CU-43 นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าในระหว่างการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *P. ostreatus* มีการผลิตแลคเคสสูงสุด 61 หน่วยต่อมล. และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส 0.84 หน่วยต่อมล. (Bezalel และ

คณะ, 1996a) ซึ่งมีแอกติวิตี้น้อยกว่า *Agrocybe* sp. CU-43 ที่ผลิตแลคเคส 470 หน่วยต่อมล. และแมงกานีสเพอร์ออกไซด์ 4.34 หน่วยต่อมล. นอกจากนี้มีรายงานว่า การย่อยสลายฟลูออรีนเกิดจากเอนไซม์ในกลุ่มดังกล่าวแล้ว อย่างไรก็ตามบางกรณีอาจพบว่าการย่อยสลายฟลูออรีนอาจเกิดได้โดยวิธีอื่นๆ ได้เช่นกัน เช่น โดย cytochrome P-450 monooxygenases ซึ่งพบว่ามีบทบาทในการย่อยสลายฟลูออรีนในราหลายชนิด (Crawford และ Gupta, 1990; Pothuluri และคณะ, 1993; Schlenk และคณะ, 1994)

ในขั้นตอนการย่อยสลายฟลูออรีนในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด โดย *Agrocybe* sp. CU-43 พบว่ามีสารมัธยันตร์หลักคือสารมัธยันตร์ 1 (รูปที่ 4.10) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีค่า retention time เท่ากับสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอล จึงสันนิษฐานได้ว่าสารมัธยันตร์ 1 คือ 9-ฟลูออรีนอล และเนื่องจากในขั้นตอนการย่อยฟลูออรีนโดย *Agrocybe* sp. CU-43 มีสารมัธยันตร์ 1 เกิดขึ้นตั้งแต่สัปดาห์แรกและสะสมมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดตลอดการย่อยสลายฟลูออรีน จึงได้ตรวจสอบต่อไปว่าสารมัธยันตร์ 1 เป็นสารมัธยันตร์สุดท้ายหรือไม่ โดยการทดสอบการย่อย 9-ฟลูออรีนอล และพบว่า 9-ฟลูออรีนอล ถูกเปลี่ยนไปเป็นสารมัธยันตร์ชนิด 1-1 (รูปที่ 4.11) จึงอาจกล่าวได้ว่า 9-ฟลูออรีนอลไม่ใช่สารมัธยันตร์สุดท้ายของกระบวนการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Agrocybe* sp. CU-43 และควรมีการศึกษาต่อไปว่าสารมัธยันตร์ชนิด 1-1 ดังกล่าวเป็นสารใด

สารมัธยันตร์อีกชนิดที่น่าสนใจเนื่องจากสังเกตเห็นได้ชัดในการย่อยฟลูออรีนในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 2 คือสารมัธยันตร์ 2 (รูปที่ 4.10) พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ retention time ของสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีโนน จึงสันนิษฐานได้ว่าสารมัธยันตร์ 2 คือ 9-ฟลูออรีโนน ซึ่งทั้ง 9-ฟลูออรีนอลและ 9-ฟลูออรีโนน มีรายงานว่ามีความเป็นพิษน้อยกว่าฟลูออรีน (Pothuluri และคณะ, 1992; Garon และคณะ, 2000) ดังนั้นการย่อยสลายฟลูออรีนได้เป็นสารมัธยันตร์ทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยรา *Agrocybe* sp. CU-43 จึงอาจกล่าวได้ว่า *Agrocybe* sp. CU-43 มีความสามารถในการบำบัดสารพิษทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการบำบัดการปนเปื้อนฟลูออรีน

การย่อยสลายฟลูออรีนแล้วได้สารมัธยันตร์เป็น 9-ฟลูออรีนอลและ 9-ฟลูออรีโนนนั้นพบได้ในการย่อยสลายฟลูออรีนโดยราหลายสายพันธุ์ (Crawford และ Gupta, 1990; Schlenk และคณะ, 1994; Bezalel และคณะ, 1996b; Cerniglia และ Sutherland, 2001) เช่น การย่อยสลายฟลูออรีนด้วยแลคเคสโดย *Corioloopsis gallica* และการย่อยฟลูออรีนในดินโดย *P. chrysosporium* ที่พบว่ามี 9-ฟลูออรีโนนเกิดขึ้น (Hammel, 1995; Bressler และคณะ, 2000) และการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *P. ostreatus* ที่พบว่ามีสารมัธยันตร์คือ 9-ฟลูออรีโนน และ 9-ฟลูออรีนอล แต่สารมัธยันตร์ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นสารมัธยันตร์สุดท้ายของการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *P. ostreatus* (Bezalel และคณะ, 1996b) ซึ่งแตกต่างจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Agrocybe* sp. CU-43 ที่พบว่ามี 9-ฟลูออรีนอลไม่ใช่สารมัธยันตร์สุดท้ายและสามารถถูกย่อยสลายไปเป็นสารมัธยันตร์ชนิดใหม่ได้ต่อไป

มีรายงานจำนวนมากแสดงไว้ว่าแหล่งที่มีการสะสม PAH มากที่สุดคือดิน ทั้งนี้เนื่องจาก PAH มีความสามารถที่จะถูกดูดซับหรือยึดเกาะกับอนุภาคต่างๆได้ง่าย จึงเกิดการสะสมของ PAH ความเข้มข้นสูงในส่วนตะกอนดิน (Moore และ Ramamoorthy, 1984) นอกจากนี้ยังพบด้วยว่าฟลูออรีนมีการสลายตัวช้า โดยมีครึ่งชีวิตในดิน 32–60 วัน (Crawford และคณะ, 1993) ดังนั้นเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ *Agrocybe* sp. CU-43 ในกระบวนการบำบัดการปนเปื้อนจาก PAH ในพื้นที่จริง จึงได้ทดสอบความสามารถของ *Agrocybe* sp. CU-43 ในการย่อยสลายฟลูออรีนความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อดินแห้ง 1 กรัม ในแบบจำลองดินโดยเติมซีลี้อย่างสำเร็จรูป 10% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เพื่อช่วยปรับสภาพดินและเพิ่มปริมาณสารอาหารในดินรวมทั้งช่วยเพิ่มรูพรุนให้กับดิน ซึ่งเป็นปัจจัยที่ช่วยให้ *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถเจริญได้ดีขึ้น (ศรานนท์ เจริญสุข, 2537) และมีรายงานว่าซีลีอามีผลส่งเสริมการผลิตเมกานีสเพอร์ออกซิเดสใน *P. ostreatus* (Giardina และคณะ, 2000) จากผลการทดลองพบว่า *Agrocybe* sp. CU-43 มีประสิทธิภาพในการย่อยฟลูออรีนความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อดินแห้ง 1 กรัม ได้ทั้งในภาวะปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ โดยสามารถย่อยได้ดีที่สุดในภาวะปลอดเชื้อ โดยฟลูออรีนถูกย่อยจนสมบูรณ์ในสัปดาห์ที่ 4 ในขณะที่ชุดควบคุมในภาวะปลอดเชื้อ มีฟลูออรีนเหลืออยู่ 64% และยังสามารถเห็นการเจริญของ *Agrocybe* sp. CU-43 ในชุดทดลองนี้ นอกจากนี้ *Agrocybe* sp. CU-43 ยังสามารถทำงานร่วมกับเชื้อธรรมชาติที่อยู่ในดินทำให้ฟลูออรีนถูกสลายได้เร็วกว่าการย่อยด้วยเชื้อธรรมชาติที่อยู่ในดินเพียงอย่างเดียว โดยในชุดทดลองที่มีการเติม *Agrocybe* sp. CU-43 มีฟลูออรีนเหลืออยู่ 2% ในขณะที่ชุดควบคุมมีฟลูออรีนเหลืออยู่ 43% แม้ว่าอัตราการย่อยฟลูออรีนของ *Agrocybe* sp. CU-43 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติที่อยู่ในดินจะช้ากว่าการย่อยสลายฟลูออรีนในภาวะปลอดเชื้อ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ฟลูออรีนในดินก็ถูกย่อยสลายได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน สาเหตุที่อัตราการย่อยสลายฟลูออรีนของ *Agrocybe* sp. CU-43 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติช้ากว่าการย่อยสลายในภาวะปลอดเชื่อนั้น อาจเกิดเนื่องจากช่วงแรก *Agrocybe* sp. CU-43 ต้องปรับตัวให้เข้ากับภาวะที่เกิดขึ้นจากการสลายสารประกอบต่างๆในดิน เช่น ความเป็นกรด-เบสที่เปลี่ยนแปลง ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือสารมัธยันตร์ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อธรรมชาติโดยเฉพาะสารที่สร้างขึ้นจากการสลาย PAH โดยเชื้อธรรมชาติหรือการถูกยับยั้งการทำงานโดยเชื้อธรรมชาติ เป็นต้น (Boyle, 1995; Canet และคณะ, 2001; Habe และคณะ, 2001; Meysami และ Baheri, 2003; Garon และคณะ, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าในภาวะปลอดเชื้อ *Agrocybe* sp. CU-43 สามารถยึดเกาะกับซีลีออดีดีกว่าในภาวะไม่ปลอดเชื้อ ส่งผลให้เชื้อสามารถเจริญและแทรกเข้าไปในดินได้เป็นอย่างดี ทำให้สามารถย่อยฟลูออรีนได้เร็วกว่าในภาวะไม่ปลอดเชื้อ เช่นเดียวกับความสามารถของ *P. ostreatus* ที่สามารถยึดเกาะกับฟางข้าวในภาวะปลอดเชื้อได้ดีกว่าในภาวะไม่ปลอดเชื้อ ซึ่งมีผลให้การย่อยสลายแอนทราซีน พีแนนทรีนและไพรีนเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าในภาวะไม่ปลอดเชื้อ (Eggen และ Majcherczyk, 1998; Eggen, 1999)

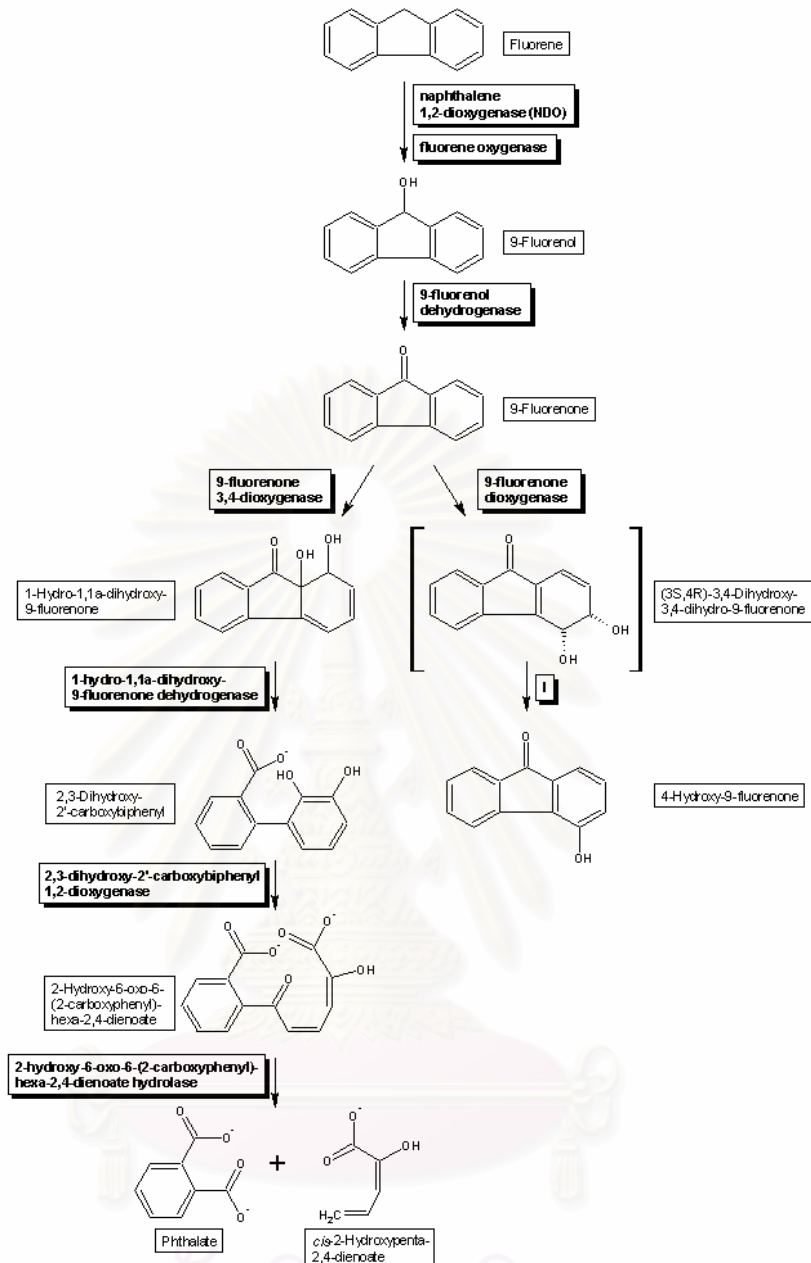
เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายฟลูออรีนในดินของ *Agrocybe* sp. CU-43 กับเชื้อต่าง ๆ เช่น การทดลองของ Canet และคณะ (2001) ได้ทดสอบความสามารถของรา 3 ชนิดในการย่อยสลายตัวอย่างดินปนเปื้อนฟลูออรีนเข้มข้น 16.1 ไมโครกรัมต่อดิน 1 กรัม โดยเก็บตัวอย่างในสัปดาห์ที่ 8 และสัปดาห์ที่ 32 พบว่าตัวอย่างดินที่บำบัดด้วย *P. chrysosporium* มีปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่ 74.9% และ 37.8% สำหรับตัวอย่างดินที่บำบัดด้วย *Coriolus versicolor* มีฟลูออรีนในดินเหลืออยู่ 84.2% และ 47.6% และตัวอย่างดินที่บำบัดด้วย *P. ostreatus* มีฟลูออรีนในดินเหลืออยู่ 86.7% และ 28.0% ใน 8 และ 32 สัปดาห์ ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่า *Agrocybe* sp. CU-43 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟลูออรีนในดินได้ดีกว่า คือสามารถย่อยสลายฟลูออรีนที่ความเข้มข้นสูงถึง 250 ไมโครกรัมต่อดิน 1 กรัมและยังใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายที่สั้นกว่าโดยย่อยสลายเกือบสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เมื่อตรวจสอบการเจริญของ *Agrocybe* sp. CU-43 ตลอดช่วงเวลาของการย่อยฟลูออรีน โดยการวัดน้ำหนักแห้งของเซลล์ พบว่าปริมาณฟลูออรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สูงมีผลต่อการเจริญของ *Agrocybe* sp. CU-43 โดยในสัปดาห์แรกของการย่อยฟลูออรีนการเจริญของเชื้อคงที่ (รูปที่ 4.13) ซึ่งเป็นระยะที่มีปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่ 46.5% หรือประมาณ 232.5 มก.ต่อลิตร (รูปที่ 4.8ค) จากนั้นการเจริญค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 ของการย่อยสลายฟลูออรีน ซึ่งเป็นเวลาที่มีฟลูออรีนเหลือเพียง 36% หรือประมาณ 180 มก.ต่อลิตร และพบว่ามี การเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 เมื่อฟลูออรีนในอาหารถูกย่อยจนสมบูรณ์แล้ว

นอกจากนี้ยังมีรายงานความสามารถของ *Agrocybe* ในการย่อยสลาย PAH ชนิดต่าง ๆ เช่น *A. praecox* ในการย่อยสลายพีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนทรีน ไพรีน เข้มข้น 53 ไมโครกรัมต่อกรัมและไพรีนเข้มข้น 6.3 ไมโครกรัมต่อกรัมที่ปนเปื้อนในดินปลอดเชื้อใน 287 วัน ได้ 41% 1.9% 0.5% 22.1% 0.8% 13.3% ตามลำดับ (Gramss และคณะ, 1999) และยังมี การรายงานการสร้างเอนไซม์ *Agrocybe aegerita* peroxidase (AaP) จากรา *Agrocybe aegerita* ซึ่งมีกลไกในการทำงานเป็นแบบผสมระหว่างเอนไซม์ hemethiolate haloperoxidases ซึ่งได้มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้วกับ cytochrome P450 ซึ่งเป็นการทำงานที่แตกต่างไปจากเพอร์ออกซิเดสที่มีรายงานทั่วไป บริเวณ เร่งปฏิกิริยา ของ AaP ประกอบด้วยเฟอร์ริก ฮีมไทโอเลท [heme-Fe³⁺]-Cys และมีรายงานว่าสามารถย่อยสลาย แนพทาซีน โทลูอิน หรือสารประกอบที่มีโครงสร้างแบบวงแหวนได้ดี สำหรับสารมัธยันตร์ชนิดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ AaP เช่น ครีซอล (cresols) เบนซิล แอลกอฮอล์ (benzyl alcohol) หรือ พารา-เบนโซควิโนน (*p*-benzoquinone) (Jin และคณะ, 2004; Ullrich และ Hofrichter, 2007) นอกจากนี้มีรายงานว่า *Agrocybe aegerita* มีประสิทธิภาพในการช่วยลดการปนเปื้อนโลหะหนักบางชนิด เช่น แคดเมียมและปรอทได้ (Baldrian, 2003)

อย่างไรก็ตาม ในกระบวนการย่อยสลายฟลูออรีนอย่างสมบูรณ์ โดย *Agrocybe* sp. CU-43 ต้องทำงานร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เช่น *Pseudomonas mendocina* MC2 ซึ่งมีรายงานว่า

