# การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนโดยราฟอกขาวที่คัดแยกได้ในประเทศไทย

นางสาวปวีณา ทองเกร็ด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BY WHITE-ROT FUNGI ISOLATED FROM THAILAND

Miss Paweena Thongkred

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009
Copyright of Chulalongkorn University

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนโดยราฟอกขาวที่คัดแยกได้ในประเทศไทย |
| โดย | นางสาวปวีณา ทองเกร็ด |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีชีวภาพ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(นายอนิวรรต เฉลิมพงษ์)

ปวีณา ทองเกร็ด : การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนโดยราฟอกขาวที่คัดแยกได้ในประเทศไทย. (BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BY WHITE-ROT FUNGI ISOLATED FROM THAILAND) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, 133 หน้า.

การเก็บตัวอย่างเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาว (white-rot fungi) ในพื้นที่ 11 จังหวัด ของประเทศไทย สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ 20 ไอโซเลต และจัดจำแนกได้ทั้งหมด 6 สกุล 19 ชนิด เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติม 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate (ABTS) พบว่า ราทั้ง 20 ไอโซเลตสามารถสร้างแลคเคสได้ เมื่อวัดแอกติวิตีเชิงปริมาณ พบว่า *Pycnoporus coccineus* (Fr.) Bond. et Sing. KB4 *P. coccineus* PB1 และ *P. sanguineus* (L. ex Fr.) Murr. MHS3 สามารถสร้างแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสได้มากที่สุด โดยมีแอกติวิตีอยู่ในช่วง 3.61-2.65 และ 0.13-0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และพบว่าราทั้ง 20 ไอโซเลต ไม่พบการสร้างลิกนิน เพอร์ออกซิเดส ทั้งนี้ *P. coccineus* KB4 และ *P. coccineus* PB1 สามารถผลิตแลคเคสได้มากที่สุดในช่วง late log phase ถึง early stationary phase ส่วน *P. sanguineus* MHS3 สามารถผลิตแลคเคสได้มากที่สุดในช่วง early stationary phase เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *Pycnoporus* ทั้ง 3 ไอโซเลต *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้มากที่สุด รวมทั้งสามารถเติบโตบนอาหารที่มีพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์-บอน (PAHs) ได้แก่ anthracene phenanthrene fluoranthene pyrene และ benzo(a)pyrene ได้ดีที่สุดอีกด้วย สำหรับภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส พบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในอาหารสูตร Basal Medium ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เปปโตน 0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้นที่ 5 โดยมีแอกติวิตีของแลคเคสสูงสุด 6.12$\pm$0.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์หยาบ พบว่า แลคเคสมีการทำงานและความเสถียรดีที่สุดที่ความเป็นกรดด่าง 3.5 ส่วนแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส มีการทำงานและความเสถียรดีที่สุดที่ความเป็นกรดด่าง 5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานและความเสถียรของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิ-เดส คืออุณหภูมิห้องหรือ ประมาณ 28 องศาเซลเซียส $FeSO_4$ และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของแลคเคส ส่วน $ZnCl_2$ และ EDTA มีผลยับยั้งการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ในขณะที่ $MnSO_4$ จะช่วยเพิ่มการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส เมื่อทำการย่อยสลาย PAHs 5 ชนิด (100 ppm) ด้วยเอนไซม์หยาบ พบว่าแลค-เคสความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สามารถย่อยสลาย pyrene และ anthracene ได้มากที่สุด ที่ 76.35 และ 74.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง ส่วน fluoranthene สามารถย่อยสลายได้มากที่สุด ที่ 84.22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และ benzo(a)pyrene และ phenanthrene จะถูกย่อยสลายได้ดีขึ้นหากมีการเติมเมดิเอเตอร์ (1 mM ABTS) โดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย 66.25 และ 50.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2552.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

## 5072351523: MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: WHITE-ROT FUNGI / PAHs / LACCASE

PAWEENA THONGKRED : BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BY WHITE-ROT FUNGI ISOLATED FROM THAILAND. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PONGTHARIN LOTRAKUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D., 133 pp.

Basidiocarp samples of white-rot fungi collected from 11 provinces in Thailand. Twenty isolates were grown to pure cultures. The collected fungi were identified into 6 genera and 19 species. The abilities to produce ligninolytic enzymes of these fungal isolates were tested using Potato Dextrose Agar (PDA) containing 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate (ABTS). All isolates were found positive for laccase. When quantitatively assayed for ligninolytic enzymes, *Pycnoporus coccineus* (Fr.) Bond. et Sing. KB4, *P. coccineus* PB1, and *P. sanguineus* (L. ex Fr.) Murr. MHS3 showed the highest laccase and manganese peroxidase activities in ranges of 3.61-2.65 and 0.13-0.03 U $ml^{-1}$, respectively, while none of these 20 isolates produced lignin peroxidase. *P. coccineus* KB4 and *P. coccineus* PB1 produced laccase during late log phase to early stationary phase whereas *P. sanguineus* MHS3 produced the enzyme during early stationary phase. Among these *Pycnoporus* isolates, *P. coccineus* KB4 indicated the highest laccase activity and showed the best growth on a medium containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), including anthracene, phenanthrene, fluoranthene, pyrene, and benzo(a)pyrene. For optimum condition of laccase production, *P. coccineus* KB4 gave the best laccase yield (6.12±0.40 U $ml^{-1}$) when grown at 28°C for 8 days in Basal Medium containing 2 percent (w/v) glucose and 2.5 percent (w/v) peptone with initial pH 5.0. The crude laccase and manganese peroxidase were subjected for enzyme characterization. The optimum pH and stability of laccase were shown at pH 3.5, whereas those of manganese peroxidase were shown at pH 5.0. Both laccase and manganese peroxidase had depicted optimum temperature and stability at room temperature (not higher than 28°C). $FeSO_4$ and SDS inhibited laccase while $ZnCl_2$ and EDTA inhibited manganese peroxidase. $MnSO_4$ was found to induce activity of manganese peroxidase. When 5 PAHs (100 ppm each) were degraded by crude laccase from *P. coccineus* KB4 (1 U $ml^{-1}$), it was found that 76.35 and 75.67 percent of pyrene and anthracene were degraded within 2 hours whereas 84.22 percent of fluoranthene were degraded within 24 hours. Benzo(a)pyrene and phenanthrene could be degraded by the enzyme more rapidly only when a mediator, 1 mM ABTS, was added to the reaction mixtures with 66.25, and 50.47 percent degradation after 24 hours.

Field of Study : ……Biotechnology……Student's Signature.....
Academic Year : .....…2009……Advisor's Signature.....
Co-Advisor's Signature.....…

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้คำปรึกษา และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง หัวหน้าภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ นายอนิวรรต เฉลิมพงษ์ ที่กรุณาเป็นกรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก) ในการสอบวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และหน่วยปฏิบัติการ การวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ สมาชิกในหน่วยปฏิบัติการการวิจัยการใช้ ประโยชน์จากชีวมวลพืช บุคลากรในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ขอกราบระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ผู้วางรากฐานให้โอกาสทางการศึกษา และญาติพี่น้องผู้มีอุปการคุณทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดี ตลอดมา ทำให้งานวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยรุ่นที่ 11 ครั้งที่ 1/2553 (ภาคต้น ปีการศึกษา2553) บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ..... ช

สารบัญตาราง……..……..……..……..…….. ญ

สารบัญรูป……..……..……..…… ฎ

บทที่

1. บทนำ……..……..…… 1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….……..……..... 4
3. วิธีดำเนินการวิจัย…..……..…… 26
   - 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย……..……..…….. 26
   - 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย……..…… 27
   - 3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย……..……..…… 28
     - 3.3.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดเห็ดราในรากลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย…… 28
     - 3.3.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนินโนไลติกเอนไซม์…… 28
     - 3.3.3 การศึกษาการเติบโตของรา……... 29
     - 3.3.4 การศึกษาการเติบโตของราบนอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติม PAHs….. 30
     - 3.3.5 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส……... 30
     - 3.3.6 การเตรียมแลคเคสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ..... 31
     - 3.3.7 การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน..... 32
     - 3.3.8 การจัดทำตัวอย่างแห้งและ culture บริสุทธิ์เก็บในพิพิธภัณฑ์พืช… 34
4. ผลการวิจัย……..……..……..……..……..……..……..... 35
   - 4.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย…… 35
   - 4.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนินโนไลติกเอนไซม์…… 60

หน้า

4.3 การศึกษาการเติบโตของรา..... 64
4.4 การศึกษาการเติบโตของราบนอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติม PAHs..... 64
4.5 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส..... 68
4.6 การเตรียมแลคเคสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ..... 76
4.7 การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน..... 86
5. การอภิปรายผลการวิจัย..... 89
5.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย..... 89
5.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนินโนไลติกเอนไซม์..... 90
5.3 การศึกษาการเติบโตของรา..... 91
5.4 การศึกษาการเติบโตของราบนอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติม PAHs..... 92
5.5 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส..... 93
5.6 การเตรียมแลคเคสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ..... 95
5.7 การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน..... 100
6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 103
6.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย..... 103
6.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนินโนไลติกเอนไซม์..... 103
6.3 การศึกษาการเติบโตของรา..... 104
6.4 การศึกษาการเติบโตของราบนอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติม PAHs..... 104
6.5 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส..... 104
6.6 การเตรียมแลคเคสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ..... 105
6.7 การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน..... 107
6.8 ข้อเสนอแนะ..... 108
รายการอ้างอิง..... 109
ภาคผนวก..... 118
ภาคผนวก ก..... 119
ภาคผนวก ข..... 121
ภาคผนวก ค..... 122

หน้า

ภาคผนวก ง..... 123
ภาคผนวก จ..... 126
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 133

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | สมบัติทางกายภาพและเคมีของสารประกอบ PAHs บางชนิด…… | 5 |
| 2 | การจัดกลุ่มของ PAHs โดย International Agency for Research on Cancer ตามผลของการก่อมะเร็งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง..... | 7 |
| 3 | การปนเปื้อนของ PAHs ในอากาศของทวีปเอเชียระหว่างปี ค.ศ. 1999-2004..... | 10 |
| 4 | แบคทีเรียบางชนิดที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้…….. | 14 |
| 5 | ราบางชนิดที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้…….. | 17 |
| 6 | ราฟอกขาวบางชนิดที่สามารถสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์ได้…… | 20 |
| 7 | ค่า redox potential ($E^{o}$) ของแลคเคสที่ผลิตได้จากราและพืชบางชนิด……. | 23 |
| 8 | ตัวอย่างเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวที่เก็บได้จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทยในการศึกษานี้..... | 36 |
| 9 | ความสามารถในการสร้างแลคเคสของรา 20 ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA ที่มีการเติม ABTS ความเข้มข้น 250 ppm เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง…… | 61 |
| 10 | แลคเคสแอกติวิตีของรา 20 ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง. | 62 |
| 11 | แมงกานีส เพอร์ออกซิเดสแอกติวิตีของรา 20 ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง…… | 63 |
| 12 | ผลของ PAHs ต่อการเติบโตของ *P. coccineus* KB4 *P. coccineus* PB1 และ *P. sanguineus* MHS3 เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร Basal Medium Agar ที่มีการเติม PAHs เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง…… | 66 |
| 13 | การตกตะกอนของแลคเคสจาก *P. coccineus* KB4 ด้วยแอมโมเนียม-ซัลเฟต……... | 77 |
| 14 | ผลการย่อย PAHs แต่ละชนิดโดยการใช้แลคเคส…… | 126 |
| 15 | ผลการย่อย PAHs แต่ละชนิดโดยการใช้แลคเคสร่วมกับเมดิเอเตอร์…….. | 127 |

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ไดอะแกรมแสดงโครงสร้างของสารประกอบ PAHs บางชนิด ตัวเลขในไดอะแกรมแสดงตำแหน่งของคาร์บอนในโมเลกุล…….. | 4 |
| 2 | วิถีการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียและราบางชนิด…… | 16 |
| 3 | วิถีออกซิเดชันของลิกนิน เพอร์ออกซิเดส…… | 19 |
| 4 | วิถีออกซิเดชันของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส…….. | 21 |
| 5 | วิถีออกซิเดชันของแลคเคส…….. | 21 |
| 6 | ไดอะแกรมแสดงโครงสร้างของเมดิเตอร์บางชนิดที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นปฏิกิริยาของแลคเคส……... | 24 |
| 7 | แผนที่พื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดราในกลุ่มไวต์รอตในการศึกษานี้…….. | 35 |
| 8 | ลักษณะเส้นใยเห็ดรากลุ่มราฟอกขาวที่คัดแยกได้ในประเทศไทย เมื่อเติบโตอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน (A) *Ganoderma australe* NKP2 (B) *G. australe* NKS4 (C) *G. australe* PTN3 (D) *G. dahlii* CB24 (E) *G. lobatum* BK5 (F) *G.lobatum* RED6 (G) *G. lucidum* NKP3 (H) *G. lucidum* NRM9 (I) *G. lucidum* RED2 (J) *Microporus xanthopus* CB2 (K) *Phellinus pachyphloeus* PJK2 (L) *Polyporus tenuiculus* KB1 (M) *Pycnoporus coccineus* KB4 (N) *P. coccineus* PB1 (O) *P. sanguineus* MHS3 (P) *Schizophyllum commune* BK1 (Q) *S. commune* BK2 (R) *S. commune* CB4 (S) *Trametes elegans* PJK1 และ (T) *Trametes* sp. BK3……. | 39 |
| 9 | ลักษณะดอกเห็ดของ *Ganoderma australe* (Berk.) NKP2 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์…….. | 40 |
| 10 | ลักษณะดอกเห็ดของ *G. australe* (Berk.) NKS4 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์……..... | 41 |
| 11 | ลักษณะดอกเห็ดของ *G. australe* (Berk.) PTN3 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์……..... | 42 |
| 12 | ลักษณะดอกเห็ดของ *G. dahlii* (Henn.) Aoshima. CB24 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะเส้นใย…….. | 43 |

รูปที่ หน้า

13 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. lobatum* (Schw.) Atk BK5. (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์..... 44
14 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. lobatum* (Schw.) Atk. RED6 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์..... 45
15 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. lucidum* (W. Curt. ex Fr.) Karst. NKP3 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์..... 46
16 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. lucidum* (W. Curt. ex Fr.) Karst. NRM9 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์..... 47
17 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. lucidum* (W. Curt. ex Fr.) Karst. RED2 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์..... 48
18 ลักษณะดอกเห็ดของ *Microporus xanthopus* (Fr.) Kuntz. CB2 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของเส้นใย..... 49
19 ลักษณะดอกเห็ดของ *Phellinus pachyphloeus* (Quel.) PJK2 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์..... 50
20 ลักษณะดอกเห็ดของ *Polyporus tenuiculus* (Beauv.) Fr. KB1 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์..... 51
21 ลักษณะดอกเห็ดของ *Pycnoporus coccineus* (Fr.) Bond. et. Sing. KB4 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์..... 52
22 ลักษณะดอกเห็ดของ *P. coccineus* (Fr.) Bond. et. Sing. PB1 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์..... 53
23 ลักษณะดอกเห็ดของ *P. sanguineus* (L. ex Fr.) Murr. MHS3 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์..... 54
24 ลักษณะดอกเห็ดของ *Schizophyllum commune* Fr. BK1 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของเส้นใย..... 55
25 ลักษณะดอกเห็ดของ *S. commune* Fr. BK2 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของเส้นใย..... 56
26 ลักษณะดอกเห็ดของ *S. commune* Fr. CB4 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของเส้นใย..... 57

| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 27 | ลักษณะดอกเห็ดของ *Trametes elegans* (Spreng. ex Fr.) Fr. PJK1 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์..... | 58 |
| 28 | ลักษณะดอกเห็ดของ *Trametes* sp. (Fr.) BK3 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของเส้นใย..... | 59 |
| 29 | การเติบโตและการผลิตแลคเคสของ (A) *P. coccineus* KB4 (B) *P. coccineus* PB1 และ (C) *P. sanguineus* MHS3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium เป็นเวลา 20 วัน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส..... | 65 |
| 30 | การเติบโตและการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ที่มี (A) กลูโคส (B) ฟรุกโตส และ (C) ซูโครส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 14 วัน เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส..... | 70 |
| 31 | การเติบโตและการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ที่มี (A) แอล-แอสพาราจีน (B) เปบโตน และ (C) แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน เป็นเวลา 14 วัน เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส..... | 71 |
| 32 | การเติบโตและการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ที่มี กลูโคสและเปบโตน เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เป็นเวลา 14 วัน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ (A) 28 องศาเซลเซียส (B) 30 องศาเซลเซียส (C) 40 องศาเซลเซียส และ (D) 50 องศาเซลเซียส..... | 72 |
| 33 | การเติบโตและการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ที่มี กลูโคสและเปบโตน เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เป็นเวลา 14 วัน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่าง ๆ (A) pH 3 (B) pH 4 (C) pH 5 และ (D) pH 6 (E) pH 7 (F) pH 8 และ (G) pH 9..... | 74 |

| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 34 | ผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของ (A) แลคเคส และ (B) แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส เมื่อทำการปรับความเป็นกรดด่างของ reaction mixture ด้วย buffer ต่าง ๆ ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์คำนวณโดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของ reaction mixture ที่บ่มใน 0.1 M glycine HCl buffer pH 3.5 ที่บ่มที่อุณหภูมิห้อง..... | 80 |
| 35 | ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของ (A) แลคเคส และ (B) แมงกานีส เพอร์-ออกซิเดส เมื่อทำการบ่ม reaction mixture ที่ความเป็นอุณหภูมิต่าง ๆ ค่าแอก-ติวิตีสัมพัทธ์คำนวณโดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของ reaction mixture ที่บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 องศาเซลเซียส) ..... | 81 |
| 36 | ผลของไอออนต่าง ๆ ที่ มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิ-เดส เมื่อเติมไอออนลงใน reaction mixture ที่ความเข้มข้น 10 mM และ 1 เปอร์เซ็นต์ (สำหรับ SDS) ก่อนทำการวัดแอกติวิตีตามปกติ ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์คำนวณโดยเปรียบเทียบกับการวัดแอกติวิตีปกติ โดยไม่มีการเติมไอออน..... | 82 |
| 37 | ผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อความเสถียรของ (A) แลคเคส และ (B) แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส เมื่อทำการบ่ม reaction mixture ที่ความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์คำนวณโดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของ reaction mixture ที่บ่มใน 0.1 M glycine HCl buffer pH 3.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส..... | 84 |
| 38 | ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของ (A) แลคเคส และ (B) แมงกานีส เพอร์-ออกซิเดส เมื่อทำการบ่ม reaction mixture ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์คำนวณโดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของ reaction mixture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส..... | 85 |
| 39 | ผลของการย่อยสลาย PAHs แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm ด้วยแลคเคส ที่ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และแลคเคสร่วมกับเมดิเอเตอร์ (1mM ABTS) เป็นเวลา (A) 2 ชั่วโมง และ (B) 24 ชั่วโมง ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส..... | 88 |
| 40 | กราฟมาตรฐานของโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)..... | 122 |

| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 41 | ตัวอย่างโครมาโตแกรมของการย่อยสลาย anthracene ความเข้มข้น 100 ppm โดยการใช้แลคเคสที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา (A) 2 ชั่วโมง และ (B) 24 ชั่วโมง โดย (1) แสดงชุดควบคุม และ (2) แสดงชุดการทดลอง..... | 128 |
| 42 | ตัวอย่างโครมาโตแกรมของการย่อยสลาย phenanthrene ความเข้มข้น 100 ppm โดยการใช้แลคเคสที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา (A) 2 ชั่วโมง และ (B) 24 ชั่วโมง โดย (1) แสดงชุดควบคุม และ (2) แสดงชุดการทดลอง..... | 129 |
| 43 | ตัวอย่างโครมาโตแกรมของการย่อยสลาย fluoranthene ความเข้มข้น 100 ppm โดยการใช้แลคเคสที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา (A) 2 ชั่วโมง และ (B) 24 ชั่วโมง โดย (1) แสดงชุดควบคุม และ (2) แสดงชุดการทดลอง..... | 130 |
| 44 | ตัวอย่างโครมาโตแกรมของการย่อยสลาย pyrene ความเข้มข้น 100 ppm โดยการใช้แลคเคสที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา (A) 2 ชั่วโมง และ (B) 24 ชั่วโมง โดย (1) แสดงชุดควบคุม และ (2) แสดงชุดการทดลอง..... | 131 |
| 45 | ตัวอย่างโครมาโตแกรมของการย่อยสลาย benzo(a)pyrene ความเข้มข้น 100 ppm โดยการใช้แลคเคสที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา (A) 2 ชั่วโมง และ (B) 24 ชั่วโมง โดย (1) แสดงชุดควบคุม และ (2) แสดงชุดการทดลอง..... | 132 |

# บทที่ 1

# บทนำ

พอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป จัดเรียงเป็นเส้นตรง เป็นมุม หรือเป็นกลุ่ม มีเฉพาะอะตอมของไฮโดรเจน และคาร์บอน ส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงและของเสียที่เป็นสารอินทรีย์ รวมทั้งเป็นของเสียที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการผลิตในอุตสาหกรรม ซึ่งสารเหล่านี้จะค่อย ๆ สะสมเพิ่มปริมาณขึ้นในธรรมชาติจนเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดย PAHs จัดเป็นสารก่อการกลายพันธุ์และเป็นสารก่อมะเร็งที่มีผลต่อ พืช สัตว์ รวมทั้งมนุษย์อีกด้วย (Juan et al., 2008) PAHs เหล่านี้จะปนเปื้อนในอากาศ แหล่งน้ำ อาหาร ดิน และดินตะกอน ซึ่งการปนเปื้อนของ PAHs ในประเทศไทยนั้นพบว่าในกรุงเทพมหานคร บริเวณเส้นทางการจราจรมีการปนเปื้อนสารในกลุ่ม PAHs อยู่ในช่วงความเข้มข้น 7.10–83.04 นาโนกรัมต่อตารางเมตร (Ruchirawat et al., 2005) ส่วนในแม่น้ำเจ้าพระยาพบว่ามีการปนเปื้อนของ PAHs ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 5 จนถึง 1,500 นาโนกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบการปนเปื้อนของ PAHs ในประเทศไทยกับทั่วโลกแล้วถือว่าอยู่ในระดับปานกลาง (Wattayakorn, 2003) อย่างไรก็ดีควรได้มีการกำจัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนออกไปเพื่อลดการสะสมหรือชะลอไม่ให้มีปริมาณสูงขึ้นไปกว่านี้ ทั้งนี้การกำจัดสาร PAHs สามารถกำจัดได้โดยใช้วิธีทางเคมี เช่น การทำปฏิกิริยากับสารอื่นให้เปลี่ยนแปลงเป็นสารใหม่ที่มีพิษน้อยลง หรือใช้ วิธีทางกายภาพ เช่น การกรอง การเจือจาง การทำให้แห้ง เป็นต้น แต่ทั้งสองวิธีนี้มีราคาสูงเนื่องจากต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ซับซ้อน และยังมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Canet et al., 1999) ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) ซึ่งวิธีนี้จะเป็นการใช้สิ่งมีชีวิต เช่น พืช แบคทีเรีย สาหร่าย และราในการกำจัด PAHs โดยสำหรับพืชนั้นจะนำสาร PAHs เข้าไปและเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ (Kipopoulou et al.,1999) แต่จะมีข้อเสียคือ พืชต้องใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตทำให้เห็นผลได้ช้า รวมทั้งพืชจะสามารถย่อยสลายได้เฉพาะ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ๆ และที่ความเข้มข้นน้อย ๆ เท่านั้น (Widdowson et al., 2005) ส่วนแบคทีเรียและสาหร่ายบางชนิดนั้นสามารถผลิตเอนไซม์ไดออกซีจีเนส (dioxygenase) เพื่อย่อยสลาย PAHs ได้ แต่จะไม่สามารถทนต่อ PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูง ๆ นอกจากนี้เอนไซม์ที่สาหร่ายและแบคทีเรียสร้างมักมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อชนิดของ PAHs ทำให้สามารถย่อยสลาย PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงและโครงสร้างซับซ้อนได้น้อย ราเป็นอีกกลุ่มสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs เนื่องจากราหลายชนิดสามารถผลิตลิกนิ-

โนไลติกเอนไซม์ (liginolytic enzyme) ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ โดยเฉพาะในกลุ่มราฟอกขาว (white-rot fungi) นอกจากนี้รายังสามารถทนและเจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน PAHs ได้ดีและสามารถสร้างเส้นใยแทรกเข้าไปในดินและสัมผัสกับสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Field et al., 1992) ยิ่งไปกว่านั้นเอนไซม์ที่ราสร้างเป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์ และยังสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ไม่ละลาย น้ำได้ด้วย (Han et al., 2004) รากลุ่มฟอกขาวนั้นส่วนใหญ่อยู่ในคลาส Basidiomycetes ซึ่งสามารถผลิตลิกนิโนไลติกเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายทางชีวภาพ (Cerniglia., 1997) ลิกนิโนไลติกเอนไซม์นั้นเป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์ที่อยู่ในกลุ่มของออกซิโดรีดักเทส (extracellular oxido-reductase) ซึ่งประกอบไปด้วยเอนไซม์แลคเคส (laccase) และเอนไซม์ เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) ได้แก่ ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) และแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) (Mechichi et al., 2006)

ในปัจจุบันมีการศึกษาราในกลุ่มราฟอกขาวเพื่อใช้ในการย่อยสลายทางชีวภาพของ PAHs เนื่องจากรากลุ่มนี้มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs หลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพไม่ว่าจะเป็น phenanthrene anthracene benzo(a)pyrene fluoranthene และ pyrene โดยเฉพาะอย่างยิ่งราที่สามารถผลิตแลคเคสได้ เช่น *Trametes versicolor* (Han et al., 2004) *Ganoderma lucidum* และ *Coriolus hirsutus* (Cho et al., 2002) เป็นต้น สำหรับในประเทศไทยมีการรายงานถึงราที่สามารถผลิตลิกนิโนไลติกเอนไซม์ได้และนำมาใช้ในการย่อยสลาย PAHs ไว้เพียงไม่กี่ชนิด เช่น *Trametes* sp. *Polyporus* sp. *Nigroporus* sp. (Premjit et al., 2009) และ *Ganoderma lucidum* (Punnapayak et al., 2009) เป็นต้น ประเทศไทยนั้นอยู่ในเขตร้อนชื้น และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง เห็ดราก็เป็นสิ่งมีชีวิตอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความหลากหลายมาก ดังนั้นจึงน่าที่จะยังมีเห็ดราอีกหลายชนิดในประเทศไทยที่ยังไม่มีการศึกษาทางอนุกรมวิธาน รวมทั้งการนำเห็ดราเหล่านั้นมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลาย PAHs ด้วย งานวิทยานิพนธ์นี้จึงมุ่งทำการคัดแยกและจำแนกเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย ศึกษาถึงความ สามารถในการผลิตลิกนิโนไลติกเอนไซม์ หาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตแลคเคสและนำเอน- ไซม์ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายสารกลุ่ม PAHs ต่อไป

**วัตถุประสงค์ของงานวิจัย**

เพื่อศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนโดยราฟอกขาวสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย

**ขอบเขตของงานวิจัย**

1. การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดเห็ดราในรากลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย
2. การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนินโนไลติกเอนไซม์
3. การศึกษาการเติบโตของรา
4. การศึกษาการเติบโตของราบนอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติม PAHs
5. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส
6. การเตรียมแลคเคสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ
7. การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

ได้เห็ดรากลุ่มราฟอกขาวที่สร้างลิกนินโนไลติกเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายสารพอลิไซคลิกแอ-โรแมติกไฮโดรคาร์บอนได้

# บทที่ 2

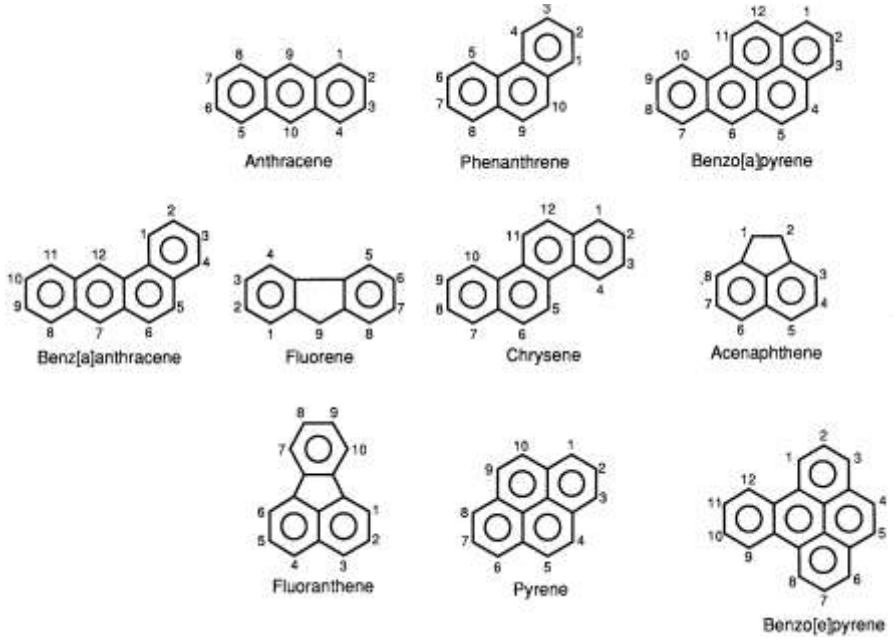
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 **พอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน** (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)

พอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบที่ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป มีเฉพาะอะตอมของไฮโดรเจนและคาร์บอน มีการ จัดเรียงตัวของวงแหวนเบนซีนที่เป็นองค์ประกอบได้หลายรูปแบบคือ เป็นเส้นตรง (linear) เป็นมุม (angular) หรือเป็นกลุ่ม (cluster) PAHs นั้นเป็นสารประกอบไม่ชอบน้ำ หรือไฮโดรโฟบิค (hydrophobic) จึงมีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ มักละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ทำให้ PAHs สลายตัวได้ช้าในธรรมชาติ โดยทั่วไปแล้วสามารถแบ่ง PAHs ได้เป็น 2 กลุ่มคือ

2.1.1 กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จะประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 2-3 วง เป็นสารที่สามารถระเหย ละลาย และถูกย่อยสลายได้ง่าย เช่น acenaphthene fluorene anthracene และ phenanthrene เป็นต้น (รูปที่1 และตารางที่1)

2.1.2 กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จะประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป เป็นสารที่ละลายและถูกย่อยสลายได้ยาก เช่น fluoranthene pyrene chrysene benzo(a)anthracene และ benzo(a)pyrene เป็นต้น (Cerniglia, 1997) (รูปที่1 และตารางที่1)




รูปที่ 1 ไดอะแกรมแสดงโครงสร้างของสารประกอบ PAHs บางชนิด ตัวเลขในไดอะแกรมแสดงตำแหน่งของคาร์บอนในโมเลกุล (ที่มา: Cerniglia, 1997)

ตารางที่ 1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของสารประกอบ PAHs บางชนิด (Bojes and Pope, 2007)

| ชนิดของ PAHs | จำนวนวงแหวนเบนซีน | น้ำหนักโมเลกุล | การละลายในน้ำ (มก./ลิตร) | ความดันไอ (มม.ปรอท) |
|---|---|---|---|---|
| Naphthalene | 2 | 128.17 | 31 | $8.89x10^{-2}$ |
| Acenapthylene | 3 | 154.2 | 16.1 | $2.90x10^{-3}$ |
| Acenaphthene | 3 | 154.21 | 3.8 | $3.75x10^{-3}$ |
| Fluorene | 3 | 166.22 | 1.9 | $3.24x10^{-3}$ |
| Anthracene | 3 | 178.23 | 0.045 | $2.55x10^{-5}$ |
| Phenanthrene | 3 | 178.23 | 1.1 | $6.80x10^{-4}$ |
| Fluoranthene | 4 | 202.26 | 0.26 | $8.13x10^{-6}$ |
| Pyrene | 4 | 202.26 | 0.132 | $4.25x10^{-6}$ |
| Chrysene | 4 | 228.29 | 0.0015 | $7.80x10^{-9}$ |
| Benzo(a)anthracene | 4 | 228.29 | 0.011 | $1.54x10^{-7}$ |
| Benzo(b)fluoranthene | 5 | 252.32 | 0.0015 | $8.06x10^{-8}$ |
| Benzo(k)fluoranthene | 5 | 252.32 | 0.0008 | $9.59x10^{-11}$ |
| Benzo(a)pyrene | 5 | 252.32 | 0.0038 | $4.89x10^{-9}$ |
| Benzo(g,h,i)perylene | 6 | 276.34 | 0.0003 | $1.00x10^{-10}$ |
| Indeno(1,2,3-cd)pyrene | 6 | 276.34 | 0.062 | $1.40x10^{-110}$ |
| Dibenzo(a,h)anthracene | 6 | 278.35 | 0.0005 | $2.10x10^{-11}$ |

จากตารางที่ 1 และรูปที่ 1 จะเห็นว่า ความสามารถในการละลายน้ำจะขึ้นอยู่กับมวลโมเลกุล และการจัดเรียงวงแหวนเบนซีนในโครงสร้างของ PAHs โดย PAHs ที่มีวงเบนซีนต่อกันเป็นเส้นตรงจะสามารถถูกย่อยสลายได้มากกว่าโครงสร้างวงเบนซีนที่ต่อกันเป็นมุม และ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงจะละลายน้ำได้น้อยกว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำทำให้การย่อยสลายในธรรมชาติเกิดขึ้นได้ยาก (Bojes and Pope, 2007)

**2.2 แหล่งกำเนิดของ PAHs**

PAHs นั้นเกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงและของเสียจำพวกสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการผลิตในอุตสาหกรรม หรือเกิดจากปรากฏการณ์ตามธรรมชาติ โดยทั่วไปสามารถแบ่งแหล่งกำเนิดของ PAHs ได้เป็น 2 ประเภทคือ

2.2.1 Pyrogenic Source เป็นแหล่งของ PAHs ที่เกิดขึ้นจากการกระทำของมนุษย์เป็นหลัก เช่น การเผาไหม้ที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการผลิตในอุตสาหกรรม การรั่วไหลของน้ำมันปิโตรเลียมที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการขนส่ง การเผาสิ่งปฏิกูล การปิ้ง ย่าง รมควันอาหาร รวมทั้งควันไอเสียรถยนต์และควันบุหรี่ เป็นต้น (Saha et al., 2009)

2.2.2 Petrogenic Source เป็นแหล่งของ PAHs ที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ เช่น การระเบิดของภูเขาไฟ และไฟไหม้ป่า เป็นต้น (Saha et al., 2009)

ส่วนใหญ่แล้ว PAHs นั้นเกิดขึ้นจากการกระทำของมนุษย์เป็นหลัก ทำให้เกิดการแพร่กระจายของ PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อม และด้วยคุณสมบัติของ PAHs นั้นละลายน้ำได้ยาก ทำให้เมื่อกระจายตัวเข้าสู่สิ่งแวดล้อมแล้ว มักถูกดูดซับโดยดิน หรือรวมตัวกับอนุภาคของฝุ่นละอองที่ฟุ้งกระจายอยู่ในอากาศแล้วตกลงมารวมตัวกับดิน และเมื่อไหลลงสู่แหล่งน้ำ จึงเกิดเป็นตะกอนสะสมอยู่ตามก้นของแหล่งน้ำหรือแม่น้ำ (Ferrarese et al., 2008) สารเหล่านี้จะค่อย ๆ สะสมเพิ่มปริมาณขึ้นในธรรมชาติจนเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

**2.3 ความเป็นพิษของสารประกอบ PAHs**

โดยทั่วไป PAHs เป็นสารที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่ำ ซึ่งแนวโน้มของความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันนั้นมักจะพบในสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ คือ เกิดการระคายเคืองการอักเสบของผิวหนังอย่างเฉียบพลัน เช่น anthracene จะทำให้เกิดอาการแสบร้อนและคัน pyrene จะทำให้เกิดอาการอักเสบ บวมแดง บริเวณที่สัมผัส เป็นต้น (Hinga, 2003) สำหรับความเป็นพิษเรื้อรังมักจะพบใน PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง (Ashok et al., 1995) ได้แก่ การเกิดการกลายพันธุ์ (Mutagenesis) การก่อให้เกิดมะเร็ง (Carcinogenesis) และการก่อให้เกิดความผิดปกติของทารกในครรภ์ (Tetatogenesis) เป็นต้น

ดังนั้น U.S. Environmental Protection Agency ของประเทศสหรัฐอเมริกา จึงได้ประกาศให้สารประกอบ PAHs 16 ชนิด (ตารางที่ 1) เป็นสารพิษที่ได้รับการเฝ้าระวังมากกว่าสารอื่นและต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างถูกวิธีและเร่งด่วน นอกจากนี้ International Agency for Research on Cancer (IARC) ยังได้ทำการจัดกลุ่ม PAHs ตามผลของการก่อมะเร็งในมนุษย์และสัตว์ทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มของ PAHs ที่น่าจะก่อมะเร็งในมนุษย์ กลุ่มของ PAHs ที่อาจก่อมะเร็งในมนุษย์ และกลุ่มของ PAHs ที่ไม่ก่อมะเร็งในมนุษย์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การจัดกลุ่มของ PAHs โดย International Agency for Research on Cancer ตามผลของการก่อมะเร็งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง (IARC, 1999)

| | | |
|---|---|---|
| กลุ่ม 2A | กลุ่มของ PAHs ที่น่าจะก่อมะเร็งในมนุษย์ (propable carcinogenic to humans) มีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ | |
| | Benzo(a)anthracene | |
| | Benzo(a)pyrene | |
| | Dibenzo(a,h)anthracene | |
| กลุ่ม 2B | กลุ่มของ PAHs ที่อาจก่อมะเร็งในมนุษย์ (possible carcinogenic to humans) มีทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ | |
| | Benzo(b)fluoranthene | Benzo(j)fluoranthene |
| | Benzo(k)fluoranthene | Dibenzo(a,e)pyrene |
| | Dibenzo(a,h)acridine | Dibenzo(a,h)pyrene |
| | Dibenzo(a,j)acridine | Dibenzo(a,j)pyrene |
| | Dibenzo(a,l)pyrene | Indeno(1,2,3-cd)pyrene |
| | Naphthalene | |
| กลุ่ม 3 | กลุ่มของ PAHs ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (unclassifiable as carcinogenic to humans) มีทั้งหมด 23 ชนิด ได้แก่ | |
| | Anthracene | Benzo(a)fluorene |
| | Benzo(a)acridine | Benzo(c)acridine |
| | Benzo(c)fluorene | Benzo(b)fluorene |
| | Benzo(e)pyrene | Benzo(g,h,i)perylene |
| | Benzo(c)phenanthrene | Benzo(g,h,i)fluoranthene |
| | Coronene | Chrysene |
| | Dibenzo(a,h)acridine | Dibenzo(a,c)anthracene |
| | Cyclopenteno(c,d)pyrene | Dibenzo(a,e)fluoranthene |
| | Dibenzo(a)anthracene | Fluorene |
| | Fluoranthene | Phenanthrene |
| | Perylene | Triphenylene |
| | Pyrene | |

**2.4 การได้รับ PAHs เข้าสู่ร่างกายมนุษย์**

2.4.1 การบริโภค

ในปัจจุบันการปนเปื้อน PAHs พบได้ในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะ อาหารประเภทเนื้อสัตว์ จำพวกเนื้อ หมูและไก่ ซึ่งพบอยู่ในช่วง 0.1-1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แต่เมื่อนำมาผ่านการปิ้ง ย่าง หรือรมควัน พบว่ามีปริมาณ PAHs เพิ่มขึ้นเป็น 100-500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็น benzo(a)pyrene มากถึง 157 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เนื้อสัตว์ที่พบ PAHs ในปริมาณรองลงมาคือสัตว์ทะเลเนื่องมาจากการปนเปื้อนของ PAHs ในแหล่งน้ำที่สัตว์พวกนี้อาศัยอยู่ โ ดยมีปริมาณ PAHs ประมาณ 0.04-1.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อนำมาผ่านการปิ้ง ย่าง หรือรมควัน พบว่ามีปริมาณ PAHs เพิ่มขึ้นเป็น 1-100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จะเห็นได้ว่ากรรมวิธีประกอบอาหารด้วยการปิ้ง ย่าง และรมควันจะเป็นการเพิ่มปริมาณ PAHs ได้ถึงประมาณ 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นกรรมวิธีประกอบอาหารจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มปริมาณ PAHs นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าปริมาณของ benzo(a)pyrene ที่มนุษย์บริโภคเข้าไปนั้นอยู่ช่วง 0.05-0.29 ไมโครกรัมต่อวัน โดยพบสูงสุดที่ประเทศเน เธอร์แลนด์คือ 0.42 ไมโครกรัมต่อวัน ทั้งนี้หากร่างกายยังได้รับสาร benzo(a)pyrene ต่อไปเรื่อย ๆ ก็อาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ (Vos et al., 1990)

2.4.2 การสูดดม หายใจ

มนุษย์สามารถได้รับ PAHs จากการสูดดม หายใจรับ PAHs ที่แพร่กระจายมาจากไอเสียรถยนต์ แก๊สจากโรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งควันบุหรี่ มีการศึกษาพบว่าผู้ที่สูบบุหรี่มากถึง 15-25 มวนต่อวันเป็นเวลานานกว่า 10 ปี ป่วยเป็นมะเร็งปอดมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในบุหรี่นั้นมีปริมาณของ benzo(a)pyrene สูงถึง 20-70 นาโนกรัมต่อบุหรี่ 1 มวน สารกลุ่มนี้สามารถรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายของเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย เมื่อเอนไซม์ทำงานไม่ได้ก็นำไปสู่การกลายของเซลล์ต่าง ๆ และกลายเป็นมะเร็งได้ในที่สุด (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

2.4.3 การสัมผัสทางผิวหนัง

PAHs สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายมนุษย์จากการสัมผัสกับสารเคมีได้ เช่น การ ใช้ลูกเหม็น (naphthalene) หรือการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีอนุพันธ์ของ PAHs เป็นองค์ประกอบ (IARC, 1983)

**2.5 การสะสมของ PAHs ในธรรมชาติ**

ปริมาณการสะสมของ PAHs ในธรรมชาตินั้นมีตัวแปรที่สำคัญคือ ค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของสารประกอบ PAHs แต่ละชนิด โดยจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างของ PAHs นั้นและยังรวมถึงปริมาณที่สารนั้นปนเปื้อนด้วย เช่น naphthalene ที่มีโครงสร้างเป็นวงเบนซีน 2 วง จะมีค่าครึ่ง-ชีวิตอยู่ที่ประมาณ 2-3 วัน แต่ถ้าเป็น benzo(a)pyrene ที่มีโครงสร้างเป็นวงเบนซีน 5 วง จะมีค่าครึ่งชีวิตนานถึง 30-300 วัน (Turki, 2009) เป็นต้น ทำให้เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณ PAHs ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมมักจะพบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงในปริมาณมากกว่า PAHs ที่มีมวล-โมเลกุลต่ำ

มีรายงานว่าการปนเปื้อนของ PAHs ในประเทศไทยนั้นส่วนใหญ่เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันเชื้อเพลิง ทำให้ PAHs ฟุ้งกระจายอยู่ในอากาศและไปรวมตัวกับอนุภาคของฝุ่นละออง ในช่วงปี ค.ศ. 1999-2004 พบการสะสมของ PAHs ในอากาศถึง 1.97-13.5 นาโนกรัมต่อตารางเมตร PAHs เหล่านี้เกิดจากควันไอเสียรถยนต์ในบริเวณที่มีการจราจรหนาแน่น ซึ่งสาเหตุนี้จัดเป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อน PAHs ในอากาศทั้งในประเทศไทยและในทวีปเอเชีย (Chang et al., 2006) (ตารางที่ 3) สำหรับการปนเปื้อน PAHs ในแหล่งน้ำพบว่าที่นิคมอุตสาหกรรมมาบ-ตาพุดตรวจพบ benzo(a)anthracene benzo(a)pyrene benzo(b)fluranthene benzo(g,h,i) perylene dibenzo(a,h)antracene และ indeno(1,2,3-c,d)pyrene ในน้ำทะเล บริเวณริมชายฝั่งในปริมาณ 0.04 0.04 0.05 0.02 0.01 และ 0.03 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

จากที่กล่าวไปแล้วข้างต้นจะเห็นว่า ประเทศไทยมีการปนเปื้อน PAHs หลายชนิด แต่อย่างไรก็ดีประเทศไทยยังไม่มีการกำหนดมาตรฐานของปริมาณ PAHs เมื่อทำการเปรียบเทียบการปนเปื้อนของ PAHs ในประเทศไทยกับทั่วโลกแล้วถือว่าอยู่ในระดับปานกลาง (Wattayakorn, 2003) แต่สารประกอบกลุ่มนี้ยังมีการสะสมเพิ่มปริมาณสูงขึ้นในสิ่งแวดล้อมอยู่ตลอดเวลา อีกทั้งยังมีการสะสมเพิ่มขึ้นในสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในห่วงโซ่อาหารอีกด้วย ดังนั้นจึงควรมีการกำจัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนออกไปเพื่อลดการสะสมหรือชะลอไม่ให้มีปริมาณสูงขึ้นไปกว่านี้

ตารางที่ 3 การปนเปื้อนของ PAHs ในอากาศของทวีปเอเชียระหว่างปี ค.ศ. 1999-2004 (Chang et al., 2006)

| ประเทศ | แหล่งกำเนิดหลัก | ชนิด PAHs ที่พบมาก | ปริมาณ PAHs (นาโนกรัมต่อตารางเมตร) |
|---|---|---|---|
| ไทย | การประกอบอาหาร การเผาไหม้ของเชื้อเพลิง และควันไอเสียรถยนต์ | benzo(g,h,i)perylene และ coronene | 1.97-13.5 |
| มาเลเซีย | ควันไอเสียรถยนต์ | ไม่มีข้อมูล | 10.4 |
| จีน | การประกอบอาหาร | PAHs ที่มีวงแหวนเบนซีน 2-3 วง | 17 |
| | ควันไอเสียรถยนต์ และอุตสาหกรรม | benzo(b)fluoranthene pyrene fluoranthene chrysene และ indenol(1,2,3-cd)pyrene | 3-330 |
| เกาหลี | การเผาไหม้ของเชื้อเพลิง ควันไอเสียรถยนต์ | phenanthrene fluorene และ acenapthrene | 11-350 |
| ญี่ปุ่น | ควันไอเสียรถยนต์ | pyrene และ fluoranthene | 3.7-154 |
| ไต้หวัน | อุตสาหกรรมและการขนส่ง | PAHs ที่มีวงแหวนเบนซีน 2-3 วง | 7.8-1530 |

## 2.6 วิธีการกำจัด PAHs ในสิ่งแวดล้อม

2.6.1 การกำจัดโดยกระบวนการทางกายภาพ (Physical treatments)

2.6.1.1 การกำจัดโดยการใช้ความร้อนสูง

การกำจัด PAHs โดยการเผาที่อุณหภูมิสูงกว่า 1,000 องศาเซลเซียส จะทำให้สารพิษเสียสภาพและสลายไป แต่วิ ธีการนี้จะทำให้เกิดขี้เถ้าและแก๊สพิษออกมาด้วยและจะทำให้ดินที่สารนี้ปนเปื้อนอยู่เสียสภาพไปด้วย

2.6.1.2 การกำจัดโดยการใช้คลื่นไมโครเวฟ

วิธีนี้มักใช้บำบัดดินที่มีการปนเปื้อน PAHs แต่จะทำให้ดินเสียสภาพเนื่องจากคลื่นไมโครเวฟจะไปทำลายจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน

2.6.1.3 การกำจัดโดยการทำให้เป็นไอ

วิธีนี้จะเปลี่ยนรูป PAHs ที่ปนเปื้อนให้กลายเป็นไอแล้วระเหยออกไปจากบริเวณที่ปนเปื้อน หลังจากนั้นนำไอระเหยที่ได้ไปบำบัดต่อไป ซึ่งสามารถกำจัดสารพิษได้หลายชนิด แต่มีข้อเสียคือ ต้องใช้อุณหภูมิสูง และเป็นกระบวนการกำจัดที่ใช้เวลามากกว่า 2 วิธีที่กล่าวข้างต้น

การกำจัดโดยกระบวนการทางกายภาพเป็นกระบวนการที่มีข้อดีคือ ใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายน้อยและเห็นผลได้อย่างรวดเร็ว แต่ก็มีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ใน การกำจัด และยัง อาจเกิดผลข้างเคียงกับสิ่งแวดล้อม เช่น ทำลายจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน ทำลายสมบัติที่ดีของดิน และทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ (Henner et al., 1997) เป็นต้น

2.6.2 การกำจัดโดยกระบวนการทางเคมี (Chemical treatments)

การกำจัด PAHs โดยการใช้สารเคมีจะต้องพิจารณาถึงโครงสร้างและสมบัติของ PAHs ที่ปนเปื้อน โดยทั่วไปวิธีการกำจัดทางเคมีแบ่งได้เป็น 2 แบบคือ

2.6.2.1 การสกัด ( Extraction)

วิธีนี้เป็นการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยทำการสกัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินให้ออกมาอยู่ในตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่นิยมใช้ได้แก่ เอทานอล อะซีโตน 2-โพรพานอล เพนทานอล และเอทิลอะซิเตท แต่วิธีนี้จะมีข้อเสียคือ จะต้องมากำจัด PAHs ที่อยู่ในตัวทำละลายอีกครั้ง ซึ่งเป็นการเสียเวลาและค่าใช้จ่ายมากขึ้น

2.6.2.2 การออกซิเดชัน (Oxidation)

เป็นวิธีที่ใช้สารเคมีมาทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสาร PAHs ที่ปนเปื้อน มักใช้กับดินที่ปนเปื้อนโดยสารเคมีที่นิยมใช้ได้แก่

2.6.2.2.1 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) เป็นสารที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการกำจัดสาร PAHs ที่ตกค้าง โดยปกติแล้วจะใช้ที่ความเข้มข้นประมาณ 3-35 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นั้นจะเปลี่ยนไปเป็นไฮดรอกซิล แรดิคอล (hydroxyl radical, $^{\bullet}OH$) ซึ่งจะเป็นสารที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์ได้ทั้งสารประกอบพวกอัลเคนและแอโร-แมติก แต่การใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถกำจัดสารประกอบแอโร-แมติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงได้มีการเติมเฟอร์รัสไอรอน (II) เพื่อเร่งการเกิดออกซิเดชันของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ให้ดียิ่งขึ้น โดยเรียกสารละลายผสมนี้ว่า Fenton’s reagent ได้มีการศึกษาการใช้ Fenton’s reagent ในการย่อยสลาย PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน พบว่าเป็นวิธีที่มี

ประสิทธิภาพอย่างมาก โดยสามารถย่อยสลาย PAHs ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Ferrarese et al., 2008)

2.6.2.2.2 โอโซนออกซิเดชัน (Ozone oxidation) เป็นวิธีการออกซิเดชันที่ให้ผลเร็วและมีประสิทธิภาพสูงในอุตสาหกรรมเคมีและเครื่องดื่ม ทำให้มีการศึกษาการประยุกต์วิธีนี้ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน โดยพบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดี เพราะจะเปลี่ยน PAHs ให้เป็นสารอินเตอร์มีเดียท (Intermediate) ที่สามารถละลายได้ในน้ำ แต่การใช้โอโซนออกซิเดชันเพียงอย่างเดียวไม่สามารถกำจัด PAHs ได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากจำเป็นต้องมีการใช้จุลินทรีย์ร่วมด้วย (Mark et al., 2005)

การกำจัด PAHs โดยกระบวนการทางเคมีนั้นเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างมากเนื่องจากเป็นกระบวนการที่เห็นผลเร็ว และมีประสิทธิภาพในการกำจัดสูงไม่ว่าจะเป็น PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำหรือ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง แต่วิธีนี้ เป็นการใช้สารเคมีเป็นหลัก ดังนั้นย่อมเกิดการตกค้างของสารเคมีที่ใช้กำจัดหลงเหลืออยู่ในธรรมชาติ จึงเป็นวิธีที่มีผลต่อสิ่งแวดล้อม และยัง ต้องมีการกำจัดสารเคมีที่ตกค้างนั้นอีกต่อหนึ่ง ค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการกำจัดจึงมากตามไปด้วย

2.6.3 การย่อยสลายทางชีวภาพ (Bioremediation)

เป็นการบำบัดของเสียและฟื้นฟูสภาพแวดล้อมโดยวิธีชีวภาพโดยการปรับเปลี่ยนสารประกอบอันตรายให้เป็นสารประกอบที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดหรือไม่มีเลย สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการบำบัด

2.6.3.1 การใช้พืชในการบำบัดสารพิษ (Phytoremediation)

เป็นวิธีที่ใช้พืชมาบำบัดสารพิษที่มีการปนเปื้อนและตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถประยุกต์ในการบำบัดสารพิษทั้งในรูปสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่อยู่ในตัวกลาง ดิน น้ำ หรืออากาศ เช่น ไตรไนโตรโทลูอีน (2,4,6-trinitrotoluene) โทลูอีน (toluene) ไตรคลอโรเอทิลีน (trichloroethylene) เอทิลเบนซีน (ethylbenzene) ไซลีน (xylene) โลหะหนัก (heavy metals) นิวไคลด์กัมมันตรังสี (radionuclides) รวมทั้งสารประกอบ PAHs พืชจะลดการปนเปื้อนของสารพิษเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อมโดยการเก็บสะสม ตรึง หรือเปลี่ยนรูป จากการศึกษาพบว่ามีพืชหลายชนิดที่สามารถใช้ในการบำบัดสารพิษได้ เช่น *Betula pendula Festuca arundinacea Panicum viratum Morus rubra* และ *Populus* sp. เป็นต้น (Cutcheon and Schnoor, 2003) ซึ่งกระบวนการที่พืชใช้ในการบำบัดนี้สามารถแบ่งได้เป็น 5 กระบวนการหลักดังนี้ (อลิสา วังใน, 2553)

2.6.3.1.1 Phytoaccumulation (phytoextraction) เป็นกระบวนการที่พืชดูดซึมสารพิษเข้าไปเก็บสะสมอยู่ที่ลำต้น ใบ และยอด

2.6.3.1.2 Phytodegradation (phytotransformation) เป็นกระบวนการที่พืชดูดซึมสารพิษเข้าไปจากนั้นมีการเปลี่ยนรูปสารและ/หรือมีการย่อยสลายสารพิษนั้นให้มีความเป็นพิษน้อยลง

2.6.3.1.3 Phytovolatilization เป็นกระบวนการที่พืชสามารถเปลี่ยนสารพิษบางชนิดให้เป็นก๊าซและระเหยออกไป

2.6.3.1.4 Phytostabilization เป็นกระบวนการที่พืชเปลี่ยนสารพิษให้อยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษต่ำ และ/หรือละลายน้ำได้น้อยลง ซึ่งเป็นการลดการกระจายตัวของสารพิษเหล่านี้ในธรรมชาติ

2.6.3.1.5 Plant-assisted bioremediation เป็นการย่อยสลายสารพิษร่วมกันระหว่างพืชและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ที่รากพืชเพื่อให้สารพิษนั้นมีความเป็นพิษน้อยลง

การใช้พืชในการบำบัดสารพิษจำพวก PAHs นั้น พืชจะทำการดูดซึม PAHs ผ่านทางผนังเซลล์ของรากซึ่งอาจจะมีการย่อยสลาย PAHs ไปแล้วส่วนหนึ่งโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยร่วมกับรากพืช จากนั้น PAHs ก็จะถูกลำเลียงขึ้นไปทางไซเลม (Xylem) ของพืชจนถึงใบแล้วเกิดการระเหยออกสู่อากาศ ในหลายงานวิจัยได้มีการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในดินโดยใช้พืชและพบว่า อัตราการย่อยสลาย PAHs ของพืชนั้นจะแปรผกผันกับมวลโมเลกุลของ PAHs โดยพืชจะมีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำได้มากกว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง (Widdowson et al., 2005)

จะเห็นได้ว่าการใช้พืชในการบำบัดสารพิษเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายในกระบวนการการบำบัดค่อนข้างน้อย สามารถทำได้ง่าย รวมทั้งไม่เกิดสารพิษตกค้างในธรรมชาติเหมือนการใช้สารเคมีในการกำจัด แต่ก็ยังมีข้อเสียในเรื่องของ ระยะเวลาในการบำบัดที่ต้องใช้เวลานาน เพราะต้องใช้เวลาให้พืชเติบโตทั้งยังไม่สามารถควบคุมอัตราการบำบัดสารพิษให้แน่นอนได้ เนื่องจากพืชจะมีช่วงเวลาในการเจริญเติบโตในแต่ละฤดูกาลไม่เท่ากัน และถ้าสารพิษมีปริมาณมากเกินไปจะทำให้พืชเจริญเติบโตช้าหรือตายได้ รวมทั้งพืชที่นำมาใช้ในการบำบัดสารพิษนั้นจะมีการสะสมของสารพิษตกค้างอยู่ภายในต้นซึ่งเป็นอันตรายต่อสัตว์ต่าง ๆ ในห่วงโซ่อาหารอีกด้วย (อลิสา วังใน, 2553)

2.6.3.2 การย่อยสลายโดยการใช้แบคทีเรีย

ในวิธีนี้แบคทีเรียจะใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต ทำให้สาร PAHs ถูกกำจัดอย่างถาวร ซึ่ง PAHs บางชนิดนั้นสามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) จนได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ รวม ทั้งพลังงานในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วย มี รายงานว่า แบคทีเรียมากกว่า 60 สกุล สามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลากหลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แบคทีเรียบางชนิดที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ (Loick et al., 2009)

| สารประกอบ PAHs | ชนิดของแบคทีเรีย |
|---|---|
| Naphthalene | *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes denitrificans*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas vesicularis*, *Rhodococcus* sp., *Sphingomonas paucimobilis* และ *Streptomyces* sp. |
| Acenaphthylene | *Beijerinckia* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa* และ *Sphingomonas* sp. |
| Acenaphthene | *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes paradoxus*, *Beijerinckia* sp., *Cycloclasticus* sp., *Coriolopsis gallica*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa* และ *Sphingomonas* sp. |
| Fluorene | *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp., *Cycloclasticus* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia, Pseudomonas saccharophila*, *Rhodococcus* sp. และ *Staphylococcus auriculans* |
| Phenanthrene | *Aeromonas* sp., *Agmenellum quadruplicatum*, *Arthrobacter polychromogenes, Bacillus* sp. *Beijerinckia* sp., *Brevibacterium* sp. *Cycloclasticus* sp., *Flavobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Pseudomonas aeruginosa* |
| Fluoranthene | *Alcaligenes denitrificans*, *Cycloclasticus* sp., *Gordonia* sp., *Mycobacterium* sp., *Mycobacterium austroafricanum*, *Mycobacterium flavescens*, *Pasteurella* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp. และ *Sphingomonas paucimobilis* |
| Pyrene | *Coriolopsis gallica*, *Cycloclasticus* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas citronellolis* และ *Rhodococcus* sp. |

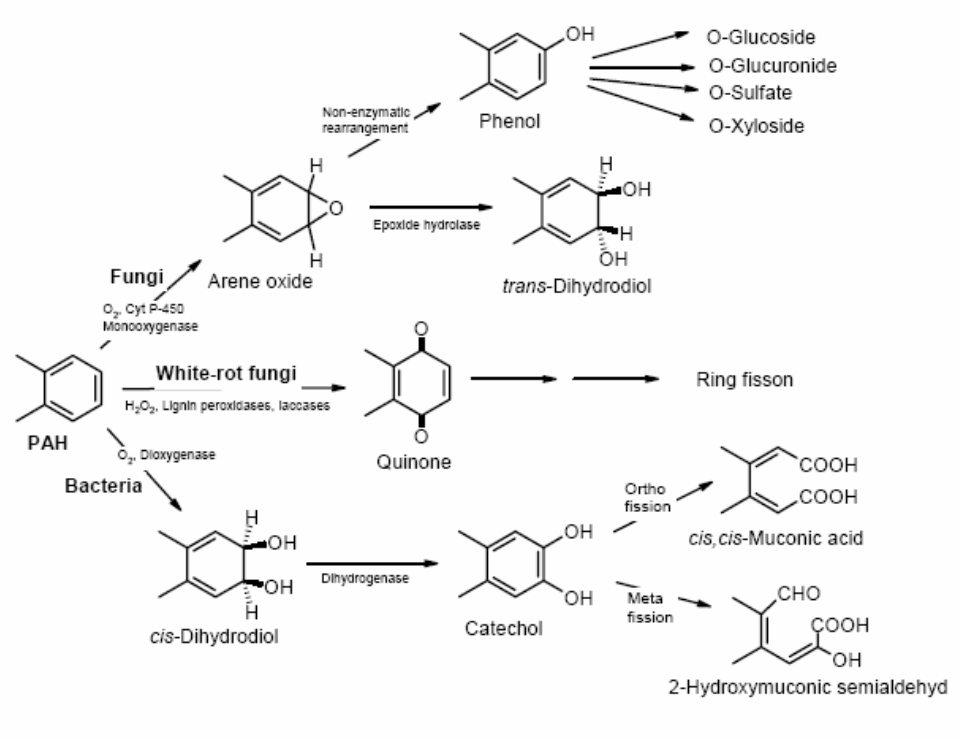
ตารางที่ 4 (ต่อ)

| สารประกอบ PAHs | ชนิดของแบคทีเรีย |
|---|---|
| Benz(a)anthracene | *Beijerinckia* sp. และ *Mycobacterium* sp. |
| Chrysene | *Gordonia* sp., *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus* sp. และ *Sphingomonas paucimobilis* |
| Benzo(b)fluoranthene | *Sphingomonas paucimobilis* |
| Benzo(a)pyrene | *Beijerinckia* sp., *Coriolopsis gallica*, *Mycobacterium* sp. *Mycobacterium austroafricanum, Pseudomonas* sp. *Pseudomonas cepacia, Selenastrum capricornutum* และ *Sphingomonas paucimobilis* |
| Dibenzo(a,h)anthracene | *Pseudomonas cepacia* และ *Sphingomonas paucimobilis* |

การย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียนั้นเกิดขึ้นได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ซึ่งกระบวนการการย่อยสลายในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนนั้นจะเกิดขึ้นได้ช้ามาก และกลไกการเกิดปฏิกิริยายังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Harayama et al., 1997) สำหรับการย่อยสลายในภาวะที่มีออกซิเจนนั้นได้รับการศึกษากันมาก กระบวนการนี้จะเริ่มโดยแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ไดออกซีจีเนส (dioxygenase) ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับโครงสร้างของ PAHs เกิดเป็น *cis*-dihydrodiol หลังจากนั้นจะมีการดึงน้ำออกกลายเป็น catechol ทำให้เกิดการแตกวงได้ 2 แบบ คือ แบบ *ortho* fission ได้เป็น *cis*,*cis*-muconic acid หรือแบบ *meta* fission ได้เป็น 2-hydroxymuconic-semialdehyde ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวิถีการย่อยทั้ง 2 แบบนี้จะเกิดถูกย่อยสลายต่อไปและเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ จนได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (รูปที่ 2) แบคทีเรียสามารถย่อยสลายคาร์บอนที่เป็นโครงสร้างหลักของ PAHs ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ได้ถึง 56-77 เปอร์เซ็นต์ และกลายเป็นชีวมวลที่ใช้ในการเติบโต 16-35 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ดีการใช้แบคทีเรียในการย่อยสลาย PAHs ก็ยังมีข้อจำกัดคือ แบคทีเรียไม่สามารถทน PAHs ที่มีความเป็นพิษสูง ได้ (Turki, 2009)

2.6.3.3 การย่อยสลายโดยการใช้รา

การย่อยสลาย PAHs โดยราเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่ราผลิตและส่งออกมาสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากราสามารถทนและเติบโตในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน PAHs ได้ดีและโครงสร้างของราที่เป็นเส้นใยทำให้สามารถแทรกเข้าไปในดินและสัมผัสกับสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินได้ดี จึงมีผู้สนใจศึกษาศักยภาพของราในการย่อยสลาย PAHs กันมาก (Cerniglia, 1997) (ตารางที่ 5)




รูปที่ 2 วิถีการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียและราบางชนิด (ที่มา: Cerniglia, 1997)

ตารางที่ 5 ราบางชนิดที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ (Cerniglia, 1997)

| สารประกอบ PAHs | ชนิดของรา |
|---|---|
| Acenaphthene | *Cunninghamella elegans* |
| Anthracene | *Bjerkandera* sp., *Cunninghamella elegans*, *Naematoloma frowardii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete laevis*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Ramaria* sp., *Rhizoctonia solani* และ *Trametes versicolor* |
| Phenanthrene | *Aspergillus niger*, *Cunninghamella elegans*, *Naematoloma frowardii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete laevis*, *Pleurotus ostreatus*, *Syncephalastrum racemosum* และ *Trametes versicolor* |
| Fluoranthene | *Cunninghamella elegans*, *Naematoloma frowardii*, *Laetiporus sulphureus*, *Penicillium* sp. และ *Pleurotus ostreatus* |
| Fluorene | *Cunninghamella elegans*, *Laetiporus sulphureus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* และ *Trametes versicolor* |
| Pyrene | *Aspergillus niger*, *Agrocybe aegerita*, *Candida parapsilopsis*, *Crinipellis maxima*, *Crinipellis perniciousa*, *Crinipellis stipitaria*, *Crinipellis zonata*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium oxysporum*, *Kuehneromyces mutablis*, *Marasmiellus ramealis*, *Marasmius rotula*, *Mucor* sp., *Naematoloma frowardii*, *Penicillium janczewskii*, *Penicillium janthinellum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Syncephalastrum racemosum* และ *Trichoderma harzianum* |
| Benz(a)anthracene | *Candida krusei*, *Cunninghamella elegans*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete laevis*, *Pleurotus ostreatus*, *Rhodotorula minuta*, *Syncephalastrum racemosum* และ *Trametes versicolor* |
| Chrysene | *Cunninghamella elegans*, *Penicillum janthinellum* และ *Syncephalastrum racemosum* |

ตารางที่ 5 (ต่อ)

| สารประกอบ PAHs | ชนิดของรา |
|---|---|
| Benzo(a)pyrene | *Aspergillus ochraceus*, *Bjerkandera adusta*, *Bjerkandera* sp. *Candida maltosa*, *Candida maltosa*, *Candida tropicalis*, *Chrysosporium pannorum*, *Cunninghamella elegans*, *Mortierella verrucosa*, *Naematoloma frowardii*, *Neurospora crassa*, *Penicillium janczewskii*, *Penicillium janthinellum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete laevis*, *Pleurotus ostreatus*, *Ramaria* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Syncephalastrum racemosum*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma* sp. และ *Trichoderma viride* |
| Benzo(e)pyrene | *Cunninghamella elegans* |

โดยทั่วไปสามารถแบ่งราที่ย่อยสลาย PAHs ได้เป็น 2 กลุ่มคือ

2.6.3.3.1 ราที่ไม่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ (Non-ligninolytic fungi)

ราในกลุ่มนี้จะผลิตเอนไซม์ที่เรียกว่า cytochrome P-450 monooxygenase ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs ให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ dihydrodiols phenols quinones และ dihydrodiol epoxides กลุ่มของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาอาจมารวมกันเกิดเป็นสารประกอบที่คล้ายกับสารในกลุ่มของ glucuronides xylosides glucosides และ sulfates และปฏิกิริยาโดยรวมก็สามารถลดความเป็นพิษของสารนี้ได้ ในขณะที่บางปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอาจเกิดเป็นพวก oxidation products ที่ยังคงมีความเป็นพิษอยู่ เช่น quinones หรือ dihydrodiol epoxides (Cerniglia, 1997) ราในกลุ่มนี้มีข้อด้อยคือ เอนไซม์ที่ผลิตได้นั้นอยู่ภายในเซลล์ทำให้ไม่สามารถย่อยสลาย PAHs ที่อยู่ภายนอกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.6.3.3.2 ราที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ (Ligninolytic fungi)

โดยเฉพาะราในกลุ่มราฟอกขาว จะผลิตลิกนิโนไลติกเอนไซม์ (liginolytic enzymes) ที่สามารถย่อยสลาย PAHs และสารอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำได้ โดยจะผลิตเอนไซม์เหล่านี้ออกมาภายนอกเซลล์ ทั้งนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะไม่จำเพาะเจาะจงกับโครงสร้างของ PAHs ทำให้สามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิดรวมไปถึงชนิดที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนและมวลโมเลกุลสูงด้วย โดย PAHs จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบจำพวก quinones จากนั้น

สารประกอบจำพวก quinones นี้ อาจถูกย่อยสลายวงเบนซีนเปลี่ยนโครงสร้างต่อไปจนได้คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Cerniglia, 1997)

**2.7 ราฟอกขาว**

ราฟอกขาวนั้นส่วนใหญ่อยู่ในคลาส Basidiomycetes ราในกลุ่มนี้เมื่อ เจริญบนไม้ จะทำให้ไม้เปลี่ยนสีเป็นสีขาว ซึ่งเป็นผลของการย่อยสลายลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของไม้ ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ที่มีสารพวกฟีนอลิคชนิดต่าง ๆ เ ป็นองค์ประกอบ ดังนั้นรากลุ่มนี้จึงมีความสามารถในการย่อยสลายสารอื่นที่มีโครงสร้าง เป็นสารประกอบฟีนอลิคห รือมีวงเบนซีน คล้ายกับลิกนินได้ด้วย โดยอาศัยการทำงานของลิกนิโนไลติกเอนไซม์ที่รากลุ่มนี้ผลิตได้ (Cerniglia, 1997) ลิกนิโนไลติกเอนไซม์เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์ของรา โดยจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ออกซิโดรีดักเทส (extracellular oxidoreductase) ซึ่งประกอบไปด้วยเอนไซม์แลคเคส (Laccase) และเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) ได้แก่ ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase) และแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase) (Mechichi et al., 2006) รากลุ่ม ราฟอกขาวสามารถแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม ตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์ดังนี้

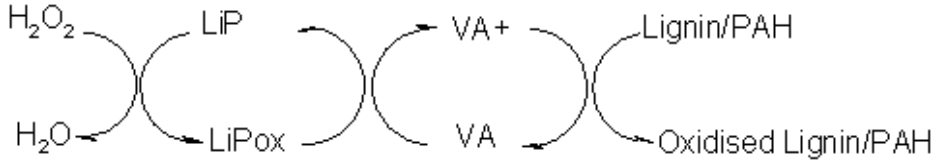
กลุ่มที่ 1 สามารถสร้างลิกนิน เพอร์ออกซิเดส แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส และแลคเคส

กลุ่มที่ 2 สามารถสร้างลิกนิน เพอร์ออกซิเดส และแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

กลุ่มที่ 3 สามารถสร้าง แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส และแลคเคส ซึ่งเป็นกลุ่มที่พบ ได้มากที่สุด (Hatakka et al., 2001) (ตารางที่ 6)

2.7.1 ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase; LiP)

ลิกนิน เพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (EC 1.11.1.14) ที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ ถูกพบครั้งแรกใน *Phanerochaete chrysosporium* (Tein and Kirk, 1983) โดยโครงสร้างของเอนไซม์มีเฟอร์ริก ฮีม (ferric heme) เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์นี้สามารถย่อยสารประกอบทั้งพวกฟีนอลและไม่ใช่ฟีนอลได้ โดยในปฏิกิริยาเริ่มต้นนั้น LiP จะถูกออกซิไดซ์โดยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ทำให้สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนได้โดยผ่านการทำงานของสารอินเตอร์มิเดียทคือ veratryl alcohol ซึ่ง LiP จะตัดตรงบริเวณพันธะ $C_\alpha - C_\beta$ ของวงแหวนแอโรแมติก (Tein and Kirk, 1986) (รูปที่ 3)




รูปที่ 3 วิถีออกซิเดชันของลิกนิน เพอร์ออกซิเดส (ที่มา: Wells et al., 2006)

ตารางที่ 6 ราฟอกขาวบางชนิดที่สามารถสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์ได้ (Eggert et al., 1996)

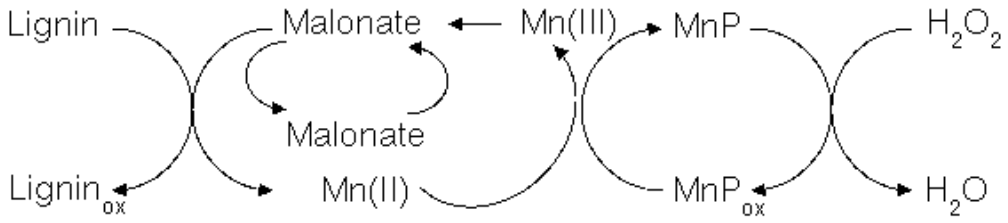
| ชนิดของรา | ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส | แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส | แลคเคส |
|---|---|---|---|
| *Bjerkandera* sp. | - | + | + |
| *Bjerkandera adusta* | + | - | - |
| *Ceriporiopsis subvermispora* | - | + | + |
| *Cyathus stercoreus* | - | + | + |
| *Ganoderma colossum* | - | + | + |
| *Ganoderma lucidum* | - | + | + |
| *Ganoderma voleciocum* | - | + | + |
| *Lentinus edodes* | - | + | + |
| *Perenniporia medulla-panis* | - | + | - |
| *Phlebia brevispora* | + | + | + |
| *Phlebia radiata* | + | + | + |
| *Phanerochaete chrysosporium* | + | + | - |
| *Phanerochaete sordida* | + | + | - |
| *Pleurotus ostreatus* | + | + | + |
| *Pleurotus sapidus* | + | + | + |
| *Pycnoporus cinnabarinus* | - | - | + |
| *Trametes cingulata* | + | + | + |
| *Trametes giggosa* | + | + | + |
| *Trametes hirsatua* | + | + | + |
| *Trametes versicolor* | + | + | + |
| *Trametes villosa* | - | + | + |

หมายเหตุ + สามารถตรวจพบแอกติวิตีของเอนไซม์ได้

- ไม่สามารถตรวจพบแอกติวิตีของเอนไซม์ได้

2.7.2 แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase; MnP)

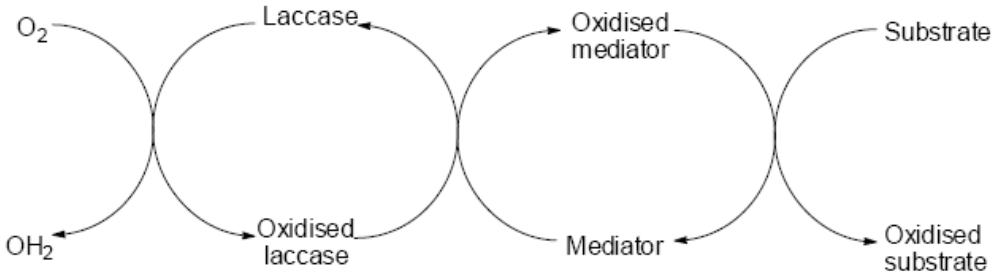
แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (MnP, E.C. 1.11.1.13) ที่มีโครงสร้างคล้ายกับ LiP คือ ประกอบด้วยเฟอร์ริก ฮีม (ferric heme) แต่ MnP นั้นมีไกลโคไปรตีนเป็นองค์ประกอบด้วย สามารถออกซิไดซ์สารประกอบทั้งพวกฟีนอลและไม่ใช่ฟีนอลได้ การทำงานของเอนไซม์นี้จะเกิดขึ้นได้ต้องมีแมงกานีสอิสระเข้ามาช่วยในการเข้าทำปฏิกิริยา โดยเริ่มจาก MnP จะถูกไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ออกซิไดซ์ หลังจากนั้นเอนไซม์ MnP ก็จะไปออกซิไดซ์เปลี่ยน Mn(II) และให้เป็น Mn(III) โดย Mn (III) ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาออกซิไดซ์สารตั้งต้นที่เป็นสารประเภทแอโรแมติกต่อไป โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นหากมีสารพวก lactase malonate หรือ oxalate ร่วมทำปฏิกิริยาด้วย (Hammel and Cullen, 2008) (รูปที่ 4)




รูปที่ 4 วิถีออกซิเดชันของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส (Wells et al., 2006)

2.7.3 แลคเคส (Laccase; Lac)

แลคเคสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิเจนออกซิโดรีดักเทส (benzenediol: oxygenoxido-reductase, EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) โดยประกอบด้วยไกลโคโปรตีนที่มีโมเลกุลของทองแดง (copper) เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะใช้โมเลกุลของออกซิเจนในการออกซิไดซ์สารในกลุ่มแอโรแมติกได้โดยผ่านปฏิกิริยา radical-catalysed mechanism โดยมีเมดิเอเตอร์เป็นสารอินเตอร์มิเดียท (Wells et al., 2006) (รูปที่ 5 )




รูปที่ 5 วิถีออกซิเดชันของแลคเคส (Wells et al., 2006)

แลคเคสยังจัดอยู่ในกลุ่ม blue-copper oxidase โดยถูกค้นพบครั้งแรกในยางของต้น *Rhus vernicifira* หรือ Jepanese lacquer ซึ่งเป็นพืชให้น้ำมันชนิดหนึ่งของประเทศญี่ปุ่น โดย Yoshida ในปีค.ศ. 1883 ต่อมาพบว่า เอนไ ซม์แลคเคสนี้สามารถพบได้ในพืชชนิดอื่นรวมทั้งในแมลง แบคทีเรีย และรา โดยในพืชนั้นจะพบมากในวงศ์ Anacardiacea ซึ่งเป็นพืชที่มีการผลิตยางที่นำมาใช้ในการเคลือบวัสดุต่าง ๆ ส่วนในแมลงมีรายงานว่าพบ Polyphenol oxidase ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับแลคเคส สำหรับแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถผลิตแลคเคสได้ ได้แก่ *Axospirillum lipoferum* และ *Mycobacterum tuberculosis* เป็นต้น (Alexander and Zhulin, 2000) แต่ผู้ผลิตแลคเคสที่ดีที่สุดคือ รา โดยพบว่ารากว่า 60 สายพันธุ์ ทั้งที่อยู่ในคลาส Basidiomycetes Ascomycetes และ Deuteromycetes สามารถผลิตแลคเคสได้ (Alcalde, 2007)

2.7.3.1 โครงสร้างของแลคเคส

แลคเคสเป็นเอนไซม์ที่มีทองแดง 4 อะตอม เป็นองค์ประกอบ โดยไม่มีโคแฟก-เตอร์อื่น ในทองแดงทั้ง 4 อะตอมนี้จะประกอบไปด้วยบริเวณที่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้ 3 ตำแหน่งคือ

Type I copper center (T1) จะอยู่บริเวณ mononuclear cluster สามารถดูดกลืนแสงในช่วง 600 นาโนเมตร ซึ่งจะให้สีน้ำเงินอมเขียว (greenish-blue color) การดูดกลืนแสงนั้นเกิดจากพันธะโควาเลนท์ระหว่างทองแดงและซีสเทอีน (cysteine) ทำให้สามารถตรวจการแสดงผลของ electron paramagnetic spectrum (EPR) ได้

Type II copper center (T2) จะไม่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงที่มองเห็นได้ แต่สามารถตรวจสอบได้โดยการแสดงผลของ EPR

Type III copper center (T3) ประกอบไปด้วย $Cu^{+}$ 2 อะตอม ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบได้โดย EPR แต่จะสามารถดูดกลืนแสงในช่วงที่มองเห็นได้ที่ความยาวคลื่น 330 นาโน-เมตร

การทำงานของทองแดงทั้ง 3 โครงสร้างนั้นเริ่มจาก T1 จับอิเล็กตรอนที่ได้จากการออกซิไดซ์สารตั้งต้นที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิคหรือวงแหวนเบนซีน ทำให้วงเบนซีนแตกหรือเปลี่ยนโครงสร้างเป็น quinone แล้วมีการส่งต่ออิเล็กตรอนจาก T1 ไปยังบริเวณ T2 และ T3 ที่รวมกลุ่มกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า trinuclear copper cluster ทำให้สามารถรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนให้กลายเป็นน้ำได้ (Alcalde, 2007)

2.7.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของแลคเคส

2.7.3.1 Redox potential ($E^{o}$)

จากการศึกษา EPR ของ T1 พบว่า แลคเคสที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดจะมีค่า $E^{o}$ ต่างกัน แลคเคสที่ผลิตได้จากราจะมีค่า redox potential สูงกว่าแลคเคสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียและพืช โดยพบว่า แลคเคสจากต้น *Rhus vernicifira* จะมีค่า $E^{o}$ ประมาณ 0.4 โวลต์ ในขณะที่แลคเคสที่ผลิตได้จากราจะมีค่า $E^{o}$ อยู่ในช่วง 0.4 ถึง 0.8 โวลต์ (ตารางที่ 7) ซึ่งการที่ T1 มีค่า $E^{o}$ สูงนั้นจะช่วยให้สามารถออกซิไดซ์สารตั้งต้นได้หลากหลายขึ้น (Alcalde, 2007)

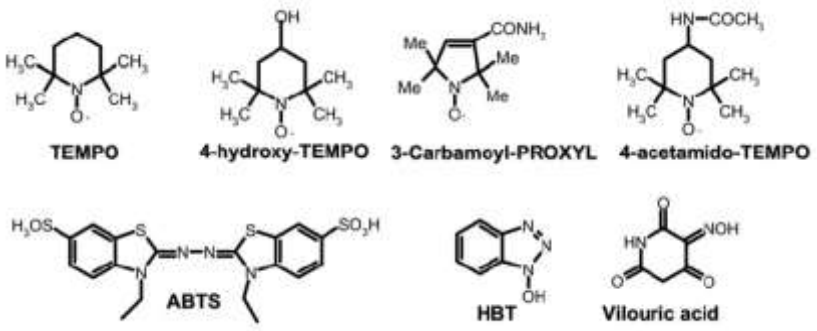
ตารางที่ 7 ค่า redox potential ($E^{o}$) ของแลคเคสที่ผลิตได้จากราและพืชบางชนิด (Alcalde, 2007)

| สิ่งมีชีวิตที่ผลิตแลคเคส | | $E^{o}$ (โวลต์) |
|---|---|---|
| *Trametes versicolor* | ราในคลาส Basidiomycete | 0.79 |
| *Trametes villosa* | ราในคลาส Basidiomycete | 0.79 |
| *Neurospora crassa* | ราในคลาส Ascomycete | 0.78 |
| *Rhizoctonia solani* | ราในคลาส Deuteromycete | 0.71 |
| *Coprinus cinereus* | ราในคลาส Basidiomycete | 0.55 |
| *Scytalidium thermophilum* | ราในคลาส Basidiomycete | 0.51 |
| *Myceliophthora thermophila* | ราในคลาส Ascomycete | 0.47 |
| *Rhus vernicifera* | พืช | 0.43 |
| *Cuburbita pepo* | พืช | 0.34 |

2.7.3.2 เมดิเอเตอร์

จากการที่ราสามารถผลิตแลคเคสที่มีค่า $E^{o}$ ที่สูงกว่าสิ่งมีชีวิตอื่นได้นั้น ทำให้ราสามารถออกซิไดซ์สารตั้งต้นได้หลากหลายชนิด แต่ก็ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากแลคเคสไม่สามารถที่จะตัดพันธะระหว่างคาร์บอนและไฮโดรเจนที่เรียงตัวเป็นเส้นตรงได้ (Wells et al., 2006) ทำให้มีการศึกษาถึงการใช้เมดิเอเตอร์เพื่อช่วยในการส่งต่ออิเล็กตรอนของแลคเคส ทำให้แลคเคสสามารถตัดพันธะระหว่างคาร์บอนและไฮโดรเจนได้ โดยมีเมดิเอเตอร์หลายชนิดที่ช่วยในการออกซิไดซ์ของแลคเคสให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO) 4-hydroxy-TEMPO 4-acetamido-TEMPO 3-carbomoyl-PROXYL

1-hydroxybenztriazole (HBT) vilouric acid (VA) และ 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) เป็นต้น (รูปที่ 6)




รูปที่ 6 ไดอะแกรมแสดงโครงสร้างของเมดิเตอร์บางชนิดที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นปฏิกิริยาของแลคเคส (ที่มา: Wells et al., 2006)

2.7.3.3 สารยับยั้งการทำงานของแลคเคส

การทำงานของแลคเคสสามารถถูกยับยั้งได้โดยสารหลายชนิด เช่น เอไซด์ (azide) เฮไลด์ (halide) ไซยาไนด์ (cyanide) ไธโอไซยาไนด์ (thiocyanide) ฟลูโอไรด์ (fluoride) และ ไฮดรอกไซด์ (hydroxide) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะไปจับตรงตำแหน่ง T2 และ T3 ส่งผลให้เกิดการขัดขวางการส่งผ่านอิเล็กตรอน และยับยั้งแอกติวิตี ของเอนไซม์ ส่วน สารประกอบโลหะและกรดไขมันบางชนิด จะไปมีผลกับกรดอะมิโน และการเกิด chelation ของทองแดง โดยทั่วไปแลคเคสของราจะมีช่วงความเสถียรอยู่ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3-7 และที่อุณหภูมิ 35-80 องศาเซลเซียส (Alcalde, 2007)

## 2.8 การใช้รากลุ่มฟอกขาวและลิกนิโนไลติกเอนไซม์ในการย่อยสลาย PAHs

ในปัจจุบันมีการศึกษาราในกลุ่มฟอกขาวเพื่อใช้ในการย่อยสลายทางชีวภาพของ PAHs เนื่องจากรากลุ่มนี้มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs หลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถแบ่งรูปแบบการย่อยสลาย PAHs โดยการใช้ลิกนิโนไลติกเอนไซม์ได้เป็น 3 รูปแบบคือ