สามารถใช้ 9-ฟลูออรีโนนแต่ไม่สามารถใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยกระบวนการ dioxygenation ด้วยเอนไซม์ 9-fluorenone-3,4-dioxygenase ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 1-hydro-1,1 α -dihydroxy-9-fluorenone ซึ่งสามารถถูกย่อยสลายด้วย 1-hydro-1,1 α -dihydroxy-9-fluorenone dehydrogenase ได้เป็น 2,3-Dihydroxy-2'-carboxybiphenyl จากนั้นเอนไซม์ 2,3-dihydroxy-2'-carboxybiphenyl 1,2-dioxygenase จะเข้ามาช่วยในการย่อยสลาย เกิดเป็น 2-Hydroxy-6-oxo-6-(2-carboxyphenyl)-hexa-2,4-dienoate ซึ่งถูกย่อยอีกครั้งด้วย 2-hydroxy-6-oxo-6-(2-carboxyphenyl)-hexa-2,4-dienoate hydrolase จนได้ผลิตภัณฑ์เป็น Phthalate และ *cis*-2-Hydroxypenta-2,4-dienoate (Casellas และคณะ, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 5.1 สำหรับพทาเลท (Phthalate) และ *cis*-2-Hydroxypenta-2,4-dienoate สามารถถูกย่อยสลายต่อไปเป็น 3,4-Dihydroxybenzoate หรือ Catechol ซึ่งสามารถถูกย่อยสลายต่อไปเป็น acetyl CoA เพื่อเข้าสู่วิถีแมแทบอลิซึม TCA cycle ต่อไป (http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/show_pathway?MAP00362+C01163) ซึ่งได้มีรายงานการนำ *Pseudomonas mendocina* MC2 มาช่วยในการย่อยสลายฟลูออรีน (co-culture) ร่วมกับ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ F101 ซึ่งย่อยฟลูออรีนแล้วได้สารมัธยันตร์คือ 9-ฟลูออรีโนนสะสมเป็นสารมัธยันตร์สุดท้าย



รูปที่ 5.1 กระบวนการย่อยสลายฟลูออรีนอย่างสมบูรณ์ของกระบวนการย่อยสลายฟลูออรีน (ที่มา Wattiau และคณะ, 2001)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในจีนัส *Agrocybe* มีความสามารถสร้างที่มีประโยชน์ด้านการแพทย์ได้หลายชนิด เช่น hemolysins (Berne และคณะ, 2002) สารต้านมะเร็ง (antitumor) (Zhao และคณะ, 2003) *A. cylindracea* สามารถผลิตสารต้านการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (antimutagenic) (Taira และคณะ, 2005) *A. cylindracea* สามารถสร้างโปรตีนที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Nakamura และคณะ, 2002) และราสปิซีส์นี้ยังสามารถผลิตเพปไทด์ชื่อ agrocybin ที่มีฤทธิ์ต้านราชนิดอื่น ๆ (Ngai และคณะ, 2005) *A. cylindracea* สายพันธุ์ B และ *A. aegerita* สามารถผลิตสารป้องกันการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งสามารถป้องกัน

ดีเอ็นเอไม่ให้อุณหภูมิสูงทำลาย จากการชักนำด้วยสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (Lo และคณะ, 2005; Lin และคณะ, 2006)

นอกจากการประยุกต์ใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนจากสารพิษแล้ว ความสามารถในการผลิตแลคเคสและแมงกานีสเพอร์ออกไซด์ของ *Agrocybe* sp. CU-43 ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง เช่น ช่วยเร่งปฏิกิริยาออกซิโดซ์เพื่อบำบัดการปนเปื้อนสีสังเคราะห์ หรือสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สีสังเคราะห์ การบำบัดน้ำทิ้งในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ การกำจัดลิกนินในอุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ เป็นต้น (Reid และ Paice 1994; Decarvalho และคณะ, 1999 Mohorcic และคณะ, 2004)

งานวิจัยนี้เป็นรายงานฉบับแรกที่ได้รายงานการพบแอกติวิตีและการแสดงออกของแลคเคสในระหว่างการย่อยสลายฟลูออรีนด้วยราในจีนัส *Agrocybe* และเป็นรายงานแรกที่ได้แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนแลคเคสของราในจีนัส *Agrocybe* รวมทั้งเป็นรายงานแรกที่แสดงว่าราในจีนัส *Xylaria* สามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนได้ ราทั้งสองไอโซเลตนี้ (*Xylaria* sp. CU-1 และ *Agrocybe* sp. CU-43) มีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อบำบัดการปนเปื้อนของสารประกอบกลุ่มนี้ทั้งในน้ำและในดินต่อไป

อย่างไรก็ตามยังคงมีขอบเขตงานวิจัยที่ควรศึกษาต่อไป เช่น ชนิดของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อย 9-ฟลูออรีนอลและสารมัธยันตร์ต่อจากนั้นจนถึงผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นโดยรา *Agrocybe* sp. CU-43 รวมถึงลักษณะสมบัติและสารมัธยันตร์ในการย่อยสลาย PAH ชนิดอื่น ตลอดจนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาวสมบูรณ์ของยีนแลคเคสของ *Agrocybe* sp. CU-43 ด้วย นอกจากนี้ควรศึกษาลักษณะสมบัติและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในการย่อยสลาย PAH ชนิดต่าง ๆ โดย *Xylaria* sp. CU-1

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กิติโรจน์ หวันตาหลา. 2546. การศึกษาปริมาณ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) ในบรรยากาศ ณ บริเวณสถานีขนส่งสายใต้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
- ปรีชา รัตน์ง. 2546. เห็ดยานางิ/เห็ดโคนญี่ปุ่น ใน: ฐานข้อมูลเห็ด. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สาขาพืชผัก ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร, เชียงใหม่, pp 201-206
- ศรานนท์ เจริญสุข. 2537. คู่มือการเพาะเห็ด. ส่งเสริมอาชีพธุรกิจเพชรกระรัต, กรุงเทพฯ

ภาษาอังกฤษ

- Addleman, K., Dumonceaux, T., Paice, M.G., Bourbonnais, R. and Archibald, F.S. 1995. Production and characterization of *Trametes versicolor* mutants unable to bleach hardwood kraft pulp. Applied and Environmental Microbiology 61:3687-3694
- Adriaens, P. and Vogel, T.M. 1995. Biological treatment of chlorinated organics. In: Young, L.Y. and Cerniglia, C.E. (eds) Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley-Liss, New York, N.Y., pp 435-486
- Aitken, M.D. 1993. Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. Chemical Engineering Journal 52:B49-B58
- Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation, 2 edn. Academic Press, San Diego. California
- Alloway, J.B. and Ayres, D.C. 1993. Chemical principles of environmental pollution. Chapman and Hall, London
- Amagai, T., Takaharashi, Y., Mutsushita, H., Morkjoy, D., Sukasem, P. and Tabucanon, M. 1999. A survey on polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soil in Chiang-Mai, Thailand. Environmental International 25:593-572
- Anne, V., Agnès, J. and Pierre, M. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons emitted from a hot-mix drum, asphalt plant: study of the influence from use of recycled bitumen. Journal of Environmental Engineering and Science 6:727-734
- Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J.M. and Beck, A.J. 2004. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated waste using composting approaches. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 34:249-289
- Archibald, F.S. 1992. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. Applied and Environmental Microbiology 58:3110-3116
- Asamudo, N.U., Daba, A.S. and Ezeronye, O.U. 2005. Bioremediation of textile effluent using *Phanerochaete chrysosporium*. African Journal of Biotechnology 4:1548-1553
- Atlas, R.M. and Unterman, R. 1999. Bioremediation. In: Demain, A.C. and Davies, J.E. (eds) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2nd edn. ASM Press, Washington, D.C., pp 666-681
- Aust, S., Swaner, D.P.R. and Stahl, J.D. 2003. Detoxification and Metabolism of Chemicals by White-rot Fungi. Oxford University Press., Washington, D.C.

- Aust, S.D. 1995. Mechanisms of degradation by white rot fungi. Environmental Health Perspectives 103
- Backman, A. and Jansson, J.K. 2004. Degradation of 4-chlorophenol at low temperature and during extreme temperature fluctuations by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. Microbial Ecology 48:246-253
- Baldrian, P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. Enzyme and Microbial Technology 32 78-91
- Berne, S., Krizaj, I., Pohleven, F., Turk, T., Macek, P. and Sepcic, K. 2002. *Pleurotus* and *Agrocybe* hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/General Subjects 1570:153-159
- Bergmeyer, H.U. 1974. Methods of Enzymatic Analysis 1, 2 edn. Academic Press, New York
- Bezalel, L., Hadar, Y. and Cerniglia, C.E. 1996a. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 62:292-295
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P. and Freeman, J.P. 1996b. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 62:2554-2559
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P., Freeman, J.P. and Cerniglia, C.E. 1996c. Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 62:2547-2553
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P. and Freeman, J.P. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 62:2554-2559
- Blumer, M. 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. Scientific American 234:34-45
- Bogan, B.W. and Lamar, R.T. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. Applied and Environmental Microbiology 62:1597-1603
- Bogan, B.W., Schoenike, B., Lamar, R.T. and Cullen, D. 1996a. Expression of *lip* genes during growth in soil and oxidation of anthracene by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology 62:3697-3703
- Bogan, B.W., Schoenike, B., Lamar, R.T. and Cullen, D. 1996b. Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology 62:2381-2386
- Boominathan, K., Balachandra, D.S., Randall, T.A., Kelley, R.L. and Reddy, C.A. 1990. Lignin peroxidase-negative mutant of the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Bacteriology 172:260-265
- Boonchan, S., Britz, M.L. and Stanley, G.A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial co-cultures. Applied and Environmental Microbiology 66:1007-1019
- Boonyatumanond, R., Takada, H., Wattayakorn, G. and Ayako, T. 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine and marine sediments in Thailand. Marine Pollution Bulletin 52:942-956

- Bowlen, G.F. and Kosson, D.S. 1995. In situ processes for bioremediation of BTEX and petroleum fuel products. In: Young, L.Y. and Cerniglia, C.E. (eds) Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals Wiley-Liss, New York, N.Y, pp 515–544
- Boyle, C.D. 1995. Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade organopollutants in soil. Canadian Journal of Microbiology 41:345–353
- Bressler, D.C., Fedorak, P.M. and Pickard, M.A. 2000. Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Corioloopsis gallica*. Biotechnology Letters 22:1119–1125
- Brunow, G. 2001. Methods to reveal the structure of lignin and coal. In: Steinbüchel, A. (ed) Lignin, Humic Substances. Wiley-VCH, Germany, pp 89–116
- Budavari, S. 1989. Drugs and Biologicals. In: Budavari, S. (ed) The Merck Index - Encyclopedia of Chemicals. Rahway, Merck and Co., Inc., NJ, p 650
- Bumpus, J.A. and Aust, S.D. 1986. Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin degrading system. Bio Essays 6:166–170
- Buswell, J.A. and Odier, E. 1987. Lignin biodegradation. Biotechnology and Bioengineering 6:1–60
- Canet, R., Birnstingl, J.G., Malcolm, D.G., Lopez-Real, J.M. and Beck, A.J. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microfora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. Bioresource Technology 76:113–117
- Casellas, M., Grifoll, M., Sabaté, J. and Solanas, A.M. 1998. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. Canadian Journal of Microbiology 44:734–742
- Cerniglia, C.E. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 19:324–333
- Cerniglia, C.E. and Sutherland, J.B. 2001. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. Cambridge university press England
- Chagasa, E.P. and Durrant, L.R. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorajju* Enzyme and Microbial Technology 29:473–477
- Chen, S., Ge, W. and Buswell, J.A. 2004. Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Volvarellia volvacea*. European Journal of Biochemistry 271:318–328
- Chivukula, M., Spadaro, J.T. and Renganathan, V. 1995. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. Biochemistry 34:7765–7772
- Chulalaksananukul, S., Gadd, G.M., Sangvanich, P., Sihanonth, P., Piapukiew, J. and Vangnai, A.S. 2006. Biodegradation of benzo[*a*]pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. FEMS Microbiology Letters 262:99–106

- Clemente, A.R., Anazawa, T.A. and Durrant, L.R. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. Brazilian Journal of Microbiology 32:255–261
- Coates, J.D., Woodward, J., Allen, J., Phillip, P. and Lovley, D.R. 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. Applied and Environmental Microbiology 63:3589–3593
- Colao, M.C., Garzillo, A.M., Buonocore, V., Schiesser, A. and Ruzzi, M. 2003. Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete *Trametes trogii*. Applied Microbiology and Biotechnology 63:153–158
- Conesa, A., Punt, P.J. and van den Hondel, C.A. 2002. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. Journal of Biotechnology 93:143–158
- Connell, D., Lam, P., Richaedson, B. and We, R. 1999. Introduction to Ecotoxicology. Blackwell Science, london
- Crawford, D.L. and Gupta, R.K. 1990. Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. Current Microbiology 21:229–231
- Crawford, S.L., Johnson, G.E. and Goetz, F.E. 1993. The potential for bioremediation of soils containing PAHs by composting. Compost Science and Utilization Summer
- Cullen, D. 2002. Molecular genetics of lignin-degrading fungi and their applications in organopollutant degradation. In: Kempken (ed) The Mycota Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp 71–81
- Decarvalho, M., Monteiro, M. and Sant'Anna, G., Jr. 1999. Laccase from *Trametes versicolor*. Stability at temperature and alkaline conditions and its effect on biobleaching of hardwood kraft pulp. Applied Biochemistry and Biotechnology 77:723-733
- de Jong, E., Field, J.A., Spinnler, H.E., Wijnberg, J.B.P.A. and de Bont, J.A.M. 1994. Significant biogenesis of chlorinated aromatic by fungi in natural environments. Applied and Environmental Microbiology 60:264–270
- Doerge, D.R., Divi, R.L. and Churchwell, M.I. 1997. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. Analytical Biochemistry 250:10–17
- Duedahl-Olesen, L., White, S. and Binderup, M. 2006 Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in danish smoked fish and meat products. Polycyclic Aromatic Compounds 26:163–184
- Eggen, T. 1999. Application of fungal substrate from commercial mushroom production *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of creosote contaminated soil. International Biodeterioration and Biodegradation 44:117–126
- Eggen, T. and Majcherczyk, A. 1998. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. International Biodeterioration and Biodegradation 41:111–117
- Enrique, L., Cédric, B., Hauke, H. and Antonis, C. 2007. Cultivation-independent analysis reveals a shift in ciliate 18S rRNA gene diversity in a polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted soil. FEMS Microbiology Ecology 62:365–373
- Espindola, L.H.S., Espindola, F.S., Freitas, G.R. and Brandeburgo, M.A.M. 2007. Biodegradation of red40 dye by the mushroom *Pleurotus sp florida*. Journal of Biosciences 23:90–93

- Evans, C.S. and Hedger, J.N. 2001. Degradation of plant cell wall polymers. In: Gadd, G.M. (ed) Fungi in bioremediation. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1–64
- Farrell, R.L., Murtagh, K.E., Tien, M., Mozuch, M.D. and Kirk, T.K. 1989. Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme and Microbial Technology 11:322–328
- Fernandez, P., Grifoll, A.M., Solanas, A.M., Bayona, J.M. and Albaiges, J. 1992. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. Environmental Science and Technology 26:817–829
- Field, J.A., De Jong, E., Costa, F.G. and De Bont, J.A.M. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. Applied and Environmental Microbiology 158:2219–2226
- Fontcuberta, M., Arqués, J.F., Martínez, M., Suárez, A., Villalbí, J.R., Centrich, F., Serrahima, E., Duran, J. and Casas, C. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples collected in Barcelona, Spain. Journal of Food Protection 69:2024–2028
- GAO/RCED-96–13. 1996. Superfund: EPA has identified limited alternatives to incineration for cleaning up PCB and dioxin contamination Washington
- Galliano, H., Gas, G., Seris, J.L. and Boudet, A.M. 1991. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: manganese peroxidase and laccase. Enzyme and Microbial Technology 13:478–482
- Garivait, H., Laowagul, W., Sukasem, P., Ngod-Ngam, S., Polprasert, C. and Reutergardh, L.B. 2002. Airborne polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in Bangkok urban air II. Level and distribution. In: รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2537–2545 ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมด้านสิ่งแวดล้อม. กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม, กทม., pp ๕7–73
- Garon, D., Krivobok, S. and Seigle-Murandi, F. 2000. Fungal degradation of fluorene. Chemosphere 40:91–97
- Garon, D., Sage, L. and Seigle-Murandi, F. 2004. Effects of fungal bioaugmentation and cyclodextrin amendment on fluorene degradation in soil slurry. Biodegradation 15:1–8
- Genney, D.R., Alexander, I.J., Killham, K. and Meharg, A.A. 2004 Degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) fluorene is retarded in a scots pine ectomycorrhizosphere. New Phytologist 163:641–649
- Gettemy, J.M., Ma, B., Alic, M. and Gold, M.H. 1998. Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family Applied and Environmental Microbiology 64:569–574
- Gianna, P., Cennamob, G., Faraco, V., Amoresanob, A., Sannia, G. and Giardina, P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. Enzyme and Microbial Technology 33:220–230
- Gold, M., Glenn, J. and Alic, M. 1988. Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. Methods in Enzymology 161:74–78
- Gold, M.H. and Alic, M. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* Microbiological Review 57