2.8.1 การใช้ราที่สามารถผลิตลิกนิโนไลติกเอนไซม์ในการย่อยสลาย PAHs

เป็นการนำเชื้อราหรือเส้นใยรามาทำการย่อยสลาย PAHs โดยตรง จาก การศึกษาที่นำ *Trametes versicolor* มาทำการย่อยสลาย PAHs ในฟลาสก์ โดยการเลี้ยงราให้มีการเติบโตก่อนแล้วเติม phenanthrene ลงในอาหารที่ความเข้มข้น 100 ppm พบว่า *T. versicolor* สามารถย่อยสลาย phenanthrene ได้ถึง 65 เปอร์เซ็นต์ (Han et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Lentinus tigrinus* สามารถย่อยสลาย anthracene phenanthrene fluoranthene pyrene

benzo(a)anthracene และ benzo(a)pyrene ได้ถึง 91 เปอร์เซ็นต์ (Covino et al., 2001) และยังพบว่า *Pleurotus ostreatus* สามารถย่อยสลาย catechol phenanthrene pyrene benzo(*a*)pyrene anthracene fluorene ได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) จนเกิดเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ได้ 0.19-3.0 เปอร์เซ็นต์ (Bezalel et al., 1996) สำหรับการนำราไปทำการย่อยสลาย PAHs ในดิน พบว่า *Bjerkandera adusta Lentinus triginus* และ *Irpex lacteus* สามารถย่อยสลาย phenanthrene fluoranthene pyrene และ chrysene ได้ 35-45 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังพบว่าราทั้ง 3 ชนิดนี้ สามารถทนภาวะเค็มได้ จึงสามารถย่อยสลาย PAHs ที่มีการปนเปื้อนในดินบริเวณชายทะลได้อีกด้วย (Valentin et al., 2006)

2.8.2 การใช้ลิกนิโนไลติกเอนไซม์ในการย่อยสลาย PAHs

เป็นการนำเอนไซม์มาทำการย่อยสลาย PAHs โดยในช่วงแรกมีการศึกษาการย่อยสลาย PAHs โดยใช้ ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส และแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส จาก *Phanerochaete chrysosponum* พบว่าสามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด เช่น anthracene phenanthrene fluorine pyrene benzo(a)pyrene และ benzo(a)anthracene เป็นต้น (Hammel et al., 1986; Field et al., 1992; Pickard et al., 1999) สำหรับการใช้แลคเคสในการย่อยสลาย PAHs พบว่าแลคเคสที่ผลิตได้จาก *Trametes versicolor* สามารถย่อยสลาย anthracene และ benzo(a)pyrene ได้ (Dodor et al., 2004) ส่วนแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตได้จาก *Coriolus hirsutus* สามารถย่อยสลาย benzo(a)pyrene fluoranthene phenanthrene และ pyrene ได้อยู่ในช่วง 10.9-97.2 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ดีการใช้แลคเคสบริสุทธิ์จาก *C. hirsutus* ไม่สามารถย่อยสลาย fluoranthene และ pyrene ได้หากไม่มีการเติมเมดิเอเตอร์ (Cho et al., 2002) ทำให้มีการศึกษาถึงการใช้เอนไซม์แลคเคสร่วมกับเมดิเอเตอร์ เช่น ABTS และ HBT พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ถึง 40 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Han et al., 2004)

2.8.3 การใช้เอนไซม์รูปตรึงในการย่อยสลาย PAHs

มีรายงานการใช้แลคเคสรูปตรึงในการย่อยสลาย PAHs โดยทำการตรึงแลคเคสกับสารตัวกลางต่าง ๆ เช่น alginate chitosan chitin และ cellulose เป็นต้น ผลพบว่า แลคเคสรูปตรึงจาก *Pycnoporus sanguineus* สามารถย่อยสลาย anthracene phenanthrene และ pyrene ได้ 85-93 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 20 วัน ซึ่ง มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เซลล์ในการย่อยสลาย PAHs (Low et al., 2009) และมีการใช้แลคเคสรูปตรึงจาก *T. versicolor* ร่วมกับ 1mM ABTS จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของแลคเคสทำให้สามารถย่อยสลาย PAHs ได้สูงขึ้นถึง 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้เอนไซม์ รูปตรึงในการย่อยสลาย PAHs จะช่วยเพิ่มความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างให้กับแลคเคสด้วย (Dodor et al., 2004)

# บทที่ 3

# วิธีการดำเนินการวิจัย

## 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

| อุปกรณ์ | บริษัท / ประเทศ |
|---|---|
| เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น SPL15 | Labcon/The Republic of South Africa |
| หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) | Ta Chang Medical Instrument Factory/ Taiwan |
| เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) รุ่น N-N series | Tokyo Rikakikai Co., LTD/ Japan |
| เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น PP-50 | Sartorius/ Germany |
| เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610 | Sartorius/ Germany |
| เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205 | Denver Instrument Company/ USA |
| ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV 123 | ISSOC/ Thailand |
| ตู้อบ (Hot air oven) | Binder / USA |
| กล้องจุลทรรศน์รุ่น CH 30 RF200 | Olympus/ Japan |
| กล้องจุลทรรศน์รุ่น BX-51 | Olympus/ Japan |
| เครื่องปั่นเหวี่ยงรุ่น Rotofix32 | Hettich/ Germany |
| เครื่องปั่นเหวี่ยง (Programmable centrifuge) รุ่น B-22M | IEC/USA |
| เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS Spectrophotometer) รุ่น 2800 | Unico/USA |
| เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS Spectrophotometer) รุ่น HP 8453 | Agilent/USA |
| เครื่อง High Performance Liquid Chromatography รุ่น Prostar | Varian/ USA |
| ชุดกรอง Ultrafiltration รุ่น Viva science 250 | Sartorius/ Germany |
| ถุงไดอะไลซิส รุ่น Cello Sep, MWCO 12,000-14,000 | Membrabe Filtration Products/USA |

| 3.2 **สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย** | **บริษัท / ประเทศ** |
|---|---|
| กรดไฮโดรคลอริค (HCl) | Schrlau / Spain |
| กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) | Sigma/USA |
| คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 .5H_2O$) | Carlo Erba Reagent/ Italy |
| แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต($CaCl_2 .2H_2O$) | Carlo Erba Reagent/ Italy |
| ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 .7H_2O$) | May & Baker/ England |
| ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) | Carlo Erba Reagent/ Italy |
| ดี แอล-ฟีนิลอะลานีน ($C_9H_{11}NO_2$) | Himedia/India |
| ไดคลอโลมีเทน ($CH_2Cl_2$) | Ajax Finechem/ Australia |
| เบนโซ(เอ)ไพรีน ($C_{20}H_{12}$) | Sigma/USA |
| เปบโตน (Peptone) | Difco/ USA |
| โปแทสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) | Ajax Finechem/ Australia |
| ไพรีน ($C_{16}H_{10}$) | Sigma/USA |
| ฟรุกโตส ($C_6H_{12}O_6$) | Sigma/USA |
| ฟลูโอแรนทีน ($C_{16}H_{10}$) | Sigma/USA |
| ฟีแนนทีน ($C_{14}H_{10}$) | Carlo Erba Reagent/ Italy |
| แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 .7H_2O$) | Carlo Erba Reagent/ Italy |
| แมงกานีสคลอไรด์เตรตตะไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) | Carlo Erba Reagent/ Italy |
| แมงกานีสซัลเฟตเตรตตะไฮเดรต ($MnSO_4.4H_2O$) | Merck/ Germany |
| อะซีโตไนไตรล์ ($CH_3CN$) | Ajax Finechem/ Australia |
| อะดีนีน ($C_5H_5N_5$) | Across/USA |
| แอนทราซีน ($C_{14}H_{10}$) | Sigma/USA |
| แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) | Merck/ Germany |
| แอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรต ($C_4H_{10}N_2O_4$) | Fluka/Switzerland |
| ไอรอน(II)ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 .7H_2O$) | May & Baker/ England |
| เอบีทีเอส 2,2 -azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) ($C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$) | Sigma/USA |

## 3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.3.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย

3.3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดรากลุ่มราฟอกขาวจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย โดย นำตัวอย่างเห็ดราจากสภาพธรรมชาติมาเช็ดผิวดอกเห็ดด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ใช้มีดตัดชิ้นเนื้อด้านในเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาวางบนจานเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ , 2547) ประมาณ 2-3 วัน จนเส้นใยเจริญออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อ เขี่ยเส้นใยบริสุทธิ์ที่ได้ลงในอาหารแข็งเอียง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป สำหรับการเก็บเชื้อเป็น stock culture ทำการเก็บเส้นใยในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการ subculture ทุก ๆ 6 เดือน เพื่อเตรียม stock culture ใหม่

3.3.1.2 การจำแนกชนิด

ทำการจำแนกชนิดโดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีของ อนิวรรต เฉลิมพงษ์ (2541) และเปรียบเทียบลักษณะที่ตรวจสอบได้กับรูปวิธานของ Ryvarden และ Johansen (1980) และ Gilbertson และ Ryvarden (1987) และเอกสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

### 3.3.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์

3.3.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง

นำเส้นใยบริสุทธิ์ของราฟอกขาว มาเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใยที่ขอบโคโลนี นำเส้นใยที่ เจาะ 1 ชิ้น มาวางลงบนกลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารสูตรสำหรับการทดสอบความสามารถในการสร้างแลคเคสและเพอร์ออกซิเดสคือ อาหารสูตร PDA ที่เติม 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chairattanamanokorn et al., 2004) และทดสอบความสามารถในการสร้างแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส โดยใช้อาหารสูตร PDA ที่เติม $MnCl_2.H_2O$ ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร (Chairattanamanokorn et al., 2004) ทำการบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เก็บผลโดยการวัดอัตราส่วนระหว่างวงสีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3.2.2 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เชิงปริมาณ

ทำการเลี้ยงเห็ดราไอโซเลตที่ให้ผลบวกของแลคเคสจากข้อ 3.3.2.1 ในอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใยที่ขอบโคโลนี นำเส้นใยที่เจาะ 5 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium (Madhavi and Lele, 2006) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน โดยกรองแยกเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำอาหารเหลวที่ได้มาทำการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ (ภาคผนวก ง) ดังนี้

แลคเคสตามวิธีของ Madhavi และ Lele (2006) โดย 1 ยูนิตของแลคเคส คือ ปริมาณของแลคเคสที่สามารถออกซิไดซ์ ABTS 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที (Wolfenden and Willson, 1982; Childs and Bardsley, 1975)

แมงกานีส เพอร์ออกซิเดสตามวิธีของ Watanabe et al. (2001) โดย 1 ยูนิตของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส คือ ปริมาณของ แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ที่สามารถออกซิไดซ์ 2,6-Dimethoxyphenol 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที

ลิกนิน เพอร์ออกซิเดสตามวิธีของ Tuisel et al. (1990) โดย 1 ยูนิตของลิกนิน เพอร์ออกซิเดสคือ ปริมาณของลิกนิน เพอร์ออกซิเดสที่สามารถออกซิไดซ์ Veratryl alcohol 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 3.3.3 การศึกษาการเติบโตของรา

คัดเลือกเห็ดราที่มีความสามารถในการผลิตแลคเคสได้มากที่สุดจากข้อ 3.3.2.2 มาศึกษาอัตราการเติบโตและช่วงเวลาของการผลิตแลคเคสโดยเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน เพื่อวัดน้ำหนักแห้งของเซลล์และวัดแอกติวิตีของแลคเคส โดยกรองแยกเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วนำอาหารเหลวที่ได้ไปวัดเอนไซม์แอกติวิตีด้วยวิธีในข้อ 3.3.2.2 ส่วนเส้นใยนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ แล้วนำค่าน้ำหนักแห้งและแอกติวิตีของแลคเคส ที่ได้มาสร้างกราฟแสดงการเติบโต และการสร้างเอนไซม์เทียบกับเวลา ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**3.3.4 การศึกษาการเติบโตของราบนอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติม PAHs**

นำเส้นใยบริสุทธิ์ของราในข้อ 3.3.3 มาเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใยที่ขอบโคโลนี นำเส้นใยที่เจาะ 1 ชิ้น มาวางลงบนกลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารสูตร Basal Medium Agar (ภาคผนวก ก ) ที่มีการเติม PAHs คือ benzo(a)pyrene pyrene antracene phenanthrene และ fluoranthene (ละลายใน acetonitrile) แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 10 และ 100 ppm ทำการบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เก็บผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี โดยชุดควบคุมจะไม่มีการเติม PAHs แต่จะเติม acetonotrile ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหา ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตเทียบกับชุดควบคุม

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโต = ((T/C)x100)-100

T = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของชุดการทดลอง (เซนติเมตร)

C = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของชุดควบคุม (เซนติเมตร)

**3.3.5 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส**

คัดเลือกเชื้อราที่สามารถสร้างแลคเคสได้มากที่สุดและทน PAHs ได้ดีจากข้อ 3.3.4 มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคสโดยปรับองค์ประกอบในสูตรอาหาร Basal Medium ใช้อาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีภาวะของการเลี้ยงที่ทำการปรับในแต่ละขั้นตามลำดับดังนี้

3.3.5.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เช่น กลูโคส ซูโครส และ ฟรุกโตส (ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v))

3.3.5.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เช่น เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต (ที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v))

3.3.5.3 อุณหภูมิ (ที่อุณหภูมิ 28 30 40 และ 50 องศาเซลเซียส)

3.3.5.4 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหาร (pH 3 4 5 6 7 8 และ 9)

ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน เพื่อวัดน้ำหนักแห้งและวัดแอกติวิตีของแลคเคส โดย กรองแยกเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำอาหารเหลวที่ได้ไปวัดแอกติวิตีของแลคเคสด้วยวิธีในข้อ 3.3.2.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**3.3.6 การเตรียมแลคเคสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ**

3.3.6.1 การเตรียมแลคเคส

เลี้ยงราตามภาวะที่ได้ในข้อ 3.3.5 แยกส่วนอาหารเหลวมาทำให้มีความเข้มข้นของแลคเคสสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) จากนั้นตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate precipitation) ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ก่อนนำไปศึกษาลักษณะสมบัติต่อไป

3.3.6.1.1 การทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน

เลี้ยงราตามภาวะที่ได้ในข้อ 3.3.5 แล้วทำการกรองแยกเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำอาหารเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที วัดปริมาตรส่วนอาหารเหลวที่แยกได้ แล้ว นำมาทำให้แลคเคสมีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยเครื่องอัลตราฟิลเตรชัน Viva Flow 250 (Sartorius, Germany) โดยการใช้ membrane cut off ที่ 10,000 Da ภายใต้ความดันของก๊าซไนโตรเจน 3 บาร์ ทำการวัดแอกติวิตีของแลคเคสทั้งส่วนที่กรองผ่านและไม่ผ่านเมมเบรนตามวิธีในข้อ 3.3.2.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3.6.1.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำส่วนของเหลวที่มีแอกติวิตีของแลคเคสจากข้อ 3.3.6.1.1 มาทำการวัดปริมาตรเริ่มต้นแล้วคำนวณปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ค่อยๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไป พร้อมทั้งกวนเบาๆ เมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมดแล้ว ทำการกวนทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในกระบะน้ำแข็ง หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกตะกอนโปรตีนออกจากสารละลาย นำส่วนของเหลวมาทำการวัดปริมาตร เพื่อตกตะกอนโปรตีนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่สูงขึ้น โดยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น 40 60 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นำส่วนตะกอนที่ได้จากแต่ละช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมาละลายใน 0.1 M glycine HCl buffer (pH 3.5) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาใส่ในถุงไดอะไลซิส (Cello Sep, MWCO 12,000-14,000, Membrabe Filtration Products, Inc., Texas, USA) ทำการไดอะไลซิสใน 0.1 M glycine- HCl buffer (pH 3.5) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าเกลือในถุงไดอะไลซิสแพร่ออกมาจนหมด จากนั้นนำเอนไซม์แต่ละส่วนที่ได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry et al., 1951) โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน และทำการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.3.2.2

3.3.6.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์หยาบ

3.6.2.1 การศึกษาผลของความเป็นกรดด่าง ที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

ทำการวัดแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.3.2.2 แต่ปรับ pH ของ reaction mixture ให้เป็น pH 3 4 5 6 7 8 และ 9 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ได้แก่ 0.1 M glycine HCl buffer (pH 3-4) 0.1 M tartrate buffer (pH 4-6) 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6-8) และ 0.1 M glycine sodium hydroxide buffer (pH 8-9)

3.3.6.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

ทำการวัดแอกติวีตีตามวิธีในข้อ 3.3.2.2 แต่บ่ม reaction mixture ที่อุณหภูมิ 28 (อุณหภูมิห้อง) 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส

3.3.6.2.3 การศึกษาผลของไอออนที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

เติม $CuSO_4$ $MnSO_4$ $MgSO_4$ $ZnCl_2$ $CaCl_2$ $FeSO_4$ NaCl และ EDTA ใน reaction mixture จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 mM และ เติม SDS จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ก่อนทำการวัดแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.3.2.2

3.3.6.2.4 การศึกษาผลของความเป็นกรดด่าง ที่มีต่อความเสถียรของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

นำเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.6.1.2 ไปบ่มในบัฟเฟอร์ต่างๆ ตามข้อ 6.2.1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาวัดค่าแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.3.2.2 ในภาวะปกติ

3.3.6.2.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของแลคเคสและแมงกา-นีส เพอร์ออกซิเดส

นำเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.6.1.2 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 28 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาวัดค่าแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.3.2.2 ในภาวะปกติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำและนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 3.3.7 การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน

3.3.7.1 การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน

3.3.7.1.1 การย่อยสลาย PAHs โดยการใช้แลคเคส

เตรียม stock solution ของ PAHs 5 ชนิด ได้แก่ benzo(a)pyrene pyrene antracene phenanthrene และ fluoranthene โดยละลายใน acetonitrile ที่ความเข้มข้นสุดท้าย

ของ PAHs แต่ละชนิดคือ 1000 ppm ทำการย่อยสลาย PAHs โดยการเติม PAHs แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm ใน 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) ปริมาตร 0.67 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแลคเคสที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรของ Reaction mixture ทั้งหมดเป็น 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดและเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง สำหรับชุดควบคุมจะเติม 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) แทนเอนไซม์ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ยและช่วงพิสัย

3.3.7.1.2 การย่อยสลาย PAHs โดยการใช้แลคเคสร่วมกับเมดิเอเตอร์ (mediator)

ทำการย่อยสลาย PAHs ตามภาวะในข้อ 3.3.7.1.1 โดยมีการเติมเมดิเอเตอร์ ABTS ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1mM สำหรับชุดควบคุมจะเติม 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) แทนเอนไซม์ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ยและช่วงพิสัย

3.3.7.2 การตรวจสอบการย่อยสลาย PAHs

3.3.7.2.1 การสกัดแยก PAHs (Cho et al., 2002)

นำสารละลายที่ผ่านการบ่มมาทำการสกัดแยกเอาส่วนของ PAHs โดยการเติม dichloromethane ต่อ reaction mixture ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 เขย่าให้เข้ากันดีแล้วทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น จากนั้นจึงนำไปใส่กรวยแยกเพื่อเก็บของเหลวส่วนล่าง นำของเหลวส่วนบนมาทำการสกัดซ้ำอีกครั้ง หลังจากนั้นนำของเหลวส่วนล่างที่เก็บได้ทั้งหมดมาทำการระเหย dichloromethane ออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ละลายตะกอน PAHs ด้วย acetonitrile ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

3.3.7.2.2 การตรวจสอบการย่อยสลาย PAHs (Cho et al., 2002)

ทำการตรวจสอบการย่อยสลาย PAHs ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 reverse phase ความยาว 150 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร โดยมี acetonitrile และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วน 70 ต่อ 30 ตามลำดับ ใช้ตัวตรวจวัดแบบ UV ที่ความยาวคลื่น 295 250 236 235 และ 225 นาโนเมตร สำหรับ benzo(a)pyrene phenanthrene pyrene fluoranthene และ antracene ตามลำดับ โดยปรับให้มีอัตราการชะเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที นำค่าพื้นที่ใต้กราฟมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายของ PAHs โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย PAHs

เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย = ((T/C)x100)-100

T = พื้นที่ใต้กราฟของชุดการทดลอง (mAU*s)

C = พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม (mAU*s)

### 3.3.8 การจัดทำตัวอย่างแห้งและ culture บริสุทธิ์เก็บในพิพิธภัณฑ์พืช

ทำการจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยนำดอกเห็ดที่ได้จากการเก็บตัวอย่างและผ่านการจำแนกชนิดแล้ว มาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หรือจนกว่าดอกเห็ดแห้ง จัดเก็บตัวอย่างแห้งใส่ถุงหรือกล่องพลาสติก ที่มีลูกเหม็น 1-2 เม็ด เพื่อป้องกันการทำลายจากแมลง บันทึก specimen หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์พืช

# บทที่ 4

# ผลการวิจัย

## 4.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย

4.1.1 การเก็บตัวอย่าง

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย ช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - ธันวาคม พ.ศ.2551 ในพื้นที่ 14 จังหวัด (รูปที่ 7) คือ แม่ฮ่องสอน น่าน ตาก กรุงเทพฯ นครปฐม ปทุมธานี นครราชสีมา ร้อยเอ็ด อุดรธานี ชลบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และ นครศรีธรรมราช การเก็บตัวอย่างจะเลือกรากลุ่มราฟอกขาวที่มีลักษณะเป็นดอกเห็ดและเจริญขึ้นมาบนไม้ผุ ตอไม้ หรือต้นไม้ จากการ เก็บตัวอย่างได้ตัวอย่างดอกเห็ดจำนวน 101 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต จาก 11 จังหวัด คือ แม่ฮ่องสอน 1 ตัวอย่าง กรุงเทพฯ 4 ตัวอย่าง นครปฐม 2 ตัวอย่าง ปทุมธานี 1 ตัวอย่าง นครราชสีมา 1 ตัวอย่าง ร้อยเอ็ด 2 ตัวอย่าง ชลบุรี 3 ตัวอย่าง กาญจนบุรี 2 ตัวอย่าง เพชรบุรี 1 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ 2 ตัวอย่าง และ นครศรีธรรมราช 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 8)

รูปที่ 7 แผนที่พื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวในการศึกษานี้
(แผนที่ดัดแปลงจาก http:// www.nectec.or.th/user/htk/graphic/thailand-map.gif )

ตารางที่ 8 ตัวอย่างเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวที่เก็บได้จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทยในการศึกษานี้

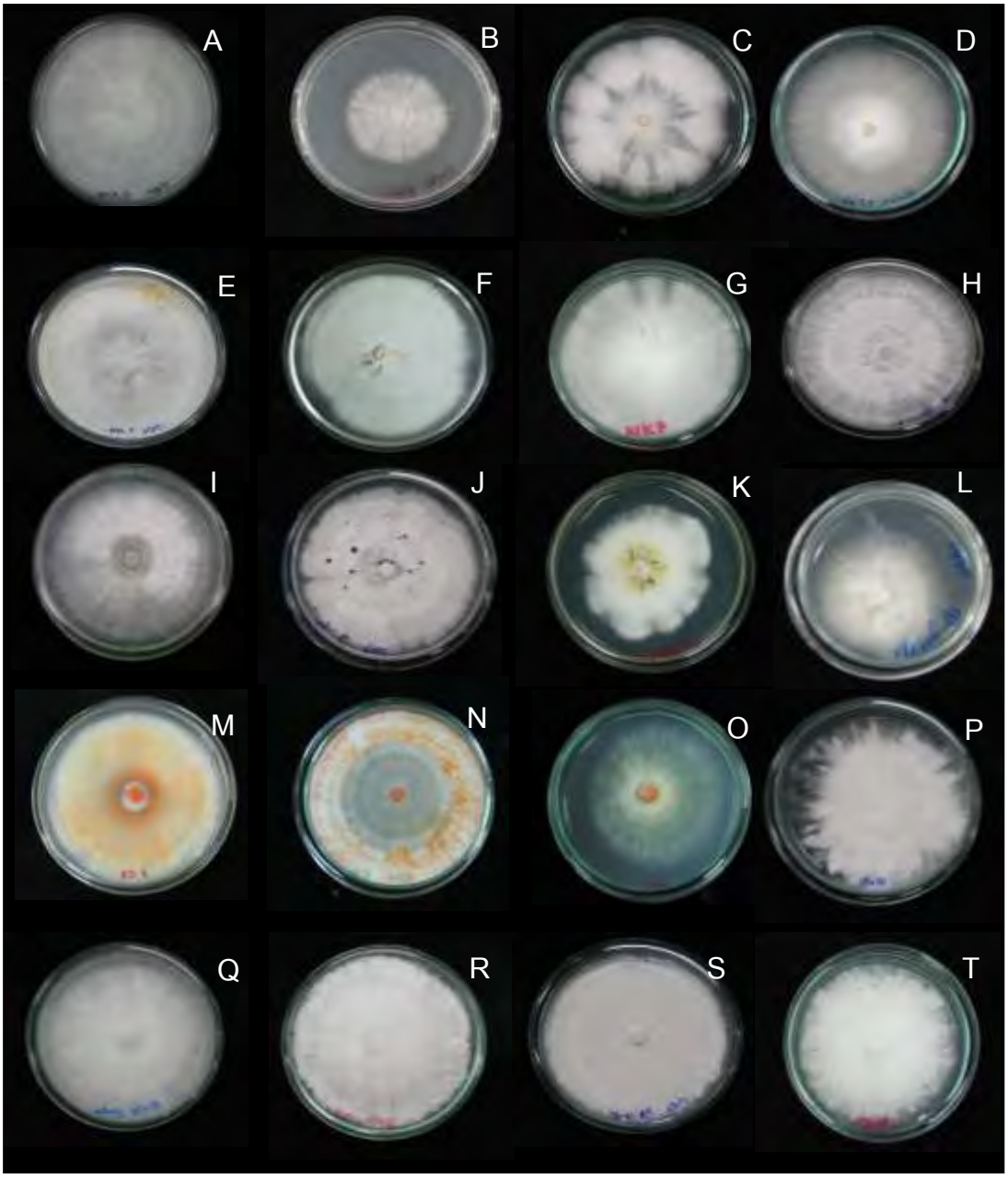
| ชื่อวิทยาศาสตร์ | สถานที่เก็บตัวอย่าง | ลักษณะถิ่นอาศัย | วันที่ทำการเก็บตัวอย่าง | Code number สำหรับพิพิธภัณฑ์พืช |
|---|---|---|---|---|
| *Ganoderma australe* NKP2 | อ. สามพราน จ.นครปฐม | ตอต้นหมากผุ (*Areca catechu* Linn.) | 16 มกราคม 2551 | Thongkred 001 BCU |
| *G. australe* NKS4 | อ. ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช | โคนต้นไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 19 มกราคม 2551 | Thongkred 002 BCU |
| *G. australe* PTN3 | อ. หลักหก จ.ปทุมธานี | โคนต้นกระถินณรงค์ *(Acacia auriculaceformis* Cunn.) | 25 กรกฎาคม 2551 | Thongkred 003 BCU |
| *G. dahlii* CB24 | อ. ศรีราชา จ.ชลบุรี | ตอไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 3 พฤษภาคม 2551 | Thongkred 004 BCU |
| *G. lobatum* BK5 | เขตปทุมวัน จ.กรุงเทพฯ | โคนต้นจามจุรีผุ (*Samanea saman* (Jacq.) Merr.) | 16 พฤษภาคม 2551 | Thongkred 005 BCU |
| *G. lobatum* RED6 | อ. เมือง จ.ร้อยเอ็ด | ตอต้นมะม่วง (*Mangifera indica* Linn.) | 14 เมษายน 2551 | Thongkred 006 BCU |
| *G. lucidum* NKP3 | อ. สามพราน จ.นครปฐม | โคนต้นมะนาว (*Citrus aurantifolia* Swing.) | 16 มกราคม 2551 | Thongkred 007 BCU |
| *G. lucidum* NRM9 | อ. สะแกราช จ.นครราชสีมา | ตอไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 10 มิถุนายน 2551 | Thongkred 008 BCU |
| *G. lucidum* RED2 | อ. เมือง จ.ร้อยเอ็ด | ตอต้นลำไย (*Dimocarpus longan* lour.) | 14 เมษายน 2551 | Thongkred 009 BCU |
| *Microporus xanthopus* CB2 | อ. ศรีราชา จ.ชลบุรี | กิ่งไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 3 พฤษภาคม 2551 | Thongkred 010 BCU |
| *Phellinus pachyphloeus* PJK2 | อ. บางสะพานน้อย จ.ประจวบคีรีขันธ์ | ตอไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 28 ธันวาคม 2551 | Thongkred 011 BCU |
| *Polyporus tenuiculus* KB1 | อ. ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี | กิ่งไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 18 พฤษภาคม 2551 | Thongkred 012 BCU |
| *Pycnoporus coccineus* KB4 | อ. ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี | กิ่งไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 18 พฤษภาคม 2551 | Thongkred 013 BCU |

ตารางที่ 8 (ต่อ)

| ชื่อวิทยาศาสตร์ | สถานที่เก็บตัวอย่าง | ลักษณะถิ่นอาศัย | วันที่ทำการเก็บตัวอย่าง | Code number สำหรับพิพิธภัณฑ์พืช |
|---|---|---|---|---|
| *P. coccineus* PB1 | อ. แก่งกระจาน จ.เพชรบุรี | โคนต้นไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 15 มิถุนายน 2551 | Thongkred 014 BCU |
| *P. sanguineus* MHS3 | อ. แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน | ตอไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 26 ธันวาคม 2551 | Thongkred 015 BCU |
| *Schizophyllum commune* BK1 | เขตปทุมวัน จ.กรุงเทพฯ | ตอไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 12 มกราคม 2551 | Thongkred 016 BCU |
| *S. commune* BK2 | เขตปทุมวัน จ.กรุงเทพฯ | ตอไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 12 มกราคม 2551 | Thongkred 017 BCU |
| *S. commune* CB4 | อ. ศรีราชา จ.ชลบุรี | ตอไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 3 พฤษภาคม 2551 | Thongkred 018 BCU |
| *Trametes elegans* PJK1 | อ. บางสะพานใหญ่ จ.ประจวบคีรีขันธ์ | ตอไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 18 เมษายน 2551 | Thongkred 019 BCU |
| *Trametes* sp. BK3 | เขตปทุมวัน จ.กรุงเทพฯ | โคนต้นไม้ไม่ทราบชนิด (Unknown Angiosperm) | 5 พฤศจิกายน 2551 | Thongkred 020 BCU |

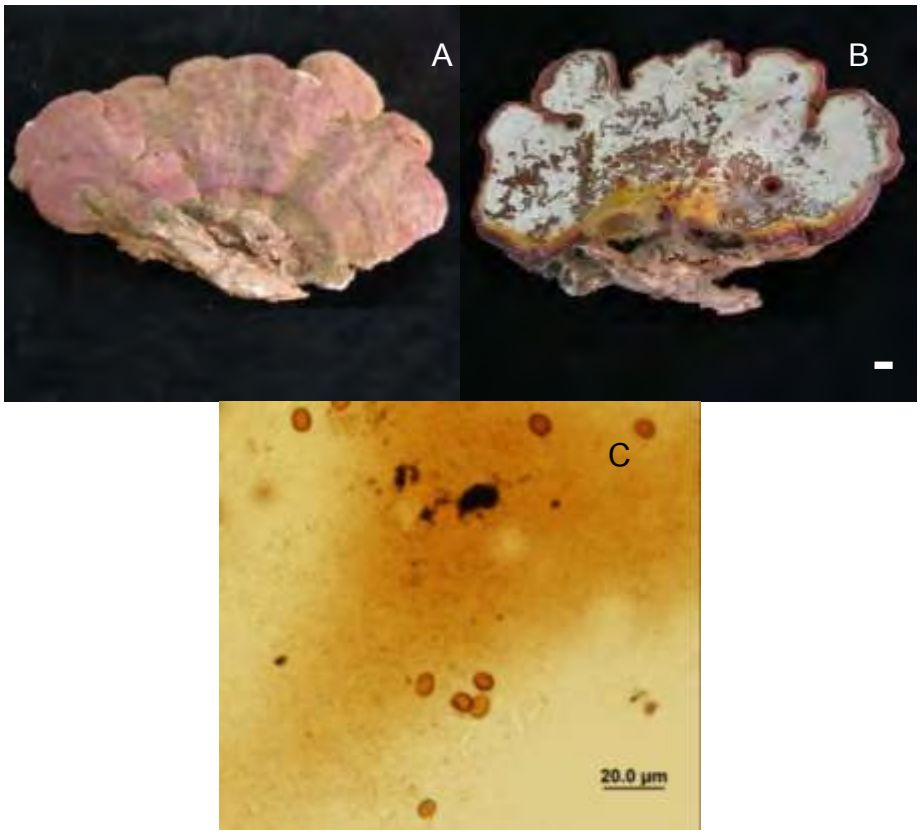
4.1.2 การจำแนกชนิด

จากการเลี้ยงตัวอย่างเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย บนอาหารสูตร PDA ได้เส้นใยที่บริสุทธิ์ของรากลุ่มราฟอกขาวทั้งหมด 20 ไอโซเลต (รูปที่ 8) เมื่อทำการจำแนกชนิดโดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดร่วมกับลักษณะของเส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA ตามวิธีของ อนิวรรต เฉลิมพงษ์ (2541) และเปรียบเทียบลักษณะที่ตรวจสอบได้กับรูปวิธานของ Ryvarden และ Johansen (1980) และ Gilbertson และ Ryvarden (1987) และเอกสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ผลพบว่าราทั้ง 20 ไอโซเลต จัดอยู่ในสกุลต่างๆ จำนวน 6 สกุล ได้แก่ *Ganoderma Microporus Phellinus Polyporus Pycnoporus Schizophyllum* และ *Trametes* และสามารถระบุชนิดได้ 19 ชนิด โดยแต่ละไอโซเลตมีลักษณะต่าง ๆ ดังนี้




รูปที่ 8 ลักษณะเส้นใยเห็ดรากลุ่มราฟอกขาวที่คัดแยกได้ในประเทศไทย เมื่อเติบโตอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน (A) *Ganoderma australe* NKP2 (B) *G. australe* NKS4 (C) *G. australe* PTN3 (D) *G. dahlii* CB24 (E) *G. lobatum* BK5 (F) *G. lobatum* RED6 (G) *G. lucidum* NKP3 (H) *G. lucidum* NRM9 (I) *G. lucidum* RED2 (J) *Microporus xanthopus* CB2 (K) *Phellinus pachyphloeus* PJK2 (L) *Polyporus tenuiculus* KB1 (M) *Pycnoporus coccineus* KB4 (N) *P. coccineus* PB1 (O) *P. sanguineus* MHS3 (P) *Schizophyllum commune* BK1 (Q) *S. commune* BK2 (R) *S. commune* CB4 (S) *Trametes elegans* PJK1 และ (T) *Trametes* sp. BK3

4.1.2.1 *Ganoderma australe* (Berk.) NKP2




รูปที่ 9 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. australe* (Berk.) NKP2 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกเป็นรูปครึ่งวงกลม ขนาดดอกกว้าง 17-18 เซนติเมตร ยาว 11-12 เซนติเมตร ขรุขระ ไม่เป็นมันวาว สีน้ำตาลอมแดง ขอบดอกหยักเป็นคลื่น สีน้ำตาลอมแดง ลักษณะปากรูกลมถึงเหลี่ยม ขนาด 6-7 รูต่อมิลลิเมตร ไม่มีก้านดอก เนื้อ เหนียว สีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ 9 A-B)

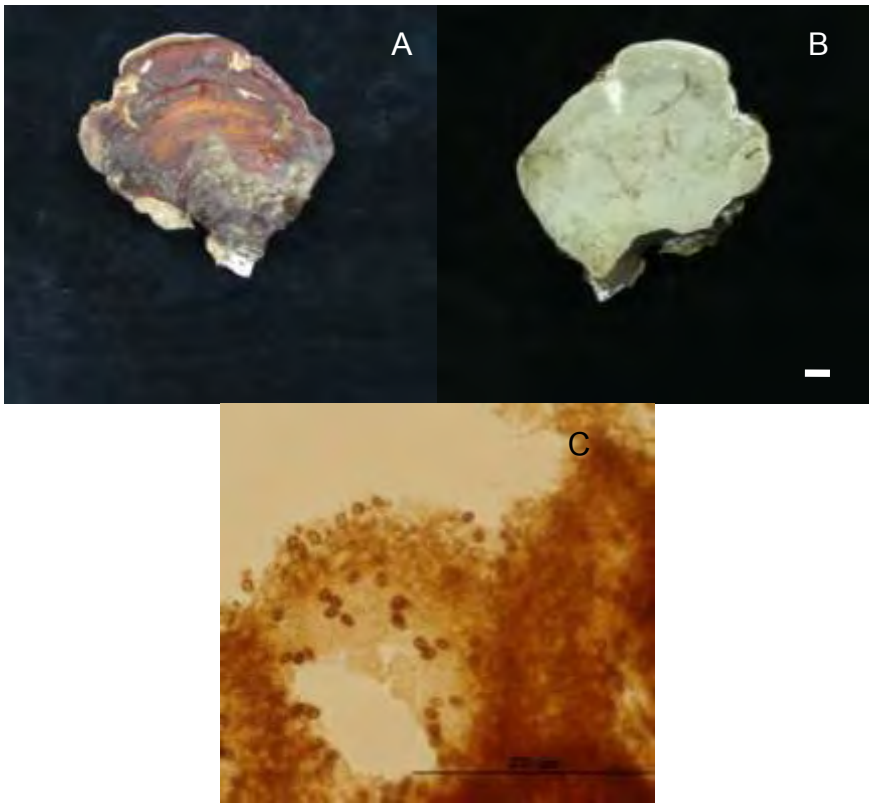
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์กลมถึงรูปไข่ ปลายข้างหนึ่งตัดเป็นเส้นตรง มีสองชั้น ขนาดกว้าง 5-6 ไมโครเมตร ยาว 6-7 ไมโครเมตร (รูปที่ 9 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Trimitic คือ Skeletal hyphae Binding hyphae และ Generative hyphae

4.1.2.2 *G. australe* (Berk.) NKS4




รูปที่ 10 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. australe* (Berk.) NKS4 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกเป็นรูปครึ่งวงกลมหรือคล้ายรูปพัด ขนาดดอกกว้าง 11-12 เซนติเมตร ยาว 9-10 เซนติเมตร ผิวขรุขระ สีดำปนเทา ขอบดอกเรียบ สีครีมอนน้ำตาลแดง ลักษณะปากรูกลม ขนาด 5-6 รูต่อมิลลิเมตร ไม่มีก้านดอก เนื้อ แข็ง สีน้ำตาล เข้ม (รูปที่ 10 A-B)

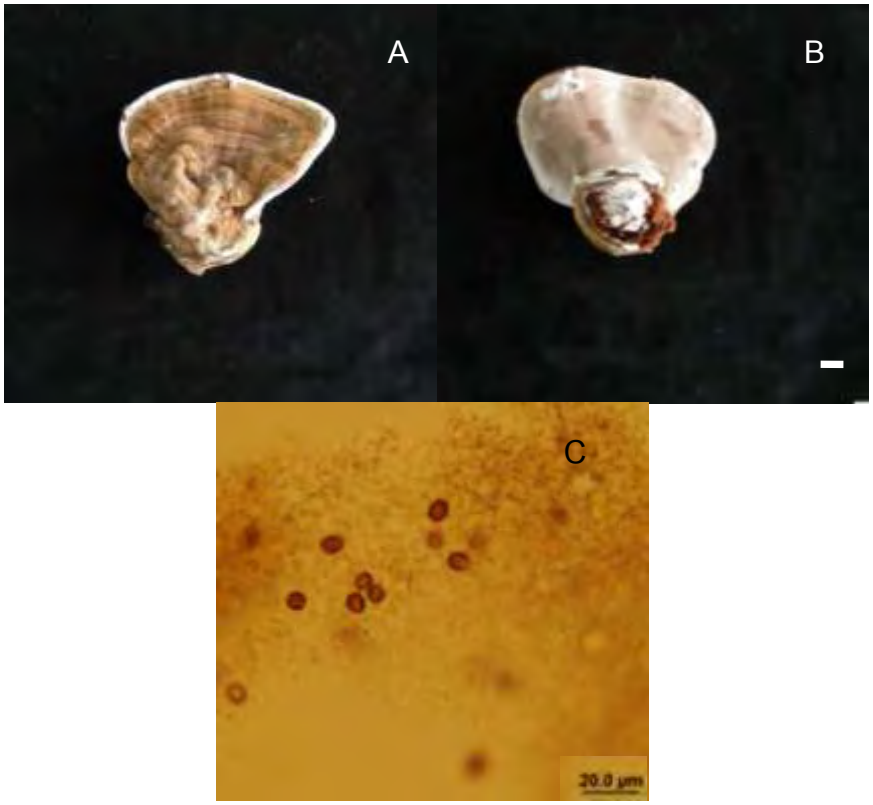
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์กลมถึงรูปไข่ ปลายข้างหนึ่งตัดเป็นเส้นตรง มีสองชั้น ขนาดกว้าง 5-6 ไมโครเมตร ยาว 6-7 ไมโครเมตร (รูปที่ 10 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Trimitic

4.1.2.3 *G. australe* (Berk.) PTN3




รูปที่ 11 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. australe* (Berk.) PTN3 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกคล้ายรูปพัด ดอกกว้าง 6-7 เซนติเมตร ยาว 8-9 เซนติเมตร ผิวดอกคล้ายกำมะหยี่ ขรุขระ ไม่มันวาว สีน้ำตาล ขอบดอกเรียบ สีขาวอมเหลือง ลักษณะปากรูกลม ขนาด 4-5 รูต่อมิลลิเมตร มีก้านดอกเทียม เนื้อ เหนียว สีน้ำตาล (รูปที่ 11 A-B)

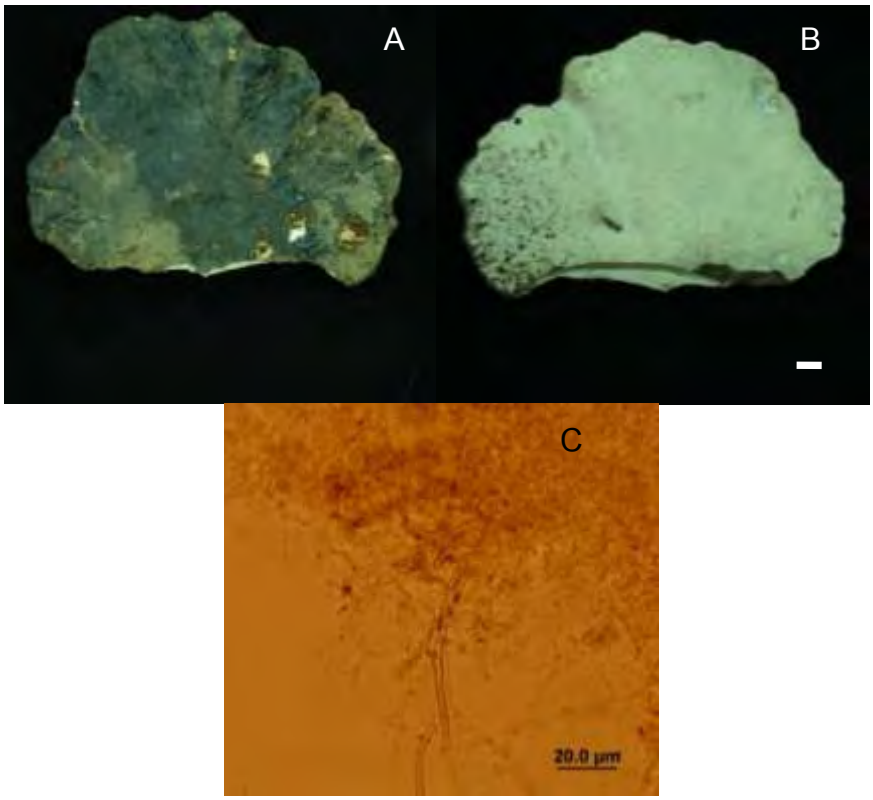
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์เป็นแบบกลมรี มีสองชั้น ขนาดสปอร์กว้าง 6-8 ไมโครเมตร ยาว 8-10 ไมโครเมตร (รูปที่ 11 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Trimitic

4.1.2.4 *G. dahlii* (Schw.) Aoshima. CB24




รูปที่ 12 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. dahlii* (Henn.) Aoshima. CB24 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะเส้นใย ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

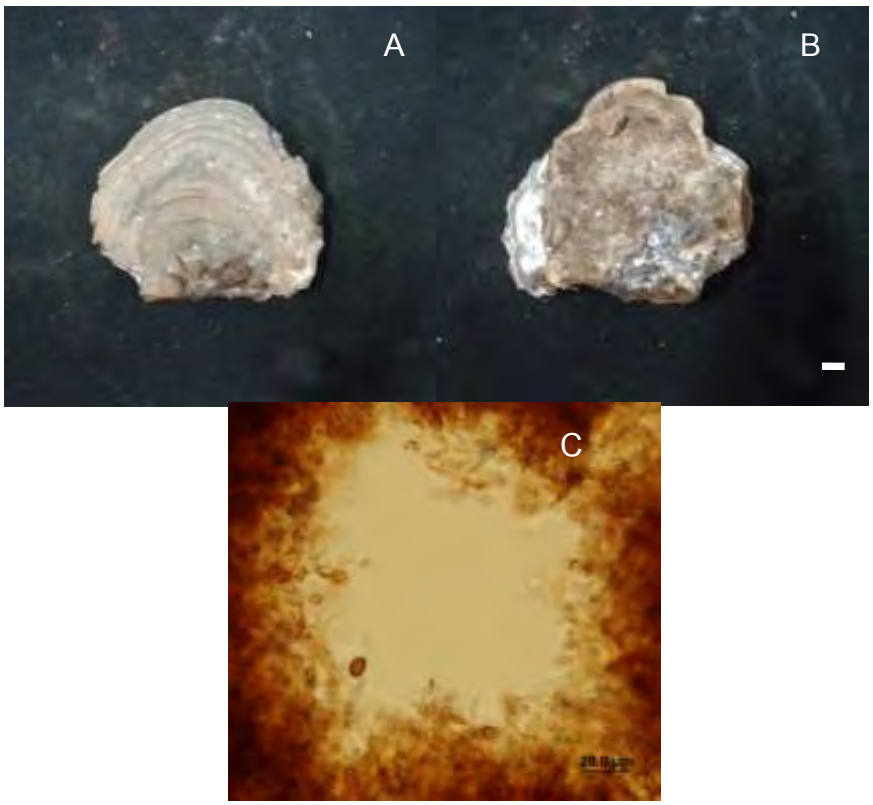
**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกเป็นรูปครึ่งวงกลมหรือคล้ายรูปพัด ดอกกว้าง 16-17 เซนติเมตร ยาว 11-12 เซนติเมตร ผิวสีน้ำตาลดำถึงดำ ขอบดอกหยัก ลักษณะปากรูกลม ขนาด 3-4 รูต่อมิลลิเมตร ไม่มีก้านดอก เนื้อ แข็ง สีเหลืองอมน้ำตาล (รูปที่ 12 A-B)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Trimitic (รูปที่ 12 C)

4.1.2.5 *G. lobatum* (Schw.) Atk. BK5




รูปที่ 13 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. lobatum* (Schw.) Atk BK5. (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกเป็นรูปครึ่งวงกลม ดอกกว้าง 10-11 เซนติเมตร ยาว 11-12 เซนติเมตร ผิวดอกไม่เรียบ มีลักษณะเป็นคลื่น ดอกมี 2 ชั้น ดอกชั้นบนมีสีน้ำตาลเข้ม หนา 0.3-0.4 เซนติเมตร ดอกชั้นล่างมีสีน้ำตาล หนา 0.2-0.3 เซนติเมตร ขอบดอกเรียบ สีน้ำตาล รู 5-6 รูต่อมิลลิเมตร ลักษณะปากรูกลม ไม่มีก้านดอก เนื้อ เหนียว สีน้ำตาล (รูปที่ 13 A-B)

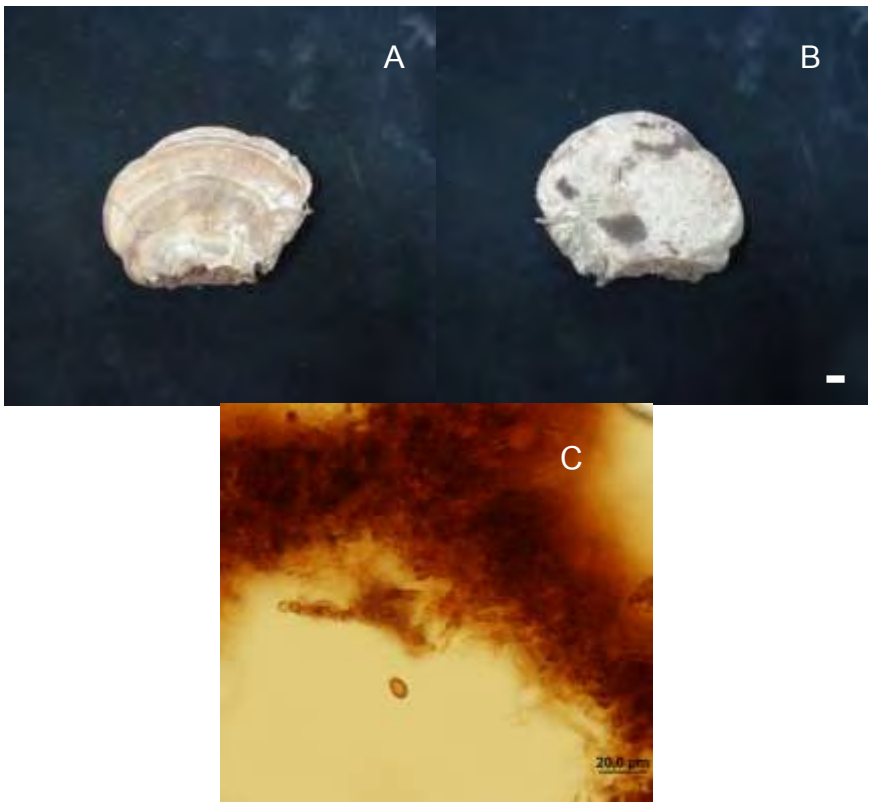
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์กลมถึงรูปไข่ ปลายข้างหนึ่งตัดเป็นเส้นตรง มีสองชั้น ขนาดกว้าง 5-6 ไมโครเมตร ยาว 6-7 ไมโครเมตร (รูปที่ 13 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Trimitic

4.1.2.6 *G. lobatum* (Schw.) Atk. RED6




รูปที่ 14 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. lobatum* (Schw.) Atk. RED6 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกรูปครึ่งวงกลม ดอกขนาดกว้าง 9-10 เซนติเมตร ยาว 11-12 เซนติเมตร ผิวดอกไม่เรียบ ลักษณะเป็นคลื่น มีรอยแตกที่ผิวดอก สีน้ำตาล ขอบดอกเรียบ สีน้ำตาล ลักษณะปากรูรูกลม ขนาด 5-6 รูต่อมิลลิเมตร ไม่มีก้านดอก เนื้อ เหนียว สีน้ำตาล (รูปที่ 14 A-B)

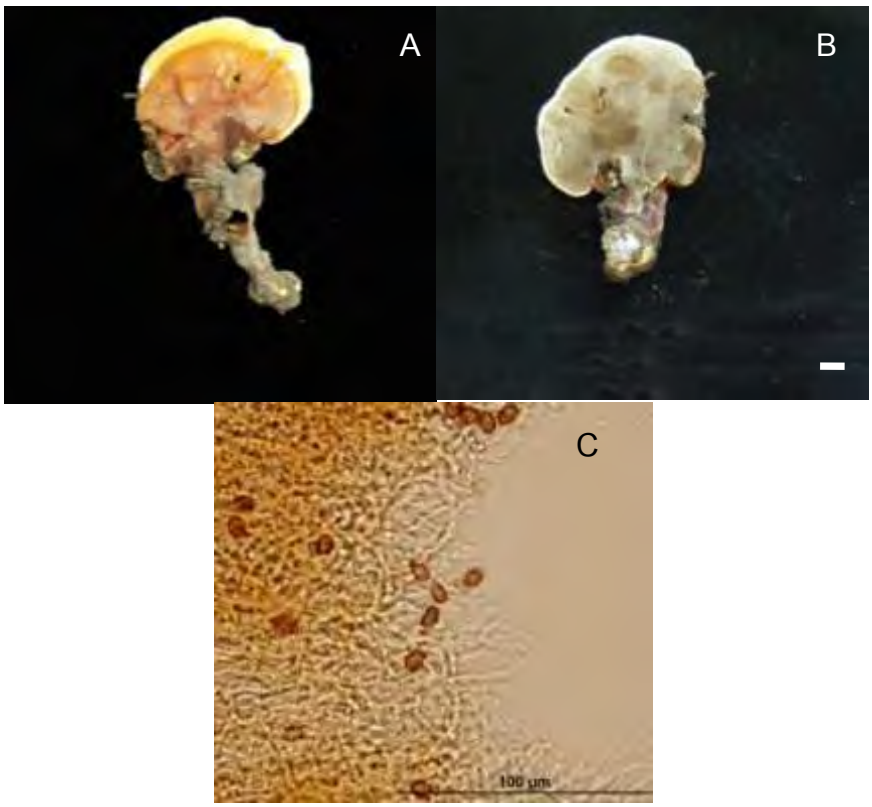
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์กลมถึงรูปไข่ ปลายข้างหนึ่งตัดเป็นเส้นตรง มีสองชั้น ขนาดกว้าง 4-5 ไมโครเมตร ยาว 6-7 ไมโครเมตร (รูปที่ 14 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Trimitic

4.1.2.7 *G. lucidum* (W. Curt. ex Fr.) Karst. NKP3




รูปที่ 15 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. lucidum* (W. Curt. ex Fr.) Karst. NKP3 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ━ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกคล้ายรูปพัด ดอกขนาดกว้าง 5-6 เซนติเมตร ยาว 11-12 เซนติเมตร ผิวเรียบเป็นมันวาว สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ขอบดอกเรียบสีเหลืองอ่อน ลักษณะปากรูกลมถึงเหลี่ยม ขนาด 4-6 รูต่อมิลลิเมตร สีขาว มีก้านดอกอยู่บริเวณกึ่งกลางดอก สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาล เข้ม ขนาด 4-6 เซนติเมตร เนื้อ เหนียว สีน้ำตาล (รูปที่ 15 A-B)

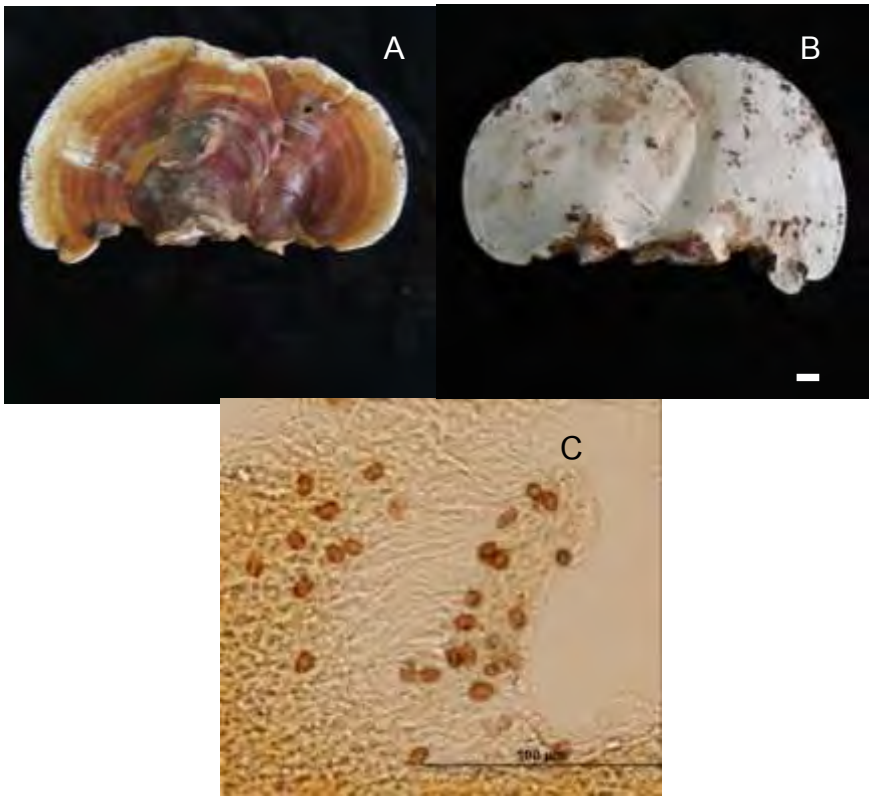
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์เป็นแบบรีรูปไข่ ปลายข้างหนึ่งตัดเป็นเส้นตรง มีสองชั้น ขนาดสปอร์กว้าง 4-5 ไมโครเมตร ยาว 6-7 ไมโครเมตร (รูปที่ 15 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Dimitic คือ Skeletal hyphae และ Generative hyphae

4.1.2.8 *G. lucidum* (W. Curt. ex Fr.) Karst. NRM9




รูปที่ 16 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. lucidum* (W. Curt. ex Fr.) Karst. NRM9 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกเป็นรูปครึ่งวงกลมหรือคล้ายรูปพัด ดอกขนาดกว้าง 17-19 เซนติเมตร ยาว 12-14 เซนติเมตร ดอกมี 2 ดอกซ้อนกันทางด้านข้าง ดอกใหม่ซ้อนอยู่ทางด้านล่างของดกอเก่า ผิวดอกเรียบ เป็นมัน วาว สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ขอบดอกเรียบ สีขาวถึงเหลืองอ่อน ลักษณะปากรูกลม ขนาด 5-6 รูต่อมิลลิเมตร มีก้านดอกเทียม เนื้อ เหนียว สีน้ำตาล (รูปที่ 16 A-B)

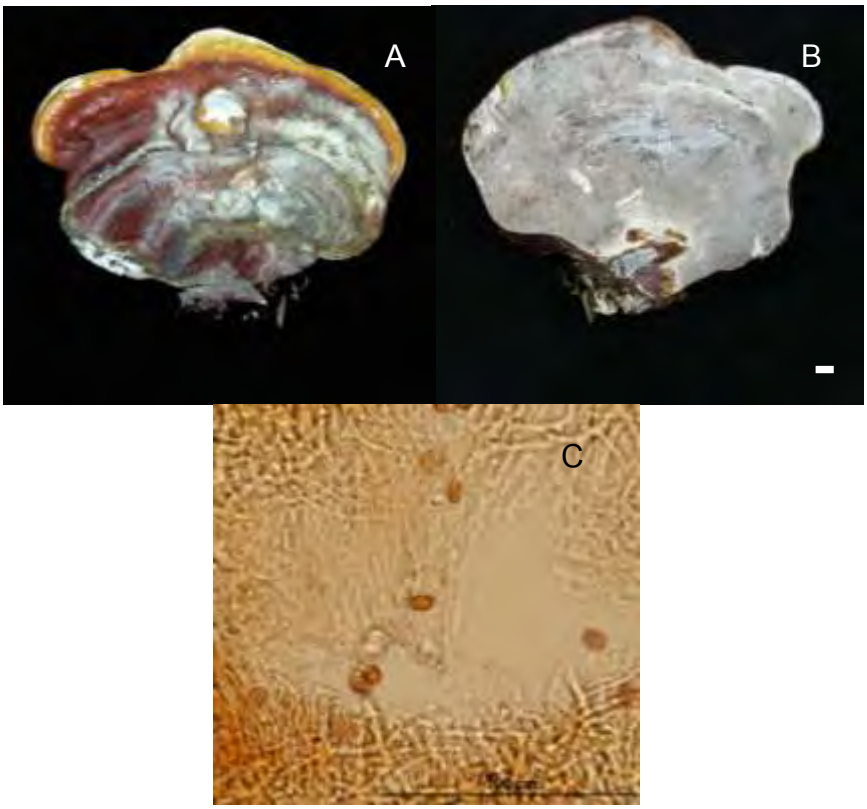
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์รีรูปไข่ ปลายข้างหนึ่งตัดเป็นเส้นตรง มีสองชั้น ขนาดกว้าง 5-6 ไมโครเมตร ยาว 7-8 ไมโครเมตร (รูปที่ 16 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Dimitic

4.1.2.9 *G. lucidum* (W. Curt. ex Fr.) Karst. RED2




รูปที่ 17 ลักษณะดอกเห็ดของ *G. lucidum* (W. Curt. ex Fr.) Karst. RED2 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกรูปครึ่งวงกลมหรือคล้ายรูปพัด ขนาดดอกกว้าง 16-17 เซนติเมตร ยาว 14-15 เซนติเมตร ผิวเรียบ เป็นมันวาว สีน้ำตาลเข้มถึงน้ำตาลแดง ขอบดอกหยักเป็นคลื่น สีเหลืองอ่อน ลักษณะปากรูกลมถึงเหลี่ยม 6-7 รูต่อมิลลิเมตร มีก้านดอกเทียม เนื้อ เหนียว สีน้ำตาล (รูปที่ 17 A-B)

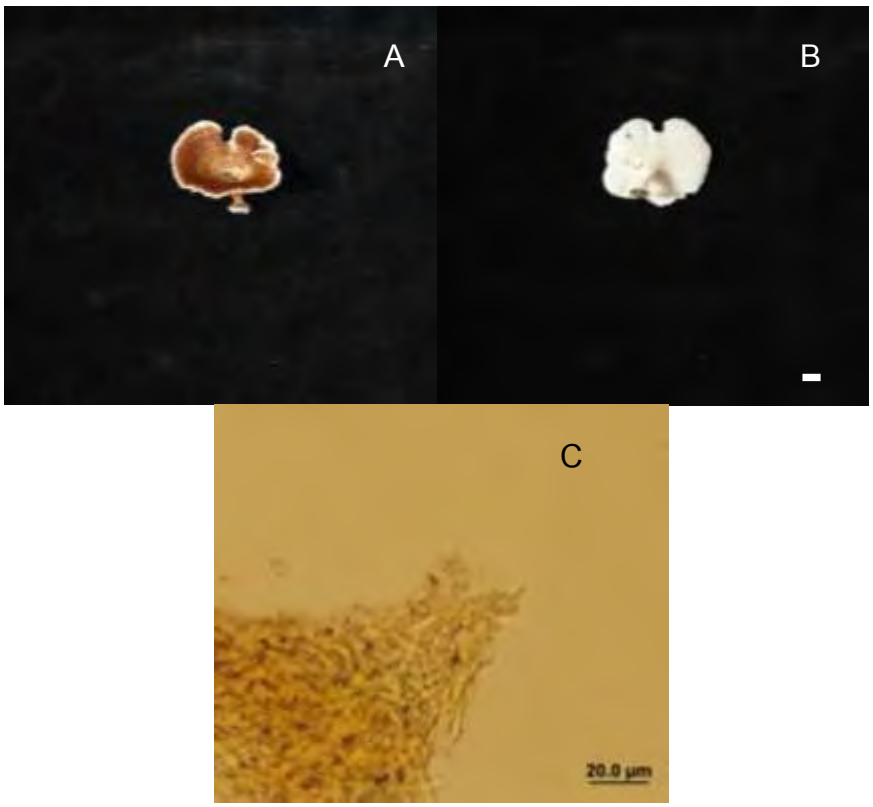
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์รีรูปไข่ ปลายข้างหนึ่งตัดเป็นเส้นตรง มีสองชั้น ขนาดกว้าง 5-6 ไมโครเมตร ยาว 6-7 ไมโครเมตร (รูปที่ 17 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Dimitic

4.1.2.10 *Microporus xanthopus* (Fr.) Kuntz. CB2




รูปที่ 18 ลักษณะดอกเห็ดของ *Microporus xanthopus* (Fr.) Kuntz. CB2 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของเส้นใย ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกเป็นรูปกรวยปากกว้าง มีริ้วเป็นรัศมี ย่นเล็กน้อย หมวก ขนาดดอกกว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 3-4 เซนติเมตร ผิวมันวาว เป็นแถบวงกลมสีน้ำตาลอมเหลืองถึงน้ำตาลเข้ม ขอบดอกหยักเป็นคลื่นสีเหลืองอ่อน ลักษณะปากรูกลมถึงกลมรี ขนาด 8-9 รูต่อมิลลิเมตร มีก้านดอกรูปทรงกระบอก ไม่อยู่กึ่งกลางดอก ขนาด 0.5 เซนติเมตร เนื้อ เหนียว สีขาว (รูปที่ 18 A-B)

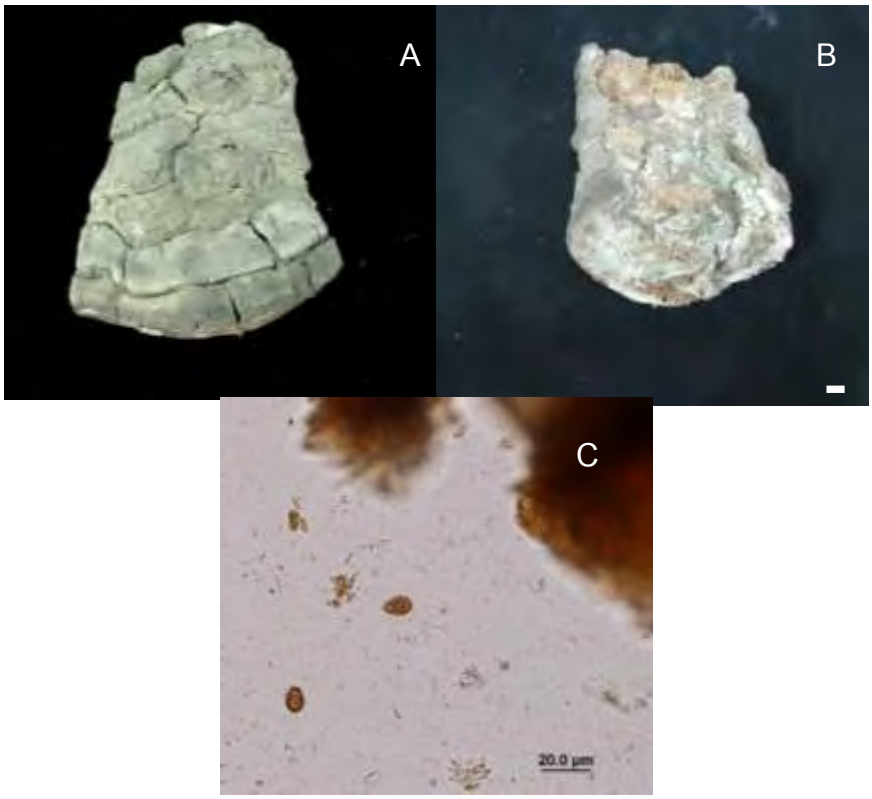
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์รียาว ผนังบางเรียบ ขนาดกว้าง 3-4 ไมโครเมตร ยาว 5-6 ไมโครเมตร

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Trimitic (รูปที่ 18 C)

4.2.1.11 *Phellinus pachyphloeus* (Quel.) PJK2




รูปที่ 19 ลักษณะดอกเห็ดของ *Phellinus pachyphloeus* (Quel.) PJK2 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกคล้ายรูปเกือกม้า ขนาดดอกกว้าง 12-15 เซนติเมตร ยาว 18-20 เซนติเมตร ผิวดอกขรุขระ มีร่องและแตก สีเทาดำถึงดำ ขอบไม่เรียบ สีดำปนเทา ลักษณะปากรูกลมถึงกลมรี ขนาด 5-6 รูต่อมิลลิเมตร ไม่มีก้านดอก เนื้อ แข็ง สีเหลืองอมน้ำตาลอ่อน (รูปที่ 19 A-B)

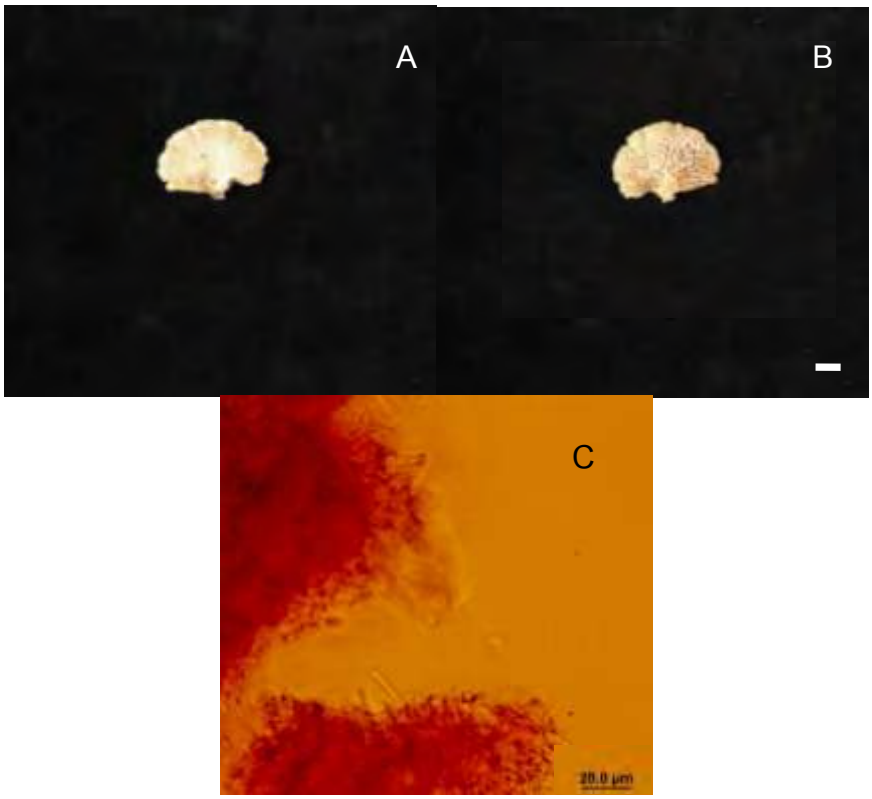
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์รีรูปไข่ เรียบ ผนังสองชั้น ขนาดกว้าง 3-4 ไมโครเมตร ยาว 5-6 ไมโครเมตร (รูปที่ 19 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Dimitic

4.2.1.12 *Polyporus tenuiculus* (Beauv.) Fr. KB1




รูปที่ 20 ลักษณะดอกเห็ดของ *Polyporus tenuiculus* (Beauv.) Fr. KB1 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกเป็นรูปครึ่งวงกลมหรือคล้ายรูปพัด ขนาดดอกกว้าง 6-7 เซนติเมตร ยาว 3-5 เซนติเมตร ผิว ไม่เรียบ มีปมนูน เล็ก ๆ ที่ผิวดอก สีขาวอมเหลือง ขอบดอกเรียบ สีเหลืองอ่อน ลักษณะปากเป็นหกเหลี่ยมแบบรวงผึ้ง สีเหลืองอ่อน ขนาด 1-2 รูต่อมิลลิเมตร มีก้านดอกเทียม เนื้อ แข็ง เปราะ สีขาว (รูปที่ 20 A-B)

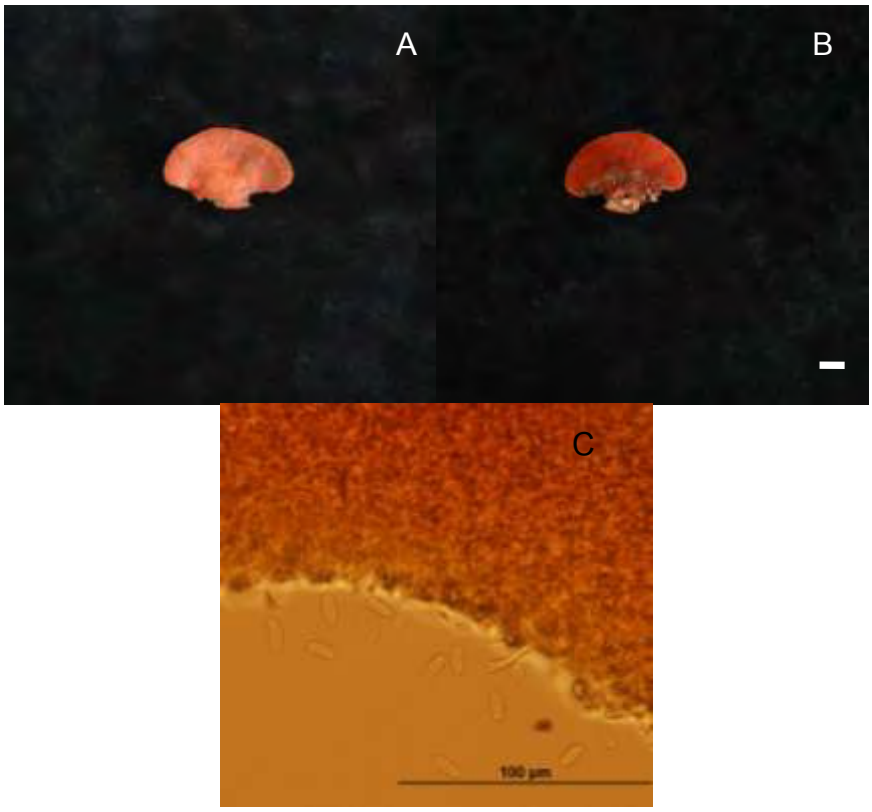
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์รียาว เรียบ ผนังบาง ชั้นเดียว ขนาดกว้าง 2-4 ไมโครเมตร ยาว 6-8 ไมโครเมตร (รูปที่ 20 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Dimitic

4.2.1.13 *Pycnoporus coccineus* (Fr.) Bond et. Sing. KB4




รูปที่ 21 ลักษณะดอกเห็ดของ *Pycnoporus coccineus* (Fr.) Bond. et. Sing. KB4 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกเป็นรูปครึ่งวงกลมหรือคล้ายรูปพัด ขนาดดอกกว้าง 4-5 เซนติเมตร ยาว 3-4 เซนติเมตร ผิวเรียบ แบน สีส้มอมแดง ไม่มีริ้วรัศมี ขอบดอกเรียบ สีส้มอมแดง ลักษณะปากรูกลม ขนาด 4-5 รูต่อมิลลิเมตร สีส้มอ่อน มีก้านดอกเทียม เนื้อ เหนียว สีส้มอ่อนถึงส้มอมแดง (รูปที่ 21 A-B)

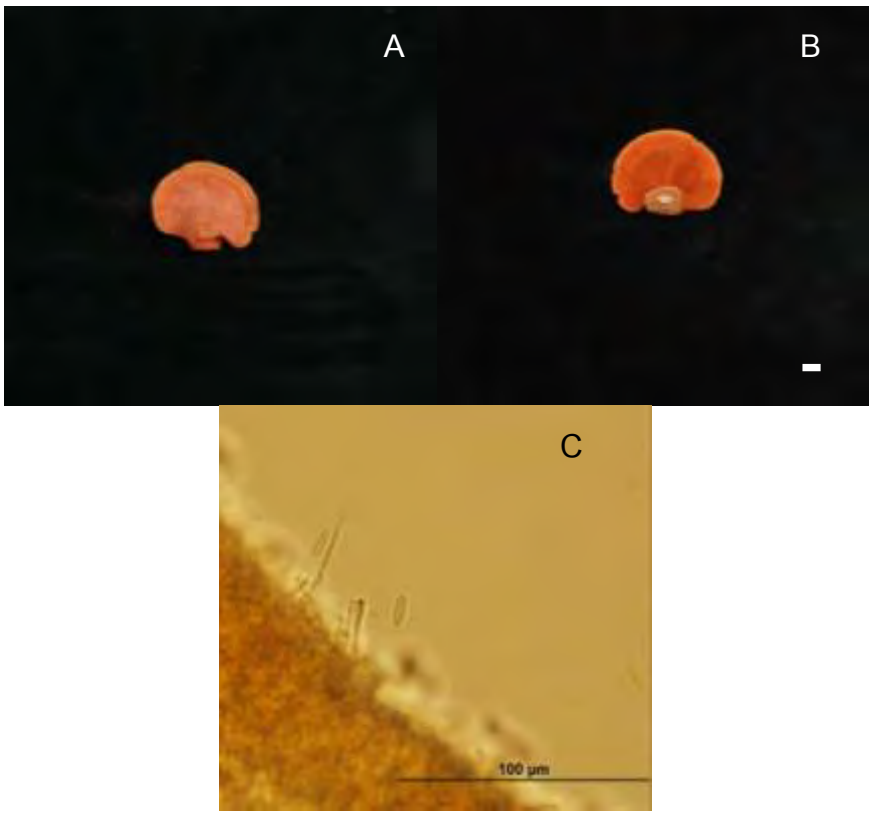
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์รียาว เรียบ ผนังบางชั้ นเดียว ขนาดกว้าง 2-3 ไมโครเมตร ยาว 3-4 ไมโครเมตร (รูปที่ 21 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Dimitic

4.2.4.14 *P. coccineus* (Fr.) Bond. et. Sing. PB1




รูปที่ 22 ลักษณะดอกเห็ดของ *P. coccineus* (Fr.) Bond. et. Sing. PB1 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ(C) ลักษณะของสปอร์ (▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกเป็นรูปครึ่งวงกลมหรือคล้ายรูปพัด ขนาดดอกกว้าง 3-4 เซนติเมตร ยาว 2-3 เซนติเมตร ผิวเรียบ แบน สีส้มอมแดง ไม่มีริ้วรัศมี ขอบดอกเรียบ สีส้มอมแดง ลักษณะปากรูกลม สีส้มอ่อน ขนาด 4-5 รูต่อมิลลิเมตร มีก้านดอกเทียม เนื้อ เหนียว สีส้มอ่อนถึงส้มอมแดง (รูปที่ 22 A-B)

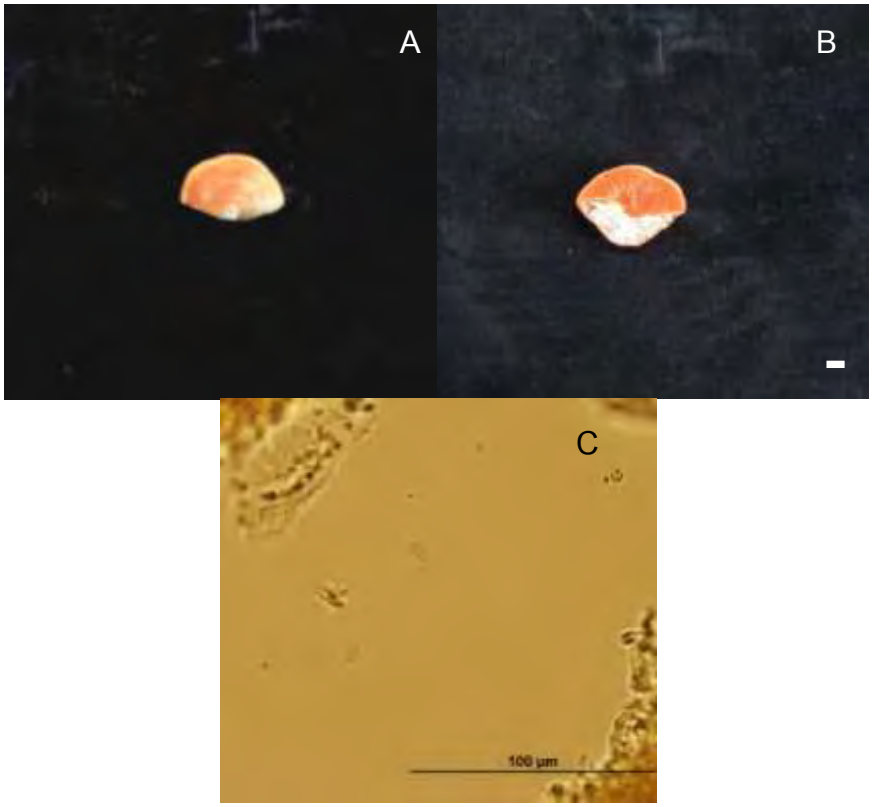
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์รียาว ผนังบางชั้นเดียว ขนาด 2-3 ไมโครเมตร ยาว 3-4 ไมโครเมตร (รูปที่ 22 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Dimitic

4.2.1.15 *P. sanguineus* (L. ex Fr.) Murr. MHS3




รูปที่ 23 ลักษณะดอกเห็ดของ *P. sanguineus* (L. ex Fr.) Murr. MHS3 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกเป็นรูปครึ่งวงกลมหรือคล้ายรูปพัด ขนาดดอกกว้าง 3-4 เซนติเมตร ยาว 2-3 เซนติเมตร ผิว ดอกเรียบ สีส้มถึงสีส้มอมแดง มีริ้วรัศมี (zonate) ขอบดอกเรียบ สีส้มอมเหลือง ลักษณะปากรูกลม สีส้มอมเหลือง ขนาด 5-7 รูต่อมิลลิเมตร ไม่มีก้านดอก เนื้อ เหนียว สีส้ม อมเหลือง (รูปที่ 23 A-B)

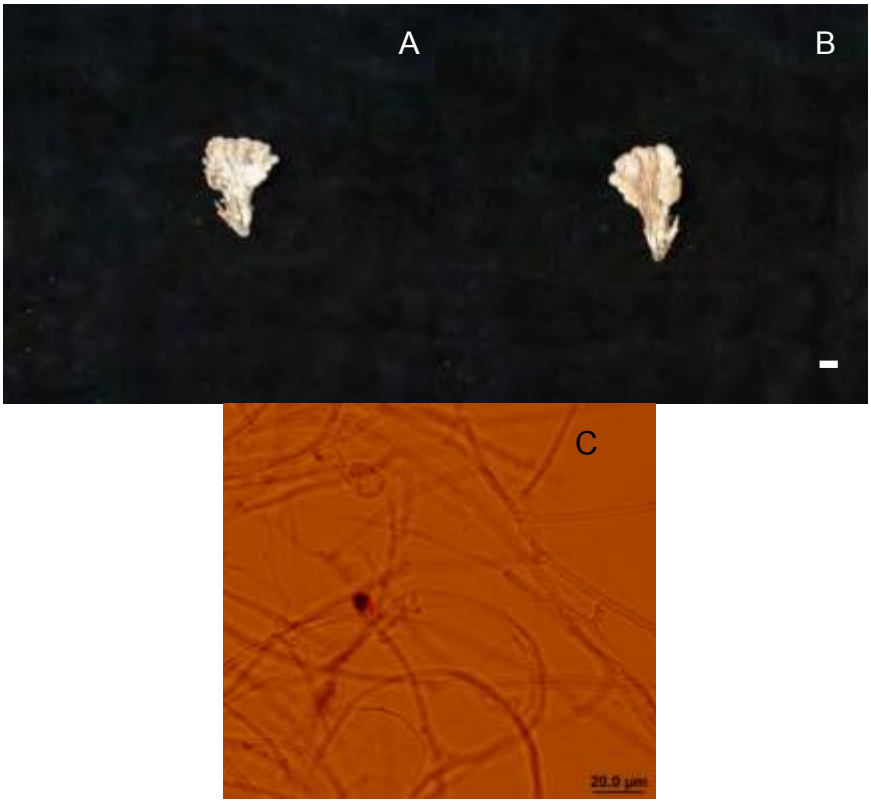
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์รียาว ผนังบางชั้นเดียว ขนาดกว้าง 3-4 ไมโครเมตร ยาว 4-5 ไมโครเมตร (รูปที่ 23 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Dimitic

4.2.1.16 *Schizophyllum commune* Fr. BK1




รูปที่ 24 ลักษณะดอกเห็ดของ *Schizophyllum commune* Fr. BK1 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของเส้นใย ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

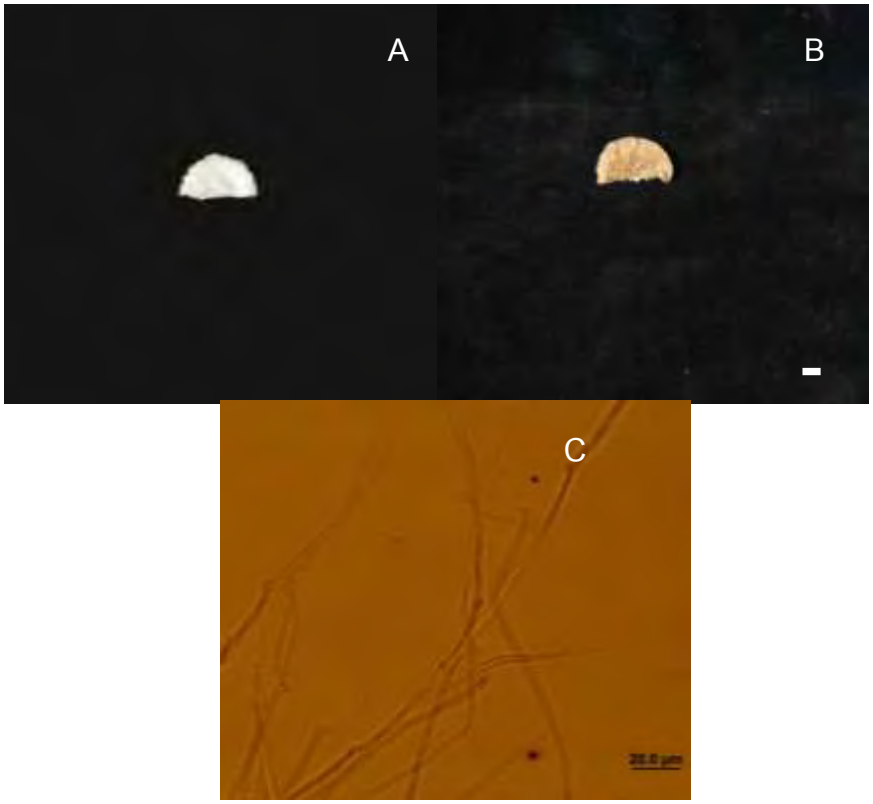
**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกคล้ายตีนตุ๊กแก ขนาดดอกกว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 5-6 เซนติเมตร ผิวไม่เรียบนูนจากกลางดอกจนถึงขอบดอก ขอบดอกงอลง มีสีขาวถึงขาวปนเทา มีครีบเรียงเป็นรัศมีไปจากฐานดอก แยกเป็นแฉกตามยาวและม้วนงอลงบริเวณขอบดอก มีก้านดอก ไม่อยู่กึ่งกลางดอก ขนาด 0.2-0.5 เซนติเมตร เนื้อ เหนียว สีขาว (รูปที่ 24 A-B)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Trimitic (รูปที่ 24 C)

4.2.1.17 *S. commune* Fr. BK2




รูปที่ 25 ลักษณะดอกเห็ดของ *S. commune* Fr. BK2 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของเส้นใย ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