- Gramss, G., Voigt, K.D. and Kirsche, B. 1999. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. Biodegradation 10:51–62
- Guillen, F. and Evans, C.S. 1994. Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. Applied and Environmental Microbiology. 60:2811–2817
- Habe, H., Chung, J.S., Lee, J., Kasuga, K., Yoshida, T., Nojiri, H. and Omori, T. 2001. Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins by two types of bacteria having angular dioxygenases with different features. Applied and Environmental Microbiology 67:3610–3617
- Hamman, S. 2004. Bioremediation capabilities of white rot fungi. BI570 – review article Spring
- Hammel, K.E. 1995. Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi. Environmental Health Perspectives 103 41–43
- Han, M.J., Choi, H.T. and Song, H.G. 2004. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. The Journal of Microbiology 42:94–98
- Hatakka, A. 2001. Biodegradation of lignin. In: Hofrichter, M. and Steinbüchel, A. (eds) Biopolymers. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp 129–180
- Head, I.M. and Swannell, R.P.J. 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. Current Opinion in Biotechnology 10:234–239
- Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbauer, M. and Szewzyk, U. 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. Applied and Environmental Microbiology 64:2788–2793
- Hennion, M.C., Pichon, V. and Barcelo, D. 1994. Surface water analysis (trace-organic contaminants) and EC regulations. Trends in analytical chemistry 13:361–372
- Hildén, K., Martinez, A.T., Hatakka, A. and Lundell, T. 2005. The two manganese peroxidases Pr-MnP2 and Pr-MnP3 of *Phlebia radiata*, a lignin-degrading basidiomycete, are phylogenetically and structurally divergent. Fungal Genetics and Biology 42:403–419
- Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.Y., Thacker, J.R. and Kues, U. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. FEBS Journal 273:2308–2326
- Imura, Y., Ikeda, S., Sonoki, T., Hayakawa, T., Kajita, S., Kimbara, K., Tatsumi, K. and Katayama, Y. 2002. Expression of a gene for Mn-peroxidase from *Coriolus versicolor* in transgenic tobacco generates potential tools for phytoremediation. Applied Microbiology and Biotechnology 59:246–251
- Ikehata, K., Buchanan, I.D. and Smith, D.W. 2004. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. Journal of Environmental Science & Engineering 3
- International Agency for Research on Cancer. 1983–1985. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Lyon, France

- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1983. Fluorene In: Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Polycyclic aromatic compounds. Part 1, chemical, environmental and experimental data, Lyon, France, pp 365–371
- Jansson, J.K. 2003. Marker and reporter genes: Illuminating tools for environmental microbiologists. Current Opinion in Microbiology 6:310–316
- Jin, S., Bryson, T.A. and Dawson, J.H. 2004. Hydroperoxoferric heme intermediate as a second electrophilic oxidant in cytochrome P450-catalyzed reactions. Journal of Biological Inorganic Chemistry 9:644 – 653
- Johannes, C. and Majcherczyk, A. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. Applied and Environmental Microbiology 66:524–528
- Jorge, O.O. and Mary, J.W. 2007. Identification of the C₃₀H₁₆ polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[cd]naphthol[1,2,3-*lm*]perylene as a product of the supercritical pyrolysis of a synthetic jet fuel Polycyclic Aromatic Compounds 27:165–183
- Kamitsuji, H., Watanabe, T., Honda, Y. and Kuwahara, M. 2004. Direct oxidation of polymeric substrates by multifunctional manganese peroxidase isozyme from *Pleurotus ostreatus* without redox mediators. Biochemical Journal Immediate Publication 386:387-393
- Kanally, R.A. and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high- molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. Journal of Bacteriology 182:2059–2097
- Kangsadalampai, K., Butryee, C. and Manoonphol, K. 1996. Direct mutagenicity of the polycyclic aromatic hydrocarbon-containing fraction of smoked and charcoal-broiled foods treated with nitrite in acid solution. Food and Chemical Toxicology 35:213–218
- Karahanian, E., Corsini, G., Lobos, S. and Vicuna, R. 1998. Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. Biochimica et Biophysica Acta 1443:65-74
- Karam, J. and Nicell, J.A. 1997. Potential application of enzymes in waste treatment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 69:141-153
- Kawai, S., Umezawa, T. and Higuchi, T. 1988. Degradation mechanism of phenolic b-1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. Archives of Biochemistry and Biophysics 262:99–110
- Kiiskinen, L.L., Ratto, M. and Kraus, K. 2004. Screening for novel laccase-producing microbes. Journal of Applied Microbiology 97:640 – 646
- Kim, K.M., Ryoo, K.H. and Jung, H.S. 2004. Polymorphism of the nuclear ITS region in *Trametes versicolor* and another method for determining evolutionary speed of fungal species. In: Inoculum Newsletter of the Mycological Society of America, p 21
- Koduri, R.S. and Tien, M. 1995. Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase role of veratryl alcohol. The Journal of Biological Chemistry. 270:22254-22258
- Koker, T.H., Zhao, J., Allsop, S.F. and Janse, B.J.H. 2000. Isolation and enzymic characterisation of south African white rot fungi. Mycological Research 104:820–824

- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. and Gold, M.H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters 169:247-250
- Lankinen, P. 2004. Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose-containing media. In: Agriculture and Forestry. University of Helsinki, Helsinki, p 54
- Lau, K.L., Tsang, Y.Y. and Chiu, S.W. 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. Chemosphere 52:1539-1546
- Law, W.M., Lau, W.N., Lo, K.L., Wai, L.M. and Chiu, S.W. 2003. Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*. Chemosphere 52:1531-1537
- Leatham, G.F., Forrester, I.T. and Mishra, C. 1991. Enzymes from solid substrates. Recovering extracellular degradative enzymes from *Lentinula edodes* cultures grown on commercial wood medium. In: Timell, T.E. (ed) Springer Series in Wood Science. Springer-Verlag, Berlin, pp 95-110
- Lide, D.R. and Frederikse, H.P.R. 1993. CRC handbook of chemistry and physics, 74 edn. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Liers, C., Ullrich, R., Pecyna, M., Schlosser, D. and Hofrichter, M. 2007. Production, purification and partial enzymatic and molecular characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha*. Enzyme and Microbial Technology 41:785-793
- Liers, C., Ullrich, R., Steffen, K.T., Hatakka, A. and Hofrichter, M. 2006. Mineralization of ¹⁴C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. Applied Microbiology and Biotechnology 69:573-579
- Lin, S.Y., Wang, L.H., Lee, H., Chiang, B.T., Tsai, S.J. and Lin, M.Y. 2006. Protective effects of solvent extracts from Taiwanese *Agrocybe cylindracea* strain B against DNA damage induced by environmental mutagens Journal of the Science of Food and Agriculture 86:1308-1316
- Lin, T.C., Chang, F.H., Hsieh, J.H., Chao, H.R. and Chao, M.R. 2001. Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and total suspended particulates in a Taiwanese temple. Bulletin of Environment Contamination and Toxicology 67:332-338
- Lo, K.M., Peter, C. and Cheung, K. 2005. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba* Food Chemistry 89:533-539
- Machado, K.M.G., Compart, L.C.A., Morais, R.O., Rosa, L.H. and Santos, M.H. 2006. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. Brazilian Journal of Microbiology 37:481-487
- Maijala, P., Harrington, T.C. and Raudaskoski, M. 2003. A peroxidase gene family and gene trees in *Heterobasidion* and related genera. Mycologia 95:209-221
- Majcherczyk, A., Johannes, C. and Huttermann, A. 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. Enzyme and Microbial Technology 22:335-341

- Malachova, K. 1999. Using short-term mutagenicity tests for the evaluation of geotoxicity of contaminated soils. Journal of Soil Contamination 8:667–680
- Maltseva, O.V., Niku-Paavola, M.L., Leontievsky, A.A., Myasoedova, N.M. and Golovleva, L.A. 1991. Ligninolytic enzymes of the white rot fungus *Panus tigrinus*. Biotechnology and Applied Biochemistry 13:291–302
- Mansur, M., Arias, M.E., Copa-Patino, J.L., Flårdh, M. and González, A.E. 2003. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. Mycologia 95:1013–1020
- Martínez, A.T. 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. Enzyme and Microbial Technology 30:425–444.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martínez, M.J., Gutierrez, A. and del Río, J.C. 2005. Biodegradation of lignocellulosic: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology 8:195–204
- Martínez, D., Larrondo, L., Putnam, N., Gelpke, M.S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K., Ramaiya, P., Detter, J., Larimer, F., Coutinho, P., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D. and Rokhsar, D. 2004. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. Nature biotechnology 22:695–700
- Mastral, A.M. and Callen, M.S. 2000. A review on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation. Environmental Science and Technology 34:3051–3057
- Matsubara, M., Suzuki, J., Deguchi, T., Miura, M. and Kitaoka, Y. 1996. Characterization of manganese peroxidases from the hyperlignolytic fungus IZU-154. Applied and Environmental Microbiology 62:4066–4072
- Mayer, A.M. and Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry 60:551–565
- Mester, T. and Tien, M. 2000. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. International Biodeterioration & Biodegradation 46:51–59.
- Meysami, P. and Baheri, H. 2003. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. Advances in Environmental Research 7: 881–887
- Michaels, G.B. and Lewis, D.L. 1985. Sorption and toxicity of azo and triphenylmethane dyes to aquatic microbial populations. Environmental Toxicology and Chemistry 4:45–50
- Michaels, G.B. and Lewis, D.L. 1986. Microbial transformation rates of azo and triphenylmethane dyes. Environmental Toxicology and Chemistry 5:161–166
- Mohan, S., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R. and Shimizu, Y. 2006. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency Reviews in Environmental Science and Biotechnology 5:347–374
- Mohorcic, M., Friedrich, J. and Pavkob, A. 2004. Decoloration of the diazo dye reactive black 5 by immobilised *Bjerkandera adusta* in a stirred tank bioreactor. Acta Chimica Slovenica 51:619-628
- Mollea, C., Bosco, F. and Ruggeri, B. 2005. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. Chemosphere 60:636–643

- Monna, L., Omori, T. and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-p-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63. Applied and Environmental Microbiology 59:285-289
- Moore, J.W. and Ramamoorthy, S. 1984. Aromatic hydrocarbons-polycyclics. In: Organic chemicals in natural waters: Applied monitoring and impact assessment. Springer-Verlag, New York, pp 67-87
- Mori, T., Kitano, S. and Kondo, R. 2003. Biodegradation of chloronaphthalenes and polycyclic aromatic hydrocarbons by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. Applied Microbiology and Biotechnology 61:380-383
- Myers, S.R., Ali, M.Y., Wright, T. and Cunningham, C. 2007. Benzo[a]pyrene metabolism: role of bioalkylation. Polycyclic Aromatic Compounds 27:339-359
- Nakamura, O., Ohba, H., Sallay, I., Yagi, F., Moriwaki, S. and Yasuda, S. 2002. Leukemic cell-adsorbing material containing lectin protein from *Agrocybe cylindracea* or jequirity plant seed. US Patent Number 6420171. In. Japan as represented by Secretary of Agency of Industrial Science USA
- Narro, M.L., Cerniglia, C.E., Van Baalen, C. and Gibson, D.T. 1992. Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. Applied and Environmental Microbiology 58:1351-1359
- National Research Council of Canada (NRCC). 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: formation, sources, fate and effects on aquatic biota. In: NRCC Report No. 18981, p.209
- Neff, J.M. 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: Sources, fates and biological effects. Applied Science Publishers Ltd, Essex, England
- Nerud, F., Zouchova, Z. and Misurcova, Z. 1991. Ligninolytic properties of different white-rot fungi. Biotechnology Letters 13:657-660
- Ngai, P.H., Zhao, Z. and Ng, T.B. 2005. Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. Peptides 26:191-196
- Nishida, T., Yoshinori, K., Mimura, A. and Takahara, Y. 1988. Lignin biodegradation by wood-rotting fungi I. screening of lignin-degrading fungi. Mokuzai Gakkaishi 34:530-536
- Nordin, K. 2004. 4-chlorophenol biodegradation by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. In: Department of Biochemistry and Biophysics. Stockholm University p72
- Okamoto, K., Ito, Y., Shigematsu, I., Yanagi, S.O. and Yanase, H. 2003. Cloning and characterization of a laccase gene from the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Mycoscience 44:11-17
- Okino, L.K., Machado, K.M.G., Fabris, C. and Bononi, V.L.R. 2000. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16:889-893
- Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R. and Vazquez-Duhalt, R. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloropsis gallica* UAMH 8260 laccase. Applied and Environmental Microbiology 65:3805-3809
- Pieper, D. and Reineke, W. 2000. Engineering bacteria for bioremediation. Current Opinion in Biotechnology 11:262-270

- Pointing, S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology 57:20-33
- Pothuluri, J.U., Heflich, R.H., Fu, P.P. and Cerniglia, C.E. 1992. Fungi metabolism and detoxication of fluoranthene. Applied and Environmental Microbiology 58:937-941
- Pothuluri, J.V., Freeman, J.P., Evans, F.E. and Cerniglia, C.E. 1993. Biotransformation of fluorene by the fungus *Cunninghamella elegans*. Applied and Environment Microbiology 59:1977-1980
- Pozdnyakova, N.N., Rodakiewicz-Nowak, J. and Turkovskaya, O.V. 2004. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 30:19-24
- Purcaro, G., Navas, J.A., Guardiola, F., Conte, L.S. and Moret, S. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons in frying oils and snacks. Journal of Food Protection 69:199-204
- Rabinovich, M.L., Bolobava, A.V. and Vasilchenko, L.G. 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review Applied Biochemistry and Microbiology 40:1-17
- Rao, P.S., Ansari, M.F., Pipalatkhar, P., Kumar, A., Nema, P. and S. Devotta, S. 2008. Measurement of particulate phase polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) around a petroleum refinery. Environmental Monitoring and Assessment 137:387-392
- Reddy, C.A. and Mathew, Z. 2001. Bioremediation potential of white rot fungi. Cambridge University Press, Cambridge
- Reid, I.D. and M.G., P. 1994. Biological bleaching of kraft pulp by white rot fungi and their enzymes. FEMS Microbiological Reviews 13:369-373
- Reinik, M., Tamme, T., Roasto, M., Juhkam, K., Tenno, T. and Kiis, A. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in meat products and estimated PAH intake by children and the general population in Estonia Food Additives and Contaminants 24:429-437
- Rockne, K.J., Shor, L.M., Young, L.Y., Taghon, G.L. and Kosson, D.S. 2002. Distributed sequestration and release of PAHs in weathered sediment: The role of sediment structure and organic carbon properties. Environmental Science and Technology 36:2636-2644
- Romantschuk, M., Sarand, I., Petanen, T., Peltola, R., Jonsson-Vihanne, M., Koivula, T., Yrjala, K. and Haahtela, K. 2000. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. Environmental Pollution 107:179-185
- Ruiz-Duenas, F.J., Martinez, M.J. and Martinez, A.T. 1999. Heterologous expression of *Pleurotus eryngii* peroxidase confirms its ability to oxidize Mn^{2+} and different aromatic substrates. Applied and Environmental Microbiology 65:4705-4707
- Ruttimann-Johnson, C., Salas, L., Vicuna, R. and Kirk, T.K. 1993. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispota*. Applied and Environment Microbiology 56:1792-1797
- Ruttimann, C., Schwember, E., Salas, L., Cullen, D. and Vicuna, R. 1992. Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispota*. Biotechnology and Applied Biochemistry 16:64-76

- Sack, U., Heinze, T.M., Deck, J., Cerniglia, C.E., Martens, R., Zadrazil, F. and Fritsche, W. 1997a. Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. Applied and Environmental Microbiology. **63:3919–3925**
- Salony, N., Garg, R., Baranwal, M., Chhabra, S., Mishra, T., Chaudhuri, K. and Bisaria, V.S. 2008. Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. Biochimica et Biophysica Acta **1784:259-268**
- Samanta, S.K., Singh, O.V. and Jain, R.K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. . Trends in Biotechnology and Applied Biochemistry **20:243–248**
- Saparrat, M.C.N. and Guillen, F. 2005. Ligninolytic ability and potential biotechnology applications of the south american fungus *Pleurotus laciniotocrenatus*. Folia microbiologica **50:155–160**
- Sasek, V., Cajthaml, T. and Bhatt, M. 2003. Use of fungal technology in soil remediation: a case study. Water Air and Soil Pollution **3:5–14**
- Schirmer, K., Dixon, D.G., Greenberg, B.M. and Bols, N.C. 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. Toxicology **127:129–141**
- Schlenk, D., Bevers, R.J., Vertino, A.M. and Cerniglia, C.E. 1994. P-450 catalysed S-oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. Xenobiotica **24:1077–1083**
- Schliephake, K., Mainwaring, D.E., Longergan, G.T., Jones, I.K. and Baker, W.L. 2000. Transformation and degradation of the bisazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. Enzyme and Microbial Technology **27:100–107**
- Schoemaker, H.E. and Piontek, K. 1996. On the interaction of lignin peroxidase with lignin. Pure and Applied Chemistry **68:2089–2096**
- Silva, M., Esposito, E., Moody, J.D., Canhos, V.P. and Cerniglia, C.E. 2004. Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cyclothyrium* sp. Chemosphere **57:943–952**
- Sims, R.C. and Overcash, M.R. 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. Research Reviews **88:1–68**
- Srinivasan, C., D'Souza, T.M., Boominathan, K. and Reddt, C.A. 1995. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. Applied and Environmental Microbiology **61:4274–4277**
- Steffen, K., Hatakka, A. and Hofrichter, M. 2002. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. Applied Microbiology and Biotechnology **60:212–217**
- Steffen, K.T., Hataka, A. and Hofrichter, M. 2003. Degradation of benzo[*a*]pyrene by the litter-decompositing basidiomycetes *Stropharia coronilla*: role of manganese peroxidase. Applied and Environmental Microbiology. **69:3957–3964**
- Stewart, P. and Cullen, D. 1999. Organization and differential regulation of a cluster of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Bacteriology **181:3427–3432**