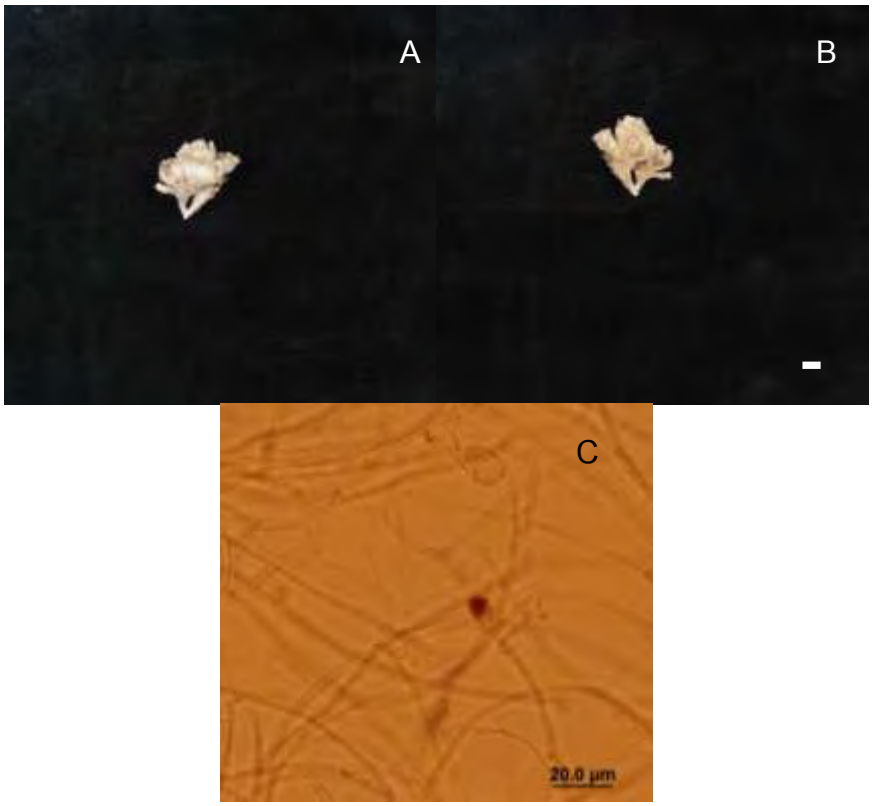
**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกคล้ายรูปพัด ขนาดดอกกว้าง 2-4 เซนติเมตร ยาว 2-3 เซนติเมตร ผิวไม่เรียบ นูนจากกลางดอกจนถึงขอบดอก ขอบดอกงอลง มีสีขาวถึงขาวปนเทา มีครีบเรียงเป็นรัศมีไปจากฐานดอก แยกเป็นแฉกตามยาวและม้วนงอลงบริเวณขอบดอก ไม่มีก้านดอก เนื้อ เหนียว สีขาว (รูปที่ 25 A-B)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Trimitic (รูปที่ 25 C)

4.2.1.18 *S. commune* Fr. CB4




รูปที่ 26 ลักษณะดอกเห็ดของ *S. commune* Fr. CB4 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของเส้นใย ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

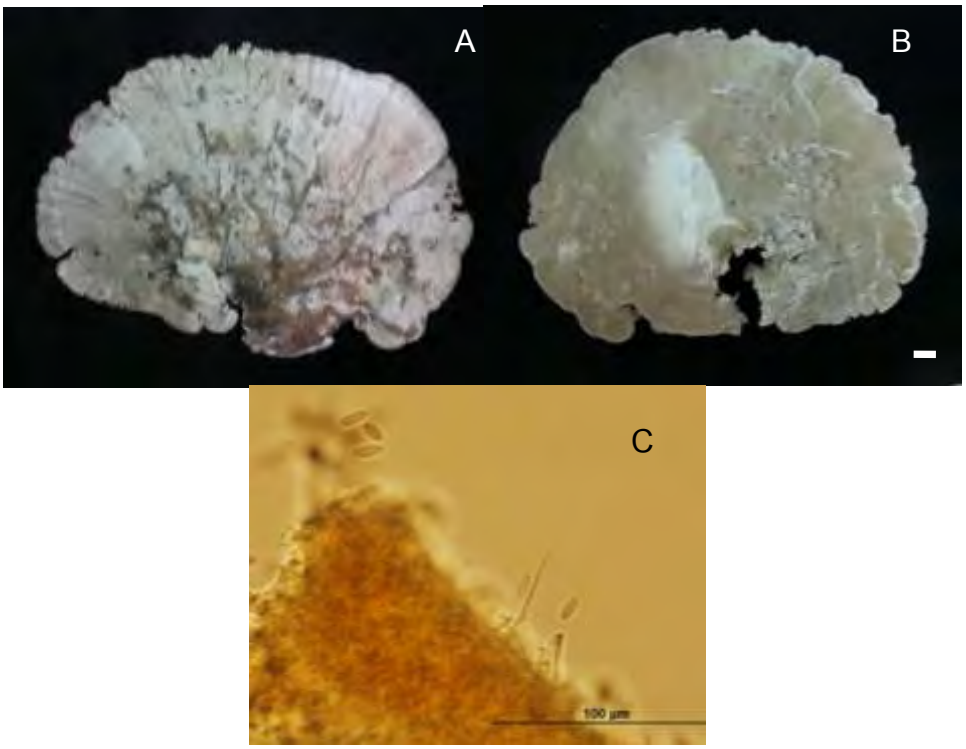
**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกคล้ายตีนตุ๊กแก ขนาดดอกกว้าง 3-4 เซนติเมรต ยาว 4-5 เซนติเมตร มีสองดอกซ้อนติดกัน ผิวไม่เรียบ มีลักษณะนูนจากกลางดอกจนถึงขอบดอก ขอบดอกงอลง มี สีขาวถึงขาวปนเทา มีครีบเรียงเป็นรัศมีไปจากฐานดอก เป็นแฉกตามยาวและม้วนงอลงบริเวณขอบดอก มีก้านดอกขนาด 0.2-0.3 เซนติเมตร เนื้อ เหนียว สีขาว (รูปที่ 26 A-B)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Trimitic (รูปที่ 26 C)

4.2.1.19 *Trametes elegans* (Spreng. ex Fr.) Fr. PJK1




รูปที่ 27 ลักษณะดอกเห็ดของ *Trametes elegans* (Spreng. ex Fr.) Fr. PJK1 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของสปอร์ ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกคล้ายรูปพัดโค้งเข้า ขนาดดอกกว้าง 32-35 เซนติเมตร ยาว 20-25 เซนติเมตร ผิวไม่เรียบ ขอบดอกหยัก มีสีขาวถึงขาวปนสีขาวครีม ลักษณะปากรูกลมถึงเหลี่ยม ขนาด 3-4 รูต่อมิลลิเมตร สีขาวถึงเหลืองอ่อน มีก้านดอกเทียม เนื้อ เหนียว สีขาว (รูปที่ 27 A-B)

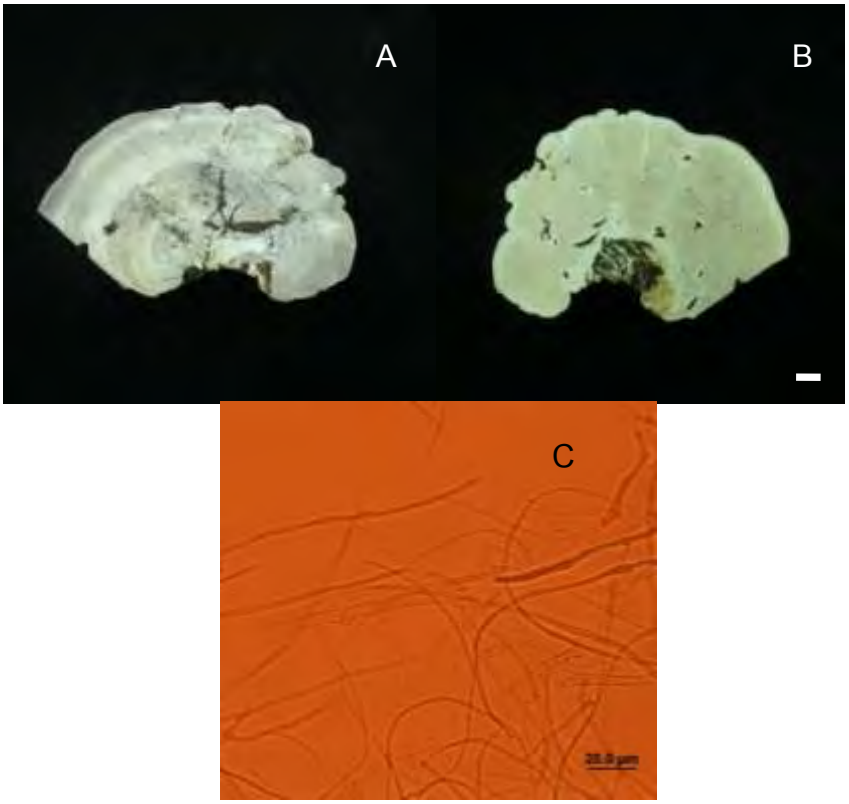
**ลักษณะสปอร์**

ลักษณะสปอร์ทรงกระบอกถึงรีรูปไข่ ผนังบางมีชั้นเดียว ขนาดกว้าง 2-3 ไมโครเมตร ยาว 7-8 ไมโครเมตรเมตร (รูปที่ 27 C)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Trimitic

4.2.1.20 *Trametes* sp. BK3




รูปที่ 28 ลักษณะดอกเห็ดของ *Trametes* sp. BK3 (A) ด้านหน้า (B) ด้านหลัง และ (C) ลักษณะของเส้นใย ( ▬ แสดงความยาว 1 เซนติเมตร)

**โครงสร้างดอก**

ลักษณะดอกเป็นรูปครึ่งวงกลมหรือคล้ายรูปพัด ขนาด ดอกกว้าง 16-17 เซนติเมตร ยาว 11-12 เซนติเมตร มีริ้วรัศมี (zonate) ขอบหยัก ผิวสีขาวถึงขาวปนเทา ลักษณะปากรูกลมถึงรี ขนาด 2-3 รูต่อมิลลิเมตร ไม่มีก้านดอก เนื้อ แข็ง เหนียว สีขาว (รูปที่ 28 A-B)

**ลักษณะเส้นใย**

ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ Trimitic (รูปที่ 28 C)

**4.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์**

4.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง

นำเส้นใยบริสุทธิ์ของรากลุ่มราฟอกขาวทั้งหมด 20 ไอโซเลต มาตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์ โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA ที่เติม ABTS เพื่อทดสอบการสามารถในการสร้าง ABTS-oxidizing enzymes พบว่าราทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถสร้างแลคเคสได้โดยสังเกตจากการเกิดวงสีเขียวจนถึงสีม่วงรอบโคโลนีของรา และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีกับเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี พบว่ารา 16 ไอโซเลต มีค่าอัตราส่วนดังกล่าวมากกว่า 1 ส่วนอีก 4 ไอโซเลต มีค่าอัตราส่วนน้อยกว่า 1 โดย *G. lobatum* BK5 มีค่าอัตราส่วนดังกล่าวสูงที่สุด คือ 1.68 ในวันที่ 3 และ *S. commune* BK2 มีค่าอัตราส่วนดังกล่าวต่ำที่สุด คือ 0.78 ในวันที่ 4 (ตารางที่ 9)

สำหรับการสร้างแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ตรวจสอบได้โดยการเกิดวงสีน้ำตาลรอบโคโลนีของรา เมื่อเลี้ยงราบนอาหารสูตร PDA ที่เติม $MnCl_2.H_2O$ จากการทดลองพบว่าเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลต ไม่สร้างวงสีน้ำตาลรอบโคโลนีแม้ว่าจะทำการเลี้ยงถึง 14 วันก็ตาม แสดงว่าราทั้ง 20 ไอโซเลตนี้ ไม่มีการสร้างแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ในปริมาณที่จะตรวจสอบได้ด้วยวิธีนี้

4.2.2 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เชิงปริมาณ

ทำการเลี้ยงราที่สามารถสร้างแลคเคสจากข้อ 4.2.1 ในอาหารสูตร Basal Medium เพื่อทำการวัดแอกติวิตีของลิกนิโนไลติกเอนไซม์เชิงปริมาณ พบว่า *P. coccineus* KB4 *P. coccineus* PB1 และ *P. sanguineus* MHS3 สามารถสร้างแลคเคสได้มากที่สุด คือที่ 3.61±1.04 3.31±1.04 และ 2.65±0.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลตอื่น ๆ ส่วนใหญ่จะสร้างแลคเคสอยู่ในช่วง 0.02-0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และพบว่า ไม่สามารถตรวจสอบการสร้างแลคเคสของ *T. elegans* PJK 1 ได้ (ตารางที่ 10) ทั้งนี้ราส่วนใหญ่จะมีแลคเคสแอกติวิตีสูงที่สุดประมาณวันที่ 8 ของการเลี้ยง สำหรับแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส พบว่า สามารถวัดแอกติวิตีของแมงกานีส เพอร์-ออกซิเดสได้ 11 ไอโซเลต โดย *P. coccineus* PB1 สามารถสร้างแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ได้มากที่สุด คือที่ 0.13±0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไอโซเลตที่เหลือส่วนใหญ่จะสร้างแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสอยู่ในช่วง 0.01-0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 11)

ส่วนลิกนิน เพอร์ออกซิเดส พบว่า ไม่สามารถตรวจพบแอกติวิตีของลิกนิน เพอร์ออกซิเดส ของราทั้ง 20 ไอโซเลต

ตารางที่ 9 ความสามารถในการสร้างแลคเคสของรา 20 ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA ที่มีการเติม ABTS ความเข้มข้น 250 ppm เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

| รา | เส้นผ่านศูนย์กลางของวงสี/เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี | อัตราส่วน | วันที่แสดงอัตราส่วนสูงที่สุด |
|---|---|---|---|
| *Ganoderma australe* NKP2 | 4.32/3.14 | 1.22 | 4 |
| *G. australe* NKS4 | 4.57/3.73 | 1.38 | 3 |
| *G. australe* PTN3 | 3.80/2.50 | 1.52 | 3 |
| *G. dahlii* CB24 | 3.53/3.20 | 1.10 | 3 |
| *G. lobatum* BK5 | 3.70/2.20 | 1.68 | 3 |
| *G. lobatum* RED6 | 3.40/2.00 | 1.54 | 3 |
| *G. lucidum* NKP3 | 4.50/3.63 | 1.24 | 6 |
| *G. lucidum* NRM9 | 4.80/3.93 | 1.22 | 6 |
| *G. lucidum* RED2 | 4.80/3.90 | 1.23 | 6 |
| *Microporus xanthopus* CB2 | 7.07/9.00 | 0.79 | 7 |
| *Phellinus pachyphloeus* PJK2 | 1.67/1.27 | 1.32 | 2 |
| *Polyporus tenuiculus* KB1 | 2.13/1.60 | 1.33 | 2 |
| *Pycnoporus coccineus* KB 4 | 4.30/3.13 | 1.38 | 4 |
| *P. coccineus* PB1 | 5.73/3.97 | 1.44 | 4 |
| *P. sanguineus* MHS3 | 6.73/5.57 | 1.20 | 4 |
| *Schizophylum commune* BK1 | 5.83/6.97 | 0.84 | 6 |
| *S. commune* BK2 | 2.60/3.33 | 0.78 | 4 |
| *S. commune* CB4 | 7.10/8.07 | 0.88 | 7 |
| *Trametes elegans* PJK1 | 4.30/3.23 | 1.38 | 3 |
| *Trametes* sp. BK3 | 4.50/3.63 | 1.24 | 4 |

ตารางที่ 10 แลคเคสแอกติวิตีของรา 20 ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

| รา | แลคเคสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) | วันที่สามารถสร้างแลคเคสได้มากที่สุด |
|---|---|---|
| *Ganoderma australe* NKP2 | 0.04±0.05 | 8 |
| *G. australe* NKS4 | 0.03±0.01 | 6 |
| *G. australe* PTN 3 | 0.03±0.00 | 8 |
| *G. dahlii* CB24 | 0.03±0.00 | 6 |
| *G. lobatum* BK5 | 0.03±0.01 | 6 |
| *G. lobatum* RED6 | 0.03±0.01 | 6 |
| *G. lucidum* NKP3 | 0.04±0.01 | 8 |
| *G. lucidum* NRM9 | 0.02±0.00 | 8 |
| *G. lucidum* RED2 | 0.03±0.01 | 8 |
| *Microporus xanthopus* CB2 | 0.02±0.00 | 10 |
| *Phellinus pachyphloeus* PJK2 | 0.02±0.03 | 8 |
| *Polyporus tenuiculus* KB1 | 0.03±0.02 | 8 |
| *Pycnoporus coccineus* KB4 | 3.61±1.04 | 8 |
| *P. coccineus* PB1 | 3.31±1.04 | 8 |
| *P. sanguineus* MHS3 | 2.65±0.13 | 6 |
| *Schizophylum commune* CB4 | 0.02±0.00 | 8 |
| *S. commune* BK1 | 0.02±0.00 | 10 |
| *S. commune* BK2 | 0.002±0.00 | 10 |
| *Trametes elegans* PJK 1 | ไม่สามารถตรวจสอบได้ | - |
| *Trametes* sp. BK3 | 0.03±0.05 | 6 |

ตารางที่ 11 แมงกานีส เพอร์ออกซิเดสแอกติวิตีของรา 20 ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

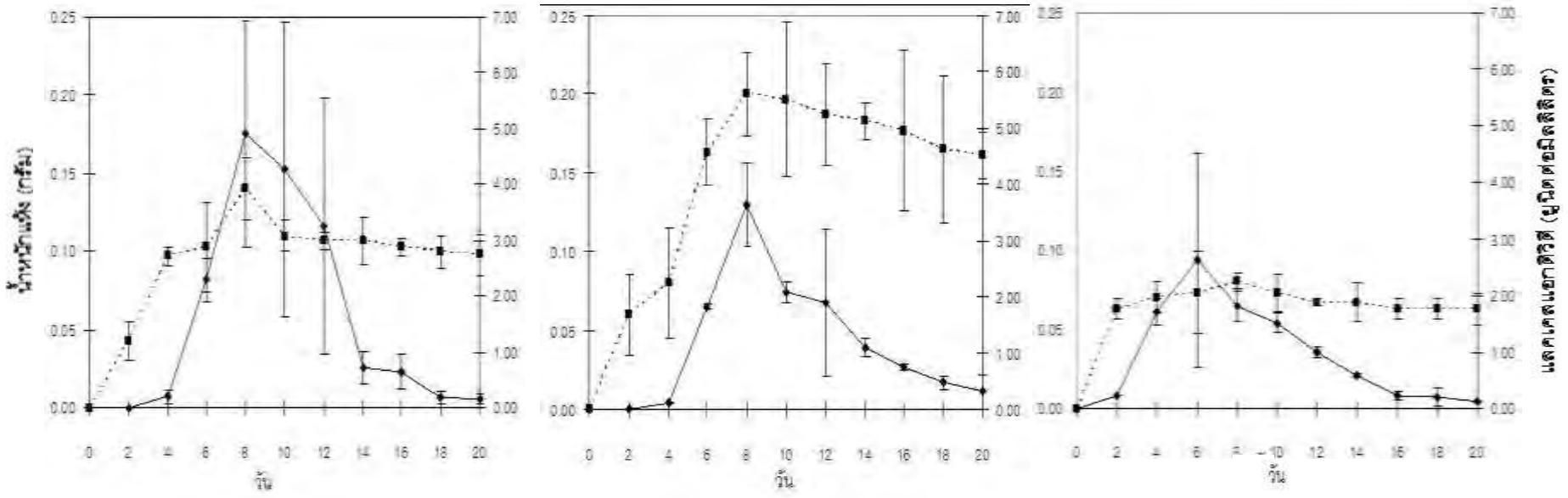
| รา | แมงกานีส เพอร์ออกซิ-เดสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) | วันที่สามารถสร้าง แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ได้มากที่สุด |
|---|---|---|
| *Ganoderma australe* NKP2 | ไม่สามารถตรวจสอบได้ | - |
| *G. australe* NKS4 | ไม่สามารถตรวจสอบได้ | - |
| *G. australe* PTN 3 | ไม่สามารถตรวจสอบได้ | - |
| *G. dahlii* CB24 | 0.02±0.00 | 4 |
| *G. lobatum* BK5 | ไม่สามารถตรวจสอบได้ | - |
| *G. lobatum* RED6 | ไม่สามารถตรวจสอบได้ | - |
| *G. lucidum* NKP3 | 0.01±0.00 | 10 |
| *G. lucidum* NRM9 | 0.02±0.00 | 10 |
| *G. lucidum* RED2 | 0.03±0.01 | 10 |
| *Microporus xanthopus* CB2 | ไม่สามารถตรวจสอบได้ | - |
| *Phellinus pachyphloeus* PJK2 | ไม่สามารถตรวจสอบได้ | - |
| *Polyporus tenuiculus* KB1 | ไม่สามารถตรวจสอบได้ | - |
| *Pycnoporus coccineus* KB4 | 0.04±0.01 | 10 |
| *P. coccineus* PB1 | 0.13±0.04 | 10 |
| *P. sanguineus* MHS3 | 0.03±0.02 | 10 |
| *Schizophylum commune* CB4 | 0.04±0.00 | 8 |
| *S. commune* BK1 | 0.05±0.00 | 8 |
| *S. commune* BK2 | 0.05±0.00 | 8 |
| *Trametes elegans* PJK 1 | 0.03±0.01 | 4 |
| *Trametes sp. BK3* | ไม่สามารถตรวจสอบได้ | - |

**4.3 การศึกษาการเติบโตของรา**

จากการวัดแอกติวิตีของแลคเคสในข้อ 4.2 พบว่า *P. coccineus* KB4 *P. coccineus* PB1 และ *P. sanguineus* MHS3 มีความสามารถในการสร้างแลคเคสได้มากที่สุด จึงทำการเลือกราทั้ง 3 ไอโซเลตนี้มาทำการศึกษาการเติบโตและช่วงเวลาของการผลิตแลคเคส พบว่า *P. coccineus* ทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถผลิตแลคเคสได้เมื่อเติบโตอยู่ในช่วง late log phase ถึง early stationary phase (วันที่ 4- 8) แต่เมื่อราเข้าสู่ late stationary phase (วันที่ 10-20) การผลิตแลค-เคสก็จะลดลง ในขณะที่ *P. sanguineus* MHS3 จะผลิตแลคเคสได้ดีในช่วง early stationary phase (วันที่ 2-6) โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างราทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่า *P. coccineus* PB1 สามารถเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร Basal Medium โดยมีน้ำหนักแห้งมากที่สุดในวันที่ 8 ที่ 0.20±0.03 กรัม และพบว่า *P. sanguineus* MHS3 มีการเติบโตน้อยที่สุด โดยมีน้ำหนักแห้งมากที่สุดในวันที่ 6 ที่ 0.073±0.03 กรัม สำหรับการผลิตแลคเคสพบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้ดีที่สุดในวันที่ 8 คือที่ 4.91±2.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 29 A) สำหรับ *P. coccineus* PB1 สามารถผลิตแลคเคสได้รองลงมาคือที่ 3.64±0.75 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 (รูปที่ 29 B) และ *P. sanguineus* MHS3 สามารถผลิตแลคเคสได้น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับราอีก 2 ไอโซเลต คือ 2.62±1.89 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 (รูปที่ 29 C)

**4.4 การศึกษาการเติบโตของราบนอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติม PAHs**

จากการศึกษาการเติบโตของรา *P. coccineus* KB4 *P. coccineus* PB1 และ *P. sanguineus* MHS3 บนอาหารสูตร Basal Medium Agar ที่มีการเติม PAHs คือ anthracene phenanthrene fluoranthene pyrene และ benzo(a)pyrene ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ PAHs แต่ละชนิดคือ 1 10 และ 100 ppm พบว่า ราทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถเติบโตได้บน PAHs ทุกชนิด และ PAHs ทุกชนิดมีผลยับยั้งการเติบโตของราทั้ง 3 ไอโซเลต โดยสังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโต พบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถทนต่อ PAHs ทุกชนิดได้ดีที่สุด และมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตต่ำที่สุด รองลงมาคือ *P. coccineus* PB1 และ *P. sanguineus* MHS3 ตามลำดับ (ตารางที่ 12) ทั้งนี้ราทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถทน anthracene ได้ดีกว่า PAHs ชนิดอื่น ๆ ในทุกความเข้มข้น โดย anthracene ที่ความเข้มข้น 100 ppm มีผลยับยั้งการเติบโตของ *P. coccineus* KB4 *P. coccineus* PB1 และ *P. sanguineus* MHS3 เท่ากับ 5.38 10 .97 และ 60.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับ phenanthrene fluoranthene pyrene และ benzo(a)pyrene พบว่ามีความเป็นพิษต่อราทั้ง 3 ไอโซเลต ค่อนข้างสูง โดยที่ความเข้มข้นเพียง 1 ppm สามารถยับยั้งการเติบโตได้ถึง 67-75 เปอร์เซ็นต์




A B C

รูปที่ 29 การเติบโตและการผลิตแลคเคสของ (A) *P. coccineus* KB4 (B) *P. coccineus* PB1 และ (C) *P. sanguineus* MHS3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium เป็นเวลา 20 วัน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ■ แสดงน้ำหนักแห้ง (กรัม) และ ◆ แสดงแลคเคสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

ตารางที่ 12 ผลของ PAHs ต่อการเติบโตของ *P. coccineus* KB4 *P. coccineus* PB1 และ *P. sanguineus* MHS3 เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร Basal Medium Agar ที่มีการเติม PAHs เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

| ความเข้มข้น (ppm) | ชนิดของ PAHs | *P. coccineus* KB4 | | *P. coccineus* PB1 | | *P. sanguineus* MHS3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.) | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโต | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.) | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโต | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.) | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโต |
| 0 | | 8.00±0.50 | 0 | 6.93±0.12 | 0 | 8.33±0.15 | 0 |
| 1 | Antracene | 7.53±0.40 | 5.88 | 6.57±0.12 | 5.19 | 7.27±0.15 | 12.73 |
| | Phenanthrene | 2.60±0.20 | 67.50 | 2.30±0.30 | 66.81 | 2.27±0.35 | 72.75 |
| | Fluoranthene | 2.27±0.10 | 71.63 | 2.20±0.15 | 68.25 | 2.07±0.06 | 75.15 |
| | Pyrene | 3.20±0.10 | 60.00 | 2.60±0.20 | 62.48 | 2.57±0.59 | 69.15 |
| | Benzo(a)pyrene | 2.13±0.15 | 73.38 | 2.10±0.10 | 69.70 | 2.07±0.15 | 75.15 |
| 10 | Antracene | 7.70±0.26 | 3.75 | 6.43±0.12 | 7.22 | 5.33±0.15 | 36.01 |
| | Phenanthrene | 2.10±0.10 | 73.75 | 1.87±0.32 | 73.02 | 2.00±0.20 | 75.99 |
| | Fluoranthene | 2.40±0.10 | 70.00 | 1.80±0.20 | 74.03 | 1.97±0.15 | 76.35 |
| | Pyrene | 2.30±0.06 | 71.25 | 2.00±0.20 | 71.14 | 2.03±0.20 | 75.63 |
| | Benzo(a)pyrene | 1.93±0.15 | 75.88 | 1.67±0.31 | 75.90 | 1.83±0.15 | 78.03 |

ตารางที่ 12 (ต่อ)

| ความเข้มข้น (ppm) | ชนิดของ PAHs | *P. coccineus* KB4 | | *P. coccineus* PB1 | | *P. sanguineus* MHS3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.) | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโต | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.) | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโต | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.) | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโต |
| 100 | Antracene | 7.57±0.40 | 5.38 | 6.17±0.06 | 10.97 | 3.33±0.12 | 60.02 |
| | Phenanthrene | 1.77±0.47 | 77.88 | 1.53±0.15 | 77.92 | 1.63±0.15 | 80.43 |
| | Fluoranthene | 1.67±0.15 | 79.13 | 1.47±0.12 | 78.79 | 1.30±0.10 | 84.39 |
| | Pyrene | 1.97±0.06 | 75.38 | 1.43±0.15 | 79.37 | 1.93±0.47 | 76.83 |
| | Benzo(a)pyrene | 1.53±0.21 | 80.88 | 1.13±0.06 | 83.69 | 1.20±0.10 | 85.59 |

**4.5 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส**

หลังจากทำการศึกษาการเติบโต การสร้างแลคเคส และความสามารถในการทนต่อ PAHs ของเชื้อราพบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถสร้างแลคเคสได้มากที่สุดและทน PAHs ได้ดีที่สุด จึงคัดเลือกราไอโซเลตนี้มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส โดยทำการปรับองค์ประกอบของอาหารสูตร Basal Medium และภาวะในการเลี้ยง ตามลำดับ ดังนี้

4.5.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เมื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 โดยการใช้กลูโคส ซูโครส และฟรุกโตส ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้มากที่สุดในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 4.31±0.46 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการเลี้ยง (รูปที่ 30 A) รองลงมาคือ อาหารที่มีฟรุกโตส 1.71±1.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 (รูปที่ 30 B) และผลิตแลคเคสได้น้อยที่สุดในอาหารที่มีซูโครส คือ 0.22±0.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 (รูปที่ 30 C) ส่วนการเติบโตของ *P. coccineus* KB4 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันพบว่า ในช่วง 8 วันแรกของการเลี้ยง การเติบโตของราไม่มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัด แต่เมื่อผ่านวันที่ 8 ของการเลี้ยงไปแล้ว การเติบโตของ *P. coccineus* KB4 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะลดลง ส่วนอาหารที่มีซูโครสการเติบโตจะลดลงหลังวันที่ 12 ซึ่งตรงกันข้ามกับอาหารที่มีฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า *P. coccineus* KB4 ยังสามารถเติบโตต่อไปได้แม้จะผ่านวันที่ 14 ของการเลี้ยงไปแล้ว โดยสรุป จะเห็นได้ว่า *P. coccineus* KB4 ยังคงสามารถผลิตแลคเคสได้มากที่สุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นฟรุกโตสและซูโครสจะทำให้ความสามารถในการผลิตแลคเคสลดลง

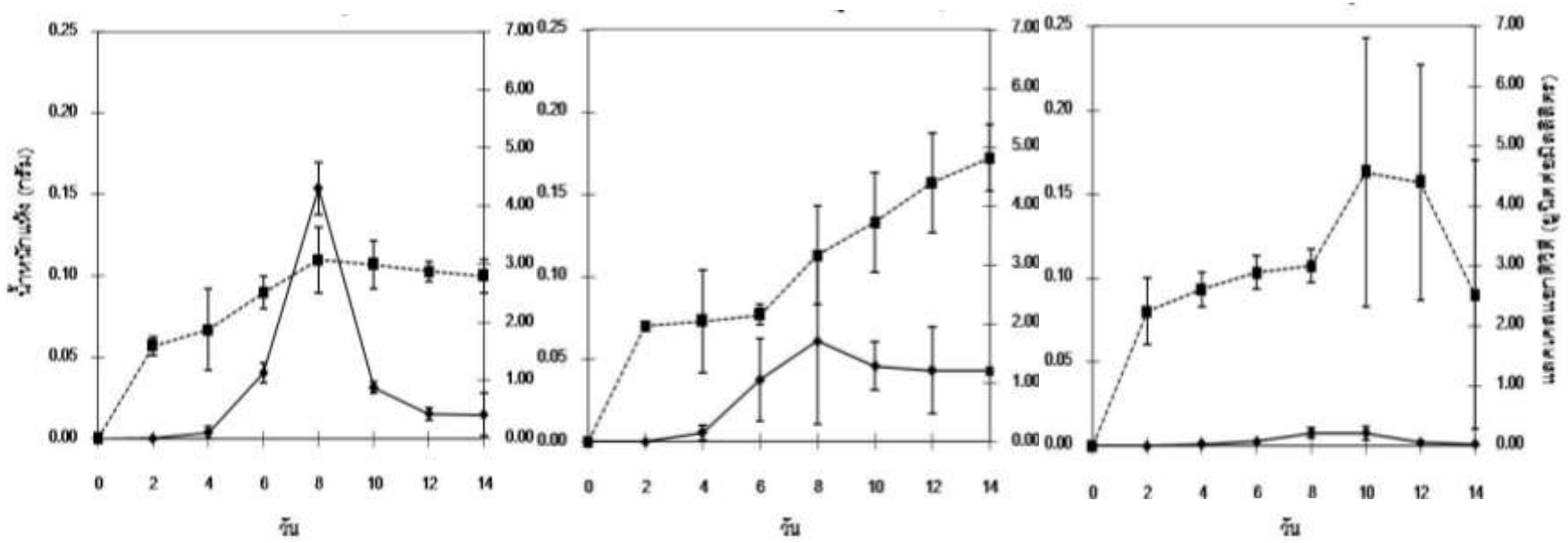
4.5.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เมื่อศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 โดยการใช้แอล-แอสพาราจีน เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้มากที่สุด ที่ 6.08±0.27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 (รูปที่ 31 B) รองลงมาคืออาหารที่มีแอล-แอสพาราจีน 4.53±0.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 (รูปที่ 31 A) และผลิตแลคเคสได้น้อยที่สุดในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.46±0.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 (รูปที่ 31 C) ส่วนการเติบโตของ *P. coccineus* KB4 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันพบว่า ในช่วง 8 วันแรกของการเลี้ยง *P. coccineus* KB4 สามารถเติบโตได้ดีในอาหารที่มีเปปโตนโดยมีน้ำหนักแห้งทั้งหมด 0.16±0.02 กรัม รองลงมาคือ แอล- แอสพาราจีน 0.11±0.01 กรัม และเติบโตได้น้อยที่สุดในอาหารที่มี

แอมโมเนียมซัลเฟตโดยมีน้ำหนักแห้ง 0.08±0.01 กรัม แต่เมื่อผ่านวันที่ 8 ไปแล้วการเติบโตของ *P. coccineus* KB4 ในอาหารที่มีเปปโตนจะลดลง ในขณะที่การเติบโตของ *P. coccineus* KB4 ในอาหารที่มีแอล-แอสพาราจีนและแอมโมเนียมซัลเฟตยังมีแนวโน้มคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง โดยสรุปจะเห็นได้ว่า *P. coccineus* KB4 สามารถเติบโตและผลิตแลคเคสได้ดีขึ้นเมื่อเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจากแอล-แอสพาราจีนมาเป็นเปปโตน

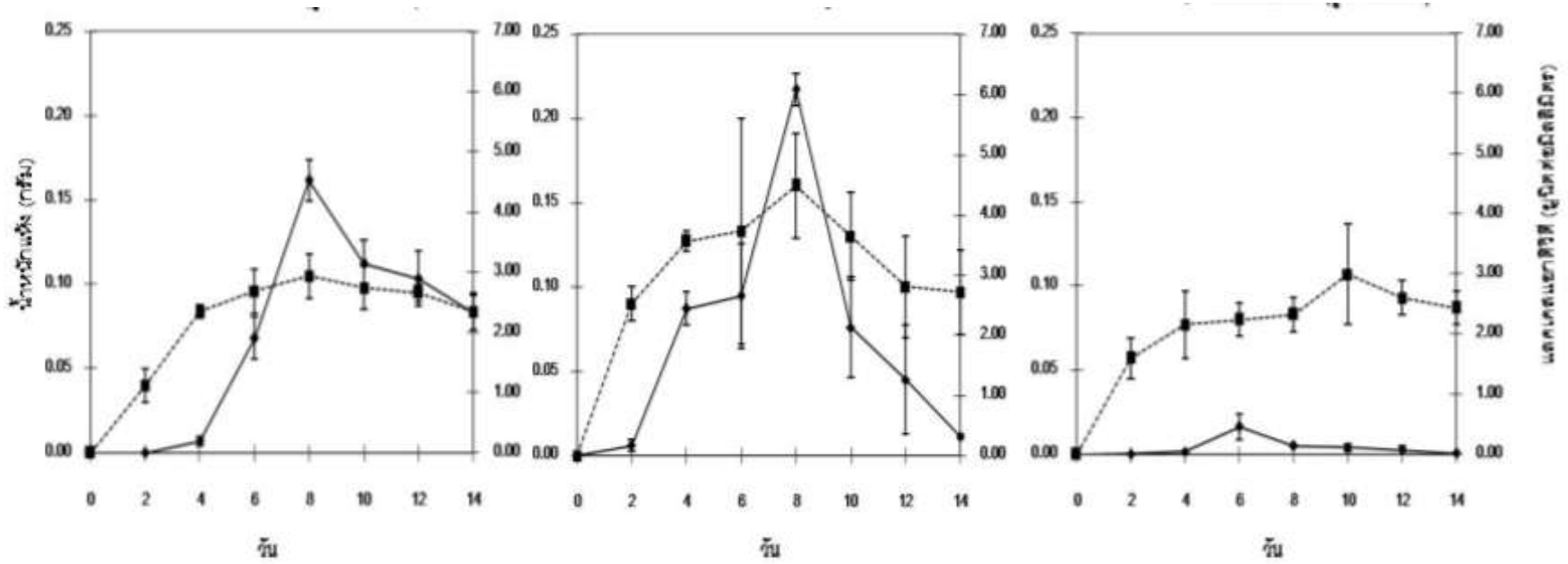
4.5.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 โดยเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ที่มีกลูโคสและเปปโตนเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 28 (เทียบเท่าอุณหภูมิห้อง) 30 40 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส คือ 6.05±0.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีการเติบโตสูงที่สุดด้วย โดยมีน้ำหนักแห้ง 0.20±0.02 กรัม ในวันที่ 8 (รูปที่ 32 A) แต่ *P. coccineus* KB4 จะมีการผลิตแลคเคสลดลงและช้าลง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 30 และ 40 องศา-เซลเซียส โดยผลิตแลคเคสได้ 5.80±0.50 และ 0.03±0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการเติบโตพบว่าลดลงเช่นกันโดยมีน้ำหนักแห้งสูงสุดที่ 0.13±0.10 กรัม ในวันที่ 8 และ 0.12±0.02 กรัม ในวันที่ 10 เมื่อเลี้ยงที่ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (รูปที่ 32 B และ 32 C) และสุดท้ายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถเติบโตได้น้อยมากโดยมีน้ำหนักแห้งสูงสุด 0.05±0.10 กรัม ของการเลี้ยงในวันที่ 8 และสามารถผลิตแลคเคสได้น้อยมากเพียง 0.002±0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 และหลังจากวันที่ 6 ของการเลี้ยงไม่สามารถตรวจพบการผลิตแลคเคสได้เลย (รูปที่ 32 D) โดยสรุปพบว่า *P. coccineus* KB4 ยังสามารถผลิตแลคเคสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งเทียบเท่าอุณหภูมิห้อง แต่การผลิตแลคเคสจะลดลงและช้าลง เมื่ออุณหภูมิของการเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้น



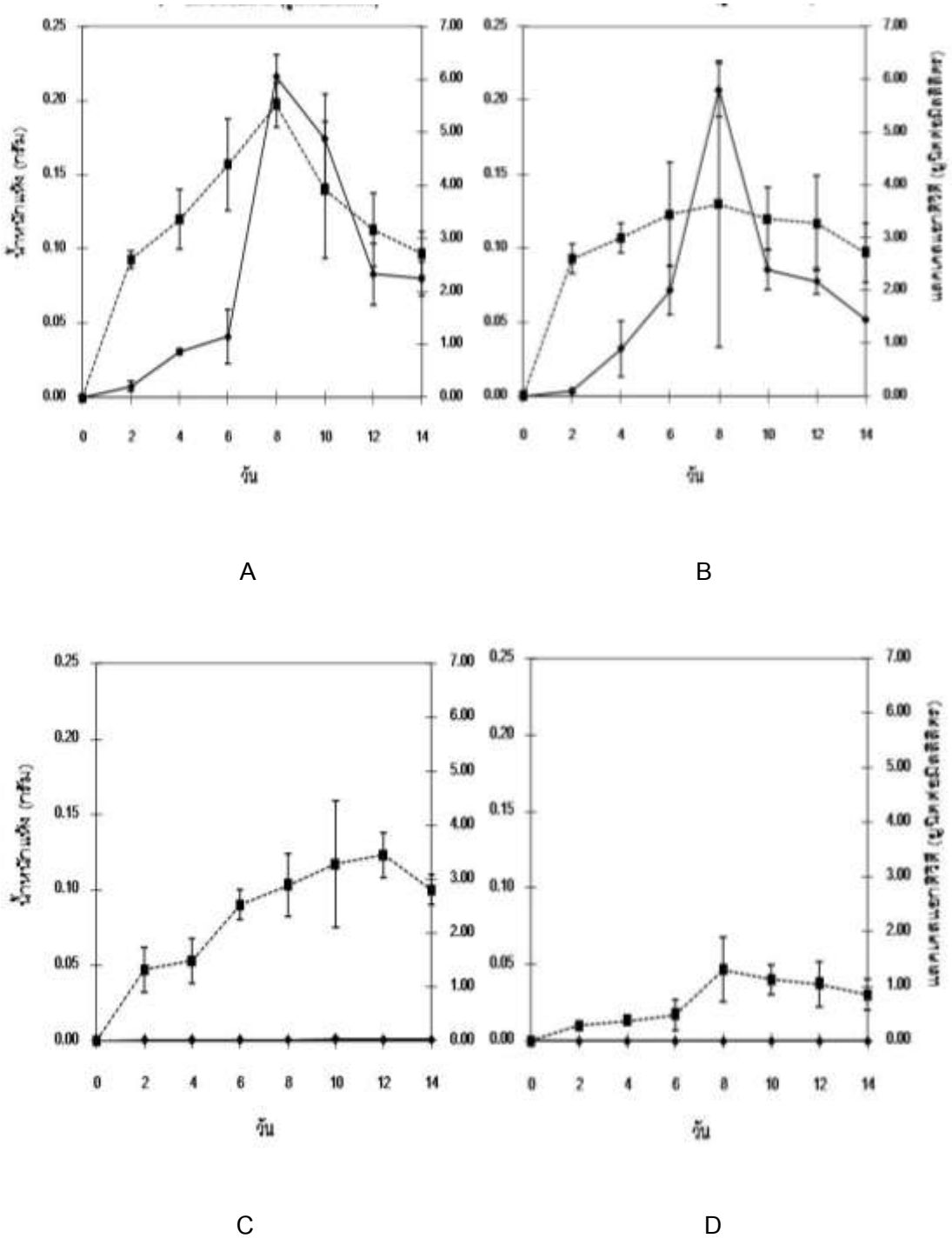

A B C

รูปที่ 30 การเติบโตและการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ที่มี (A) กลูโคส (B) ฟรุกโตส และ (C) ซูโครส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 14 วัน เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ···■··· แสดงน้ำหนักแห้ง (กรัม) และ —◆— แสดงแลคเคสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)




รูปที่ 31 การเติบโตและการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ที่มี (A) แอล-แอสพาราจีน (B) เปบโตน และ (C) แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน เป็นเวลา 14 วัน เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

■ แสดงน้ำหนักแห้ง (กรัม) และ ◆ แสดงแลคเคสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