- Sul, D., Oh, E., Im, H., Yang, M., Kim, C.-W. and Lee, E. 2003. DNA damage in T-and B-lymphocytes and granulocytes in emission in section and incineration workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutation Research **583**:109–119
- Susla, M. and Svobodova, K. 2008. Effect of various synthetic dyes on the production of manganese-dependent peroxidase isoenzymes by immobilized *Irpex lacteus* World Journal of Microbiology and Biotechnology **24**:225–230
- Sutherland, J.B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. Journal of Industrial Microbiology **9**:53–62
- Sutherland, J.B., Selby, A.L., Freeman, J.P., Evans, F.E. and Cerniglia, C.E. 1991. Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology **57**:3310–3316
- Suthersan, S.S. 1999. In situ Bioremediation CRC Press Boca Raton, LLC
- Svobodova, K., Erbanavo, P., Sklenar, J. and Novotny, C. 2006. The role of Mn-depedent peroxidase in dye decolorization by static and agitated cultures of *Irpex lacteus*. Folia Microbiologica **51**:573–578
- Swift, M.J. 1982. Basidiomycetes as components of forest ecosystems. In: Frankland, J.C., Hedger, J.N. and Swift, M.J. (eds) Decomposer basidiomycetes: their biology and ecology. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp 307–337
- Taira, K., Miyashita, Y., Okamoto, K., Arimoto, S., Takahashi, E. and Negishi, T. 2005. Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. Mutation Research **586** 115–123
- Tekere, M., Read, J.S. and Mattiasson, B. 2007. White rot fungus in packed bed and suspended carrier bioreactor systems Environmental Technology **28**:683–691
- Tekere, M., Read, J.S. and Mattiasson, B. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in extracellular fluids and static batch cultures of selected sub-tropical white rot fungi. Journal of Biotechnology **115**:367–377
- Thongsanit, P. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons in size-selected particulate matter in the air environment of Bangkok. In: Environmental Engineering. Chulalongkorn University
- Tien, M. and Kirk, T.K. 1988. Lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods in Enzymology **161**:229–238
- Totsche, W. 2008. PAH release from tar-oil contaminated soil material in response to forced environmental gradients: implications for contaminant transport. European Journal of Soil Science **59**:50–60
- Trupkin, S., Levin, L., Forchiassin, F. and Viale, A. 2003. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **30**:682–690
- Tuntawiroon, J., Mahidol, C., Navasumrit, P., Autrup, H. and Ruchirawat, M. 2007. Increased health risk in Bangkok children exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons from traffic-related sources. Carcinogenesis **28**:816–822
- Tuor, U., Wariishi, H., Schoemaker, H. and Gold, M. 1992. Oxidation of phenolic b-aryl ether lignin model compounds by mangansese peroxidase from *Phanerochaete*

- chrysosporium*. oxidative cleavage of an α -carbonyl model compound. Biochemistry **31:4986–4995**
- Ullrich, R. and Hofrichter, M. 2007. Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. Cellular and Molecular Life Sciences **64:271–293**
- U.S. Environmental Protection Agency. 1991. Drinking water criteria document for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). In: Agency, U.S.E.P. (ed) OH, for the Office of Drinking Water. the Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Cincinnati
- Uyesugi, D.F. and Kovalick, W.W. 1994. Remediation technologies screening matrix and reference guide. In, 2 edn. U.S. Department of Defense (DOD) Environmental Technology Transfer Committee
- Valentin, L., Feijoo, G., Moreira, M.T. and Lema, J.M. 2006. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. International Biodeterioration & Biodegradation **58:15-21**
- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W. and Fedorak, P.M. 1994. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing aromatic solvents. Applied and Environmental Microbiology. **60:459–466**
- Verdin, A.A., Sahraoui, L.H. and Durand, R. 2004. Degradation of benzo[*a*]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. International Biodeterioration & Biodegradation **53:65-70**
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemistry **73:1163-1172**
- Villemain, D., Guiraud, P., Bordjiba, O. and Steiman, R. 2006. Biotransformation of anthracene and fluoranthene by *Absidia fusca* Linnemann. Journal of Biotechnology **9:107–116**
- Vincent, V., Thierry, S., Fabrice, M., Bruno, L.B. and Carole, P. 2007. Determination of PAH profiles by GC-MS/MS in salmon processed by four cold-smoking techniques. Food Additives and Contaminants **24:744–757**
- Vogel, T.M. 1996. Bioaugmentation as a soil remediation approach. Current Opinion in Biotechnology and Applied Biochemistry **7:311–316**
- Wang, S., Liu, B., Sun, K. and Su, Q. 2004. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons formed during the pyrolysis of phenylalanine. Journal of chromatography. A **1025:255–261**
- Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M.H. 1991. In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemical and Biophysical Research Communications **176:269–275**
- Wariishi, H., Vallis, K. and Gold, M.H. 1992. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chealators. The Journal of Biological Chemistry. **267:23689–23695**
- Wells, A., Teria, M. and Eve, T. 2006. Green oxidations with laccase–mediator systems. Biochemical Society Transactions **34:304–308**

- Wilcke, W., Müller, S., Kanchanakool, N., Niamskul, C. and Zech, W. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in hydromorphic soils of the tropical metropolis Bangkok. Geoderma 91:297-309
- Wilson, S.C. and Jone, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Environmental Pollution 81:229-249
- World Health Organization Regional Office for Europe. 2000. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). In: Air quality guidelines for Europe, Copenhagen, pp 105-117
- Wu, J., Xiao, Y. and Yu, H. 2005. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. Bioresource Technology 96:1357-1363
- Wymelenberg, A.V., Sabat, G., Mozuch, M., Kersten, P.J., Cullen, D. and Blanchette, R.A. 2006. Structure, organization, and transcriptional regulation of a family of copper radical oxidase genes in the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology 72:4871-4877
- Zechendorf, B. 1999. Sustainable development: how can biotechnology contribute? Trends in Biotechnology and Applied Biochemistry 17:219-225
- Zhang, X.X., Cheng, S.P., Zhu, C.J. and Sun, S.L. 2006. Microbial PAH-degradation in soil: degradation pathways and contributing factors. Pedosphere 16:555-565
- Zhao, C., Sun, H., Tong, X. and Qi, Y. 2003. An antitumour lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. The Biochemical journal 374:321-327
- Zheng, Z. and Obbard, J.P. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbon removal from soil by surfactant solubilization and *Phanerochaete chrysosporium* oxidation. Journal of Environmental Quality 31:1842-1847



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ความสามารถในการเปลี่ยนสีทดสอบของราแต่ละไอโซเลต

ตารางที่ ก1 ความสามารถในการเปลี่ยนสีทดสอบของราแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้
จากงานวิจัยนี้ (- ไม่เปลี่ยนสี)

ไอโซเลต	ความกว้างของการเปลี่ยนสีรอบโคโลนี (ซม.)		
	Guaiacol	Phenol Red	Azure B
CU-1	3.0	1.0	1.0
CU-2	1.8	-	-
CU-3	1.8	-	-
CU-4	2.6	-	-
CU-5	1.1	-	-
CU-6	1.3	-	0.5
CU-7	1.2	-	-
CU-8	1.4	0.7	-
CU-9	2.5	-	-
CU-10	1.0	-	-
CU-11	2.7	-	-
CU-12	1.3	-	-
CU-13	1.0	-	-
CU-14	1.4	-	-
CU-15	1.8	-	-
CU-16	-	-	-
CU-17	-	-	-
CU-18	-	-	-
CU-19	-	-	-
CU-20	2.1	-	-
CU-21	1.2	-	-
CU-22	-	-	-
CU-23	-	-	-
CU-24	-	-	-
CU-25	1.7	-	-
CU-26	1.3	-	-
CU-27	2.3	-	-
CU-28	2.5	-	-
CU-29	2.7	0.5	-
CU-30	2.3	-	-
CU-31	2.7	-	-
CU-32	3.0	-	-
CU-33	-	-	-
CU-34	-	-	-
CU-35	-	-	-

ตารางที่ ก1 (ต่อ) ความสามารถในการเปลี่ยนสีทดสอบของราแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้ (- ไม่เปลี่ยนสี)

ไอโซเลต	ความกว้างของการเปลี่ยนสีรอบโคโลนี (ชม.)		
	Guaiacol	Phenol Red	Azure B
CU-36	-	-	-
CU-37	-	-	-
CU-38	-	-	-
CU-39	1.4	-	-
CU-40	-	-	-
CU-41	-	-	-
CU-42	-	-	-
CU-43	2.4	1.0	1.0
CU-44	-	-	-
CU-45	-	-	-
CU-46	-	-	-
CU-47	2.1	-	-
CU-48	-	-	-
CU-49	-	-	-
CU-50	-	-	-
CU-51	-	-	-
CU-52	-	-	-
CU-53	-	-	-
CU-54	-	-	-
CU-55	-	-	-
CU-56	-	-	-
CU-57	-	-	-
CU-58	-	-	-
CU-59	-	-	-
CU-60	-	-	-
CU-61	1.1	-	-
CU-62	1.7	0.5	1.0
CU-63	-	-	-
CU-64	-	-	-
CU-65	-	-	-
CU-66	0.6	-	-
CU-67	-	-	-
CU-68	-	-	-
CU-69	-	-	-
CU-70	-	-	-

ตารางที่ ก1(ต่อ) ความสามารถในการเปลี่ยนสีทดสอบของราแต่ละไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้ (- ไม่เปลี่ยนสี)

ไอโซเลต	ความกว้างของการเปลี่ยนสีรอบโคโลนี (ซม.)		
	Guaiacol	Phenol Red	Azure B
CU-71	-	-	-
CU-72	-	-	-
CU-73	-	-	-
CU-74	2.5	-	-
CU-75	-	-	-
CU-76	1.4	-	-
CU-77	2.7	-	-
CU-78	-	-	-
CU-79	-	-	-
CU-80	-	-	-
CU-81	1.0	-	-
CU-82	0.5	-	-
CU-83	2.5	-	-
CU-84	1.4	-	-
CU-85	2.0	-	-
CU-86	2.7	0.5	-
CU-87	-	-	-
CU-88	-	-	-
CU-89	2.0	-	-
CU-90	0.4	-	-
CU-91	-	-	-
CU-92	0.9	-	-
CU-93	-	-	-
CU-94	-	-	-
CU-95	-	-	-
CU-96	1.0	-	-
CU-97	-	-	-
CU-98	-	-	-
CU-99	2.2	-	0.5
CU-100	-	-	-
CU-101	2.8	-	-
CU-102	2.7	-	0.5
CU-103	2.5	-	-
CU-104	2.5	-	-
CU-105	2.5	-	-

ตารางที่ ก1(ต่อ) ความสามารถในการเปลี่ยนสีทดสอบของราแต่ละไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้ (+ เปลี่ยนสี, - ไม่เปลี่ยนสี)

ไอโซเลต	ความกว้างของการเปลี่ยนสีรอบโคโลนี (ซม.)		
	Guaiacol	Phenol Red	Azure B
CU-106	2.5	-	-
CU-107	2.5	-	-
CU-108	2.3	-	-
CU-109	2.3	-	-
CU-110	2.2	-	-
CU-111	2.2	-	-
CU-112	2.0	0.5	-
CU-113	2.0	0.5	-
CU-114	2.0	-	-
CU-115	1.9	-	-
CU-116	1.8	0.5	-
CU-117	1.7	-	-
CU-118	1.7	0.5	-
CU-119	-	-	-
CU-120	1.3	-	0.5
CU-121	1.2	-	-
CU-122	1.2	-	-
CU-123	-	-	-
CU-124	-	-	-
CU-125	1.2	-	-
CU-126	-	-	-
CU-127	-	-	-
CU-128	-	-	-
CU-129	-	-	-
CU-130	-	-	-
CU-131	-	-	-
CU-132	1.0	-	-
CU-133	0.8	-	-
CU-134	0.7	-	-
CU-135	0.7	-	-
CU-136	0.6	-	-
CU-137	-	-	-
CU-138	-	-	-
CU-139	0.4	-	-
CU-140	0.5	-	-

ตารางที่ ก1(ต่อ) ความสามารถในการเปลี่ยนสีทดสอบของราแต่ละไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้ (+ เปลี่ยนสี, - ไม่เปลี่ยนสี)

ไอโซเลต	ความกว้างของการเปลี่ยนสีรอบโคโลนี (ซม.)		
	Guaiacol	Phenol Red	Azure B
CU-141	0.5	-	-
CU-142	-	-	-
CU-143	-	-	-
CU-144	0.4	-	-
CU-145	-	-	-
CU-146	0.4	-	-
CU-147	-	-	-
CU-148	0.4	-	-
CU-149	-	-	-
CU-150	-	-	-
CU-151	-	-	-
CU-152	-	-	-
CU-153	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ไอโซเลต 1

ไอโซเลต 6

ไอโซเลต 8

ไอโซเลต 29

ไอโซเลต 43

ไอโซเลต 62



ไอโซเลต 86

ไอโซเลต 99

ไอโซเลต 100

ไอโซเลต 112

ไอโซเลต 113

ไอโซเลต 116

ไอโซเลต 118

ไอโซเลต 120

รูปที่ ก1 ไอโซเลตที่ให้ผลบวกกับสียทดสอบตั้งแต่ 2 สีขึ้นไป

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง malt extract

สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	20	กรัม
เพปโตน (peptone)	5	กรัม
กลูโคส (glucose)	20	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 °ซ 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว malt extract

สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	20	กรัม
เพปโตน (peptone)	5	กรัม
กลูโคส (glucose)	20	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 °ซ 15 นาที

3. Basal Medium

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4)	5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1	กรัม
Trace element	100	มล.
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

Trace element ประกอบด้วย

แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4)	3	กรัม
แมกกาเนียมซัลเฟต (MgSO_4)	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1	กรัม
เฟอร์รัสเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม

ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	0.1	กรัม
อะลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟต ($AlK(SO_4)_2 \cdot 7H_2O$)	10	มิลลิกรัม
กรดบอริก (H_2BO_3)	10	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	10	มิลลิกรัม
ไนโตรโลไตรแอซีเตต ($C_6H_9NO_6$)	1.5	กรัม

ละลายไนโตรโลไตรแอซีเตต ในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับความเป็นกรด-เบสให้เป็น 6.5 จากนั้นจึงค่อยๆ ละลายสารตัวอื่นทีละตัวตามลำดับจนครบทุกชนิดและปรับปริมาตรรวมให้เป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

4. modified Glucose Peptone Yeast extract medium (mGPY)

กลูโคส (Glucose)	10	กรัม
แบคโตเพปโตเน (Bacto peptone)	3	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
โซเดียมทาร์เตรต ($Na_2C_4H_4O_6$)	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้ได้ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

5. Nitrogen-limiting medium (N-limiting medium)

กลูโคส (Glucose)	10	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	0.1	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
ไอออน II เฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.001	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.001	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.001	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เป็น 4.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 °ซ 15 นาที

7. อาหารเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB broth)

เตรียมอาหารตามวิธีในข้อ 3 แต่เติมวุ้น (agar) เพิ่มลงไป 15 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 °ซ 15 นาที

ภาคผนวก ค

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย PAH ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

ซึ่งสารมาตรฐาน PAH 0.1 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มล. โดยผสมด้วยเครื่องปั่นผสมหรือโซนิเคตจนผลึก PAH ละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

2. สารละลายมาตรฐานของ PAH ในอะซิโตน

ซึ่งสารมาตรฐาน PAH ที่ต้องการเตรียม 0.1 กรัม ละลาย PAH แต่ละชนิดในอะซิโตนปริมาตร 10 มล. ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน กรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

3. สารละลาย extraction buffer สำหรับสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

Tris-HCl, pH 8.0	200	มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	250	มิลลิโมลาร์
EDTA, pH 8.0	25	มิลลิโมลาร์
SDS	5	เปอร์เซ็นต์

ผสมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 20 มล. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 25 มล. สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 5 มล. และสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 5 มล. ให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุที่ปลอดเชื้อปริมาตร 45 มล. ลงไป นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°C 20 นาที

4. สารละลาย 5% SDS

ซึ่งโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ปริมาณ 5 กรัม ค่อยๆ ทำการละลายในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายจนหมดแล้ว ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้ได้เป็น 100 ไมโครลิตร

5. สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วคนให้เข้ากัน รอให้เย็น ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุ ให้ปริมาตรเป็น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว $121^{\circ}C$ 20 นาที

6. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

ผสมสารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวด้วย Tris-HCl กับสารละลายคลอโรฟอร์มเข้าด้วยกันในอัตราส่วนฟีนอล:คลอโรฟอร์ม เท่ากับ 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$

7. สารละลาย RNaseA ความเข้มข้น 20 มล.กรัม/มล.

Tri-HCl, pH 8.0	10	มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	15	มิลลิโมลาร์
RNaseA	0.2	กรัม

ผสมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 0.1 มล. กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.15 มล. ให้เข้ากัน จากนั้นเติมผง RNaseA 0.2 กรัม แล้วปั่นผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ที่ให้เย็น แล้วดูดแบ่งใส่หลอดไมโครทิวบ์หลอดละ 1.0 มล.