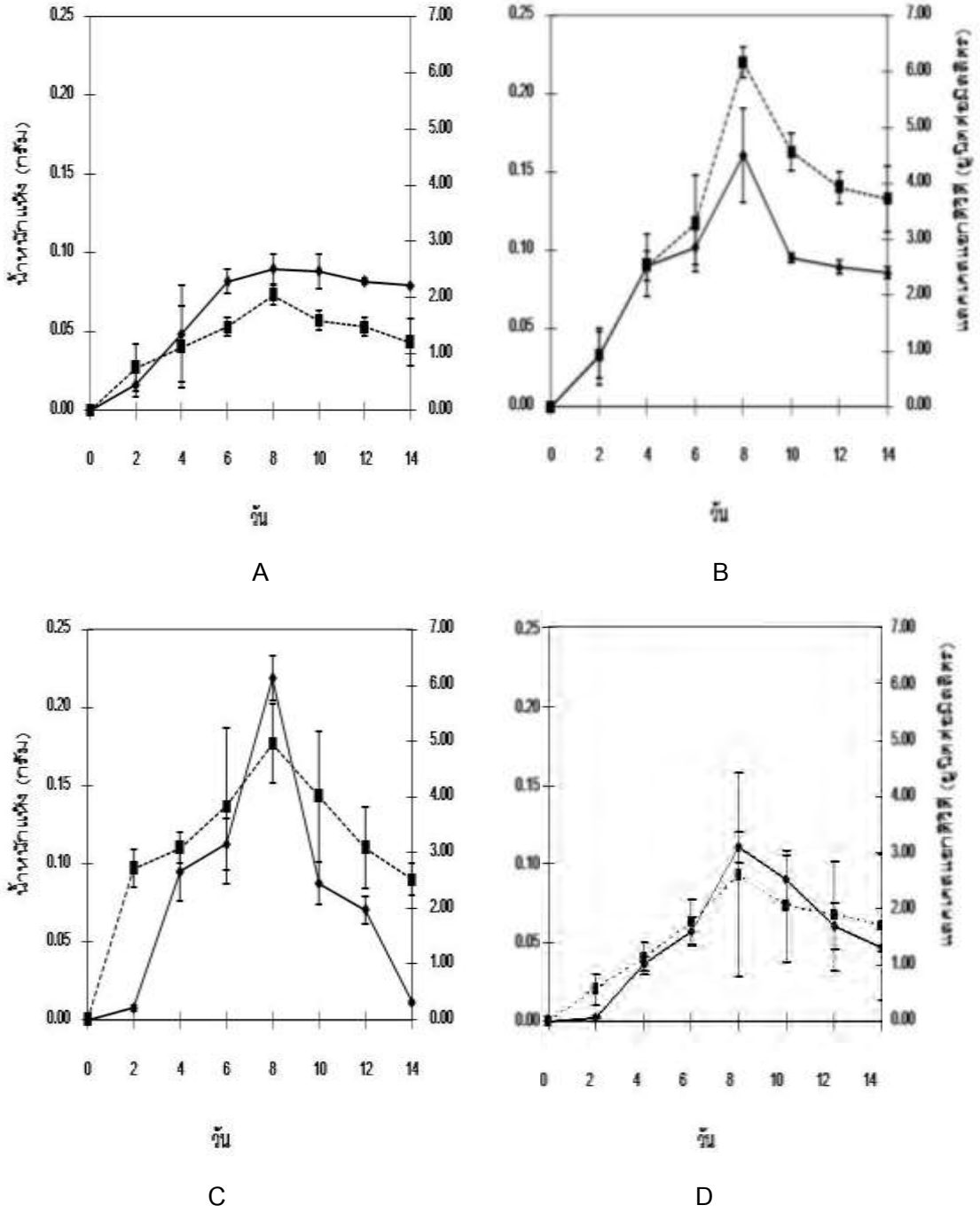



รูปที่ 32 การเติบโตและการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ที่มี กลูโคสและเปปโตน เป็นแหล่งคาร์บอนแ ละไนโตรเจน เป็นเวลา 14 วัน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ (A) 28 องศาเซลเซียส (B) 30 องศาเซลเซียส (C) 40 องศาเซลเซียส และ (D) 50 องศาเซลเซียส ·····■····· แสดงน้ำหนักแห้ง (กรัม) และ —◆— แสดงแลคเคสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

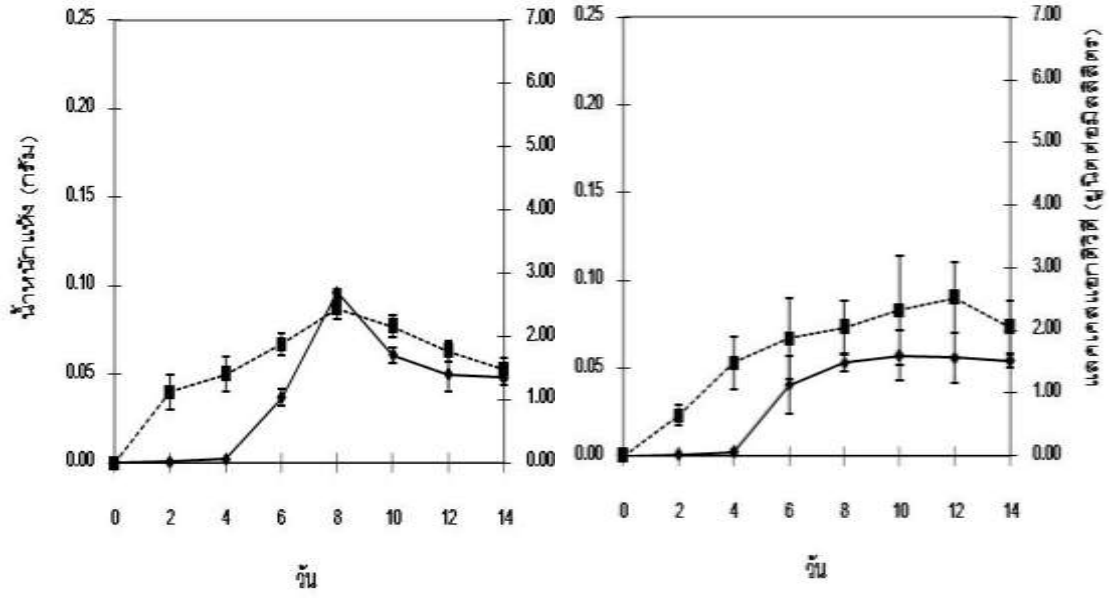
4.5.4 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

เมื่อศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการเติบโตและการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารสูตร Basal Medium ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน เป็น 3 4 5 6 7 8 และ 9 ก่อนทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้ดีที่สุด เมื่อความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 โดยมีแอกติวิตีสูงสุดเป็น 6.12±0.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 (รูปที่ 33 C) แต่ความสามารถในการผลิตแลคเคสจะลดลง เมื่อ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเบี่ยงเบนออกจาก 5 มากขึ้นเรื่อย ๆ เป็น 4 6 7 3 8 และ 9 คือที่ 4.50±0.84 3 .09±0.27 2.69±0.06 2 .51±0.006 2 .05±0.45 และ 1.60±0.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้น 8-9 *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้ช้าลง โดยมีแอก-ติวิตีสูงที่สุดในวันที่ 10 (รูปที่ 33 A-F) สำหรับการเติบโตของ *P. coccineus* KB4 ในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารต่าง ๆ กันพบว่า ที่ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4 ราสามารถเติบโตได้ดีที่สุดโดยมีน้ำหนักแห้ง 0.22±0.01 กรัม รองลงมาคือที่ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5 รามีน้ำหนักแห้ง 0.18±0.03 กรัม ส่วนที่ความเป็นกรดด่าง 3 6 7 8 และ 9 มีการเติบโตใกล้เคียงกันโดยมีน้ำหนักแห้ง อยู่ในช่วง 0.07-0.09 กรัม และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของการเติบโตกับการผลิตแลคเคสจะพบว่า ที่ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นสูงกว่า 6 ราจะสามารถผลิตแลคเคสได้น้อยและช้าลงซึ่งสอดคล้องกับการเติบโตที่ช้าลงด้วย โดยสรุปพบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้สูงสุดที่ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5 แต่การผลิตแลคเคสจะลดลงเมื่อความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารสูงขึ้นหรือลดลงมากกว่านี้

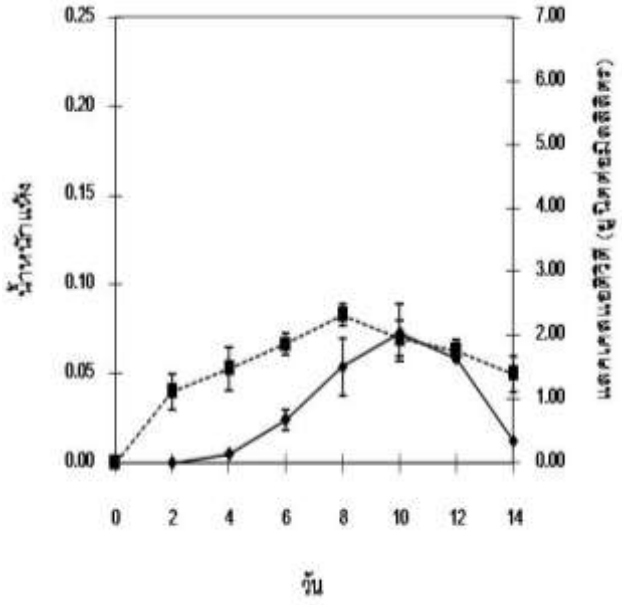
เมื่อประมวลผลจากการทดลองทั้งหมดพบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้มากที่สุดในอาหารสูตร Basal Medium ที่มีการปรับองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวคือ เปลี่ยนจากแอล-แอสพาราจีนมาเป็นเปปโตนที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับการใช้องค์ประกอบเดิมของ Basal Medium คือ กลูโคสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้นเป็น 5 และเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จะให้ค่าแอกติวิตีของแลคเคสสูงสุดเป็น 6.12±0.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ที่ไม่ผ่านการปรับแหล่งไนโตรเจนถึง 1.42 เท่า




รูปที่ 33 การเติบโตและการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ที่มี กลูโคสและเปปโตน เป็นแห ล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เป็นเวลา 14 วัน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่าง ๆ (A) pH 3 (B) pH 4 (C) pH 5 และ (D) pH 6 (E) pH 7 (F) pH 8 และ (G) pH 9 ···■··· แสดงน้ำหนักแห้ง (กรัม) และ —◆— แสดงแลคเคสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)


0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
0 2 4 6 8 10 12 14
วัน

E F


0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
0 2 4 6 8 10 12 14
วัน

G

รูปที่ 33 (ต่อ)

**4.6 การเตรียมแลคเคสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ**

4.6.1 การเตรียมแลคเคส

4.6.1.1 การทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน

เลี้ยงรา *P. coccineus* KB4 ในอาหารสูตร Basal Medium ที่มีการปรับองค์ประกอบจากข้อ 4.5 ปริมาตร 2 ลิตร นำมากรองแยกเส้นใยของราออกแล้วนำส่วนอาหารเหลวมาวัดแอกติวิตีของแลคเคสได้ 13,920 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีโปรตีน 460 มิลลิกรัม และแอกติวิตีจำเพาะ 30.26 ยูนิตต่อมิลลิกรัม หลังจากนั้นทำให้มีความเข้มข้นของแลคเคสสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตรา-ฟิลเตรชันโดยใช้ Viva Flow 250 ที่มี membrane cut off ที่ 10,000 Da แล้วนำมาวัดแอกติวิตีของแลคเคส ทั้งส่วนที่ผ่านและไม่ผ่านเมมเบรน พบว่า แอกติวิตีทั้งหมดของแลคเคสมีมากอยู่ในส่วนที่ไม่ผ่านเมมเบรนเท่ากับ 9,128 ยูนิต มีโปรตีน 224 มิลลิกรัม และแอกติวิตีจำเพาะ 40.75 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ส่วนที่ผ่านเมมเบรนมีค่าแอกติวิตีทั้งหมดของแลคเคสเท่ากับ 27.6 ยูนิต มีโปรตีน 24 มิลลิกรัม และแอกติวิตีจำเพาะ 1.15 ยูนิตต่อมิลลิกรัมและเปรียบเทียบแอกติวิตีของแลคเคสก่อนและหลังการอัลตราฟิลเตรชัน พบว่า วิธีการนี้ทำให้แลคเคสมีความเข้มข้นขึ้นถึง 1.64 เท่า

4.6.1.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

จากการตกตะกอนแลคเคสปริมาตร 200 มิลลิลิตร ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นในช่วง 0-20 20-40 40-60 60-80 และ 80-100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโปรตีนที่ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 60-80 เปอร์เซ็นต์ให้แอกติวิตีจำเพาะของแลคเคสสูงที่สุดคือ 490.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัม รองลงมาคือ โปรตีนทีตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 40-60 20- 40 และ 0-20 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแอกติวิตีจำเพาะของแลคเคส 104.33 35 .20 และ 20.74 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ สุดท้ายคือ โปรตีนที่ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 80-100 เปอร์เซ็นต์ มีแอกติวิตีจำเพาะของแลคเคส 11.98 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ซึ่งที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 60-80 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตถึง 12.20 เท่า (ตารางที่13)

ตารางที่ 13 การตกตะกอนของแลคเคสจาก *P. coccineus* KB4 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

| ช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต(เปอร์เซ็นต์) | Total volume (ml) | Activity (U/ml) | Total protein (mg) | Total activity (U) | Specific acitivity (U/mg) | purification factor |
|---|---|---|---|---|---|---|
| เอนไซม์หยาบ (ก่อนตกตะกอน) | 200 | 11.41 | 56.82 | 2,282.00 | 40.16 | 1.00 |
| 0-20 | 8 | 1.2 | 0.27 | 9.60 | 35.20 | 0.88 |
| 20-40 | 8.2 | 1.65 | 0.65 | 13.53 | 20.74 | 0.52 |
| 40-60 | 9.8 | 12.33 | 1.16 | 120.83 | 104.33 | 2.60 |
| 60-80 | 10 | 125.85 | 2.57 | 1,258.50 | 490.04 | 12.20 |
| 80-100 | 11.2 | 1.47 | 1.37 | 16.46 | 11.98 | 0.30 |

4.6.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์หยาบ

จากการศึกษาการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตพบว่า ช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 60-80 เปอร์เซ็นต์ ทำให้แลคเคสมีแอกติวิตีจำเพาะสูงที่สุด ดังนั้นจึงนำเอนไซม์ที่ได้จากช่วงความเข้มข้นนี้มาทำการศึกษาลักษณะสมบัติ ดังต่อไปนี้

4.6.2.1 การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

เมื่อศึกษาผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส โดยการปรับความเป็นกรดด่างของ reaction mixture ให้เป็น pH 3 4 5 6 7 8 และ 9 โดยคำนวณแอกติวิตีสัมพัทธ์เปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่วัดในภาวะปกติ (ใน 0.1 M glycine HCl buffer (pH 3.5)) สำหรับแลคเคส และใน 0.1 M sodium tartrate buffer (pH 5.0) สำหรับแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส พบว่า แลคเคสสามารถทำงานได้ดีที่สุดในช่วงความเป็นกรดด่าง 3.5-4 ใน 0.1 M glycine HCl buffer โดยมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ (relative activity) ที่ 100 และ 91.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 4-6 ใน 0.1 M sodium tartrate buffer มีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 71.81 62.35 และ 54.76 เปอร์เซ็นต์ และสุดท้ายที่ความเป็นกรดด่าง 6 และ 7 ใน 0.1 M sodium phosphate buffer มีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 1.91 และ 0.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับที่ความเป็นกรดด่าง 8-9 (0.1 M glycine sodium hydroxide buffer) ไม่พบแอกติวิตีของแลคเคสเลย (รูปที่ 34 A) สำหรับแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรดด่าง 5 ใน 0.1 M sodium tartrate buffer โดยมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ความเป็นกรดด่าง 4 และ 6 ใน 0.1 M sodium tartrate buffer โดยมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 75.19 และ 71.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อความเป็นกรดด่างสูงมากกว่า 6 แอกติวิตีของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส จะลดลง โดยที่ความเป็นกรดด่าง 9 (ใน 0.1 M glycine sodium hydroxide buffer) ไม่พบแอกติวิตีของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสเลย (รูปที่ 34 B) โดยสรุปได้ว่า ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานของแลคเคสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส คือ 3.5 และ 5 ตามลำดับ และเมื่อเปลี่ยนความเป็นกรดด่าง ให้สูงขึ้นหรือลดลงมากกว่านี้จะมีผลทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง

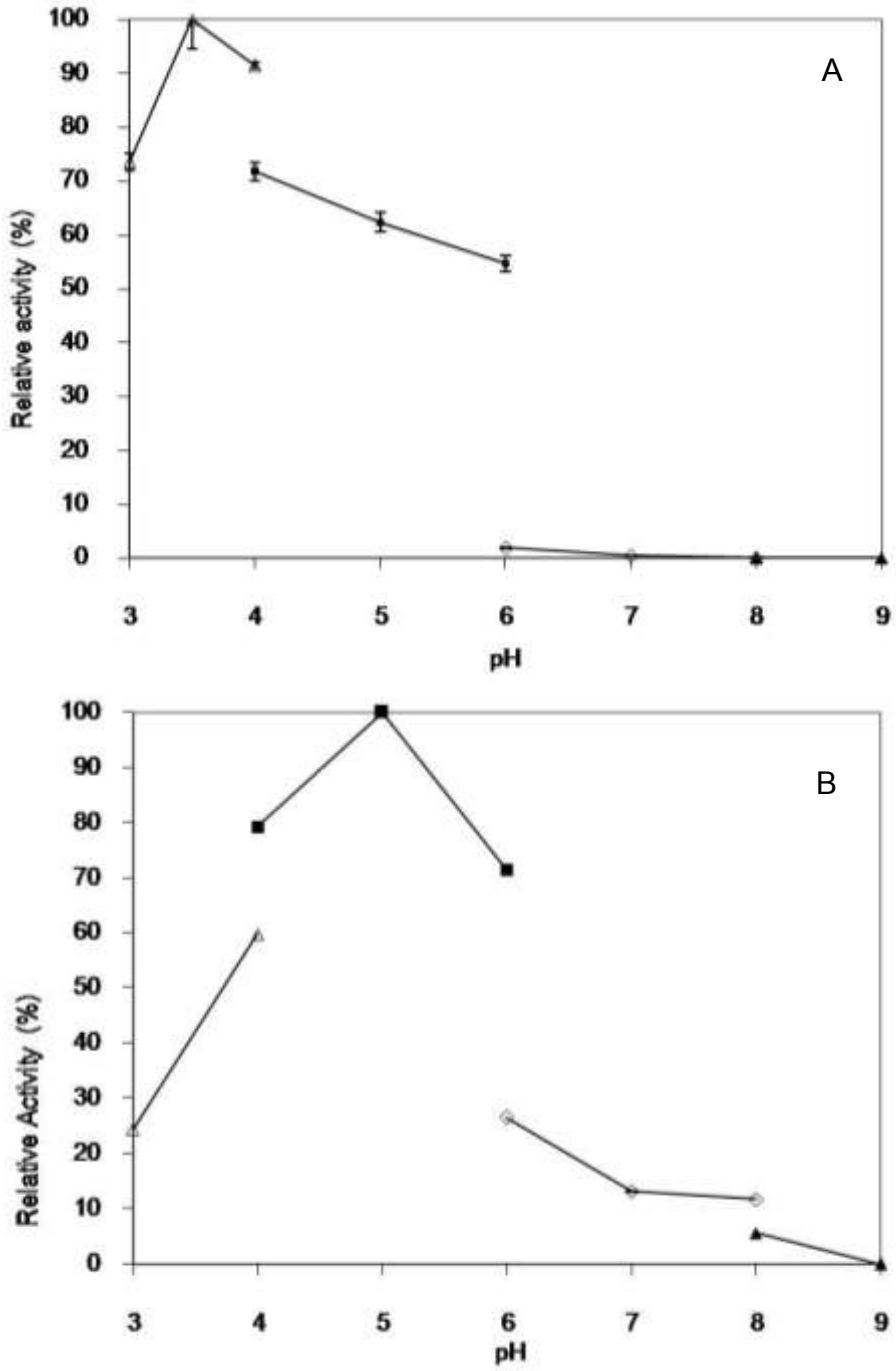
4.6.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์-ออกซิเดส โดยการบ่ม reaction mixture ที่อุณหภูมิ 28 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส คำนวณแอกติวิตีสัมพัทธ์เปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 องศา

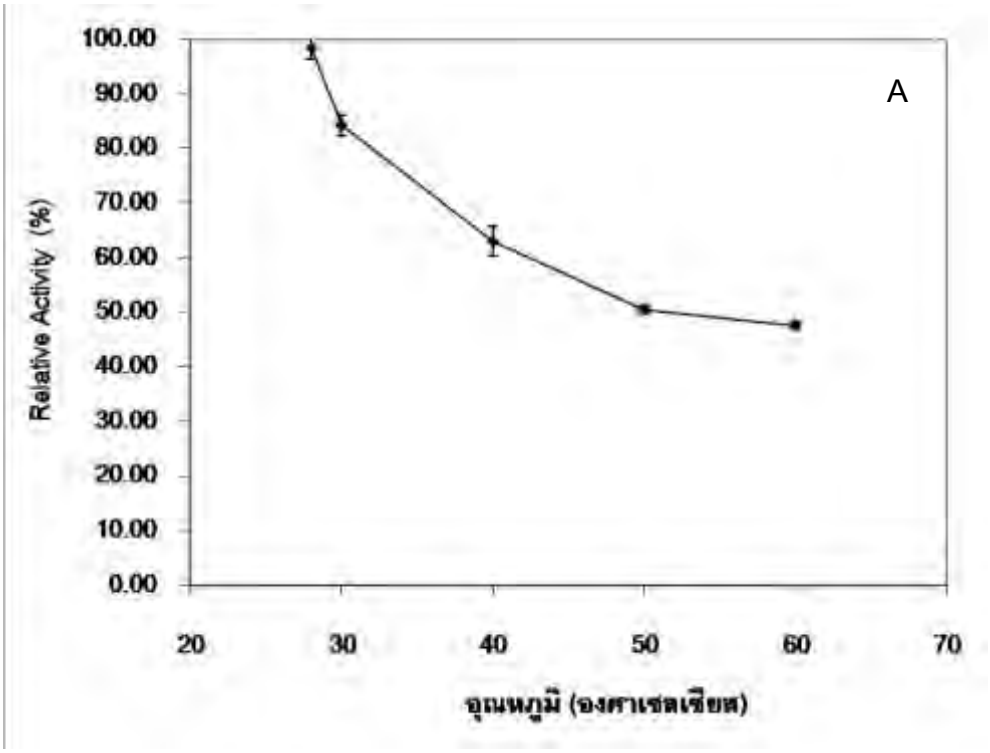
เซลเซียส) พบว่า แลคเคสทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิห้อง โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีผลทำให้การทำงานของแลคเคสลดลง โดยแลคเคสทำงานได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมี แอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 47.55 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 35 A) สำหรับแมงกานีส เพอร์ -ออกซิเดส พบว่า ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน มีแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส มีแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 98.09 และ 77.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทำงานได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส โดยมี แอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 47.45 และ 40.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 35 B) โดยสรุปได้ว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส คือ อุณหภูมิห้องหรือประมาณ 28 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีผลทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง

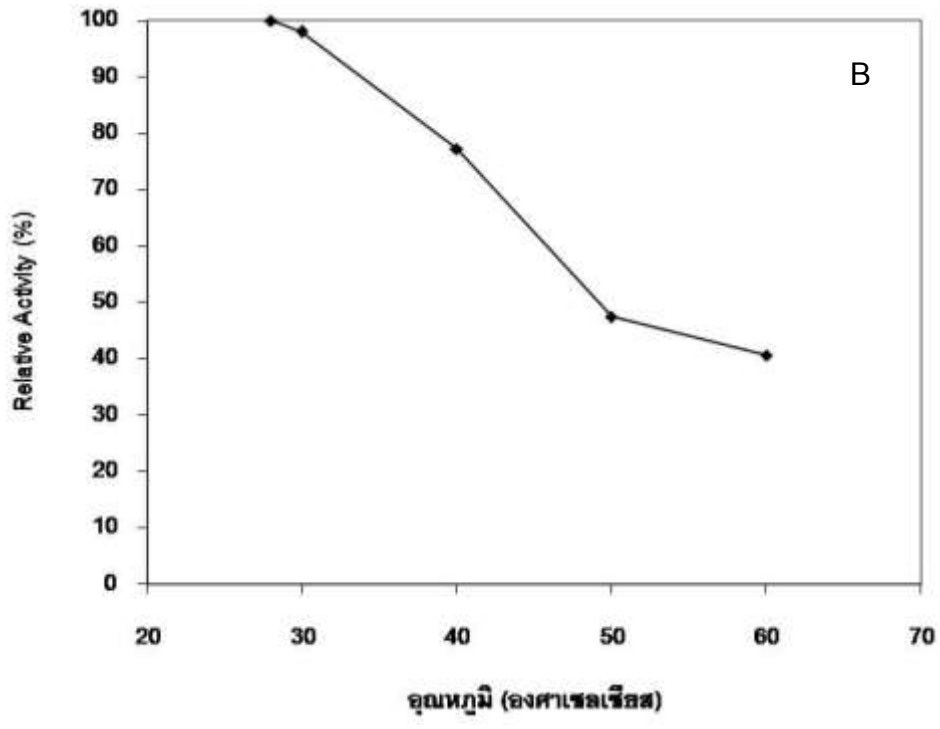
4.6.2.3 การศึกษาผลของไอออนที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

เมื่อศึกษาผลของไอออนที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออก-ซิเดส โดยการเติม $CuSO_4$ $MnSO_4$ $MgSO_4$ $ZnCl_2$ $CaCl_2$ $FeSO_4$ NaCl EDTA และ SDS ลงใน reaction mixture ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 mM และ 1 เปอร์เซ็นต์ (สำหรับ SDS) คำนวณแอกติ-วิตีสัมพัทธ์เปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่มีการเติมไอออน พบว่า $CuSO_4$ และ $MnSO_4$ มีผลยับยั้งการทำงานของแลคเคสเพียงเล็กน้อย โดยมีค่า แอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 99.07 และ 95.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ EDTA มีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 69.32 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ $MgSO_4$ $ZnCl_2$ $CaCl_2$ และ NaCl มีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 25.15 – 41.87 เปอร์เซ็นต์ ส่วน $FeSO_4$ และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของแลคเคสเกือบทั้งหมด โดยมีค่า แอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 2.15 และ 1.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 36) สำหรับแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส พบว่า $MnSO_4$ จะช่วยเพิ่มการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส โดยมี แอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 268.82 เปอร์เซ็นต์ $CaCl_2$ มีผลยับยั้งการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส เพียงเล็กน้อย โดยมีค่า แอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 95.03 เปอร์เซ็นต์ NaCl $MgSO_4$ $CuSO_4$ และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส บางส่วน โดยมีค่า แอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 81.59 81.14 70.43 และ 31.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ $ZnCl_2$ และ EDTA มีผลยับยั้งการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส เกือบทั้งหมด โดยมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 9.68 และ 6.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน $FeSO_4$ ไม่สามารถวัดแอกติวิตีของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสได้ เนื่องจากมีการเปลี่ยนสีของ reaction mixture (รูปที่ 36)

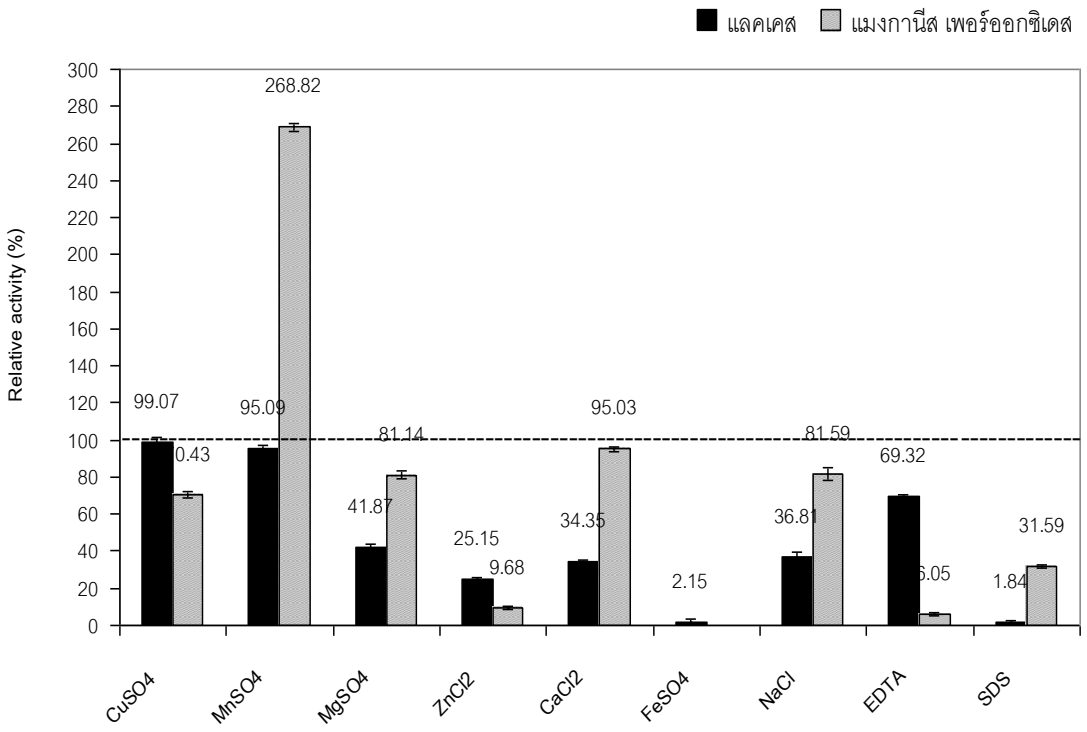



รูปที่ 34 ผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของ (A) แลคเคส และ (B) แมงกานีส เพอร์-ออกซิเดส เมื่อทำการปรับความเป็นกรดด่างของ reaction mixture ด้วย buffer ต่าง ๆ ค่าแอกติวิ-ตีสัมพัทธ์คำนวณโดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของ reaction mixture ที่บ่มใน 0.1 M glycine HCl buffer pH 3.5 ที่บ่มที่อุณหภูมิห้อง —△— แสดง 0.1 M glycine-HCl buffer (pH3-4) —■— แสดง 0.1 M sodium tartrate buffer (pH4-6) —◇— แสดง 0.1 M sodium phosphate buffer (pH6-8) และ —▲— แสดง 0.1 M glycine sodium hydroxide buffer (pH8-9)




รูปที่ 35 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของ (A) แลคเคส และ (B) แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส เมื่อทำการบ่ม reaction mixture ที่ความเป็นอุณหภูมิต่าง ๆ ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์คำนวณโดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของ reaction mixture ที่บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 องศาเซลเซียส)




รูปที่ 36 ผลของไอออนต่าง ๆ ที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสเมื่อเติมไอออนเหล่านี้ลงใน reaction mixture ที่ความเข้มข้น 10 mM และ 1 เปอร์เซ็นต์ (สำหรับ SDS) ก่อนทำการวัดแอกติวิตีตามปกติ ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์คำนวณโดยเปรียบเทียบกับการวัดแอกติวิตีปกติ ที่ไม่มีการเติมไอออน

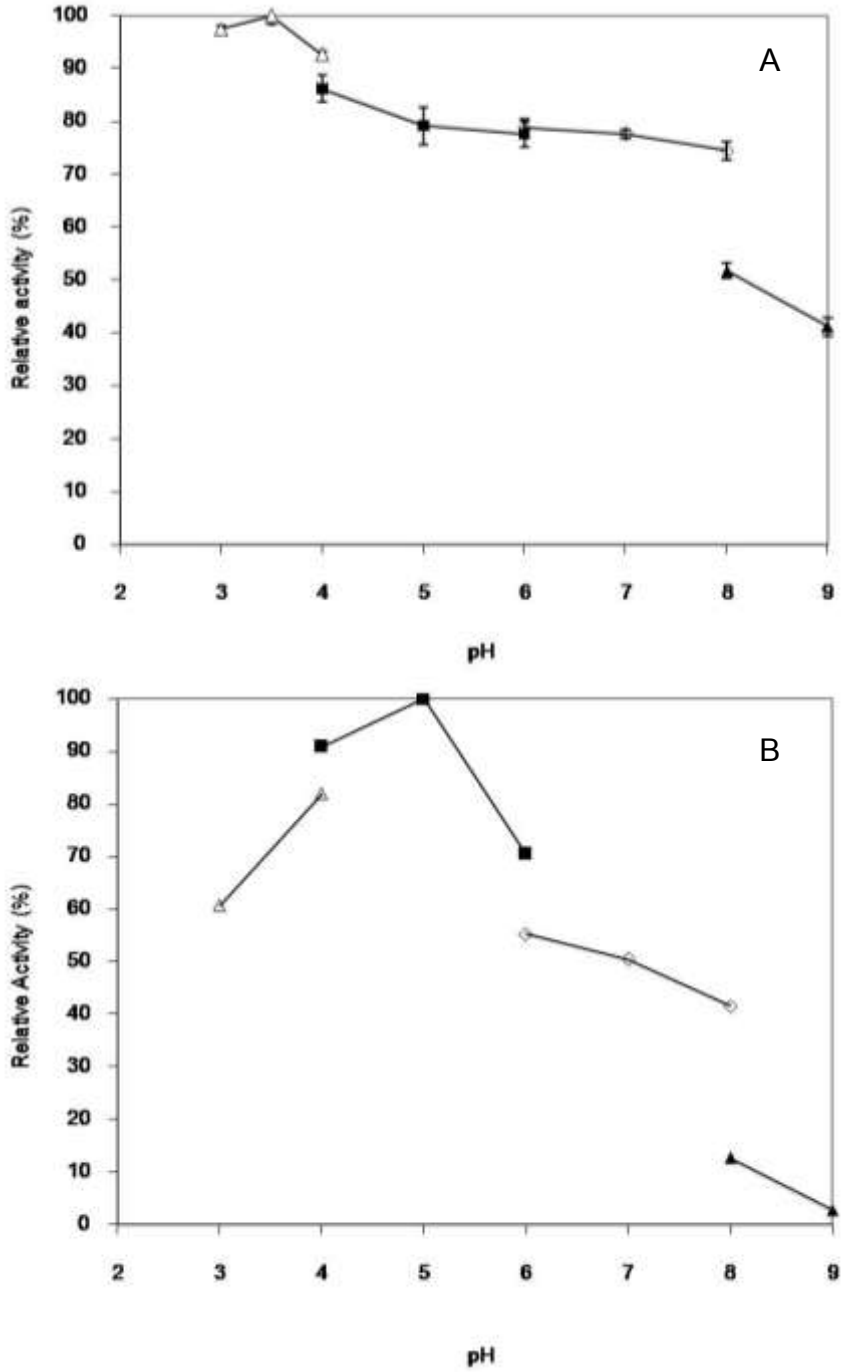
4.6.2.4 การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อความเสถียรของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

เมื่อศึกษาผลของความเป็นกรดด่าง ที่มีต่อความเสถียรของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส โดยการบ่มเอนไซม์ที่ pH 3 4 5 6 7 8 และ 9 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในภาวะปกติ คำนวณแอกติวิตีสัมพัทธ์เปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่อยู่ใน 0.1 M glycine HCl buffer (pH 3.5) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า แลคเคสมีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดด่าง 3 - 4 ใน 0.1 M glycine HCl buffer โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 97.45 (pH 3) 100 (pH 3.5) และ 92.70 (pH 4) เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือช่วงความเป็นกรดด่าง 4-8 แลคเคสจะเสียสภาพไปบางส่วน โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 86.22-77.63 เปอร์เซ็นต์ และแลคเคสจะเสียสภาพมากที่สุดที่ความเป็นกรดด่าง 8 และ 9 คือ มีแอกติวิตีสัมพัทธ์

51.75 และ 41.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 37 A) สำหรับแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส พบว่า มีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดด่าง 4-5 ใน 0.1 M sodium tartrate buffer โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 90.96 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือช่วงความเป็นกรดด่าง 4 และ 3 ใน 0.1 M glycine HCl buffer มีแอกติวิตีสัมพัทธ์ 81.97 และ 60.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความเสถียรน้อยที่สุดในช่วงความเป็นกรดด่าง 8 และ 9 คือ มีแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 12.66 และ 2.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 37 B) โดยสรุปได้ว่า ความเป็นกรดด่าง ที่แลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส มีความเสถียรมากที่สุด คือ 3.5 และ 5 ตามลำดับ และเมื่อเปลี่ยนความเป็นกรดด่างให้สูงขึ้นหรือลดลงมากกว่านี้จะมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพไป

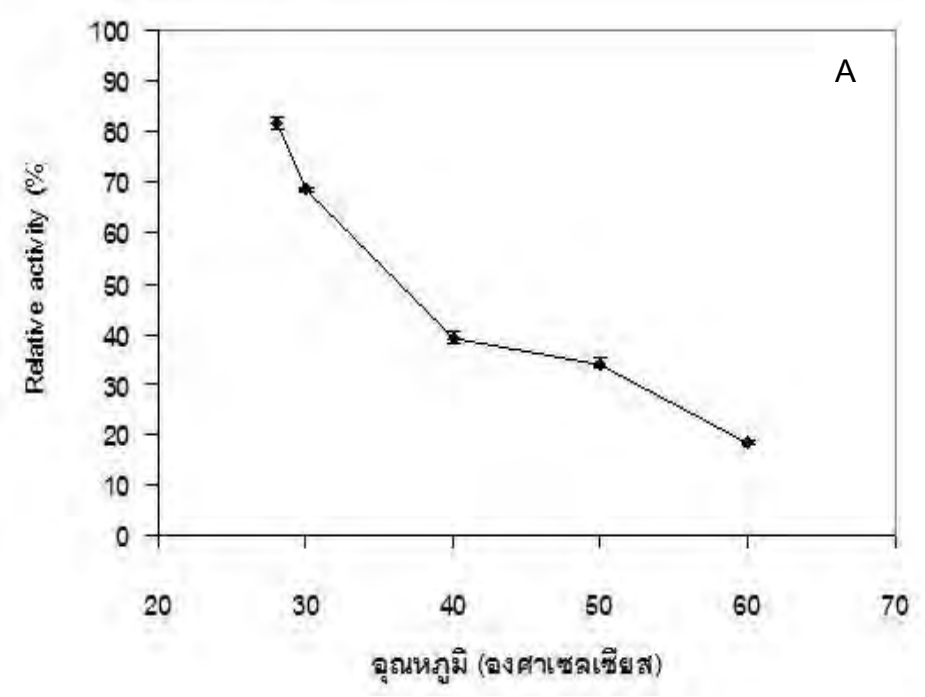
4.6.2.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

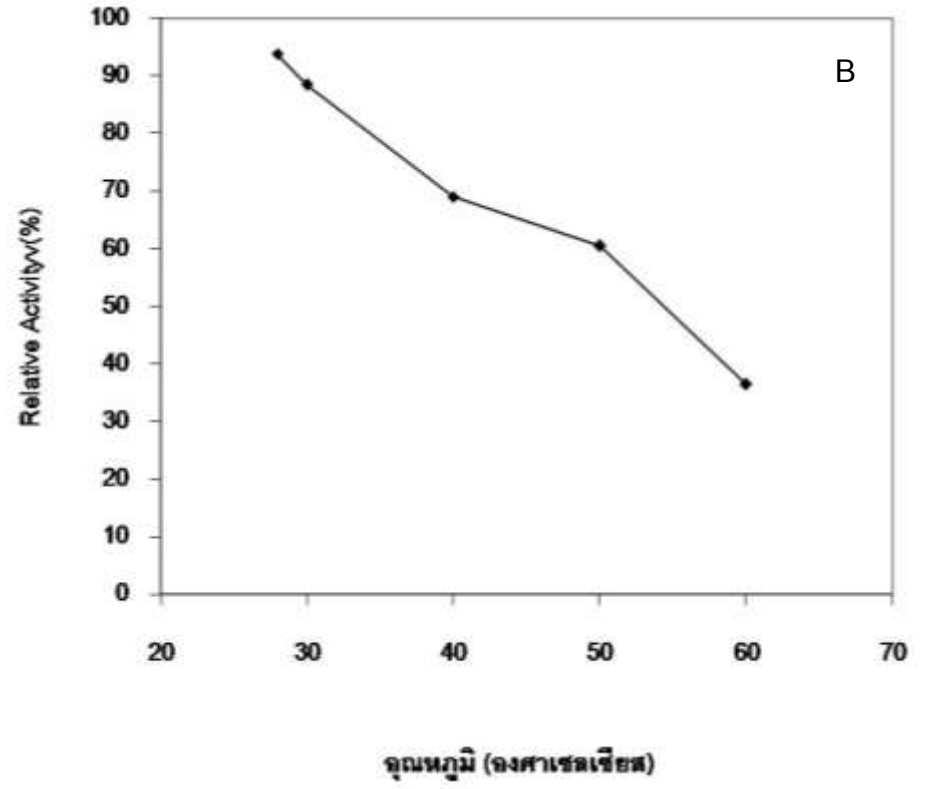
เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์-ออกซิเดส โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 28 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ในภาวะปกติ คำนวณแอกติวิตีสัมพัทธ์เปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า แลคเคสมีความเสถียรพอสมควรที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมี แอกติวิตีสัมพัทธ์ 81.71 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อ อุณหภูมิสูงขึ้น ความเสถียรของแลคเคสจะลดลงโดยที่อุณหภูมิ 30 40 และ 50 องศาเซลเซียส แลคเคสมีค่าแอก-ติวิตีสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 68.44-33.92 เปอร์เซ็นต์ และน้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์ 18.26 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 38 A) สำหรับ แมง กานีส เพอร์ออกซิเดส มีความเสถียรค่อนข้างสูงที่ช่วงอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส มี แอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 93.81 และ 88.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ความเสถียรของ แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส จะลดลงโดยที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส แมงกานีส เพอร์ ออกซิเดสมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 68.99-60.48 เปอร์เซ็นต์ และน้อยที่สุด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่แอกติวิตีสัมพัทธ์ 36.48 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 38 B) โดยสรุปได้ว่า แลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส จะมีความเสถียรมากที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีผลทำให้เอนไซม์ที่มีความเสถียรน้อยลง




รูปที่ 37 ผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อความเสถียรของ (A) แลคเคส และ (B) แมงกานีส เพอร์-ออกซิเดส เมื่อทำการบ่ม reaction mixture ใน buffer ที่มีความเป็นกรดด่างต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์คำนวณโดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่บ่มใน 0.1 M glycine HCl buffer pH 3.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส —Δ— แสดง 0.1 M glycine-HCl buffer (pH3-4) —■— แสดง 0.1 M sodium tartrate buffer (pH4-6) —◊— แสดง 0.1 M sodium

phosphate buffer (pH6-8) และ ▲ แสดง 0.1 M glycine sodium hydroxide buffer (pH8-9)



รูปที่ 38 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของ (A) แลคเคส และ (B) แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนทำการวัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิห้อง ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์คำนวณโดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซล-เซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนทำการวัดแอกติวิตี

**4.7 การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน**

4.7.1 การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน

4.7.1.1 การย่อยสลาย PAHs โดยการใช้แลคเคส

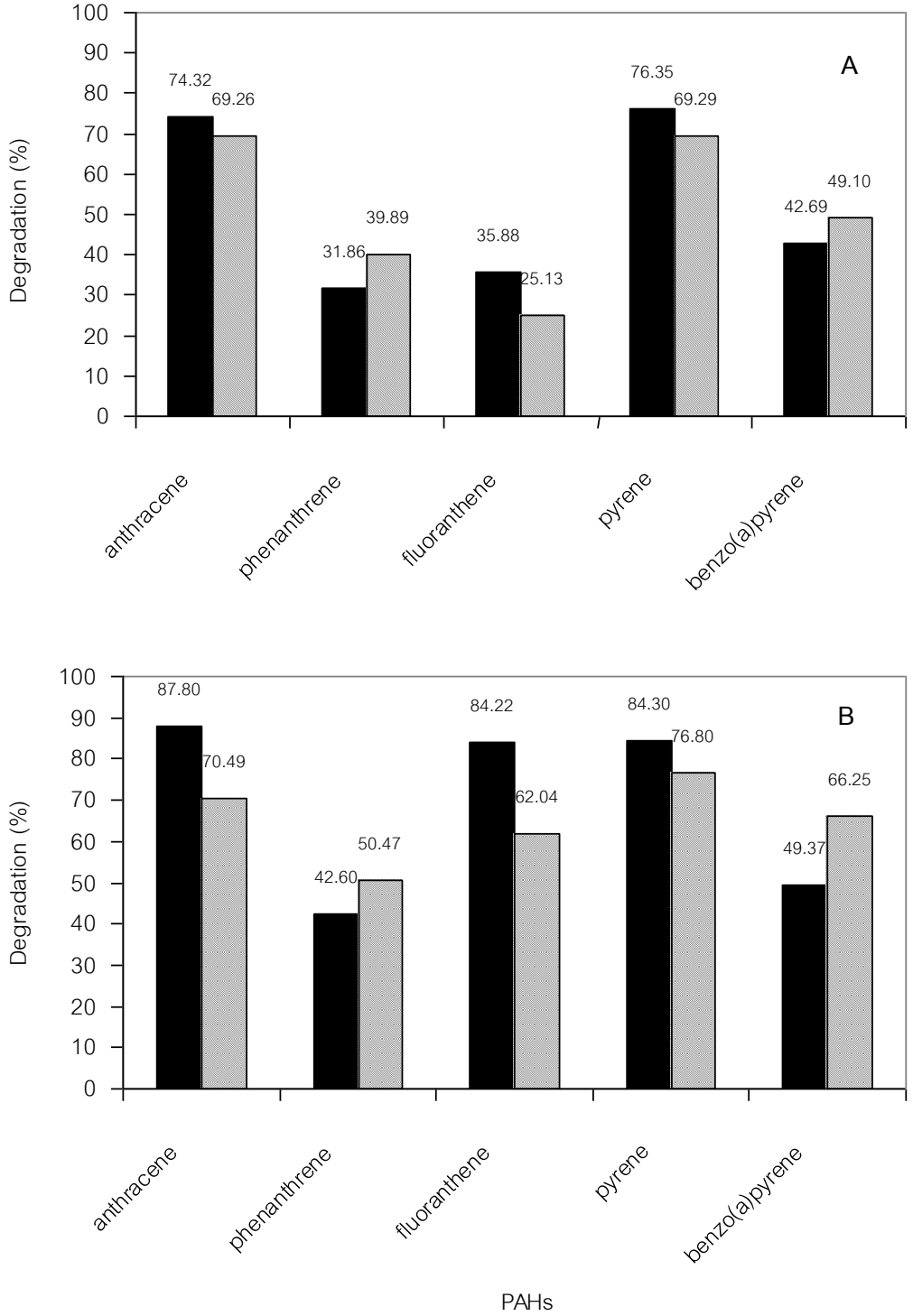
เมื่อศึกษาการย่อยสลาย PAHs 5 ชนิด ได้แก่ benzo(a)pyrene pyrene antracene phenanthrene และ fluoranthene ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ PAHs แต่ละชนิดคือ 100 ppm โดยใช้แลคเคสจาก *P. coccineus* KB4 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง แลคเคสสามารถย่อยสลาย pyrene และ anthracene ได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่ 76.35 และ 74.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ benzo(a)pyrene fluoranthene และ phenanthrene มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย 42.69 35 .88 และ 31.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 39 A) และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง แลคเคสสามารถย่อยสลาย anthracene pyrene และ fluoranthene ได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่ 87.80 84.30 และ 84.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ benzo(a)pyrene และ phenanthrene มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย 49.37 และ 42.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 39 B)

4.7.1.2 การย่อยสลาย PAHs โดยการใช้แลคเคสร่วมกับเมดิเอเตอร์ (mediator)

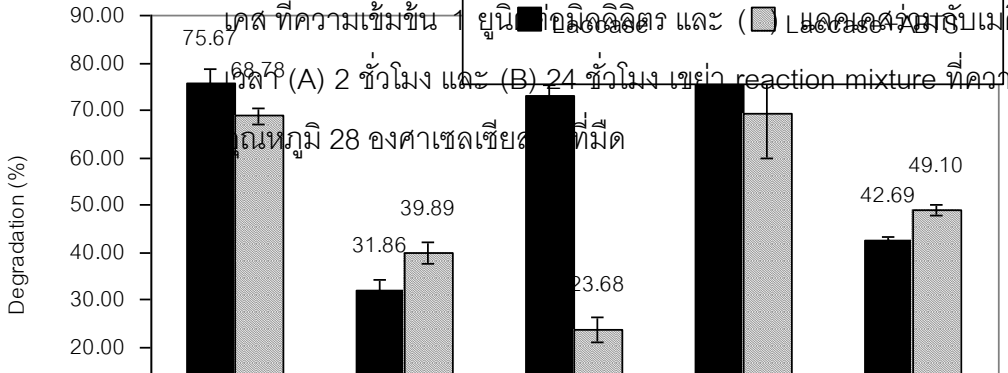
เมื่อศึกษาการย่อยสลาย PAHs 5 ชนิด ข้างต้น โดยใช้ แลคเคสจาก *P. coccineus* KB4 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ร่วมกับเมดิเอเตอร์คือ ABTS ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง แลคเคสสามารถย่อยสลาย pyrene และ anthracene ได้มากที่สุด เช่นเดียวกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การ ย่อยสลายที่ 69.29 และ 69.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ benzo(a)pyrene phenanthrene และ fluoranthene มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่ 49.10 39.89 และ 25.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 39 A) และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง แลคเคสสามารถย่อยสลาย pyrene และ anthracene ได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่ 76.80 และ 70.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ benzo(a)pyrene fluoranthene และ phenanthrene มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย 66.25 62.04 และ 50.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 39 B)

เมื่อพิจารณาผลของการใช้เมดิเอเตอร์ร่วมในการย่อยสลาย PAHs พบว่าจะขึ้นอยู่กับชนิดของ PAHs โดยเมดิเอเตอร์สามารถช่วยให้แลคเคสย่อยสลาย PAHs บางชนิดได้ดี

ขึ้น เช่น phenanthrene และ benzo(a)pyrene แต่การใช้เมดิเอเตอร์ไม่มีผลที่ชัดเจนต่อการย่อยสลาย pyrene ในขณะที่บางชนิดการเติมเมดิเอเตอร์กลับมีผลให้แลคเคสย่อยสลาย PAHs ได้น้อยลง เช่น anthracene และ fluoranthene และพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย PAHs จะขึ้นอยู่กับชนิดของ PAHs ด้วย โดยการย่อยสลาย pyrene กับ antracene ที่ 2 ชั่วโมง ให้ผลการย่อยสลายได้ใกล้เคียงกับที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่สำหรับ fluoranthene benzo(a)pyrene และ phenanthrene เมื่อบ่มให้นานขึ้นเป็น 24 ชั่วโมง จะให้ผลของการย่อยสลายดีกว่าที่เวลา 2 ชั่วโมง อย่างเห็นได้ชัด




รูปที่ 39 ผลของการย่อยสลาย PAHs แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm ด้วย (■) แลค-เคส ที่ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ (▨) แลคเคสร่วมกับเมดิเอเตอร์ (1mM ABTS) เป็นเวลา (A) 2 ชั่วโมง และ (B) 24 ชั่วโมง เขย่า reaction mixture ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส [illegible]



# บทที่ 5

# การอภิปรายผลการวิจัย

## 5.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย

5.1.1 การเก็บตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย พบว่าราในกลุ่มฟอกขาวจะเจริญอยู่บนไม้ผุ ตอไม้ หรือต้นไม้ เนื่องจากรากลุ่มนี้จะสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของไม้ได้ (Cerniglia, 1997) ซึ่งการเก็บตัวอย่างราในกลุ่มราฟอกขาวทั้งหมด 101 ตัวอย่าง สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้เพียง 20 ไอโซเลต เนื่องจากมีการปนเปื้อนของราชนิดอื่นบนดอกเห็ด เช่น *Penicillium* spp. และ *Aspergillus* spp. เป็นต้น รวมทั้งตัวอย่างราที่เก็บได้บางตัวอย่างไม่สมบูรณ์ เช่น ดอกเห็ดมีความแห้งมากทำให้เส้นใยไม่สามารถเจริญออกมาได้ หรือมีการกัดแทะของแมลง จึงไม่ประสบความสำเร็จในการแยกเส้นใยบริสุทธิ์

5.1.2 การจำแนกชนิด

ในการจำแนกชนิดของเห็ดรา จะต้องอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายด้านประกอบกัน เช่น ขนาดรูปร่าง และสีของดอกเห็ด สปอร์ รวมทั้งเส้นใย เป็นต้น ไม่สามารถใช้ลักษณะหนึ่ง ลัษณะใดมาทำการจำแนกชนิดของเห็ดได้ เนื่องจากจะเกิดความคลาดเคลื่อนในการจำแนกชนิด เมื่อ ทำการจำแนกชนิดของเห็ดราที่สามารถแยกเส้นใยที่บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 20 ไอโซ-เลต โดยทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดและสปอร์ร่วมกับลักษณะของเส้นใย ตามวิธีของ อนิวรรต เฉลิมพงษ์ (2541) และเปรียบเทียบลักษณะที่ตรวจสอบได้กับรูปวิธานของ Ryvarden และ Johansen (1980) และ Gilbertson และ Ryvarden (1987) และเอกสารอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง พบว่าราที่แยกได้จัดอยู่ในสกุลต่างๆ จำนวน 6 สกุล 19 ชนิด ได้แก่ *Ganoderma australe* NKP2 *G. australe* NKS4 *G. australe* PTN3 *G. dahlii* CB24 *G. lobatum* BK5 *G. lobatum* RED6 *G. lucidum* RED1 *G. lucidum* NKP3 *G. lucidum* NRM9 *Microporus xanthopus* CB2 *Phellinus pachyphloeus* PJK2 *Polyporus tenuiculus* KB1 *Pycnoporus coccineus* KB4 *P. coccineus* PB1 *P. sanguineus* MHS3 *Schizophyllum commune* BK1 *S. commune* BK2 *S. commune* CB4 และ *Trametes elegans* PJK1 โดยมี 1 ไอโซเลตที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ คือ *Trametes* sp. BK3 เนื่องจาก ลักษณะของสปอร์ไม่สอดคล้องกับลักษณะโครงสร้างของดอกเห็ด จึงไม่สามารถจัดจำแนกได้ ซึ่งราทั้ง 6 สกุล นี้ ได้มีรายงานการพบ

ในประเทศไทยแล้วทุกสกุล โดยมีรายงานถึงความหลากหลายของเห็ดราในประเทศไทย ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes ทั้งหมด 11 อันดับ 51 วงศ์ 154 สกุล และ 375 ชนิด (อนงค์ จันทร์-ศรีกุล, 2551; กมลชัย ชะเอม, 2546; Chairattanamanokorn et al., 2004) ซึ่งสกุลที่พบมากในประเทศไทยคือ *Ganoderma* โดยจะพบ *G. lucidum* เป็นส่วนใหญ่ (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2551; กมลชัย ชะเอม, 2546) ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษานี้ที่พบราในสกุล *Ganoderma* ถึง 9 ไอโซเลต นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบราในสกุล *Schizophyllum* และ *Microporus* ในประเทศไทยค่อนข้างมากด้วยเช่นกัน (Chanopas et al., 2006) เนื่องจากราในสกุลนี้มีความทนต่อภาวะของอากาศที่แห้งได้ดีจึงสามารถพบได้ทุกฤดูกาล (อนงค์ จันทร์ศรีกุล , 2551) ส่วนราในสกุล *Pycnoporus* นั้นมีรายงานว่า จะพบ *P. sanguineus* เป็นส่วนใหญ่เมื่อเทียบกับราชนิดอื่น ๆ ในสกุลเดียวกัน (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2551) แต่ในการศึกษานี้ยังนอกจากจะพบ *P. sanguineus* แล้วยังพบ *P. coccineus* ถึง 2 ไอโซเลตอีกด้วย

## 5.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์

5.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง

จากการตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์ โดยการเลี้ยงราทั้ง 20 ไอโซเลต บนอา หารที่เติม ABTS เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างแลคเคส โดยสังเกตจากการเกิดวงสีเขียวจนถึงสีม่วงรอบโคโลนีของรา สี ที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากการออกซิไดซ์ของ ABTS ไปเป็น ABTS radical ซึ่งให้สีเขียวจนถึงสีม่วง ABTS นั้นเป็นสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะต่อ extracellular radical-generating enzymes เช่น แลคเคส และเพอร์ออกซิเดสชนิดต่างๆ เป็นต้น (Hatakka et al., 2001) จากการศึกษาพบว่า ราทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถสร้างวงสีเขียวจนถึงม่วงได้ ซึ่ง แสดงถึงแอกติวิตีของแลคเคส และ /หรือ เพอร์ออกซิเดส ส่วนแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส นั้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์นี้จำเป็นต้องมีแมงกานีสอิสระเข้ามาช่วยในการทำปฏิกิริยา (Hammel and Cullen, 2008) ดังนั้นในการตรวจสอบความสามารถในการสร้างแมงกานีส เพอร์-ออกซิเดส จึงต้องทำการทดสอบในอาหารที่มีการเติม $MnCl_2.H_2O$ เพื่อให้แมงกานีส เพอร์ออกซิ-เดสสามารถทำปฏิกิริยาได้ โดยเอนไซม์นี้จะทำปฏิกิริยากับ $MnCl_2.H_2O$ ทำให้เกิด $MnO_2$ ซึ่งจะให้ผลเป็นวงสีน้ำตาลขึ้นมารอบโคโลนีของรา (Chairattanamanokorn et al., 2005) จากการศึกษาพบว่า ไม่พบวงสีน้ำตาลรอบโคโลนีของราทั้ง 20 ไอโซเลต อาจเป็นเพราะราทั้ง 20 ไอโซ-เลต ไม่มีสามารถสร้างแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสในปริมาณที่จะตรวจสอบได้ด้วยวิธีนี้

5.2.2 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เชิงปริมาณ

โดยทั่วไปแล้วราที่สามารถสร้างแลคเคสได้นั้นจะสร้างแลคเคสในปริมาณที่แตกต่างกันค่อนข้างมากขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของราคือ ตั้งแต่ 0.01-8.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Eggert et al., 1996) โดยมีรายงานว่าราที่สามารถสร้างแลคเคสได้มากนั้นได้แก่ *Trametes versicolor Pycnoporus sanguineus* และ *P. cinnabarinus* เป็นต้น ซึ่งจากการศึกษานี้การวัดแอกติวิตีของลิกนิโนไลติกเอนไซม์เชิงปริมาณของราทั้ง 20 ไอโซเลต พบว่า *P. coccineus* KB4 *P. coccineus* PB1 และ *P. sanguineus* MHS3 สามารถสร้างแลคเคสได้มากที่สุด ในช่วง 3.61-2.65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้การศึกษาการสร้างแลคเคสจาก *P. coccineus* นั้นมีค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับ *Pycnoporus* ชนิดอื่น มีรายงานพบว่า *P. coccineus* สามารถสร้างแลคเคสได้ประมาณ 0.8-1.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Chairattanamanokorn et al., 2005; Jaouani et al., 2005) ซึ่งจะเห็นได้ว่า *P. coccineus* KB4 ที่คัดแยกได้ในการศึกษานี้มีความสามารถในการสร้างแลคเคสได้ดีกว่าที่มีผู้รายงานไว้ สำหรับแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสนั้นพบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลตนี้ สามาร ถผลิตได้ในช่วง 0.13-0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่มีรายงานว่า *P. coccineus* มีแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสแอกติวิตีในช่วง 0.02-0.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Chairattanamanokorn et al., 2005) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษานี้ นอกจากนี้จากการผลการตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์พบว่า ความสามารถในการสร้างเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งที่ตรวจสอบได้นั้น ให้ผลไม่สอดคล้องกับการวัดแอกติวิ-ตีของเอนไซม์เชิงปริมาณในบางไอโซเลต อาจเนื่องมาจากในการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งนั้น ราจะไม่สามารถสัมผัสกับอาหารได้ดีเหมือนกับการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้ในการวัดแอก-ติวิตี จึงอาจทำให้ราเติบโตได้ไม่ดีและเอนไซม์ที่ราสร้างออกมาได้ไม่มีความสม่ำเสมอ ทำให้ค่าที่วัดได้ไม่สอดคล้องกับการวัดเชิงปริมาณได้

**5.3 การศึกษาการเติบโตของรา**

มีรายงานว่า แลคเคสโดยทั่วไปจะผลิตออกมาในการเติบโตช่วง stationary phase ของรา (Cerniglia, 1997) แต่อย่างไรก็ดีช่วงเวลาของการผลิตแลคเคสยังคงขึ้นอยู่กับชนิดของราด้วย จากการศึกษาการเติบโตและช่วงเวลาของการผลิตแลคเคสของราทั้ง 3 ไอโซเลต คือ *P. coccineus* KB4 *P. coccineus* PB1 และ *P. sanguineus* MHS3 ในอาหารสูตร Basal Medium พบว่า *P. coccineus* KB4 และ *P. coccineus* PB1 สามารถผลิตแลคเคสได้ดีที่สุดในการเติบโตช่วง late log phase จนถึง early stationary phase คือวันที่ 6-10 ของการเลี้ยง แต่ *P. sanguineus* MHS3 สามารถผลิตแลคเคสได้ดีที่สุดในการเติบโตช่วง stationary phase ทั้งนี้มีการศึกษาที่พบว่า *Ganoderma* sp. WR-1 สามารถเติบโตและผลิตแลคเคสได้มากที่สุดในช่วง late log phase เช่นกัน (Madhavi and Lele, 2006) ซึ่งคล้ายคลึงกับ *P. coccineus* KB4 และ *P. coccineus*

PB1 และเมื่อเปรียบเทียบรา 3 ไอโซเลตนี้พบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้มากที่สุดที่ 4.91±2.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการเลี้ยง

### 5.4 การศึกษาการเติบโตของราบนอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติม PAHs

จากการศึกษาการเติบโตของรา *P. coccineus* KB4 *P. coccineus* PB1 และ *P. sanguineus* MHS3 บนอาหารสูตร Basal Medium Agar ที่มีการเติม PAHs คือ anthracene phenanthrene fluoranthene pyrene และ benzo(a)pyrene ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ PAHs แต่ละชนิดคือ 1 10 และ 100 ppm พบว่า การยับยั้งการเติบโตของราทั้ง 3 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างและความเข้มข้นของ PAHs แต่ละชนิด โดย benzo(a)pyrene ที่ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 5 วง มีผลการยับยั้งการเติบโตของราทั้ง 3 ไอโซเลตมากที่สุด ส่วน anthracene ที่ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 3 วง มีผลการยับยั้งการเติบโตของราทั้ง 3 ไอโซเลตน้อยที่สุด รวมทั้งการจัดเรียงตัวของ PAHs แต่ละชนิดก็มีผลด้วย จะเห็นได้จาก phenanthrene ที่มีการจัดเรียงตัวของวงแหวนเบนซีนลักษณะเป็นมุมนั้น มีผลยับยั้งการเติบโตของราทั้ง 3 ไอโซเลตมากกว่า anthracene ที่มีจำนวนวงแหวนเบนซีนเท่ากันแต่การจัดเรียงตัวของวงแหวนเบนซีนลักษณะเส้นตรง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่พบว่า ความสามารถในการย่อยสลาย ขึ้นอยู่กับมวล-โมเลกุล และการจัดเรียงวงแหวนเบนซีนในโครงสร้างของ PAHs โดย PAHs ที่มีวงเบนซีนต่อกันเป็นเส้นตรงจะสามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าโครงสร้างวงเบนซีนที่ต่อกันเป็นมุม และ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงจะย่อยสลายได้น้อยกว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Cerniglia, 1997) อีกทั้งความเข้มข้นของ PAHs ที่เพิ่มสูงขึ้นก็มีผลยับยั้งการเติบโตของราทั้ง 3 ไอโซเลตมากขึ้นด้วย และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเติบโตของราทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถทนต่อ PAHs ทุกชนิดและเกือบทุกความเข้มข้นได้ดีที่สุด มีรายงานว่า *P. coccineus* IFO6489 จากประเทศญี่ปุ่น สามารถเติบโตบนอาหารสูตร PDA ที่ใช้ฟางข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และมี phenanthrene ที่ความเข้มข้นถึง 2,000 ppm ได้ ซึ่งอาหารสูตร PDA ที่ใช้ฟางข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนอาจจะส่งเสริมให้ราสามารถเติบโตได้ดีมากกว่าอาหารสูตร Basal Medium ที่ใช้ในการศึกษานี้ และฟางข้าวสาลีมีลิกโนเซลลูโลสที่อาจช่วยชักนำให้ *P. coccineus* IFO6489 ผลิตแลคเคสได้มากขึ้น จึงสามารถเติบโตได้ในอาหารที่มี phenanthene ที่ความเข้มข้นสูงถึง 2,000 ppm ได้ (Matsubara et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Trametes versicolor* สามารถเติบโตได้ดีในอาหารเหลวที่มีการเติม phenanthrene ความเข้มข้น 100 ppm เนื่องจากอาหารเหลวนั้นจะทำให้ราสามารถสัมผัสกับ PAHs ได้ดีกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง ทำให้ในระหว่างการเลี้ยงราสามารถย่อยสลาย PAHs ไปพร้อมกัน ความเข้มข้นของ PAHs ในอาหารเหลวจึงลดลงอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีความเป็นพิษกับราได้น้อยลง (Han et al., 2005) ซึ่งในการศึกษานี้

*P. coccineus* KB4 สามารถทน phenanthrene ได้ค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับราสายพันธุ์อื่นที่มีผู้รายงานไว้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเติบโตที่ 77.88 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในการศึกษานี้ทำการทดสอบความสามารถในการทน PAHs โดยการเลี้ยง *P. coccineus* KB4 บนอาหารสูตร Basal Medium Agar ทำให้ การเติบโตอาจไม่ดีเท่ากับการเลี้ยงในอาหารเหลว หรือใน Enriched Medium ดังที่กล่าวมาแล้ว

**5.5 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส**

จากการศึกษาการเติบโตของ *P. coccineus* KB4 นั้นพบว่า ราไอโซเลตนี้สามารถผลิตแลคเคสได้ดีในช่วงของ late log phase จนถึง early stationary phase ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าถ้าสามารถกระตุ้นให้ราเติบโตได้ดีขึ้นก็อาจทำให้มีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่สูงขึ้นตามมาด้วย

5.5.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 โดยการใช้กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยเป็นการเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเปรียบเทียบกับน้ำตาลโมเลกุลคู่ ผลพบว่า ในช่วง 8 วันแรกของการเลี้ยง การเติบโตของ *P. coccineus* KB4 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัดในอาหารที่มีน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด แสดงว่า *P. coccineus* KB4 สามารถใช้ทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ในการเติบโตได้ แต่สำหรับการผลิตแลคเคสนั้นให้ผลที่ต่างกัน โดย *P. coccineus* KB4 สามารถใช้กลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในการผลิตแลคเคสได้ดีกว่าการใช้ซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ เนื่องจากในการใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่นั้นราจะต้องผลิตเอนไซม์ออกมาเพื่อย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน จึงสามารถนำมาใช้ได้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ , 2547) และเมื่อเปรียบเทียบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเหมือนกัน คือ กลูโคส และฟรุกโตส พบว่า *P. coccineus* KB4 ยังคงสามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแลคเคสได้ดีกว่า ซึ่งอาจเป็นผล มาจากความซับซ้อนของวิถีการย่อยสลายฟรุกโตส ซึ่งทำให้สามารถย่อยสลายฟรุกโตสเพื่อนำมาใช้ในการผลิตแลคเคสได้ยากกว่ากลูโคส (Madhavi and Lele, 2006) ซึ่งผลจากการทดลองนี้คล้ายคลึงกับการศึกษาที่พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับ *P. sanguineus* สามารถให้ผลผลิตของแลคเคสสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้ซูโครสและฟรุกโตส (Pointing et al., 2000)

5.5.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 โดยการใช้แอล-แอสพาราจีน เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.25

เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าเปปโตนและแอล-แอสพาราจีนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ *P. coccineus* KB4 สามารถเติบโตและผลิตแลคเคสได้ดีกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งเปปโตนและแอล- แอสพาราจีนจัดเป็นสารกลุ่มอินทรีย์ไนโตรเจน ส่วนแอมโมเนียมซัลเฟตจัดเป็นสารกลุ่มอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้ดีกว่าอนินทรีย์ไนโตรเจน เนื่องจาก สารอินทรีย์ไนโตรเจนนั้นมักประกอบไปด้วยกรดอะมิโนและโปรตีน ทำให้จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ง่ายกว่าอนินทรีย์ไนโตรเจน (สมใจ ศิริโภค, 2547) และเมื่อเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอินทรีย์ไนโตรเจนเหมือนกันคือ เปปโตนและแอล- แอสพาราจีน พบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถเติบโตและผลิตแลคเคสในอาหารที่มีเปปโตนได้ดีกว่าแอล-แอสพาราจีน เนื่องมาจากเปป-โตนนั้นประกอบด้วยอินทรีย์ไนโตรเจนหลายชนิดที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ รวมทั้งยังประกอบไปด้วยวิตามินอีกหลายชนิดที่ช่วยในการเติบโตได้ด้วย (สมใจ ศิริโภค , 2547) ซึ่งสังเกตได้จากการเติบโตของ *P. coccineus* KB4 ที่สามารถเติบโตในอาหารที่มีเปปโตนได้มากกว่าการใช้แอล-แอสพาราจีนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนถึง 1.52 และ 2 เท่า ตามลำดับ ซึ่งเมื่อราเติบโตได้ดีขึ้นจึงทำให้สามารถผลิตแลคเคสได้มากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับการศึกษาที่พบว่า การใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถทำให้ *Pleurotus ostreatus* มีการเติบโตและผลิดแลคเคสได้สูงขึ้น (Hou et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การใช้อนินทรีย์ไนโตรเจนจำพวกแอมโมเนียมซัลเฟต จะทำให้การผลิตแลคเคสที่ผลิตจาก *Ganoderma* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ลดลงด้วยเช่นกัน (Madhavi and Lele, 2006)

5.5.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 พบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถเติบโตและผลิตแลคเคสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส การเติบโตและการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 จะลดลงเมื่ออุณหภูมิของการเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้ *P. coccineus* เป็นราในกลุ่ม mesophilic fungi จึงเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (Chairattanamanokorn et al., 2005) ซึ่งโดยทั่วไปราในกลุ่มนี้จะสามารถเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ มีผู้รายงาน ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตแลคเคสจาก *Trametes trogii* ที่เป็นราในกลุ่ม mesophilic fungi เช่นกัน โดยสามารถผลิตแลคเคสได้ดีทีสุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (Dhouib et al., 2005) แต่สำหรับ *Phlebia floridensis* ซึ่งเป็นรากลุ่ม thermophilic fungi ที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิตแลคเคสได้สูงที่อุณหภูมินี้ด้วยเช่นกัน (Arora and Gill, 2005) ดังนั้นอุณหภูมิที่

เหมาะสมต่อการผลิตแลคเคสของรานั้น จะขึ้นอยู่กับความสามาร ถในการเติบโตของราที่อุณหภูมินั้น ๆ ด้วย

5.5.4 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการเติบโตและการผลิตแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารสูตร Basal Medium ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลค-เคสได้ดีที่สุด เมื่อความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 และการผลิตแลคเคสจะลดลงเมื่อความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารสูงขึ้นหรือลดลงมากกว่านี้ ซึ่งในการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารที่มีต่อการผลิตแลคเคสของรานั้น พบว่าราส่วนใหญ่จะสามารถเติบโตได้ดีและสามารถผลิตแลคเคสได้สูงที่ความเป็นกรดด่าง 5 และเมื่อความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้นสูงขึ้นจะมีผลทำให้การเติบโตและการผลิตแลคเคสลดลง เช่น การศึกษาที่พบว่า *Trametes trogii* สามารถผลิตแลคเคสได้ดีที่ช่วงความเป็นกรดด่าง 5-6.5 แต่เมื่อความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้นสูงขึ้นจะมีผลทำให้การเติบโตและการผลิตแลคเคสลดลง (Dhouib et al., 2005)

## 5.6 การเตรียมแลคเคสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ

5.6.1 การเตรียมแลคเคส

5.6.1.1 การทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน

การทำให้แลคเคสมีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชันในการศึกษานี้ โดยเลือกใช้ membrane cut off ที่ 10,000 Da นั้น เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าแลคเคสที่ผลิตได้จาก *P. coccineus* นั้นมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 80,000-50,000 Da (Jaouani et al., 2005; Oda et al., 1991) ซึ่งจากผลพบว่า แลคเคส ไม่สามารถถูกกรองผ่านเมมเบรนและถูกทำให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นได้ถึง 1.64 เท่า อย่างไรก็ดีในอาหารเหลวส่วนที่กรองผ่านเมมเบรนตรวจพบแอกติวิตีของแลคเคสเล็กน้อย อาจเป็นไปได้ว่าแลคเคสเกิดการย่อยของโปรตีนทำให้มีขนาดเล็กลงจนต่ำกว่า 10,000 Da โดยไม่มีการสูญเสียแอกติวิตีไปทั้งหมด จึง สามารถถูกกรองผ่านเมมเบรนได้ รวมทั้งการทำให้แลคเคสมีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชันนั้น จะมีการใช้ แรงดันก๊าซมาร่วมด้วยจึงอาจเป็นไปได้ว่า แลคเคส บางส่วนที่ผ่านเมมเบรนนั้นเกิดจากการแรงดันของก๊าซทำให้สามารถผ่าน เมมเบรนได้

5.6.1.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นวิธีที่อาศัยคุณสมบัติของการละลายโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นประจุ (ionic strength) โดยความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นจะทำให้ความเข้มข้นของประจุมากขึ้นด้วย การละลายของโปรตีนจึงลดลง เพราะไอออนจะไปจับกับน้ำได้ดีกว่า ทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอนลงมา สำหรับโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลสูงนั้น จะมีความเข้มข้นของประจุมากกว่าโปรตีนที่มีมวลโมเล กุลต่ำ ทำให้การตกตะกอนของโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลสูงจะเกิดขึ้นได้ยากกว่าโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ดังนั้นจึงต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นสูง ๆ เพื่อทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมาได้ (เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์ , 2544) จากการศึกษาพบว่า แลคเคสตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 60-80 เปอร์เซ็นต์ ให้แอกติวิตีจำเพาะของแลคเคสสูงที่สุดคือ 490.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และมีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตถึง 12.20 เท่า ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับหลายงานวิจัยที่พบว่า แลคเคสจะตกตะกอนได้ดีที่สุดในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 60-80 เปอร์เซ็นต์ (Litthauer et al., 2006; Zhao et al., 2006) และจากการศึกษาที่พบว่า แลคเคสนั้นมีมวลโมเลกุลที่อยู่ในช่วง 80,000-50,000 Da จึงอาจเป็นเหตุทำให้ต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นสูงถึงจะทำให้แลคเคสตกตะกอนได้

5.6.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์หยาบ

5.6.2.1 การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของแลคเคส พบว่าแลคเคสสามารถทำงานได้ดีที่สุดในช่วงความเป็นกรดด่าง 3-4 แต่เมื่อเปลี่ยนความเป็นกรดด่างเป็นช่วง 4-6 ทำให้แลคเคสทำงานได้น้อยลง โดยทั่วไปแล้วความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคสของราคือช่วง 3-6 (Alcalde, 2007) แต่ทั้งนี้ภาวะความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ยังขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาด้วย โดยพบว่าการใช้ ABTS เป็นสารตั้งต้นในการวัดแอกติวิตีนั้น ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคสของราจะอยู่ที่ 3-4 แต่เมื่อใช้ syringaldazine เป็นสารตั้งต้น จะทำให้แลคเคสสามารถทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดด่าง 5 (Mechichi et al, 2006; Zhao et al., 2006; Shin and Lee, 2000; Garzillo et al., 1998) โดย ABTS นั้นเป็นสารตั้งต้นประเภท non-phenolic compound แต่ syringaldazine สารตั้งต้นประเภท phenolic compound (Xu, 1997) และจากการศึกษานี้ยังพบว่าชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้นั้นก็มีผลต่อการทำงานของแลคเคสด้วย โดยแลคเคสของ *P. coccineus* KB4 จะทำงานใน 0.1 M glycine HCl buffer ได้ดีกว่าใน 0.1 M sodium

tartrate buffer ที่ความเป็นกรดด่างเดียวกัน ซึ่งตรงกับที่มีผู้รายงานว่า glycine HCl buffer มีความเหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคสจาก *P. sanguineus* มากกว่า sodium tartrate buffer ในความเป็นกรดด่างเดียวกัน (Pointing et al., 2000) นอกจากนี้จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าแลคเคสยังสามารถทำงานใน sodium tartrate buffer ได้ดีกว่า phosphate buffer ที่ pH 6 เช่นเดียวกัน มีการศึกษาพบว่า แลคเคสจะสามารถทำงานได้น้อยลงในภาวะที่มีความเป็นด่าง เนื่องจาก หมู่ไฮดรอกไซด์ในบัฟเฟอร์ จะไปจับตรงตำแหน่ง T2 และ T3 ในโครงสร้างของแลคเคส ซึ่งขัดขวางการส่งผ่านอิเล็กตรอน และยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ (Alcalde, 2007)

สำหรับแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ที่ผลิตได้จาก *P. coccineus* KB4 สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรดด่าง 5 ทั้งนี้ยังไม่พบรายงานการศึกษาถึงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ที่ผลิตได้จาก *P. coccineus* แต่มีการศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ในราชนิดอื่น ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ในช่วงความเป็นกรดด่าง 4-7 เช่น แมงกานีส เพอร์ออกซิเดสที่ผลิตจาก *Phanerochaete chrysosporium* และ *Pleurotus ostreatus* สามารถทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 (Boer et al. 2006 and Ürek et al., 2004) ส่วนแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสที่ผลิตจาก *Schizophyllum* sp. สามารถทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดด่าง 6.8 (Cheng et al. 2007) เป็นต้น จะเห็นได้ว่าอยู่ในช่วงกรดอ่อน ซึ่งใกล้เคียงกับ ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสที่ผลิตได้จาก *P. coccineus* KB4 นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้นั้น ก็มีผลต่อการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสด้วยเช่นกัน โดยแมงกานีส เพอร์ออกซิ-เดสสามารถทำงานได้ดีใน sodium tartrate buffer ได้ดีกว่า sodium phosphate buffer ที่ pH 6

5.6.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์-ออกซิเดส พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีผลให้แลคเคสทำงานได้ดีที่สุด และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีผลทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของแลค-เคสจะอยู่ในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของรา (Zhao et al., 2006; Han et al., 2005; Monoz et al., 1997) ซึ่งจะเห็นได้ว่า แลคเคสที่ผลิตได้จาก *P. coccineus* KB4 จะมีความสามารถในการทำงานในช่วงอุณหภูมิที่เดียวกันเมื่อเทียบกับแลคเคสที่ผลิตได้จากราชนิดอื่น สำหรับแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ยังไม่พบรายงานการศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสที่ผลิตได้จาก *P. coccineus* แต่มีรายงานพบว่า โดยทั่วไปแล้วแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสจากราจะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส (Ürek et al.,

2004 and Mester and Field, 1997) ซึ่งตรงกับการศึกษานี้ที่พบว่า แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ที่ผลิตได้จาก *P. coccineus* KB4 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส

5.6.2.3 การศึกษาผลของไอออนที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส

จากการศึกษาพบว่า พบว่า $CuSO_4$ และ $MnSO_4$ มีผลยับยั้งการทำงานของแลค-เคสจาก *P. coccineus* KB4 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งมีการศึกษาพบว่า $CuSO_4$ และ $MnSO_4$ ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถช่วยเพิ่มการทำงานของแลคเคสที่ผลิตได้จาก *Ganoderm lucidum* สูงขึ้น แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นมากกว่านี้จะทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ $CuSO_4$ และ $MnSO_4$ ความเข้มข้น 10 mM จึงอาจมีส่วนทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของแลค-เคสที่ผลิตจาก *P. coccineus* KB4 เล็กน้อย ส่วน SDS ให้ผลยับยั้งการทำงานของแลคเคสมากที่สุด ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษา ที่ พบว่า SDS มีผลให้ยับยั้งการทำงานของแลคเคสที่ผลิตได้จาก *Maramius quercophilus* ด้วยเช่นกัน (Farnet et al., 2008) อาจเนื่องมากจาก SDS นั้นจะไปทำลายโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน ทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพไป ส่วนแมงกานีส เพอร์ออกซิ-เดส นั้นพบว่า $MnSO_4$ นั้นจะช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ให้สูงขึ้น โดยมีแ อกติวิตีสัมพัทธ์ถึง 268 เปอร์เซ็นต์ เนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์นี้จำเป็นต้องมีแมงกานีสอิสระเข้ามาช่วยในการทำปฏิกิริยา (Hammel and Cullen, 2008) จึงทำให้การทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสสูงขึ้น ส่วน EDTA ให้ผลยับยั้งการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส มากที่สุด ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาที่พบว่า EDTA ไปมีผลยับยั้งการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสที่ผลิตได้จาก *Schizophullym commune* ทั้งหมด (Cheng et al., 2007) ซึ่ง EDTA มีผลของยับยั้งการทำงานของทั้ง 2 เอนไซม์นี้ เนื่องมาจากแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม metalloenzyme การเติม EDTA จึงเกิดการ chelate ของไอออนต่าง ๆ ที่จำเป็นต่ อการทำงานของเอนไซม์ เช่น ทองแดงในแลคเคส เฟอร์ริก ฮีม และ $Mn^{2+}$ ในแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส (Alcalde, 2007) แต่จากการศึกษานี้จะเห็นว่า EDTA ความเข้มข้น 10 mM ให้ผลยับยั้งการทำงานของแลคเคสได้บางส่วนเท่านั้น อาจเนื่องมาจาก EDTA ที่ความเข้มข้นนี้ไม่เพียงพอที่จะยับยั้งการทำงานของแลคเคสที่ผลิตได้จาก *P. coccineus* KB4 ได้ ซึ่งต่างจากแลคเคสที่ผลิตได้จาก *Chaetomiun thermophilium* ที่ 10 mM EDTA ยับยั้งการทำงานของแลคเคสได้ทั้งหมด (Chefetz et al., 1998)

5.6.2.4 การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อความเสถียรของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อความเสถียรของแลคเคสพบว่า แลคเคสจาก *P. coccineus* KB4 มีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดด่าง 3 - 4 เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ใน 0.1 M glycine HCl buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงความเป็นกรดด่างที่ค่อนข้างแคบเมื่อเปรียบเทียบกับแลคเคสที่ผลิตได้จากราโดยทั่วไป ที่จะมีความเสถียรอยู่ในช่วงความเป็นกรดด่าง 3-6 เช่น แลคเคสที่ผลิตได้จาก *P. sanguineus* มีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดด่าง 3-5 และ แลคเคสที่ผลิตได้จาก *Phellinus ribis* มีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดด่าง 4-6 (Zhao et al., 2006 and Min et al, 2001) ทั้งนี้โดยทั่วไปความเป็นกรดด่างที่สูงขึ้นนั้น มีผลทำให้ความเสถียรของแลคเคสลดลง (Alcalde, 2007) อย่างไรก็ดีมีรายงานว่า การนำแลคเคสที่สามารถทำงานได้ดีในภาวะที่เป็นกรดแก่ มาใช้ในการย่อยสลายสารพิษตกค้างจากยาฆ่าแมลงจำพวก organophosphate จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้แลคเคสที่ทำงานได้ดีในภาวะความเป็นกรดอ่อน เนื่องจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารพิษตกค้างนี้มักจะมีความเป็นกรดสูง (Vikineswary et al,. 2006)

สำหรับแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส จาก *P. coccineus* KB4 จะมีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดด่าง 4-6 ใน 0.1 M sodium tartrate buffer ซึ่งเป็นช่วงที่ค่อนข้างแคบกว่าแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสที่ผลิตได้จากรา ชนิดอื่นเล็กน้อย ซึ่งโดยทั่วไปจะมีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดด่าง 3-8 (Boer et al. 2006 and Ürek et al., 2004)

5.6.2.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

โดยทั่วไปแลคเคสจากราจะมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส เช่น แลคเคสที่ผลิตได้จาก *Trametes versicolor* (Han et al, 2005) จะมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส และแลคเคสที่ผลิตได้จาก *Funalia trogii* จะมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส (Patrick et al, 2009) ในขณะที่แลคเคสจากราบางชนิดอาจมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่านี้ เช่น แลคเคสที่ผลิตได้จากรา thermophilic บางชนิด เช่น *Chaetomiun thermophilium* ที่มีความเสถียรในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส (Chefetz et al., 1998) ซึ่งจะเห็นได้ว่า แลคเคสที่ผลิตได้จาก *P. coccineus* KB4 จะมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิที่แคบ โดยอยู่ที่ 28 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับแลคเคสที่ผลิตได้จากรา mesophillic ทั่วไป สำหรับ แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส โดยทั่วไปแล้วจะมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส และมีรายงานว่า แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส จะเสียสภาพไปเมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 40

องศาเซลเซียส (Ürek et al., 2004; Mester and Field, 1997) ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษานี้ที่พบว่า แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส จาก *P. coccineus* KB4 มีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