8. สารละลายโซเดียมแอสซิเตต ความเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 5.2

ละลายโซเดียมแอสซิเตตน้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เป็น 5.2 ด้วยกรดแอสซิติค ปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว $121^{\circ}C$ 20 นาที

9. บัฟเฟอร์ TE (10/1) ความเป็นกรด-เบส 8.0

Tris-HCl ความเป็นกรด-เบส 8.0	10	มิลลิโมลาร์
EDTA ความเป็นกรด-เบส 8.0	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 8.0 ปริมาตร 10 มล. กับสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 8.0 ปริมาตร

2.0 มล. เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 1,000 มล. นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°C 20 นาที

10. บัฟเฟอร์ 50X TAE

Tris base	242	กรัม
กรดแอสติกเข้มข้น	57.1	มล.
สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	100	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนปริมาตรเท่ากับ 1,000 มล. นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°C 20 นาที

11. สีติดตาม (Loading dye)

บรอมฟินอลบลู	0.025	เปอร์เซ็นต์
ซูโครส	40	เปอร์เซ็นต์

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

12. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัม/มล. เก็บในภาชนะที่ปิดสนิท

13. สารละลาย dNTP ที่มีความเข้มข้นของแต่ละนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 10 มล.โมลาร์

ผสม dATP, dGTP, dCTP และ dTTP ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรชนิดละ 10 ไมโครลิตรให้เข้ากัน แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

14. กลีเซอรอล 80%

นำกลีเซอรอล 87% ปริมาตร 92 มล.ผสมน้ำปลอดประจุปริมาตร 8 มล.นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°C 20 นาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้ง

15. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน

ละลายแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 มก.ต่อน้ำ 1 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสแอซีเตต ขนาดรูกรว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครทิวบ์ที่อุณหภูมิ -20°ซ เมื่อนำมาใช้แล้วสามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ได้นาน 1 เดือน

16. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลายแคลเซียมคลอไรด์ 55.5 กรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มล. จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุจนปริมาตรเป็น 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 °ซ 20 นาที

17. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ซังโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

18. DEPC-treated water

เติมสารละลาย diethylpyrocarbonate (DEPC) 1 มล. ลงในน้ำกลั่นปลอดประจุ 1000 มล. บ่มเขย่าที่ 37°ซ ซ้ำมคืน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°ซ 20 นาที

19. MOPS buffer

เตรียม MOPS (3-(N-morpholino)propan sulfonic acid) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยละลาย MOPS จำนวน 104.7 กรัม ใน DEPC-treated water ปริมาตร 400 ml ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เมื่อได้ค่าความเป็นกรด-ด่างตามที่ต้องการแล้ว ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มล. ด้วย DEPC-treated water นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121° ซ นาน 20 นาที หลังจากนั้นฆ่าเชื้อแล้วสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เก็บที่ 4°ซ จนกว่าจะนำไปใช้งาน

20. 10x Running buffer (สำหรับ RNA)

ประกอบด้วย

MOPS บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์	25	มล.
โซเดียมแอซีเตต ความเข้มข้น 3 โมลาร์	3.33	มล.
สารละลายโซเดียมอีดีทีเอ ความเข้มข้น 0.35 โมลาร์	2.5	มล.

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มล. ด้วย DEPC-treated water นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121° ซ นาน 20 นาที หลังจากนั้นฆ่าเชื้อแล้วสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เก็บที่ 4°ซ จนกว่าจะนำไปใช้งาน

21. Sample buffer

เตรียมก่อนใช้งาน ใน 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

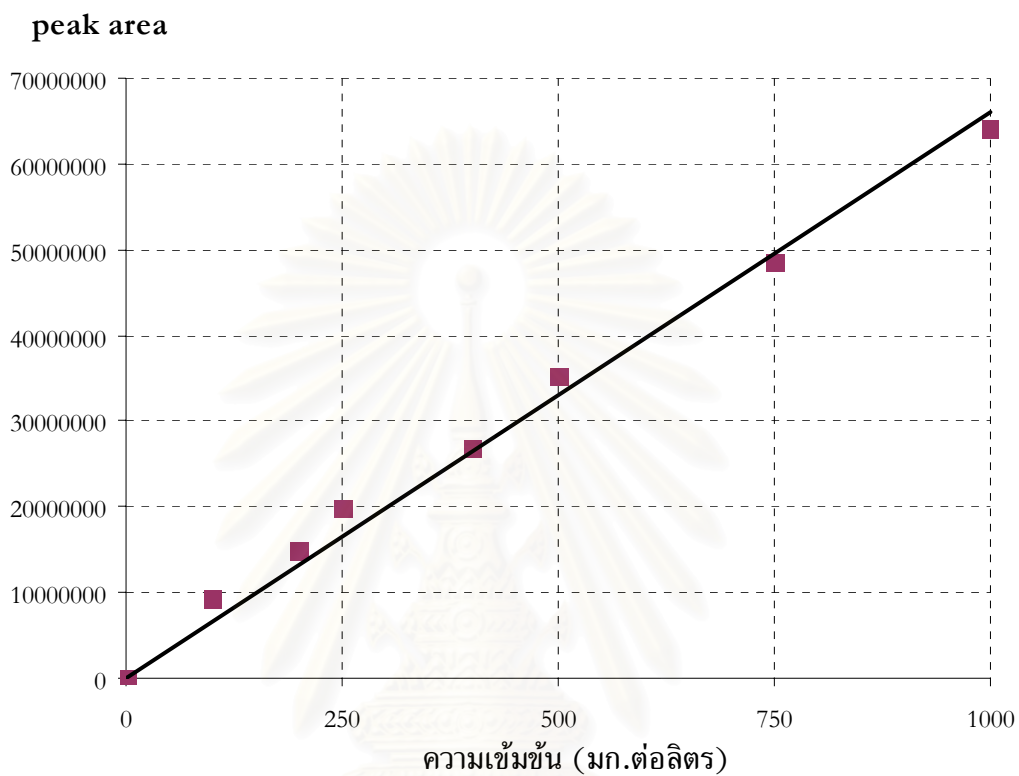
10x running buffer	100	ไมโครลิตร
ฟอร์มัลมาย (formamide)	500	ไมโครลิตร
ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde)	178	ไมโครลิตร
DEPC-treated water	222	ไมโครลิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานของฟลูออรีน



สมการของกราฟมาตรฐาน $Y = 66045X$

ค่าความเบี่ยงเบน $R^2 = 0.9902$

รูปที่ ง1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ชุดสกัดและชุดทดสอบสำเร็จรูป

1. ชุด PCR clean-up Gel Extraction ของบริษัท Macherey-Nagel GmbH & Co., ประเทศเยอรมัน

ประกอบด้วย

บัฟเฟอร์ NT
 บัฟเฟอร์ NT3
 บัฟเฟอร์ NE
 NucleoSpin® Extract II columns

ขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์ ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

2. ชุดสกัด Aurum™ Total ชุด RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา

ประกอบด้วย

RNA binding mini columns
 DNase I (lyophilized)
 Low stringency wash solution (5x concentrate)
 High stringency wash solution
 Elution solution
 DNase dilution solution
 PureZOL RNA isolation reagent

เมื่อใช้ครั้งแรก ละลาย DNaseI ใน 10 มิลลิโมลาร์ Tris (ความเป็นกรด-เบส 7.5) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ละลาย DNaseI โดยปีเปตสารขึ้นลง เมื่อ DNaseI ละลายหมดแล้ว แบ่งสารละลายใส่หลอดไมโครพิวจ์หลอดละ 5 ไมโครลิตร เก็บที่ -20°ซ

ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

3. ชุดสำเร็จ Universal Riboclone® cDNA Synthesis System ของบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา

ชุดสังเคราะห์ cDNA ประกอบด้วย

First Strand 5X บัฟเฟอร์
 Oligo(dT)15 ไพรเมอร์
 Random Hexameric ไพรเมอร์
 Sodium Pyrophosphate, 40 มิลลิโมลาร์
 Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor
 AMV Reverse Transcriptase (HC)
 1.2kb Kanamycin Positive Control RNA
 Second Strand 2.5X บัฟเฟอร์
 RNase H
 DNA Polymerase I
 T4 DNA Polymerase(c)
 Nuclease-Free Water

ขั้นตอนการสังเคราะห์สาย cDNA ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

4. ชุดสกัดอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (ของบริษัท Qiagen ประเทศเยอรมัน)

ประกอบด้วย

บัฟเฟอร์ QG

บัฟเฟอร์ PE

บัฟเฟอร์ EB

Qiaquick column

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอให้เติมเอทานอลสัมบูรณ์ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงในบัฟเฟอร์ PE
 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

5. GeneJET™ PCR cloning Kit (ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ประกอบด้วย

pJET1/blunt Cloning Vector (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) แผนที่ของ pJET1/blunt แสดงดังรูปที่ จ1

2X Reaction บัฟเฟอร์

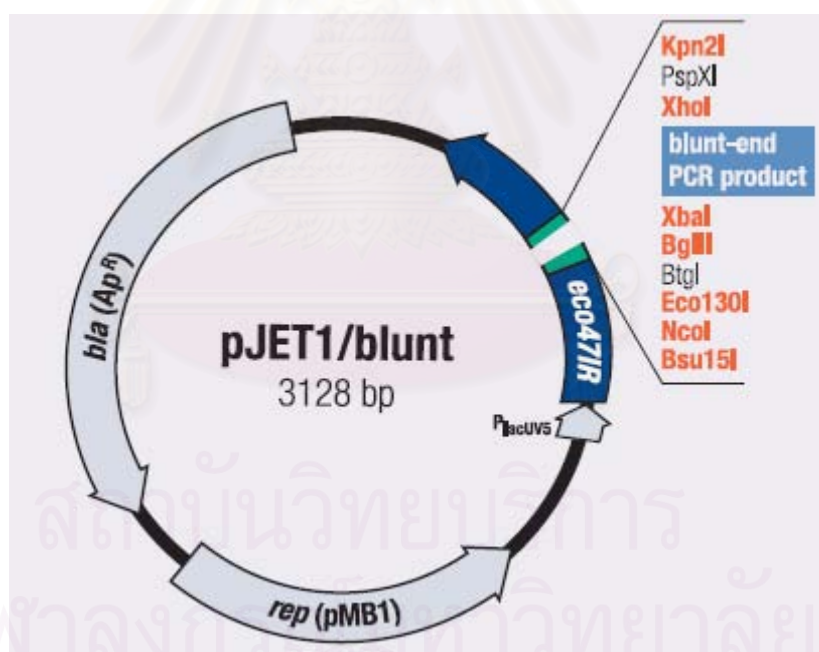
T4 DNA Blunting เอนไซม์

pJET1 ฟอว์เวิร์ด ไพรมเมอร์ (10 ไมโครโมลาร์) 21-mer 5'-GCCTGAACACCATATCCATCC-3'

pJET1 รีเวิร์ส ไพรมเมอร์ (10 ไมโครโมลาร์) 25-mer 5'-GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC-3'

ชุดควบคุมผลบวก (24 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)

น้ำปลอดนิวคลีเอส



รูปที่ จ1 แสดงแผนที่ pJET1/blunt Cloning Vector

6. ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Miniprep Kit (ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ประกอบด้วย

บัฟเฟอร์ P1

บัฟเฟอร์ P2

บัฟเฟอร์ N3

บัฟเฟอร์ PB

บัฟเฟอร์ PE

RNase A

Qiaprep Spin column

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน บัฟเฟอร์ P1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และเติมเอทานอลสัมบูรณ์ปริมาตร 24 มล. ลงในบัฟเฟอร์ PE

ขั้นตอนการสกัดพลาสมิด ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

วัสดุเพาะ

1. วัสดุเพาะ

วัสดุเพาะที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ ขี้เลื่อยสำเร็จรูปที่ใช้สำหรับเพาะเห็ดในเชิงการค้า นำมาจากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม โดยใช้ผสมใน ตัวอย่างดินในขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายฟลูออรีนในแบบจำลองดิน มีสูตรดังนี้

ขี้เลื่อยไม้ยางพาราแห้ง	100	กิโลกรัม
รำละเอียด	5	กิโลกรัม
ยิปซัม	2	กิโลกรัม
ปูนขาว	1	กิโลกรัม
ดีเกลือ	0.2	กิโลกรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเปรียบเทียบความเหมือนของยีนและโปรตีนด้วยโปรแกรม BlastN และ BlastX

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างบริเวณ ITS1 และ ITS2 บนบริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของโครโมโซมพลีดีเอ็นเอจากราไอโซเลต CU-1 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank EU593767.1 มีลำดับเบสดังนี้

```

5'      1      ATGCCCTCG GGGCTTTCTG GTGATTCATA ATAACCTTCTC GAATCGCATG GCCTTGCGCC
      61      GCGGATGGT CATTCAAAT TCTGCCCTAT CAACTTTCTG TGGCAGGGTC TTGGCCTGCC
     121      ATGGTTACAA CGGGTAACGG AGGGTTAGGG CTCGACCCCG GAGAAGGAGC CTGAGAAACG
     181      GCTACTACAT CCAAGGAAGG CAGCAGGCGC GCAAATTACC CAATCCCACG ACGGGGAGGT
     241      AGTGACAATA AATACTGATA CAGGGCTCTT TTGGGTCTTG TAATTGGAAT GAGTACAATT
     301      TAAATCCCTT AACGAGGAAC AATTGGAGGG CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC
     361      CAGCTCCAAT AGCGTATATT AAGTGTGTG CAGTTAAAAA GCTCGTAGT GAACCTTGGG
     421      CCTGGCTGGC CGGTCCGCCT CACCGCGTGC ACTGGTTCGG CCGGGCCTTT CCCTCTGGGG
     481      AGCCCTATGC CCTTCACCTG GTGTAGTGGG GAACCAGGAC TTTTACTGTG AAAAAATTAG
     541      AGTGTTCAAA GCAGGCCTAT GCTCGAATAC ATCAGCATGG AATAATAGAA TAGGACGTGT
     601      GGTTCATTT TGTGTGTTTC TAGGACCGCC GTAATGATTA ATAGGGACAG TCGGGGGCAT
     661      CAGTATTCAA TTGTCAGAGG TGAATTCCTT GGATTTATTG AAGACTAATC ACTGCGAAAG
     721      CATTGCCAA GGATGTTTTT ATTAATCAGG AACGAAAGTT AGGGGATCGA AGACGATCAG
     781      ATACCGTCGT AGTCTTAACC ATAACTATG CCGACTAGGG ATCGGACGAT GTTATTTTTT
     841      GACTCGTTCG GCACCTTACG AGAAATCAAA GTCTTTGGGT TCTGGGGGGA GTATGGTCGC
     901      AAGGCTGAAA CTTAAAGAAA TTGACGGAAG GGCACCACCA GGAGTGGAGC CTGCGGCTTA
     961      ATTTGACTCA ACACGGGGAA ACTCACCAGG TCCAGACACA ATGAGGATTG ACAGATTGAG
    1021      AGCTCTTTCT TGATTTTGTG GGTGGTGGTG CATGGCCGTT CTTAGTTGGT GGAGTGATTT
    1081      GTCTGCTTAA TTGCGATAAC GAACGAGACA TTACCTGCT AAATAGCCCG TATTGCTTTG
    1141      GCAGTACGCT GGCTTCTTAG AGGGACTATC CGCTTAAGCG GGTGGAAGTT GGATGCAATA
    1201      ACAGGTCTGT GATGCCCTTA GATGTTCTGG GCCGCACGCG CGTTACACTG ACAGAGACAG
    1261      CGAGTACTTC CTTAGTAGAG ATACTTGGGT AATCTTGTTA AACTCTGTGC TGCTGGGGAT
    1321      AGAGCATTGC AATTATTGCT CTTCAACGAG GAATTCCTAG TAAGCGTAAG TCATCAACTT
    1381      GCGTTGATTA CGTCCCTGCC CTTTGTACAC ACCGCCCGTC GCTACTACCG ATTGAATGGC
    1441      TCAGTGAGGC TTTCCGACTG GCCCAGAGGA GTCGGCAACG ACACCTCAGG GCCCGAAAGT
    1501      TATC      3'

```

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างบริเวณ ITS1 และ ITS2 บนบริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของโครโมโซมพลีดีเอ็นเอจากราไอโซเลต CU-43 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank EU487011.1 มีลำดับเบสดังนี้

```

5'      1      CATTAGAGG AAGTAAAAGT CGTAACAAGG TTTCCGTAGG TGAACCTGCG GAAGGATCAT
      61      TAACGAATAA ACCTCGGTGG GTTTGATGCT GGCCCTTGG GGCATGTGCA CCGCCTGTGC
     121      TTCTTTATTT CTCTCCACC TGTGCACCCT TTGTAGGCTT GAACCGCTTT CTTTGGCCTT
     181      CGGGTCAGTG TTGGGGACTG CTGAAATGGC TATCCCTAC CGTTCGAGTC TATGTTTTTT
     241      ACACTACACA CCATTGTTAA ACCTAGAATG TCAAAGGCTC TATGTGTGCC TATCTAAACG
     301      CTATACAAC TTCAGCAACG GATCTCTTGG CTCTCGCATC GATGAAGAAC GCAGCGAAAT
     361      GCGATAAGTA ATGTGAATTG CAGAATTCAG TGAATCATCG AATCTTTGAA CGCACCTTGC
     421      GCTCCTTGGT ATTCCGAGGA GCATGCCTGT TTGAGTGTCA TTACATTCTC AACCGTTTGA
     481      ATTTGAACGG CTTGGACTTG GGGTACTTGT TGCCGGCCCT AAAGGTCGGC TCCCTTAAA
     541      TGCATTAGCT GGTCCGCCCT CTCGCGTTGA CTTGGTGTGA TAATTCATAT TGACCCGCTT
     601      TGGCGTGGAT GTTATTTTGG GAGGCTGCTT TCTAACCGTC CTTGTGGAC AGTAGTCTCT
     661      TTCATTA      3'

```

บริเวณ rRNA ได้แก่ลำดับเบสที่ 1-62

```

5'      1      CATTAGAGG AAGTAAAAGT CGTAACAAGG TTTCCGTAGG TGAACCTGCG GAAGGATCAT
      61      TA      3'

```

บริเวณ ITS1 ได้แก่ลำดับเบสที่ 63-306 จำนวน 244 เบส

```

5'      1      ACGAATAAAC CTCGGTGGGT TTGATGCTGG CCCCTTGGGG CATGTGCACC GCCTGTCTGT
      61      CTTTATTTCT TCTCCACCTG TGCACCCTTT GTAGGCTTGA ACCGCTTTCT TTGGCCTTCC
     121      GGTCAAGTGT GGGGACTGCT GAAATGGCTA TCCCTACCG TTCGAGTCTA TGTTTTTTAC

```



```

Query 841  GACTCGTTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGC 900
          |||
Sbjct 1005  GACTCGTTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGC 1064

Query 901  AAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTA 960
          |||
Sbjct 1065  AAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTA 1124

Query 961  ATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATGAGGATTGACAGATTGAG 1020
          |||
Sbjct 1125  ATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATGAGGATTGACAGATTGAG 1184

Query 1021 AGCTCTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTT 1080
          |||
Sbjct 1185  AGCTCTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTT 1244

Query 1081 GTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACATTTACCTGCTAAATAGCCCGTATTGCTTTG 1140
          |||
Sbjct 1245  GTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACATTTACCTGCTAAATAGCCCGTATTGCTTTG 1304

Query 1141 GCAGTACGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCCGCTTAAGCGGGTGAAGTTGGATGCAATA 1200
          |||
Sbjct 1305  GCAGTACGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCCGCTTAAGCGGGTGAAGTTGGATGCAATA 1364

Query 1201 ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGTTTACACTGACAGAGACAG 1260
          |||
Sbjct 1365  ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGTTTACACTGACAGAGACAG 1424

Query 1261 CGAGTACTTCCTTAGTAGAGATACTTGGGTAATCTTGTTAAACTCTGTCGTGCTGGGGAT 1320
          |||
Sbjct 1425  CGAGTACTTCCTTAGTAGAGATACTTGGGTAATCTTGTTAAACTCTGTCGTGCTGGGGAT 1484

Query 1321 AGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGTAAGTCATCAACTT 1380
          |||
Sbjct 1485  AGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGTAAGTCATCAACTT 1544

Query 1381 GCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGC 1440
          |||
Sbjct 1545  GCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGC 1604

Query 1441 TCAGTGAGGCTTTTCGGACTGGCCAGAGGAGTCGGCAACGACACCTCAGGGCCGGAAAGT 1500
          |||
Sbjct 1605  TCAGTGAGGCTTTTCGGACTGGCCAGAGGAGTCGGCAACGACACCTCAGGGCCGGAAAGT 1664

Query 1501 TATC 1504
          |||
Sbjct 1665  TATC 1668

```

5. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์(BlastN) บริเวณ ITS1 และ ITS2 บนบริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากราโอโซเลต CU-1 กับ *Xylaria carpophila* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank Z49785.1

>[emb|Z49785.1|XCRRNA18](#) *X.carpophila* gene for 18S ribosomal RNA
Length=1696

Score = 2657 bits (2946), Expect = 0.0
Identities = 1494/1504 (99%), Gaps = 4/1504 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1  ATGCCCTCGGGGCTTT-CTGGTGATTCATAATAACTTCTCGAATCGCATGGCCTTGCGC 59
          |||
Sbjct 171  ATGCCCTCGGGGCTTTCTGGTGATTCATAATAACTTCTCGAATCGCATGGCCTTGTC 230

Query 60  CGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCTATCAACTTTCGATGGCAGGGTCTTGGCCTGC 119
          |||
Sbjct 231  CGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCTATCAACTTTCGATGGCAGGGTCTTGGCCTGC 290

```

Query	120	CATGGTTACAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAAC	179
Sbjct	291	CATGGTTACAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAAC	350
Query	180	GGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGG	239
Sbjct	351	GGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGG	410
Query	240	TAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGGGTCTTGTAAATTGGAATGAGTACAAT	299
Sbjct	411	TAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGGGTCTTGTAAATTGGAATGAGTACAAT	470
Query	300	TTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATT	359
Sbjct	471	TTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATT	530
Query	360	CCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGG	419
Sbjct	531	CCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGG	590
Query	420	GCCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACCGGTGCACTGGTTCGGCCGGGCCTTTCCTCTGGG	479
Sbjct	591	GCCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACCGGTGCACTGGTTCGGCCGGGCCTTTCCTCTGGG	650
Query	480	GAGCCCTATGCCTTCACTGGGTGTAGTGGGGAACCAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTA	539
Sbjct	651	GAGCCCTATGCCTTCACTGGGTGTAGTGGGGAACCAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTA	710
Query	540	GAGTGTCAAAGCAGGCCTATGCTCGAATACATCAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTG	599
Sbjct	711	GAGTGTCAAAGCAGGCCTATGCTCGAATACATCAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTG	770
Query	600	TGGTTCATTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGGCA	659
Sbjct	771	TGGTTCATTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGGCA	830
Query	660	TCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAA	719
Sbjct	831	TCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAA	890
Query	720	GCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	779
Sbjct	891	GCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	950
Query	780	GATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGATGTTATTTTT	839
Sbjct	951	GATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGATGTTATTTTT	1010
Query	840	TGACTCGTTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTGGGGGAGTATGGTCG	899
Sbjct	1011	TGACTCGTTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTGGGGGAGTATGGTCG	1070
Query	900	CAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTT	959
Sbjct	1071	CAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAA--CTGCGGCTT	1128
Query	960	AATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATGAGGATTGACAGATTGA	1019
Sbjct	1129	AATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATGAGGATTGACAGATTGA	1188
Query	1020	GAGCTCTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATT	1079
Sbjct	1189	GAGCTCTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATT	1248
Query	1080	TGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACATTTACCTGCTAAATAGCCCGTATTGCTTT	1139
Sbjct	1249	TGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACATTTACCTGCTAAATAGCCCGTATTGCTTT	1308
Query	1140	GGCAGTACGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCCGCTTAAGCGGGTGGAAAGTTGGATGCAAT	1199
Sbjct	1309	GGCAGTACGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCCGCTTAAGCGGGTGGAAAGTTGGATGCAAT	1368
Query	1200	AACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGGTTACTGACAGAGACA	1259
Sbjct	1369	AACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGGTTACTGACAGAGACA	1428

```

Query 1260 GCGAGTACTTCCTTAGTAGAGATACTTGGGTAATCTTGTTAAACTCTGTCGTGCTGGGGA 1319
          |||
Sbjct 1429 GCGAGTACTTCCTTAGTAGAGATACTTGGGTAATCTTGTTAAACTCTGTCGTGCTGGGGA 1488

Query 1320 TAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGTAAGTCATCAACT 1379
          |||
Sbjct 1489 TAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGTAAGTCATCAACT 1548

Query 1380 TCGGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGG 1439
          |||
Sbjct 1549 TCGGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGG 1608

Query 1440 CTCAGTGAGGCTTCCGGACTGG-CCCAGAGGAGTCGGCAACGACACCTCAGGGCCGGAAA 1498
          |||
Sbjct 1609 CTCAGTGAGGCTTCCGGACTGGCCCCAGAGGAGTCGGCAACGACACCTCAGGGCCGGAAA 1668

Query 1499 GTTA 1502
          |||
Sbjct 1669 GTTA 1672

```

6. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์(BlastN) บริเวณ ITS1 และ ITS2 บนบริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากราโอโซเลต CU-1 กับ *Xylaria* sp. F1 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AY315412

>gb|AY315412.1 *Xylaria* sp. F1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1698

Score = 2695 bits (2988), Expect = 0.0
Identities = 1500/1504 (99%), Gaps = 0/1504 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1 ATGCCCTCGGGGCTTCTGGTGATTATAAATAACTTCTCGAATCGCATGGCCTTGCGCC 60
          |||
Sbjct 171 ATGCCCTCGGGGCTTTCAGGTGATTATAAATAACTTCTCGAATCGCATGGCCTTGCGCC 230

Query 61 GGCGATGGTTCAATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGCAGGGTCTTGGCCTGCC 120
          |||
Sbjct 231 GGCGATGGTTCAATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGCAGGGTCTTGGCCTGCC 290

Query 121 ATGGTTACAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACG 180
          |||
Sbjct 291 ATGGTTACAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACG 350

Query 181 GCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGT 240
          |||
Sbjct 351 GCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGT 410

Query 241 AGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGGGTCTTGTAAATGGAATGAGTACAATT 300
          |||
Sbjct 411 AGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGGGTCTTGTAAATGGAATGAGTACAATT 470

Query 301 TAAATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTC 360
          |||
Sbjct 471 TAAATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTC 530

Query 361 CAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGG 420
          |||
Sbjct 531 CAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGG 590

Query 421 CCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACCGCTGCACTGGTTCGGCCGGGCTTTCCCTCTGGGG 480
          |||
Sbjct 591 CCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACCGCTGCACTGGTTCGGCCGGGCTTTCCCTCTGGGG 650

Query 481 AGCCCTATGCCCTTCACTGGGTGTAGTGGGAACAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTAG 540
          |||
Sbjct 651 AGCCCTATGCCCTTCACTGGGTGTAGTGGGAACAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTAG 710

```

Query 541 AGTGTTCAAAGCAGGCCTATGCTCGAATACATCAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGT 600
 |||
 Sbjct 711 AGTGTTCAAAGCAGGCATATGCTCGAATACATCAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGT 770

Query 601 GGTTCATTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGGCAT 660
 |||
 Sbjct 771 GGTTCATTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGGCAT 830

Query 661 CAGTATCAATTGTCTAGAGGTGAAATCTTGGATTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAG 720
 |||
 Sbjct 831 CAGTATCAATTGTCTAGAGGTGAAATCTTGGATTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAG 890

Query 721 CATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG 780
 |||
 Sbjct 891 CATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG 950

Query 781 ATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGATGTTATTTTTT 840
 |||
 Sbjct 951 ATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGATGTTATTTTTT 1010

Query 841 GACTCGTTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGC 900
 |||
 Sbjct 1011 GACTCGTTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGC 1070

Query 901 AAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTA 960
 |||
 Sbjct 1071 AAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTA 1130

Query 961 ATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATGAGGATTGACAGATTGAG 1020
 |||
 Sbjct 1131 ATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATGAGGATTGACAGATTGAG 1190

Query 1021 AGCTCTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTT 1080
 |||
 Sbjct 1191 AGCTCTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTT 1250

Query 1081 GTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACATTTACCTGCTAAATAGCCCGTATTGCTTTG 1140
 |||
 Sbjct 1251 GTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACATTTACCTGCTAAATAGCCCGTATTGCTTTG 1310

Query 1141 GCAGTACGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCCGCTTAAGCGGGTGAAGTTGGATGCAATA 1200
 |||
 Sbjct 1311 GCAGTACGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCCGCTTAAGCGGGTGAAGTTGGATGCAATA 1370

Query 1201 ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGGTTACACTGACAGAGACAG 1260
 |||
 Sbjct 1371 ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGGTTACACTGACAGAGACAG 1430

Query 1261 CGAGTACTTCCTTAGTAGAGATACTTGGGTAATCTTGTTAAACTCTGTCGTGCTGGGGAT 1320
 |||
 Sbjct 1431 CGAGTACTTCCTTAGTAGAGATACTTGGGTAATCTTGTTAAACTCTGTCGTGCTGGGGAT 1490

Query 1321 AGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGTAAGTCATCAACTT 1380
 |||
 Sbjct 1491 AGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGTAAGTCATCAACTT 1550

Query 1381 GCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGC 1440
 |||
 Sbjct 1551 GCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGC 1610

Query 1441 TCAGTGAGGCTTTCGGACTGGCCAGAGGAGTCGGCAACGACACCTCAGGGCCGGAAAGT 1500
 |||
 Sbjct 1611 TCAGTGAGGCTTTCGGACTGGCCAGAGGAGTCGGCAACGACACCTCAGGGCCGGAAAGC 1670

Query 1501 TATC 1504
 |||
 Sbjct 1671 TATC 1674

7. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (BlastN) บริเวณ ITS1 และ ITS2 บนบริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากราโอโซเลต CU-43 กับ *Agrocybe aegerita* strain SM981204 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AY763671.1

>[gb|AY763671.1|](#) *Agrocybe aegerita* strain SM981204 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence
Length=624

Score = 1092 bits (1210), Expect = 0.0
Identities = 605/605 (100%), Gaps = 0/605 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 63   ACGAATAAACCTCGGTGGGTTTGATGCTGGCCCCTTGGGGCATGTGCACCGCCTGTCGTT 122
          |||
Sbjct 1    ACGAATAAACCTCGGTGGGTTTGATGCTGGCCCCTTGGGGCATGTGCACCGCCTGTCGTT 60

Query 123  CTTTATTCTTCTCCACCTGTGCACCCTTTGTAGGCTTGAACCGCTTTCTTTGGCCTTCG 182
          |||
Sbjct 61   CTTTATTCTTCTCCACCTGTGCACCCTTTGTAGGCTTGAACCGCTTTCTTTGGCCTTCG 120

Query 183  GGTCAGTGTGGGGACTGCTGAAATGGCTATCCCCTACCGTTCGAGTCTATGTTTTTAC 242
          |||
Sbjct 121  GGTCAGTGTGGGGACTGCTGAAATGGCTATCCCCTACCGTTCGAGTCTATGTTTTTAC 180

Query 243  ACTACACACCATTGTTAAACCTAGAATGTCAAAGGCTCTATGTGTGCCTATCTAAACGCT 302
          |||
Sbjct 181  ACTACACACCATTGTTAAACCTAGAATGTCAAAGGCTCTATGTGTGCCTATCTAAACGCT 240

Query 303  ATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC 362
          |||
Sbjct 241  ATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC 300

Query 363  GATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGC 422
          |||
Sbjct 301  GATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGC 360

Query 423  TCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATTACATTCTCAACCGTTTGAAT 482
          |||
Sbjct 361  TCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATTACATTCTCAACCGTTTGAAT 420

Query 483  TTGAACGGCTTGGACTTGGGGTACTTGTGCCGGCCCTAAAGGTCGGCTCCCCTTAAATG 542
          |||
Sbjct 421  TTGAACGGCTTGGACTTGGGGTACTTGTGCCGGCCCTAAAGGTCGGCTCCCCTTAAATG 480

Query 543  CATTAGCTGGTCGCCCCCTCTCGCGTTGACTTGGTGTGATAATCTATTTGCACCGCTTTG 602
          |||
Sbjct 481  CATTAGCTGGTCGCCCCCTCTCGCGTTGACTTGGTGTGATAATCTATTTGCACCGCTTTG 540

Query 603  GCGTGGATGTTATTTTGGGAGGCTGCTTTCTAACCGTCCCTTGTGGACAGTAGTCTCTTT 662
          |||
Sbjct 541  GCGTGGATGTTATTTTGGGAGGCTGCTTTCTAACCGTCCCTTGTGGACAGTAGTCTCTTT 600

Query 663  CATT 667
          |||
Sbjct 601  CATT 605

```

8. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (BlastN) บริเวณ ITS1 และ ITS2 บนบริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากราโอโซเลต CU-43 กับ *Agrocybe chaxingu* strain HB-91 strain ASI 19023 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AY168833.1

>[gb|AY168833.1|](#) *Agrocybe chaxingu* strain HB-91 strain ASI 19023 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=665

Score = 1070 bits (1186), Expect = 0.0
Identities = 608/614 (99%), Gaps = 4/614 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 52  AAGGATCATTAAACGAATAAACCTCGGTGGGTTTGATGCTGGCCCCCTGGGGCATGTGCAC 111
          |||
Sbjct 1    AAGGATCATTAAACGAATAAACCTCGGTGGGTTTGATGCTGGCCCCCTGGGGCATGTGCAC 60

Query 112 CGCCTGTCGTTCTTTATTTCTTCCACCTGTGCACCCTTTGTAGGCTTGAACCGCTTTC 171
          |||
Sbjct 61  CGCCTGTCGTTCTTTATTTCTTCCACCTGTGCACCCTTTGTAGGCTTGAACCGCTTTC 120

Query 172  TTTGGCCTTCGGGTCAAGTGTGGGGACTGCTGAAATGGCTATCCCCTACCGTTCGAGTCT 231
          |||
Sbjct 121 TTTGGCCTTCGGGTCAAGTGTGGGGACTGCTGAAATGGCTATCCCCTACCGTTCGAGTCT 180

Query 232  ATGTTTTTTTACACTACACACCATTGTTAAACCTAGAATGTCAAAGGCTCTATGTGTGCCT 291
          |||
Sbjct 181  ATGTTTTTT-ACACTACACACCATTGTTAAACCTAGAATGTCAAAGGCTCTATGTGTGCCT 239

Query 292  ATCTAAACGCTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 351
          |||
Sbjct 240  ATCTAAACGCTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 299

Query 352  CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGTAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC 411
          |||
Sbjct 300  CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGTAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC 359

Query 412  GCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTGATTACATTCTCA 471
          |||
Sbjct 360  GCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTGATTACATTCTCA 419

Query 472  ACCGTTTGAAT--TTGAACGGCTTGGACTTGGGGTACTTGTGCCGGCCCTAAAGGTCGG 529
          |||
Sbjct 420  ACCGTTTGAATCTTGAACGGCTTGGACTTGGGGTACTTGTGCCGGCCCTAAAGGTCGG 479

Query 530  CTCCCCTTAAATGCATTAGCTGGTGCGCCCTCTCGCGTTGACTTGGTGTGATAATTCTAT 589
          |||
Sbjct 480  CTCCCCTTAAATGCATTAGCTGGTGCGCCCTCTCGCGTTGACTTGGTGTGATAATTCTAT 539

Query 590  TTGCACCGCTTTGGCGTGGATGTTATTTGGGAGGCTGCTTTCTAACCGTCCCCTGTGGA 649
          |||
Sbjct 540  TTGCACCGCTTTGGCGTGGATGTT-TTTGGGAGGCTGCTTTCTAACCGTCCCCTGTGGA 598

Query 650  CAGTAGTCTCTTTC 663
          |||
Sbjct 599  CAGTAGTCTCTTTC 612