## 5.7 การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน

5.7.1 การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน

จากการศึกษาการย่อยสลาย PAHs 5 ชนิด ได้แก่ benzo(a)pyrene pyrene anthracene phenanthrene และ fluoranthene ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ PAHs แต่ละชนิดคือ 100 ppm โดยใช้การใช้เอนไซม์หยาบที่ผลิตได้จาก *P. coccineus* KB4 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เอนไซม์หยาบนี้ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ แลคเคสและแมงกานีส เพอร์ - ออกซิเดส แต่การทำงานของ แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส จำเป็นต้องมีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เข้าร่วมทำปฏิกิริยาด้วย (Hammel and Cullen, 2008) ซึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้เติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ใน reaction mixture ทำให้แมงกานีส เพอร์ออกซิเดสไม่สามารถทำงานได้ จึงคาดว่าการย่อยสลาย PAHs นี้เป็นผลมาจากการทำงานของแลคเคสเพียงชนิดเดียว โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง แลคเคสสามารถย่อยสลาย pyrene และ anthracene ได้มากที่สุด ที่ 76.35 และ 74.32 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ต้องมีการใช้เมดิเอเตอร์ร่วม แต่ เมื่อเวลาผ่านไปเป็น 24 ชั่วโมง พบว่า fluoranthene จะถูกย่อยสลายได้ดีขึ้นเป็น 84.22 เปอร์เซ็นต์ ส่วน benzo(a)pyrene และ phenanthrene พบว่าถูกย่อยสลายได้ค่อนข้างช้า (42.70 และ 49.37 เปอร์เซ็นต์) แม้เวลาจะผ่านไป 24 ชั่วโมง จึง ต้องมีการใช้เมดิเอเตอร์ร่วม โดยเมดิเอเตอร์นั้นจะทำหน้าที่ในการช่วยส่งต่ออิเล็กตรอนของแลคเคส ทำให้แลคเคสสามารถตัดพันธะระหว่างคาร์บอนและไฮโดรเจนได้ (Wells et al., 2006) ในการศึกษานี้ใช้ ABTS ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM พบว่าการย่อยสลาย benzo(a)pyrene และ phenanthrene จะเกิดได้เร็วขึ้น เป็น 50.47 และ 66.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ทั้งนี้มีรายงานว่า ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs มักขึ้นอยู่กับโครงสร้างของ PAHs โดย anthracene นั้นมีโครงสร้างเป็นวงแหวนเบนซีน 3 วง เรียงตัวเป็นเส้นตรง ทำให้สามารถย่อยสลายได้ง่าย ส่วน benzo(a)pyrene นั้นมีโครงสร้างเป็นวงแหวนเบนซีน 5 วง ทำให้สามารถย่อยสลายได้ยากกว่าและใช้เวลามากกว่าด้วย (Field et al., 1995) อีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลาย PAHs คือ ค่า Ionization potential (IP) ของ PAHs แต่ละชนิด โดย PAHs ที่มีค่า IP มาก การย่อยสลายก็ยิ่งเกิดขึ้นได้น้อยตามไปด้วย จึงต้องมีการเติมเมดิเอเตอร์ เช่น ABTS เพื่อช่วยในการส่งต่ออิเล็กตรอนของแลคเคส ทำให้แลคเคสมีประสิทธิภาพในการ ย่อยสลายมากขึ้น (Alcalde, 2007) ทั้งนี้มีรายงานว่า ใน PAHs ทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้ phenanthrene มี

ค่า IP ที่สูงที่สุด คือ 8.03 อิเล็กตรอนโวลต์ รองลงมาคือ fluoranthene pyrene anthracene และ benzo(a)pyrene ที่ 7.76 7 .72 7 . 55 และ 7.12 อิเล็กตรอนโวลต์ ตามลำดับ (Pickard et al., 1999) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ที่แลคเคสจาก *P. coccineus* KB4 สามารถย่อยสลาย phenanthrene ได้น้อยที่สุด และถึงแม้ว่า benzo(a)pyrene จะมีค่า IP ที่น้อยที่สุด แต่ก็ถูกย่อยสลายโดยแลคเคสได้น้อยรองลงมาจาก phenanthrene ทั้งนี้เนื่องจาก benzo(a)pyrene มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเบนซีนถึง 5 วง จึงอาจเป็นสาเหตุให้การย่อยสลายเกิดขึ้นได้ยาก ดังนั้นการย่อยสลาย PAHs ทั้ง 2 ชนิดนี้จึงจำเป็นต้องมีการใช้เมดิเอเตอร์ร่วมด้วย สำหรับ fluoranthene pyrene และ anthracene นั้นมีค่า IP ที่อยู่ในช่วงใกล้เคียงกันและไม่สูงมากเท่า phenanthrene แลคเคสจึงมีความสามารถในการย่อยสลายสารทั้ง 2 ชนิดนี้ใกล้เคียงกันโดยไม่จำเป็นต้องทำงานร่วมกับเมดิเอเตอร์ ทั้งนี้มีการศึกษาการย่อยสลาย PAHs โดยแลคเคสที่ผลิตได้จากราหลายชนิด เช่น *Pleurotus ostreatus Pycnoporus sanguineus* (Dodor et. al., 2004) *Trametes versicolor* (Han et al., 2005) *Coriolus hirsutus* (Cho et al., 2002) และ *Ganoderma lucidum* (Punnapayak et al., 2009) เป็นต้น โดยแลคเคสที่ผลิตได้จาก *T. versicolor* สามารถย่อยสลาย phenanthrene ความเข้มข้น 20 ppm ได้ 40 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 2 ชั่วโมง ในขณะที่แลคเคสที่ผลิตได้จาก *C. hirsutus* สามารถย่อยสลาย antracene phenanthrene fluoranthene pyrene และ benzo(a)pyrene ความเข้มข้น 50 ppm ได้ 97.2-10.9 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 1 ชั่วโมง (Han et al., 2005; Cho et al., 2002) ซึ่งราทั้ง 2 สายพันธุ์นี้จะต้องใช้แลคเคสที่ความเข้มข้นสุดท้ายถึง 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าการศึกษานี้ถึง 5 เท่า และมีความเข้มข้นของ PAHs ต่ำกว่า แต่ให้ผลของการย่อยสลายใกล้เคียงกันกับการศึกษานี้ ยกเว้น benzo(a)pyrene เพียงชนิดเดียวที่แลคเคสที่ผลิตได้จาก *C. hirsutus* มีความสามารถในการย่อยสลายได้มากกว่าการศึกษานี้ และมีรายงานว่า แลคเคสที่ผลิตได้จาก *G. lucidum* ความเข้มข้นสุดท้าย 1.52 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สามารถย่อยสลาย benzo(a)pyrene ได้ 71.71 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 3 วัน (Punnapayak et al., 2009) เมื่อเทียบกับการศึกษานี้ซึ่งใช้แลคเคสที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกัน แต่ใช้เวลาในการย่อยสลาย PAHs น้อยกว่า พบว่าสามารถย่อยสลาย benzo(a)pyrene ได้ใกล้เคียงกัน (66.25 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการเติมเมดิ เอเตอร์) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แลคเคสจาก *P. coccineus* KB4 มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ได้ดีกว่าแลคเคสจาก *T versicolor* และ *C. hirsutus* รวมทั้งมีความสามารถในการย่อยสลาย benzo(a)pyrene ได้ใกล้เคียงกับแลคเคสที่ผลิตได้จาก *G. lucidum* นอกจากนี้เมื่อมีการใช้แลคเคสร่วมกับเมดิเอเตอร์คือ ABTS ความเข้มข้น 5 mM พบว่าแลคเคสจาก *T. versicolor* สามารถย่อยสลาย phenanthrene ความเข้มข้น 100 ppm ได้เพียง 40 เปอร์เซ็นต์ (Han et al., 2005) ซึ่งได้น้อยกว่าการใช้แลคเคสจาก *P. coccineus* KB4 ร่วมกับ

เมดิเอเตอร์ชนิดเดียวกันแต่ใช้ความเข้มข้นเพียง 1 mM สามารถย่อยสลาย phenanthrene ได้ถึง 50.47 เปอร์เซ็นต์

มีรายงานพบว่า การใช้เซลล์ *T. versicolor* ในการย่อยสลาย phenanthrene ความเข้มข้น 25 ppm ต้องใช้เวลาถึง 5 วัน จึงจะย่อยสลายได้ 69.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *P. coccineus* สามารถย่อย phenanthrene และ pyrene ความเข้มข้น 400 ppm โดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายในช่วง 80-50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 28 วัน (Matsubara et al., 2006; Han et al., 2005) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้เซลล์นั้นจะสามารถย่อยสลาย PAHs ที่ความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าการใช้เอนไซม์แต่ต้องใช้ระยะเวลานานกว่า นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแลคเคสรูปตรึงจาก *P. sanguineus* ซึ่งสามารถย่อยสลาย anthracene phenanthrene และ pyrene ได้ 93-85 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 20 วัน ซึ่งการใช้แลคเคสรูปตรึงนี้จะสามารถทำงานได้ในช่วงความเป็นกรดด่างที่กว้างกว่าการใช้เซลล์หรือเอนไซม์ คือช่วงความเป็นกรดด่าง 3-10 ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลาย PAH ได้ในหลายภาวะ (Low et al., 2009) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าแลค-เคสที่ผลิตได้จาก *P. coccineus* KB4 มีศักยภาพสูงในการย่อยสลาย PAHs เมื่อเปรียบเทียบกับแลคเคสในราชนิดอื่น ๆ ที่มีผู้รายงานไ ว้ แม้ในการศึกษานี้จะใช้เพียงเอนไซม์หยาบแต่ก็สามารถย่อยสลาย PAHs ได้อย่างมีศักยภาพ โดยไม่จำเป็นต้องนำแลคเคสมาผ่านกระบวนการการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ จึงเหมาะกับการนำมาใช้ในการย่อยสลาย PAHs ที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็น ดิน น้ำ หรือทราย เนื่องจาก มีต้นทุนในการผลิตไม่สูงและยังสามารถย่อยสลาย PAHs ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย ทั้งนี้ควรมีการศึกษาถึงศักยภาพในการย่อยสลาย PAHs โดยใช้แลคเคสจาก *P. coccineus* KB4 ในรูปอื่น เช่น แลคเคสรูปตรึง และการใช้เซลล์ที่มีชีวิตของ *P. coccineus* KB4 เพื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์หยาบต่อไป

# บทที่ 6

# สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

## 6.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย

6.1.1 การเก็บตัวอย่าง

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย ช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - ธันวาคม พ.ศ.2551 ในพื้นที่ 11 จังหวัด คือ แม่ฮ่องสอน กรุงเทพฯ นครปฐม ปทุมธานี นครราชสีมา ร้อยเอ็ด ชลบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และ นครศรีธรรมราช สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต

6.1.2 การจำแนกชนิด

สามารถจำแนกชนิดเห็ดราทั้ง 20 ไอโซเลต โดยจัดอยู่ในสกุลต่างๆ จำนวน 6 สกุล 19 ชนิด *Ganoderma australe* NKP2 *G. australe* NKS4 *G. australe* PTN3 *G. dahlii* CB24 *G. lobatum* BK5 *G. lobatum* RED6 *G. lucidum* RED1 *G. lucidum* NKP3 *G. lucidum* NRM9 *Microporus xanthopus* CB2 *Phellinus pachyphloeus* PJK2 *Polyporus tenuiculus* KB1 *Pycnoporus coccineus* KB4 *P. coccineus* PB1 *P. sanguineus* MHS3 *Schizophyllum commune* BK1 *S. commune* BK2 *S. commune* CB4 และ *Trametes elegans* PJK1 โดยมี 1 ไอโซเลตที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ คือ *Trametes* sp. BK3

## 6.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์

6.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง

ราทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถสร้างแลคเคสได้ โดยเมื่อเทียบอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีกับเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี พบว่ารา 16 ไอโซเลต มีค่าอัตราส่วนดังกล่าวมากกว่า 1 ส่วนอีก 4 ไอโซเลต มีค่าอัตราส่วนน้อยกว่า 1 สำหรับการสร้างแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส พบว่าเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลต ไม่ตรวจพบการสร้างแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส ในปริมาณที่จะตรวจสอบได้ด้วยวิธีนี้

6.2.2 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เชิงปริมาณ

การวัดแอกติวิตีของลิกนิโนไลติกเอนไซม์เชิงปริมาณ พบว่า *Pycnoporus coccineus* KB4 *P. coccineus* PB1 และ *P. sanguineus* MHS3 สามารถสร้างแลคเคสและแมงกานีส เพอร์-ออกซิเดสได้มากที่สุด โดยอยู่ในช่วง 3.61-2.65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.13-0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนลิกนิน เพอร์ออกซิเดส พบว่าราทั้ง 20 ไอโซเลต ไม่สามารถสร้างลิกนิน เพอร์ออก-ซิเดสได้

## 6.3 การศึกษาการเติบโตของรา

จากการศึกษาการเติบโตและการผลิตแลคเคส พบว่า *P. coccineus* KB 4 และ *P. coccineus* PB1 สามารถผลิตแลคเคสได้เมื่อเติบโตอยู่ในช่วง late log phase ถึง early stationary phase แต่เมื่อราเข้าสู่ stationary phase การผลิตแลคเคสก็จะลดลง ส่วน *P. sanguineus* MHS3 สามารถผลิตแลคเคสได้เมื่อเติบโตอยู่ในช่วง early stationary phase และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างราทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้ดีที่สุด คือที่ 4.91±2.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการเลี้ยง

## 6.4 การศึกษาการเติบโตของราบนอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติม PAHs

*P. coccineus* KB4 สามารถทนต่อ anthracene phenanthrene fluoranthene pyrene และ benzo(a)pyrene ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ PAHs แต่ละชนิดคือ 1 10 และ 100 ppm ได้ดีที่สุด และมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอีก 2 ไอโซเลต

## 6.5 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส

6.5.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

*P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้มากที่สุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสูตร Basal Medium ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ 4.31±0.46 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นฟรุกโตสและซูโครสจะทำให้ความสามารถในการผลิตแลคเคสลดลง

6.5.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

*P. coccineus* KB4 สามารถเติบโตและผลิตแลคเคสได้ดีขึ้นเมื่อเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจากแอล-แอสพาราจีนมาเป็นเปปโตนที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยมีแอกติวิตีสูงสุดที่ 6.08±0.27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

6.5.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม

*P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร Basal Medium ที่มีกลูโคสและเปปโตนเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีแอกติวิตี 6.05±0.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่การเติบโตและการผลิตแลคเคสจะลดลงเมื่ออุณหภูมิของการเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้น

6.5.4 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

*P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร Basal Medium ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 โดยมีแอกติวิตีสูงสุดเป็น 6.12±0.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่การผลิตแลคเคสจะลดลงเมื่อความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารให้สูงขึ้นหรือลดลงมากกว่านี้

เมื่อประมวลผลจากการทดลองทั้งหมดพบว่า *P. coccineus* KB4 สามารถผลิตแลคเคสได้มากกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร Basal medium ที่ไม่ผ่านการปรับแหล่งไนโตรเจนถึง 1.42 เท่า

**6.6 การเตรียมแลคเคสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ**

6.6.1 การเตรียมแลคเคส

6.6.1.1 การทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน

การทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้ Viva Flow 250 ที่มี membrane cut off ที่ 10,000 Da แลคเคสจะอยู่ในส่วนที่กรองไม่ผ่านเมมเบรนโดยมีความเข้มข้นสูงขึ้นกว่าเดิมถึง 1.64 เท่า

6.6.1.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

แลคเคสจะตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 60-80 เปอร์-เซ็นต์ โดยให้แอกติวิตีจำเพาะสูงที่สุด 490.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และมีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตถึง 12.20 เท่า

6.6.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์หยาบ

จากการศึกษาการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตพบว่า ช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 60-80 เปอร์เซ็นต์ ทำให้แลคเคส มีแอกติวิตีจำเพาะสูงที่สุด ดังนั้นจึงนำเอนไซม์ที่ได้จากช่วงความเข้มข้นนี้มาทำการศึกษาลักษณะสมบัติต่อไป

6.6.2.1 การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์-ออกซิเดส คือ 3.5 ใน 0.1 M glycine HCl buffer และ 5 ใน 0.1 M sodium tartrate buffer ตามลำดับ และเมื่อเปลี่ยนความเป็นกรดด่าง ให้สูงขึ้นหรือลดลงมากกว่านี้จะมีผลทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง

6.6.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส คือ อุณหภูมิห้องหรือประมาณ 28 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีผลทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง

6.6.2.3 การศึกษาผลของไอออนที่มีต่อการทำงานของแลคเคส และแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

จากการศึกษาผลของไอออนที่มีต่อการทำงานของแลคเคส และแมงกานีส เพอร์-ออกซิเดส พบว่า $CuSO_4$ และ $MnSO_4$ มีผลยับยั้งการทำงานของแลคเคสเพียงเล็กน้อย โดยมีแอก-ติวิตีสัมพัทธ์ 99.07 และ 95.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับ EDTA $MgSO_4$ $ZnCl_2$ $CaCl_2$ และ NaCl มีแอกติวิตีสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 69.32–25.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วน $FeSO_4$ และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของแลคเคสเกือบทั้งหมด โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์ 2.15 และ 1.84 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส พบว่า $MnSO_4$ จะช่วยเพิ่มการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 268.82 เปอร์เซ็นต์ NaCl $MgSO_4$ $CuSO_4$ และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส บางส่วน โดยมีค่า แอกติวิตีสัมพัทธ์ในช่วง 81.59-31.59 เปอร์เซ็นต์ $ZnCl_2$ และ EDTA มีผลยับยั้งการทำงานของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสเกือบทั้งหมด ที่ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 9.68 และ 6.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการเติม $FeSO_4$ มีผลต่อสีของ reaction mixture จึงไม่สามารถวัดแอกติวิตีของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสได้

6.6.2.4 การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อความเสถียรของแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

ความเป็นกรดด่างที่แลคเคสและแมงกานีส เพอร์อ อกซิเดส มีความเสถียรมากที่สุด คือ 3.5 ใน 0.1 M glycine HCl buffer และ 5 ใน 0.1 M sodium tartrate buffer ตามลำดับ เมื่อเปลี่ยนความเป็นกรดด่างให้สูงขึ้นหรือลดลงมากกว่านี้จะมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพไป

4.6.2.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของแลคเคสและแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส

แลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส จะมีความเสถียรมากที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีผลทำให้เอนไซม์ที่มีความเสถียรลดลง

## 6.7 การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน

6.7.1 การย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน

6.7.1.1 การย่อยสลาย PAHs โดยการใช้แลคเคส

จากการย่อยสลาย PAHs โดยการใช้แลคเคสจาก *P. coccineus* KB4 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง แลคเคสสามารถย่อยสลาย pyrene และ anthracene ได้มากที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย 76.35 และ 74.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ benzo(a)pyrene fluoranthene และ phenanthrene มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย 42.69 35.88 และ 31.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง แลคเคสสามารถย่อยสลาย anthracene pyrene และ fluoranthene ได้มากที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่ 87.80 84.30 และ 84.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ benzo(a)pyrene และ phenanthrene มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย 49.37 และ 42.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

6.7.1.2 การย่อยสลาย PAHs โดยการใช้แลคเคสร่วมกับเมดิเอเตอร์ (mediator)

เมื่อทำการย่อยสลาย PAHs โดยการใช้แลคเคสจาก *P. coccineus* KB4 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ร่วมกับเมดิเอเตอร์คือ ABTS ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง แลคเคสสามารถย่อยสลาย pyrene และ anthracene ได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่ 69.29 และ 69.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ benzo(a)pyrene phenanthrene และ fluoranthene มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่ 49.10 39.89 และ 25.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง แลคเคสสามารถย่อยสลาย pyrene และ anthracene ได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่ 76.80 และ 70.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ benzo(a)pyrene fluoranthene และ phenanthrene มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย 66.25 62.04 และ 50.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ดังนั้นผลของการใช้เมดิเอเตอร์ร่วมในการย่อยสลาย PAHs พบว่าจะขึ้นอยู่กับชนิดของ PAHs โดยเมดิเอเตอร์สามารถช่วยให้แลคเคสย่อยสลาย PAHs บางชนิดได้ดีขึ้น

**ข้อเสนอแนะ**

เนื่องจากในการศึกษานี้เป็นการใช้แลคเคสย่อยสลาย PAHs ใน reaction mixture เท่านั้น ซึ่งในการปนเปื้อนของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมนั้นอาจมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการทำงานของแลคเคส ดังนั้น ควรมีการศึกษาการใช้แลคเคสในรูปอื่น เช่น แลคเคสรูปตรึง และการใช้เซลล์ที่มีชีวิตของ *P. coccineus* KB4 ถึงประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs เปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์อิสระ ต่อไป

# รายการอ้างอิง

## ภาษาไทย


กมลชัย ชะเอม . 2546. **การคัดแยกเห็ดราที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

กรมควบคุมมลพิษ. 2541. **เบนโซ(เอ)ไพรีน**. กรุงเทพมหานคร: ศรีเมืองการพิมพ์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ . 2547. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์. 2544. **เทคโนโลยีชีวภาพ**. ลำปาง: บรรณกิจการพิมพ์.

สมใจ ศิริโภค. 2547. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริม.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล . 2551. **ความหลากหลายของเห็ดราขนาดใหญ่ในประเทศไทย**. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนิวรรต เฉลิมพงษ์ . 2541. **การจำแนกชนิดพันธุ์เห็ดราขนาดใหญ่ในระบบนิเวศป่าไม้**. กรุงเทพมหานคร: กลุ่มวิจัยโรคพืชวิทยาและจุลชีววิทยาป่าไม้กรมป่าไม้.

อลิสา วังใน. 2553. **การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ**. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.


## ภาษาอังกฤษ


Alcalde, M. 2007. Laccase: Biological function, molecular structure industrial application. **Industrial Enzymes**. 34:461–476.

Alexander, G. and Zhulin, I.B. 2000. Laccases are widspread in bacteria. **Trends in Biotechnology**. 18:41–42.

Arora, D. S. and Gill, P. K. 2005. Productionn of ligniolytic enzymes by *Phlebia floridesis*. **World Journal of Microbiology**. 21:1021-1028.

Ashok, B. T., Saxena, S., K. Singh, P. and Musarrat, J. 1995. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil around Mathura oil refinery, India. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 11:691-692.

Berrio, J., Plou, F. J., Ballesteros, A., Martinez, A. T. and Martinez. M. J. 2007. Immobilization of *Pycnoporus coccineus* laccase on Eupergit C: Stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters. **Biocatalysis and Biotransformation**. 25:130-134.

Bezalel, L., Hadar, L. B. Y. and Cerniglia, C. E. 1996. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Appiled and Environmental Microbiology**. 62:292-295.

Boer, C. G., Obici, L. and Souza C. G. M. 2006. Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. **Rosane Marina Peralta Process Biochemistry.** 41:1203–1207.

Bojes, H. K. and Pope, P. G. 2007. Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 47:288–295.

Canet, R., Lopez-Real, J. and Beck, A.J. 1999. Overview of polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation by white-rot fungi. **Land Contamination and Reclamation**. 7:191-197.

Cerniglia C. E. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 19:324–333.

Chairattanamanokorn, P., Imai, T., Kondo, R., Sekine, M., Higuchi, T. and Ukita, M. 2004. Decolorization of alcohol distillery wastewater by thermotolerant white rot fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology.** 41:583–588.

Chang, K.F., Fang, G. C., Cheng, J. C. and Wu, Y.S. 2006. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Asia: a review from 1999 to 2004. **Environmental Pollution**. 142:388:396.

Chanopas, M., Chanopas, W., Jongjitvimol, T., Chiangkool, A. and Sanpote, P. 2006. Survey on macrofungi at Doy Weang La wildlife sanctuary in Mae Hong Son province. **Naresuan Science Journal**. 2:175 – 181.

Chefetz, B., Chen, Y. and Hadar, Y. 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilium* and its role in humification. **Appiled and Environmental Microbiology**. 64:3175-3179.

Cheng, X. Rong, J., Pingsheng, L., Qin, Z., Wenzhong, T. and Zudong, L. 2007. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**. 41:258-264.

Childs R.E. and Bardsley, W.G. 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. **Biochemical Journal**. 145:93–103.

Cho, S.J., Park, S. J., Lim, J. S., Rhee, Y. H. and Shin, K.S. 2002 . Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase of *Coriolus Hirsutus*. **Biotechnology Letters.** 24:1337–1340.

Covino, S., Svobodov, K., Kresinova, Z., Petruccioli, M., Federici, F., Annibale, A., Cvancarova, M. and Cajthaml, T. 2001. *In vivo* and *in vitro* polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. **Bioresource Technology**. 101:3004–3012.

Cutcheon, S. C. M. and Schnoor, J. L. 2003. Phytoremediation: Transformation and control of contaminants. **Journal of Hazardous Materials**. 108:142-143.

Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., Hmidi, R., Labat, M., Martinez, M. J. and Sayadi, S. 2005. Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 21:1415–1423.

Dodor, D. E., Hwang, H. M. and Ekunwe, S. I.N. 2004. Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**. 35:210–217.

Eggert, C., Temp, U. And Eriksson, K. E. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. **Applied Environmental and Microbiology**. 62:1151-1158.

Farnet, A.M., Gil, G. and Ferre E.. 2008. Effects of pollutants on laccase activities of *Marasmius quercophilus*, a white-rot fungus isolated from a Mediterranean schlerophyllous litter. **Chemosphere**. 70:895–900.

Ferrarese, E., Gianni, A. and Oprea, I. A. 2008. Remediation of PAH-contaminated sediments by chemical oxidation. **Journal of Hazardous Materials**. 152:128–139.

Field, J. A., Boelsma, F., Baten, H. and Rulkens, W. H. 1995. Oxidation of anthracene in water/solvent mixtures by the white-rot fungus, *Bjerkandera* sp. strain BOS55. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 44:234-240.

Field, J.A., de Jong, E., Feijoo Costa, G. and de Bont, J.A. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi. **Application and Environmental Microbiology**. 58:2219-2226.

Garzillo, A., Colao, M., Caruso, C., Caporale, C., Celletti, D. and Buonocore, V. 1998. Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 49:545-551.

Gilbertson, R.L., and Ryvarden, L. 1987. **North American Polypores** . Volume 2 . Oslo Norway:Fungiflora.

Hammel, K. E. and Cullen, D. 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Current Opinion in Plant Biology**. 11:349–355.

Hammel, K. E., Kalyanaraman, B., and Kirk,T. K. 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and fibenzo[*p*]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. **The Journal of Biological Chemistry**. 261:16948-16952.

Han, M. J., Choi, H.T and Song, H. G. 2005. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. **The Journal of Microbiology**. 43: 555-560.

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.

Harayama, S., Iwabychi, T., Yamauchi, Y. and Katsuta, A. 1997. Isolation and characterization of marine Nocardioides capable of growing and degrading phenanthrene at 42°C. **Journal of Marine Biotechnology**. 6:86-90.

Hatakka, A. Hofrichter, M. and Lundell, T. 2001. Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. **Applied Environmental and Microbiology**. 67:4588-4593.

Henner, P., Schiavon, M. Morel, J. L. and Lichtfouse, E. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) occurrence and remediation methods. **Analysis Magazine**. 25:56-59.

Hinga, K. R. 2003. Degradation rates of low molecular weight PAH correlate with sediment TOC in marine subtidal sediments. **Marine Pollution Bulletin**. 46:466-474.

Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C. and Yan, B. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of an anthraquinone dye. **Process Biochemistry Journal**. 39:1415–1419.

IARC, 1983. Polynuclear aromatic compounds. Part 1, Chemical, environmental and experimental data. **IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**. 32:500.

IARC, 1999. Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. **IARC Scientific Publications**. 148: 505.

Jaouani, A., Guillen, F., Penninckx, M. J., Martinez, A. T., and Martinez, M. J,. 2005. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. **Enzyme and Microbial Technology**. 36:478–486.

Juan, D., Jun, C., Juan, Z. and Shixiang, G. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and extracellular enzyme secretion in agitated and stationary cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Environmental Sciences.** 20:88–93.

Kipopolou, A.M., Manoli, E. and Samara, C. 1999. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. **Environmental Pollution.** 106:369-380.

Litthauer, D., Jansen, M., Tonder, A. V. and Wolffaardt, F. W. 2006. Purification and kinetics of a thermastable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). **Enzyme and Microbial Technology**. 40:563-568.

Loick, N., Hobbs, P. J., M. Hale D. C. and Jones, D. L. 2009. Bioremediation of poly-aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil by composting. **Environmental Science and Technology**. 39:271–332.

Low, L. Y. S., Abdullah, N. and Vikineswary, S. 2009. Evaluation of support materials for immobilization of *Pycnoporus sanguineus* mycelia for laccase production and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Research Journal of Environmental Sciences**. 3:357-366.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. 193:265–275.

Madhavi, S. R. and Lele, S.S. 2006. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. **Process Biochemistry**. 41:581–588.

Mark, M. O., Dobson, A. D. W., Barnes, J. D. and Singleton, I. 2005. The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil. **Chemosphere**. 63:307–314

Matsubara, M., Lynch, J. M. and Leij, A. F. 2006. A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. **Enzyme and Microbial Technology**. 39:1365–1372.

Mechichi, H. Z., Mechichi, T., Dhouib, A., Sayadi, S., Martınez, A. T. and Martınez, M. J. 2006. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**. 39:141–148.

Mester, T. and Field, J. A. 1997. Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. **FEMS Microbiology Letters**. 155:161-168.

Min, K. L., Kim, Y. H., Kim, Y. W., Jung, H. S. and Hah, Y. C. 2001. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 392:279–286.

Monoz, C., Guilllin, F., Martinez, A.T., Martinez, M.J.1997. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. **Current Microbiology**. 34:1–5.

Oda, Y., Adachi, K., Aita, I., Ito, M., Aso, Y. and Igarashi, H. 1991. Purification and properties of laccase excretes by *Pycnoporus coccineus*. **Agricultural and Biological Chemistry.** 51:1393-1395.

Patrick, F., Mtui, G., Mshandete, A. M., Johansson, G. and Kivaisi, A. 2009. Purification and characterization of a laccase from the basidiomycete *Funalia trogii* (Berk.) isolated in Tanzania. **African Journal of Biochemistry Research**. 3:250-258.

Pickard, M. A., Roman, R., Raunel, T. and Duhalt, V. R. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. **Applied Environmental and Microbiology**. 65:3805–3809.

Pointing, S. B., Jones, Jones, E. B. G. and Vrijmoed, L. L. P. 2000. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**. 92:139-144.

Premjet, S., Bunthong, Oraphin. and Premjet, D. 2009. The ability of five fungal isolates from nature to degrade of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in culture media Australian. **Journal of Basic and Applied Sciences**. 3:1076-1082.

Punnapayak, H., Prasongsuk, S., Messner, K., Danmek, K. and Lotrakul, P. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by laccase from a tropical white rot fungus *Ganoderma lucidum*. **African Journal of Biotechnology**. 8:5897-5900.

Ruchirawat, M., Navasumrit, P., Settachan, D., Tuntaviroon, J., Buthbumrung, N. and Sharma, S. 2005. Measurement of genotoxic air pollutant exposures in street vendors and school children in and near Bangkok. **Toxicology and Applied Pharmacology.** 206:207–217.

Ryvarden, L. and Johansen, I. 1980. **A Preliminary Polypore Flora of East Africa.** Oslo Norway:Fungiflora.

Saha, M., Togo, A., Mizukawa, K., Murakami, M., Takada, H., Mohamad, P., Zakaria, N. H., Tuyen, B. C., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Sarkar, S. K., Bhattacharya, B., Mishra, P. and Tana, T. S. 2009. Sources of sedimentary PAHs in tropical Asian waters: Differentiation between pyrogenic and petrogenic sources by alkyl homolog abundance. **Marine Pollution Bulletin**. 58: 189-200.

Shin, K.S. and Lee, Y.J. 2000. Purification and chracterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 384:109-115.

Tien, M. and Kirk, K. T. 1983. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Method in Enzymology**. 161:238-249.

Tien, M. and Kirk, K. T. 1986. Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol fl-aryl ether substructure of lignin. **Biochemical Journal**. 236:279-287.

Tuisel, H., Sinclair, R., Bumpus, J. A., Ashbaugh, W., Brock, B. J. and Aust, S.D.1990. Lignin peroxidase H2 from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and stability to temperature and pH. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 279:158-166.

Turki, A. I. A. 2009. Microbial polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in soil. **Research Journal of Environmental Toxicology**. 3:1-8.

Ürek, R. O., Nurdan, K. and Pazarlio, S. 2004. Purification and partial characterization of manganese peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**. 39:2061–2068.

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 and Biodegradation**. 58:15–21.

Vikineswary, S., Abdullah, N., Renuvathani, M., Sekaran M., Pandey, A. and Jones, E.B.G. 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**. 97: 171–177.

Vos, D. R.H., Dokkum, V. W., Schouten, A., and Berkhout, D. J. P. 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). **Food and Chemical Toxicology**. 28:263-268.

Watanabe, T., Shirai, N., Okada, H., Honda, Y. and Kuwahara, M. 2001. Production and chemiluminescent free radical reactions of glyoxal in lipid peroxidation of linnoleic acid by the ligninolytic enzyme, manganese peroxide. **European Journal of Biochemistry.** 268:6114-6112.

Wattayakorn, G. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the Chao Phraya estuary, Thailand. **The Journal of Science Research Chulalongkorn University.** 28, Special Issue I (NRC-EHWM)

Wells, A., Teria, M. and Eve, T. 2006. Green oxidations with laccase mediator systems. **Biochemical Society Transactions**. 34:304–308.

Widdowson, M. A., Shearer, S., Andersen, R. G. and Novak, J. T. 2005. Remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in groundwater using poplar trees. **Environmental Science and Technology**. 39:1598-1605.

Wolfenden, B. S. and Willson, R. L. 1982. Radical cation as reference chromogens in kinetic studies of one-eletron transfer reaction: pulse radiolysis studies of 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid). **Journal of the Chemical Society**. 2:805-812.

Xu, F. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **The Journal of Biological Chemistry**. 272:924-928.

Yoshida, H. 1883. Chemistry of lacquer (urushi). **Journal of the Chemical Society**. 43:472–486.

Zhao, M., Lu, L., Zhang, B. B., Yu, S. Y. Bian, X.J., Wang, W. and Wang, Y. 2006. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 62:1151-1158.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

| | |
|---|---|
| มันฝรั่ง | 200 กรัม |
| น้ำตาลกลูโคส | 20 กรัม |
| วุ้น | 15 กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 ลิตร |

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นลูกเต๋าขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร ต้ มกับน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เมื่อสุกแล้วจึงกรองเอาแต่น้ำ จากนั้นเติมน้ำตาลกลูโคสและวุ้นคนให้ละลายหมด เติมน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Basal Medium

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 20 | กรัม |
| L-asparagine | 2.5 | กรัม |
| D,L-phenylalanine | 0.15 | กรัม |
| Adenine | 0.0275 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 1 | กรัม |
| $MgSO_4 .7H_2O$ | 0.5 | กรัม |
| $CaCl_2$ | 0.01 | กรัม |
| $FeSO_4 .7H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| $MnSO_4.4H_2O$ | 0.001 | กรัม |
| $ZnSO_4 .7H_2O$ | 0.001 | กรัม |
| $CuSO_4 .5H_2O$ | 0.002 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เป็น 5 เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเ ครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Basal Medium Agar

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 20 | กรัม |
| L-asparagine | 2.5 | กรัม |
| D,L-phenylalanine | 0.15 | กรัม |
| Adenine | 0.0275 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 1 | กรัม |
| $MgSO_4 .7H_2O$ | 0.5 | กรัม |
| $CaCl_2$ | 0.01 | กรัม |
| $FeSO_4 .7H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| $MnSO_4.4H_2O$ | 0.001 | กรัม |
| $ZnSO_4 .7H_2O$ | 0.001 | กรัม |
| $CuSO_4 .5H_2O$ | 0.002 | กรัม |
| วุ้น | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เป็น 5 เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**ภาคผนวก ข**

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการวัดปริมาณโปรตีน (Lowry et al., 1951)

1.1 เตรียมสารละลาย BSA มาตรฐาน เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปละลายด้วยน้ำกลั่น

1.2 การเตรียมสารละลาย Lowry reagent I ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2.1 เตรียม sodium potassium tartrate ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1.2.2 เตรียม copper sulphate ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1.2.3 เตรียม sodium carbonate ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ละลายใน 0.1 N sodium hydroxide

เติมสารละลาย 1.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 1.2.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย 1.2.3 ปริมาตร 98 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยสารละลาย Lowry reagent I จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง

1.3 การเตรียมสารละลาย Lowry reagent II ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

นำ phenol reagent ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2. การเตรียม 0.1 M Glycine HCl buffer pH 3.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งไกลซีน 0.75 กรัม แล้วละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้เป็น 3.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

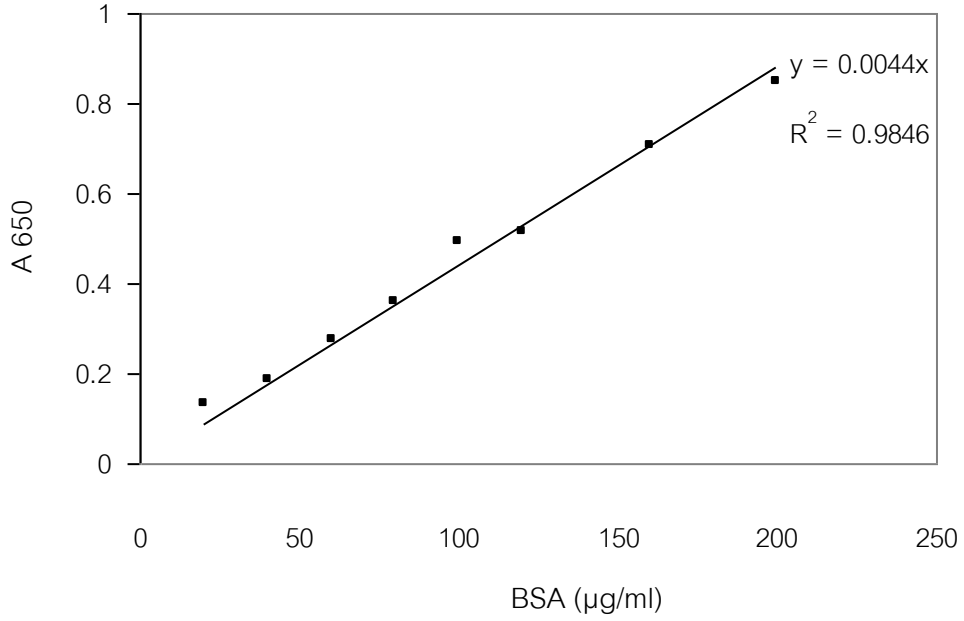
3. การเตรียม 0.1 M Glycine sodium hydroxide buffer pH 9 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เติม 0.1 M Glycine ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และเติม 0.1 M Sodium hydroxide ปริมาตร 4.4 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ด้วย 1 N NaOH ให้เป็น 9 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

**ภาคผนวก ค**

การทำกราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

1. เตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ใส่ละลาย BSA ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร ชุดควบคุมทำการเติมน้ำกลั่นแทนสารละลาย BSA ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
3. เติมสารละลาย Lowry reagent I (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Lowry reagent II (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร
5. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีน




รูปที่ 40 กราฟมาตรฐานของโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

## ภาคผนวก ง

### การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์

1. การวัดแอกติวิตีลิกนิน เพอร์ออกซิเดส (Tuisel et al., 1990)

1.1 การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| 20 mM Veratryl alcohol | 0.1 | มิลลิลิตร |
| 0.1 M Sodium Tartrate buffer (pH 3.0) | 0.25 | มิลลิลิตร |
| 2.5 mM $H_2O_2$ | 0.1 | มิลลิลิตร |
| Enzyme | 0.01 | มิลลิลิตร |
| $H_2O$ | 0.54 | มิลลิลิตร |

1.2 นำ reaction mixture ในข้อ 1.1 มาผสมกันในคิวเวต โดยเติม 2.5 mM $H_2O_2$ เป็นลำดับสุดท้าย

1.3 ทำการวัด reaction mixture ในข้อ 1.2 ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร เวลาทำปฏิกิริยา 1 นาที โดยมีชุดควบคุมเป็น reaction mixture ที่ไม่มีการเติมเอนไซม์

1.4 การคำนวณหาแอกติวิตีของลิกนิน เพอร์ออกซิเดส

1 หน่วยแอกติวิตีของลิกนิน เพอร์ออกซิเดสคือ ปริมาณของลิกนิน เพอร์ออกซิเดสที่สามารถ ออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมล ของ Veratryl alcohol ใน 1 นาที เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 310 นาโนเมตร แล้วนำมาแทนค่าตามสูตร

$$\text{ลิกนิน เพอร์ออกซิเดสแอกติวิตี (U/ml)} = \frac{\Delta \text{ A/min} * \text{Volume reaction mixture} * 1000}{93{,}000 * 1 * \text{Volume enzyme solution}}$$

$\varepsilon$ 310 นาโนเมตร = 93,000 $M^{-1}.cm^{-1}$

2. การวัดแอกติวิตีแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส (Watanabe et al., 2001)

2.1 การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| 4 mM 2,6 Dimethoxyphenol | 0.05 | มิลลิลิตร |
| 0.1 M Sodium Tartrate buffer (pH 5.0) | 0.25 | มิลลิลิตร |
| 5 mM $MnSO_4$ | 0.1 | มิลลิลิตร |
| 1 mM $H_2O_2$ | 0.1 | มิลลิลิตร |
| Enzyme | 0.01 | มิลลิลิตร |
| $H_2O$ | 0.49 | มิลลิลิตร |

2.2 นำ reaction mixture ในข้อ 2.1 มาผสมกันในคิวเวต โดยเติม 1 mM $H_2O_2$ เป็นลำดับสุดท้าย

2.3 ทำการวัด reaction mixture ในข้อ 2.2 ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เวลาทำปฏิกิริยา 1 นาที โดยมีชุดควบคุมเป็น reaction mixture ที่ไม่มีการเติมเอนไซม์

2.4 การคำนวณหาแอกติวิตีของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส

1 หน่วยแอกติวิตีของแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส คือ ปริมาณของแมงกานีส เพอร์-ออกซิเดสที่สามารถ ออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมล ของ 2,6 Dimethoxyphenol ใน 1 นาที เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร แล้วนำมาแทนค่าตามสูตร

$$\text{แมงกานีส เพอร์ออกซิเดสแอกติวิตี (U/ml)} = \frac{\Delta \text{ A/min} * \text{Volume reaction mixture} * 1000}{49{,}600 * 1 * \text{Volume enzyme solution}}$$

$\varepsilon$ 470 นาโนเมตร = 49,600 $M^{-1}.cm^{-1}$

3. การวัดแอกติวิตีแลคเคส (Madhavi and Lele, 2006)

3.1 การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| 0.1 M Glycine HCl buffer (pH 3.5) | 0.6 | มิลลิลิตร |
| 1 mM ABTS | 0.2 | มิลลิลิตร |
| Enzyme | 0.4 | มิลลิลิตร |

3.2 นำ reaction mixture ในข้อ 3.1 มาผสมกันในคิวเวต โดยเติมเอนไซม์เป็นลำดับสุดท้าย

3.3 ทำการวัด reaction mixture ในข้อ 3.2 ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เวลาทำปฏิกิริยา 1 นาที โดยมีชุดควบคุมเป็น reaction mixture ที่ไม่มีการเติมเอนไซม์

3.4 การคำนวณหาแอกติวิตีของแลคเคส (Wolfenden and Willson, 1982; Childs and Bardsley, 1975)

1 หน่วยแอกติวิตีของแลคเคส คือ ปริมาณของแลคเคสที่สามารถ ออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมล ของ ABTS ใน 1 นาที เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร แล้วนำมาแทนค่าตามสูตร

$$\text{แลคเคสแอกติวิตี (U/ml)} = \frac{\Delta \text{ A/min} * \text{Volume reaction mixture} * 1000}{36{,}000 * 1 * \text{Volume enzyme solution}}$$

$\varepsilon$ 420 นาโนเมตร = 36,000 $M^{-1}.cm^{-1}$

## ภาคผนวก จ

ผลพื้นที่ใต้กราฟของการย่อยสลาย PAHs แต่ละชนิดที่ตรวจสอบด้วยเครื่อง HPLC

ตารางที่ 14 ผลการย่อย PAHs แต่ละชนิดโดยการใช้แลคเคส