```


9. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (BlastN) บริเวณ ITS1 และ ITS2 บนบริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของโครโมโซมอดีตีเอ็นเอจากราโอโซเลต CU-43 กับ *Agrocybe chaxingu* strain ASI 19022 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AY168832.1

>[gb|AY168832.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AY168832.1) *Agrocybe chaxingu* strain ASI 19022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=674

Score = 1063 bits (1178), Expect = 0.0
Identities = 610/619 (98%), Gaps = 5/619 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query  52  AAGGATCATTAACGAATAAACCTCGGTTGGGTTTGATGCTGGCCCTTGGGGCATGTGCAC  111
      |||
Sbjct  1  AAGGATCATTAACGAATAAACCTCGGTTGGGTTTGATGCTGGCCCTTGGGGCATGTGCAC  60

Query  112  CGCCTGTCGTTCTTTATTTCTTCCACCTGTGCACCCTTTGTAGGCTTGAACCGCTTTC  171
      |||
Sbjct  61  CGCCTGTCGTTCTTTATTTCTTCCACCTGTGCACCCTTTGTAGGCTTGAACCGCTTTC  120

Query  172  TTTGGCCTTC-GGGTCAGTGTTGGGACTGCTGAAATGGCTATCCCCTACCGTTCGAGTC  230
      |||
Sbjct  121  TTTGGCCTTTTGGGTCAGTGTTGGGACTGCTGAAATGGCTATCCCCTACCGTTCGAGTC  180

Query  231  TATGTTTTTTTACACTACACACCATTGTTAAACCTAGAATGTCAAAGGCTCTATGTGTGCC  290
      |||
Sbjct  181  TATGTTTTT-TACACTACACACCATTGTTAAACCTAGAATGTCAAAGGCTCTATGTGTGCC  239

Query  291  TATCTAAACGCTATACAACCTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC  350
      |||
Sbjct  240  TATCTAAACGCTATACAACCTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC  299

Query  351  GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA  410
      |||
Sbjct  300  GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA  359

Query  411  CGCACCTTGCCTCCTTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTATTACATTCTC  470
      |||
Sbjct  360  CGCACCTTGCCTCCTTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTATTACATTCTC  419

Query  471  AACCGTTTGAAT--TTGAACGGCTTGGACTTGGGGTACTTGTGCCGGCCCTAAAGGTGC  528
      |||
Sbjct  420  AACCGTTTGAATCTTGAACGGCTTGGACTTGGGGTACTTGTGCCGGCCCTAAAGGTGC  479

Query  529  GCTCCCCTTAAATGCATTAGCTGGTCGCCCCTCTCGCTGACTTGGTGTGATAATTCTA  588
      |||
Sbjct  480  GCTCCCCTTAAATGCATTAGCTGGTCGCCCCTCTCGCTGACTTGGTGTGATAATTCTA  539

Query  589  TTTGCACCGCTTTGGCGTGGATGTTATTTGGGAGGCTGCTTTCTAACCGTCCCTTGTGG  648
      |||
Sbjct  540  TTTGCACCGCTTTGGCGTGGATGCT-TTTTGGGAGGCTGCTTTCTAACCGTCCCTTGTGG  598

Query  649  ACAGTAGTCTCTTCATTA  667
      |||
Sbjct  599  ACAGTAGTCTCTTCATTA  617

```

10. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (BlastN) บริเวณ ITS1 และ ITS2 บนบริเวณที่ประมวลผลรหัส rRNA ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากราโอโซเลต CU-43 กับ *Agrocybe aegerita* strain SM981201 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AY763670.1

>[gb|AY763670.1](#) *Agrocybe aegerita* strain SM981201 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence
Length=617

Score = 1027 bits (1138), Expect = 0.0
Identities = 591/603 (98%), Gaps = 3/603 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 63   ACGAATAAACCTCGGTGGGTTTGATGCTGGCCCCTTGGGGCATGTGCACCGCCTGTCGTT 122
          |||
Sbjct 1    ACGAATAAACCTCGGTGGGCTCGATGCTGGCCCCTTGGGGCATGTGCACCGCCTGTCGTT 60

Query 123  CTTTATTTCTTCTCCACCTGTGCACCCCTTGTAGGCTTGAACCGCTTTCTTTGGCCTTCG 182
          |||
Sbjct 61   CTTTATTTCTTCTCCACCTGTGCACCCCTTGTAGGCTTGAACCGCTTTCTTTGGCCTTTG 120

Query 183  GGTCAGTGTGGGGACTGCTGAAATGGCTATCCCCTACCGTTCGAGTCTATGTTTTTTAC 242
          |||
Sbjct 121  GGTCAGTGTGGGGACTGCTGAATGGGCTATCCCCTACCGTTCGAGTCTATGTTTTTTAC 180

Query 243  ACTACACACCATTGTTAAACCTAGAATGTCAAAGGCTCTATGTGTGCCTATCTAAACGCT 302
          |||
Sbjct 181  ACTATACACCATTGTTAAACCTAGAATGTCAAAGGCTCTATGTGTGCCTATCTAAACGCT 240

Query 303  ATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC 362
          |||
Sbjct 241  ATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC 300

Query 363  GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGC 422
          |||
Sbjct 301  GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGC 360

Query 423  TCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGTCATTACATTCTCAACCGTTTGAAT 482
          |||
Sbjct 361  TCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGTCATTACATTCTCAACCGTTTGAAT 420

Query 483  --TTGAACGGCTTGGACTTGGGGTACTTGTGCCGGCCCTAAAGGTCGGCTCCCCTTAAA 540
          |||
Sbjct 421  TCTTGAACGGCTTGGACTTGGGGTACTTGTGCCGGCCCTAAAGGTCGGCTCCCCTTAAA 480

Query 541  TGCATTAGCTGGTCGCCCTCTCGCGTTGACTTGGTGTGATAATTCTATTTGCACCGCTT 600
          |||
Sbjct 481  TGCATTAGCTGGTCGCCCTCTCGTGTGACTTGGTGTGATAATTCTATTTGCACCGCTT 540

Query 601  TGGCGTGGATGTTATTTTGGGAGGCTGCTTTCTAACCGTCCCCTTGTGGACAGTAGTCTCT 660
          |||
Sbjct 541  TGGCATGGATGTT-TTTTGGGAGGCTGCTTTCTAACCGTCCCCTTGTGGACAGTAGTCTCT 599

Query 661  TTC 663
          |||
Sbjct 600  TTC 602

```

11. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส ขนาด 800 คู่เบส (รูป 4.21) กับแลคเคส B ของ *Trametes* sp. 420 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAW28937.1 (BlastX)

>[gb|AAW28937.1](#) แลคเคส B [*Trametes* sp. 420]

Length=519

Score = 46.6 bits (109), Expect(2) = 2e-11
Identities = 21/25 (84%), Positives = 21/25 (84%), Gaps = 0/25 (0%)
Frame = +3

```
Query 66  LATQYCDGLRGALVVYDDNDPAAHL 140
          L TQYCDGLRGALVVYD  DPHA L
Sbjct 136  LNTQYCDGLRGALVVYDPADPHASL 160
```

Score = 46.6 bits (109), Expect(2) = 2e-11
Identities = 35/109 (32%), Positives = 42/109 (38%), Gaps = 19/109 (17%)
Frame = +1

```
Query 229  DPGGP*NATDLYSLFPESTIITLADW*VSIVRICFIC*KFVLRVHTVAPSAGLVPASGRD 408
          DP P LY + EST+ITLADW YH AP AG VP S
Sbjct 152  DPADP--HASLYDVDEESTVITLADW-----YHVAAPLAGAVPRSDAT 192

Query 409  FDQRCRPLCWRTAVDLGGYQRVAQQEVRVRLISVSCDPI SFSLSMGHNM 555
          +L + R RL+S+SCDP GH+M
Sbjct 193  LINGLGRWSGDPTS ELAAINVTGPKRYRFR LVSMSCDPNYTFQIDGHSM 241
```

12. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส ขนาด 800 คู่เบส (รูป 4.21) กับแลคเคส 4 ของ *Pleurotus pulmonarius* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAY41064.1 (BlastX)

>[gb|AAY41064.1](#) แลคเคส 4 [*Pleurotus pulmonarius*]

Length=262

Score = 45.8 bits (107), Expect(2) = 1e-10
Identities = 42/117 (35%), Positives = 48/117 (41%), Gaps = 35/117 (29%)
Frame = +1

```
Query 229  DPGGP*NATDLYSLFPESTIITLADW*VSIVRICFIC*KFVLRVHTVAPSAGLVPAS--- 399
          DP P + LY + E+T+ITLADW YHT APSAG P S
Sbjct 66  DPEDPHRS--LYDVDDENTVITLADW-----YHTPAPSAGPAPVSEAT 106

Query 400  -----GRDFDQRCRPLCWRTAVDLGGYQRVAQQEVRVRLISVSCDPI SFSLSMGHNM 555
          G D PL V LG R RL+S+SCDP GHNM
Sbjct 107  LINGLGLYQDGPSSPLAV-IHVKLGS-----RYRFR LVSISCDPNHIFSV DGHNM 155
```

Score = 45.1 bits (105), Expect(2) = 1e-10
Identities = 19/25 (76%), Positives = 20/25 (80%), Gaps = 0/25 (0%)
Frame = +3

```
Query 66  LATQYCDGLRGALVVYDDNDPAAHL 140
          L+TQYCDGLRGA VVYD DPH L
Sbjct 50  LSTQYCDGLRGA FVVYD PEDPHRSL 74
```

13. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส ขนาด 800 คู่เบส (รูป 4.21) กับแลคเคส 3 ของ *Pleurotus sajor-caju* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAG27435.1 (BlastX)

>[gb|AAG27435.1](#) แลคเคส 3 [*Pleurotus sajor-caju*]

Length=161

Score = 43.5 bits (101), Expect(3) = 1e-10
Identities = 18/25 (72%), Positives = 19/25 (76%), Gaps = 0/25 (0%)
Frame = +3

```
Query 66  LATQYCDGLRGALVVYDDNDPFAHL 140
          L+TQYCDGLRG VVYD DPH L
Sbjct 76  LSTQYCDGLRGVFFVYDPEDPHRS 100
```

Score = 37.7 bits (86), Expect(3) = 1e-10
Identities = 24/57 (42%), Positives = 27/57 (47%), Gaps = 19/57 (33%)
Frame = +1

```
Query 229  DPGGP*NATDLYSLFPESTIITLADW*VSIVRICFIC*KFVLRHTVAPSAGLVPAS 399
          DP P + LY + E T+ITLADW YH APSAGLVP S
Sbjct 92  DPEDPHRS--LYDIDDEDTVITLADW-----YHVPAPSAGLVPVS 129
```

Score = 28.9 bits (63), Expect(3) = 1e-10
Identities = 14/29 (48%), Positives = 18/29 (62%), Gaps = 0/29 (0%)
Frame = +2

```
Query 404  ATLINGVGRFAGGPPSTWAGINVLPNKRY 490
          +TLING+G + GP S A I+V RY
Sbjct 131  STLINGLGLYQDGPESPLAVIHVKRGSRY 159
```

14. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส ขนาด 850 คู่เบส (รูป 4.21) กับแลคเคส 1 ของ *Pleurotus sajor-caju* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank CAD45377.1 (BlastX)

>[emb|CAD45377.1](#) แลคเคส 1 [*Pleurotus sajor-caju*]

Length=531

Score = 162 bits (410), Expect(2) = 2e-45
Identities = 88/171 (51%), Positives = 103/171 (60%), Gaps = 38/171 (22%)
Frame = +1

```
Query 226  DPGGP*NATDLYSLFPESTIITLADW*VSIVRICFIC*KFVLRHTVAPSAGLVPASDAT 405
          DP P LY + T+ITL DW YH VAP ++P +D+T
Sbjct 162  DPSPD--HLSLYDIDNADTVITLEDW-----YHVAVPQNAVLPADST 202
```

```
Query 406  LINGVGRFAGGPAVDLAVINVLPNKRYRFRLLISVSCDPNFIFSIDGHNMVSPLESRVVRN 585
          LING GRFAGG LAVINV NKRYRFRLL+S+SCDPNF FSIDGH++
Sbjct 203  LINGKGRFAGGDTTALAVINVESENKRYRFRLLVSMSCDPNFTFSIDGHSL----- 251
```

```
Query 586  *KCCFVL*TIIEVDSVNVEPLTVDSIQIFAAQRYSFVFLNANQPIDNYWIRA 738
          +IE D+VN+ P+ VDSIQIFA QRYSFVFLNANQ +DNYWIRA
```

Sbjct 252 -----QVIEADAVNIVPIVVDISIQIFAGQRYSFVFLNANQTVDNWIRA 294

Score = 45.1 bits (105), Expect(2) = 2e-45
 Identities = 20/38 (52%), Positives = 25/38 (65%), Gaps = 0/38 (0%)
 Frame = +3

Query 24 IGDSSQKFRRLWLATQYCDGLRGALVVYDDNDPFAHL 137
 + D + F L+TQYCDGLRG LV+YD +DPH L
 Sbjct 133 VADQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPLVIYDPSDPHLSL 170

15. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส
 ขนาด 850 คู่เบส (รูป 4.21) กับแลคเคส C ของ *Trametes* sp. 420 หมายเลขเข้าถึงของ
 Genbank AAW28938.1 (BlastX)

>[gb|AAW28938.1](#) แลคเคส C [*Trametes* sp. 420]

Length=519

Score = 167 bits (422), Expect(2) = 3e-47
 Identities = 91/171 (53%), Positives = 103/171 (60%), Gaps = 38/171 (22%)
 Frame = +1

Query 226 DPGGP*NATDLYSLFPESTIITLADW*VSIVRICFIC*KFVLRHYHTVAPSAGLVPASDAT 405
 DP P LY + EST+ITLADW YH AP AG VP SDAT
 Sbjct 152 DPADP--HAGLYDVDESTVITLADW-----YHVAAPLAGAVPRSDAT 192
 Query 406 LINGVGRFAGGPAVDLAVINVLPNKRYRFRLLISVSCDPNFIFS IDGHNMVSPLESRVVRN 585
 LING+GR++G P +LAVINV P KRYRFRLL+S+SCDPN+ F IDGH+M
 Sbjct 193 LINGLGRWSGDPTSELAVINVTGPKRYRFRLLVSMSCDPNYTFQIDGHSM----- 241
 Query 586 *KCCFVL*TIIIEVDSVNVEPLTVDSIQIFAAQRYSFVFLNANQPIDNYWIRA 738
 T+IE D N EPL VD IQIFA QRYSFVL ANQ + NYWIRA
 Sbjct 242 -----TVIEADGQNTPEPLVDQIQIFAGQRYSFVLEANQTVGNWIRA 284

Score = 46.2 bits (108), Expect(2) = 3e-47
 Identities = 21/25 (84%), Positives = 21/25 (84%), Gaps = 0/25 (0%)
 Frame = +3

Query 63 LATQYCDGLRGALVVYDDNDPFAHL 137
 L TQYCDGLRGALVVYD DPHA L
 Sbjct 136 LNTQYCDGLRGALVVYDPADPHAGL 160

16. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส
 ขนาด 850 คู่เบส (รูป 4.21) กับแลคเคสของ *Pleurotus ostreatus* หมายเลขเข้าถึงของ
 Genbank AAR21094.1 (BlastX)

>[gb|AAR21094.1](#) แลคเคส [*Pleurotus ostreatus*]

Length=533

Score = 156 bits (394), Expect(2) = 3e-43
 Identities = 82/161 (50%), Positives = 99/161 (61%), Gaps = 36/161 (22%)
 Frame = +1

Query 256 LYSLFPESTIITLADW*VSIVRICFIC*KFVLRHYHTVAPSAGLVPASDATLINGVGRFAG 435
 LY + T+ITL DW YH VAP +P D+TLING GR+AG
 Sbjct 170 LYDIDNADTVITLEDW-----YHIVAPQNAAIPTPDSTLINGKGRYAG 212

```

Query 436 GPAVDLAVINLPLNKRYRFRLLISVSCDPNFIFSIDGHNMVSPLESRVVRN*KCCFVL*TI 615
          GP L+VINV NKRYRFRLL+S+SCDPNF FSIDGH+++ +
Sbjct 213 GPTSPLSVINVESNKRYRFRLLVSMSCDPNFIFSIDGHSL-----V 253

Query 616 IEVDSVNVEPLTVDSIQIFAAQRYSFVLNANQPIDNYWIRA 738
          IE D+VN+ P+TVDSIQIFA QRYSFVL A+Q + NYWIRA
Sbjct 254 IEADAVNIVPITVDSIQIFAGQRYSFVLTADQTVGNWIRA 294

```

Score = 43.9 bits (102), Expect(2) = 3e-43
 Identities = 18/25 (72%), Positives = 20/25 (80%), Gaps = 0/25 (0%)
 Frame = +3

```

Query 63 LATQYCDGLRGALVVYDDNDPFAHL 137
          L+TQYCDGLRG VVYD +DPH L
Sbjct 146 LSTQYCDGLRGPVVYDSSDPHLSL 170

```

17. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส ขนาด 450 คู่เบส (รูป 4.24) กับแลคเคส C ของ *Trametes* sp. 420 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAW28938.1 (BlastX)

>[gb|AAW28938.1](#) แลคเคส C [*Trametes* sp. 420]

Length=519

Score = 104 bits (259), Expect = 2e-21
 Identities = 55/102 (53%), Positives = 64/102 (62%), Gaps = 19/102 (18%)
 Frame = +3

```

Query 84 DPGGP*NATDLYSLFPESTIITLADW*VSIVRICFIC*KFVLRVHTVAPSAGLVPASDAT 263
          DP P LY + EST+ITLADW YH AP AG VP SDAT
Sbjct 152 DPADP--HAGLYDVDDDESTVITLADW-----YHVAAPLAGAVPRSDAT 192

Query 264 LINGVGRFAGGPAVDLAVINLPLNKRYRFRLLISVSCDPNFIF 389
          LING+GR++G P +LAVINV P KRYRFRLL+S+SCDPN+ F
Sbjct 193 LINGLGRWSDPTSELAVINVTGKRYRFRLLVSMSCDPNYTF 234

```

18. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส ขนาด 450 คู่เบส (รูป 4.24) กับแลคเคส 2 ของ *Lentinula edodes* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAT99290.1 (BlastX)

>[gb|AAT99290.1](#) แลคเคส 2 VT; LAC2VT [*Lentinula edodes*]

Length=518

Score = 99.4 bits (246), Expect = 7e-20
 Identities = 54/104 (51%), Positives = 63/104 (60%), Gaps = 20/104 (19%)
 Frame = +3

```

Query 84 DPGGP*NATDLYSLFPESTIITLADW*VSIVRICFIC*KFVLRVHTVAPSAGLVPASDAT 263
          DP P DLY + +ST+ITLADW YH AP AG VP SDAT
Sbjct 146 DPQDP--YVDLYDVDDDESTVITLADW-----YHVPAQAGAVPTSDAT 186

Query 264 LINGVGRFAGGPA-VDLAVINLPLNKRYRFRLLISVSCDPNFIF 392
          LING+GR GPA AV+NV+ RYRFRLL+S+SCDPNF+FS
Sbjct 187 LINGLGRSVNGPADAPFAVNVVQGSRYRFRLLVSI SCDPNFLFS 230

```

19. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลคเคสใน *Agrocybe* sp CU-43 ที่ทราบทั้งหมด 741 เบส (รูปที่ 4.25) กับแลคเคส 1 ของ *Pleurotus sajor-caju* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAR21094.1 (BlastX)

>[emb|CAD45377.1](#) แลคเคส 1 [*Pleurotus sajor-caju*]

Length=531

Score = 162 bits (410), Expect(2) = 2e-45

Identities = 88/171 (51%), Positives = 103/171 (60%), Gaps = 38/171 (22%)

Frame = +1

```
Query 226 DPGGP*NATDLYSLFPESTIITLADW*VSIVRICFIC*KFVLRHYHTVAPSAGLVPASDAT 405
          DP P LY + T+ITL DW YH VAP ++P +D+T
Sbjct 162 DPSDP--HLSLYDIDNADTVITLEDW-----YHVVA PQNAVLPTADST 202

Query 406 LINGVGRFAGGPAVDLAVINVLNPKRYRFRLLISVSCDPNFIFSIDGHNMVSPLESRVVRN 585
          LING GRFAGG LAVINV NKRYRFRLL+S+SCDPNF FSIDGH++
Sbjct 203 LINGKGRFAGGDTTALAVINVESNKRYRFRLLVSMSCDPNFTFSIDGHSL----- 251

Query 586 *KCCFVL*TIIIEVDSVNVEPLTVDSIQIFAAQRYSFVLNANQPIDNYWIRA 738
          +IE D+VN+ P+ VDSIQIFA QRYSFVLNANQ +DNYWIRA
Sbjct 252 -----QVIEADAVNIVPIVDSIQIFAGQRYSFVLNANQTVDNWIRA 294
```

Score = 45.1 bits (105), Expect(2) = 2e-45

Identities = 20/38 (52%), Positives = 25/38 (65%), Gaps = 0/38 (0%)

Frame = +3

```
Query 24 IGDSSQKFRLLWLATQYCDGLRGALVYDDNDPFAHL 137
          + D + F L+TQYCDGLRG LV+YD +DPH L
Sbjct 133 VADQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGLVYDPSDPHLSL 170
```

20. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลคเคสใน *Agrocybe* sp CU-43 ที่ทราบทั้งหมด 741 เบส (รูปที่ 4.25) กับแลคเคส 1 ของ *Ceriporiopsis subvermispora* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAO26040.1 (BlastX)

>[gb|AAO25685.1](#) Lcs-1 [*Ceriporiopsis subvermispora*]

[gb|AAO26040.1](#) แลคเคส 1 [*Ceriporiopsis subvermispora*]

[gb|AAc97074.2](#) แลคเคส precursor [*Ceriporiopsis subvermispora*]

Length=519

Score = 150 bits (379), Expect(2) = 2e-43

Identities = 89/173 (51%), Positives = 102/173 (58%), Gaps = 41/173 (23%)

Frame = +1

```
Query 226 DPGGP*NATDLYSLFPESTIITLADW*VSIVRICFIC*KFVLRHYHTVAPSAGLVPASDAT 405
          DP P DLY + EST+ITL+DW YH A S P D T
Sbjct 151 DPNDP--HADLYDVDESTVITLSDW-----YHAAA-STLTFPTFDTT 190

Query 406 LINGVGRFAG--GPAVDLAVINVLNPKRYRFRLLISVSCDPNFIFSIDGHNMVSPLESRVV 579
          LING+GRFAG G +L VI V KRYRFRLL+S+SCDPN++FSID H +
Sbjct 191 LINGLGRFAGTGGSDSNLTVITVEQKRYRFRLLVSI SCDPNWVFSIDQHEL----- 241

Query 580 RN*KCCFVL*TIIIEVDSVNVEPLTVDSIQIFAAQRYSFVLNANQPIDNYWIRA 738
          T+IEVD VN PLTVD+IQIFAAQRYSFVLNANQ +DNYWIRA
```

Sbjct 242 -----TVIEVDGVNAVPLTVDAIQIFAAQRYSFVLNANQTVDNWIRA 284

Score = 50.1 bits (118), Expect(2) = 2e-43
 Identities = 22/25 (88%), Positives = 22/25 (88%), Gaps = 0/25 (0%)
 Frame = +3

Query 63 LATQYCDGLRGALVVYDDNDPFAHL 137
 LATQYCDGLRG LVVYD NDPHA L
 Sbjct 135 LATQYCDGLRGPLVVYDPNDPHADL 159

21. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลคเคสใน *Agrocybe* sp CU-43 ที่ทราบทั้งหมด 741 เบส (รูปที่ 4.25) กับแลคเคส 4 ของ *Ceriporiopsis cinerea* สายพันธุ์ okayama7#130 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAR01245.1 (BlastX)

>gb|AAR01245.1 แลคเคส 4 [*Ceriporiopsis cinerea*]

tpg|DAA04509.1 TPA_exp: แลคเคส 4 [*Ceriporiopsis cinerea* okayama7#130]

Length=545

Score = 151 bits (382), Expect(2) = 8e-43
 Identities = 80/162 (49%), Positives = 99/162 (61%), Gaps = 36/162 (22%)
 Frame = +1

Query 256 LYSLFPESTIITLADW*VSIVRICFIC*KFVLRHYHTVAPSAGLVPASDATLINGVGRFAG 435
 LY + E+TIIT+ADW YHT APS + +D+TLING GR+ G
 Sbjct 158 LYDVDDENTIITVADW-----YHTPAPSLPIPAFADSTLINGKGRYPG 200

Query 436 GPAVDLAVINLVPNKRYRFRLLSVSCDPNFIIFSIDGHNMVSPLESRVVRN*KCCFVL*TI 615
 GP VDLA++NV+ KRYRFRLL+S++C+PN+ FSIDGH M TI
 Sbjct 201 GPKVDLAIVNVVKGKRYRFRLLSLACEPNYQFSIDGHRM-----TI 241

Query 616 IEVDSVNVEPLTVDSIQIFAAQRYSFVLNANQPIDNYWIRAL 741
 IE D EP+ VD IQIF QRYSF+L AN+P+ NYWIRAL
 Sbjct 242 IEADGYLTEPVVVDRIQIFFTGQRYSFLEANRPVANYWIRAL 283

Score = 47.0 bits (110), Expect(2) = 8e-43
 Identities = 20/37 (54%), Positives = 24/37 (64%), Gaps = 0/37 (0%)
 Frame = +3

Query 27 GDSSQKFRRLWLATQYCDGLRGALVVYDDNDPFAHL 137
 GD + F TQYCDGLRG V+YD+NDP+ HL
 Sbjct 122 GDQAGTFWYHSHFGTQYCDGLRGPFVIYDENDPYKHL 158

22. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลคเคสใน *Agrocybe* sp CU-43 ที่ทราบทั้งหมด 741 เบส (รูปที่ 4.25) กับแลคเคสของ *Pleurotus ostreatus* สายพันธุ์ okayama7#130 หมายเลขเข้าถึงของ Genbank AAR82932.1 (BlastX)

>gb|AAR82932.1 แลคเคส [*Pleurotus ostreatus*]

Length=529

Score = 165 bits (417), Expect(2) = 1e-45
 Identities = 91/171 (53%), Positives = 104/171 (60%), Gaps = 38/171 (22%)

Frame = +1

```

Query 226 DPGGP*NATDLYSLFPESTIITLADW*VSIVRICFIC*KFVLRVHTVAPSAGLVPASDAT 405
          DP P LY + TIITL DW YH VAP ++P +D+T
Sbjct 160 DPSPD--HLSLYDVDNADTIITLEDW-----YHVVA PQNAVLP TADST 200

Query 406 LINGVGRFAGGPAVDLAVINVLNPKRYRFRLLISVSCDPNFIFSIDGHNMVSPLESRVVRN 585
          LING GRFAGGP LAVINV NKRYRFRLLIS+SCDPNF FSIDGH++
Sbjct 201 LINGKGRFAGGPTSALAVINVESNKRYRFRLLISMCDPNFTFSIDGHSL----- 249

Query 586 *KCCFVL*TIIEVDSVNVEPLTVDSIQIFAAQRYSFVFLNANQPIDNYWIRA 738
          +IE D+VN+ P+ VDSIQIFA QRYSFVFLNANQ +DNYWIRA
Sbjct 250 -----QVIEADAVNIVPIVVDVSIQIFAGQRYSFVFLNANQTV DNYWIRA 292

```

Score = 43.1 bits (100), Expect(2) = 1e-45

Identities = 17/25 (68%), Positives = 20/25 (80%), Gaps = 0/25 (0%)

Frame = +3

```

Query 63 LATQYCDGLRGALVVYDDNDP H A H L 137
          L+TQYCDGLRG +VYD +DPH L
Sbjct 144 LSTQYCDGLRGPFI VYDPSDP H L S L 168

```

23. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลคเคสใน *Agrocybe* sp CU-43 ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ cDNA เป็นแม่แบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอเป็นแม่แบบ

สายบนคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลคเคสที่ใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอ เป็นแม่แบบและใช้คู่ไพรเมอร์ lacAg-F1 และ lacAg-R1

สายล่างคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแลคเคสที่ใช้ cDNA เป็นแม่แบบและใช้คู่ไพรเมอร์ lacF-1 และ lacR-1 ซึ่งมีความเหมือนกัน 98% ด้วยค่า e-value 2e-92

```

Query 2 CCTGCATCGGACGCGACTTTGATCAACGGTGTTCGGCCGCTTTGCTGGCGGACCCGCCGTC 61
          |||
Sbjct 3 CCTGCATCGGACGCGACTTTGATCAACGGTGTTCG-CCGCTTTGCTGGCGGACC-GCCGTC 60

Query 62 GACCTGGCGGTTATCAACGTGTGCCCCAACAAGAGGTACCGGTTCCGCTTGATTTCCGTC 121
          |||
Sbjct 61 GACCTGGCGGTTATCAACGTGTGCCCCAACAAGAGGTACCGGTTCCGCTTGATTTCCGTC 120

Query 122 TCTTGCGACCCCAATTTTCATTTCTCTATCGATGGGCACAACATGGTAAGTCCACTAGAA 181
          |||
Sbjct 121 TCTTGCGACCCCAATTTCA-TTCTCTATCGATGGGCACAACATGGTAAGTCCACTAGAA 179

Query 182 TCCCGCGTAGTACGAACTAAAAG 205
          |||
Sbjct 180 TCCCGCGTAGTACGAACTAAAAG 203

```

24. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gdp* ของ *Agrocybe* sp. CU-43 (รูปที่ 4.29) กับยีน *gdp* ของ *Phanerochaete chrysosporium* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank BAF31128.1 (BlastX)

>[dbj|BAF31128.1](#)| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [*Phanerochaete chrysosporium*]

Length=337

Score = 100 bits (248), Expect(5) = 3e-51

Identities = 49/82 (59%), Positives = 58/82 (70%), Gaps = 18/82 (21%)
Frame = +3

```
Query 156  VYMFKYDSVHGRFKGTVESKDGKLVINGKPVTVYAERDPAAIQWGAAGAEYIIIEATVSIS 335
           VYMFKYDSVHGRFKG+VE+KDGKL + GKP+ V+AE+DPA I WG+ GA EYI+E+T
Sbjct 43   VYMFKYDSVHGRFKGSVEAKDGKLYVEGKPIHVFAEKDPANIPWGSVGA EYIVEST---- 98

Query 336  LCIYPPVPLIALQGVTTEK 401
           GVFTTTEK
Sbjct 99  -----GVFTTTEK 106
```

Score = 78.6 bits (192), Expect(5) = 3e-51
Identities = 36/45 (80%), Positives = 42/45 (93%), Gaps = 0/45 (0%)
Frame = +2

```
Query 458  RASAHKGGAKKVVISAPSADAPMFVCGVNLESYDPKYKVV RVAT 592
           +ASAHKGGAKKV+ISAPSADAPMFVCGVNL++YD KYKV+ A+
Sbjct 106  KASAHKGGAKKVIISAPSADAPMFVCGVNLDAYDSKYKVISNAS 150
```

Score = 61.6 bits (148), Expect(5) = 3e-51
Identities = 41/46 (89%), Positives = 43/46 (93%), Gaps = 0/46 (0%)
Frame = +1

```
Query 646  ISNASCTTNCLAPLAKIINDNFGIVEGLMTTVHATTATXXTVDGPS 783
           ISNASCTTNCLAPLAK+I+D FGIVEGLMTTVHATTAT TVDGPS
Sbjct 146  ISNASCTTNCLAPLAKVIHDKFGIVEGLMTTVHATTATQKTVDGPS 191
```

Score = 27.7 bits (60), Expect(5) = 3e-51
Identities = 11/12 (91%), Positives = 11/12 (91%), Gaps = 0/12 (0%)
Frame = +2

```
Query 77   PFIDLEYMVYRF 112
           PFIDLEYMVY F
Sbjct 35   PFIDLEYMVYMF 46
```

Score = 20.4 bits (41), Expect(5) = 3e-51
Identities = 7/7 (100%), Positives = 7/7 (100%), Gaps = 0/7 (0%)
Frame = +2

```
Query 791  WRGGRSV 811
           WRGGRSV
Sbjct 195  WRGGRSV 201
```

25. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gdp* ของ *Agrocybe* sp. CU-43 (รูปที่ 4.29) กับ *gdp* ของ *Phanerochaete sordida* หมายเลขเข้าถึงของ Genbank BAF75837.1 (BlastX)

>[dbj|BAF75837.1](#) | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [*Phanerochaete sordida*]

Length=337

Score = 97.1 bits (240), Expect(5) = 7e-50
Identities = 46/82 (56%), Positives = 59/82 (71%), Gaps = 18/82 (21%)
Frame = +3

```
Query 156  VYMFKYDSVHGRFKGTVESKDGKLVINGKPVTVYAERDPAAIQWGAAGAEYIIIEATVSIS 335
```

Sbjct 43 VYMFK+DSVHGR+KG+VE+KDGKL + GKP+TV++E+DP+ I WG+ GA EYI+E+T
 VYMFKFDVSVHGRYKGSVEAKDGKLLWVEGKPIITVFSKDP SNIPWGSVGA EYI VEST----- 98

Query 336 LCIYPVPPVLIALQG VFTTTEK 401
 GVFTTTEK

Sbjct 99 -----GVFTTTEK 106

Score = 78.6 bits (192), Expect(5) = 7e-50
 Identities = 37/45 (82%), Positives = 41/45 (91%), Gaps = 0/45 (0%)
 Frame = +2

Query 458 RASAHKGGAKKVVISAPSADAPMFVCGVNLESYDPKYKVV RVAT 592
 +ASAHKGGAKKV+ISAPSADAPMFVCGVNLESYD KY V+ A+

Sbjct 106 KASAHKGGAKKVIISAPSADAPMFVCGVNLESYDSKYTVISNAS 150

Score = 61.2 bits (147), Expect(5) = 7e-50
 Identities = 39/46 (84%), Positives = 43/46 (93%), Gaps = 0/46 (0%)
 Frame = +1

Query 646 ISNASCTTNCLAPLAKIINDNFGIVEGLMTTVHATTATXXTVDGPS 783
 ISNASCTTNCLAPLAK+++D FGIVEGLMTTVH+TTAT TVDGPS

Sbjct 146 ISNASCTTNCLAPLAKVVHDKFGIVEGLMTTVHSTTATQKTVDGPS 191

Score = 26.6 bits (57), Expect(5) = 7e-50
 Identities = 10/12 (83%), Positives = 11/12 (91%), Gaps = 0/12 (0%)
 Frame = +2

Query 77 PFIDLEYMVYRF 112
 PFIDL+YMVY F

Sbjct 35 PFIDLDMVYMF 46

Score = 20.4 bits (41), Expect(5) = 7e-50
 Identities = 7/7 (100%), Positives = 7/7 (100%), Gaps = 0/7 (0%)
 Frame = +2

Query 791 WRGGRSV 811
 WRGGRSV

Sbjct 195 WRGGRSV 201

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกุลณี ชูพึงอาตม์ เกิดเมื่อวันที่ 15 สิงหาคม พ.ศ. 2515 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในปีการศึกษา 2535 และปริญญาโทสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2539 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย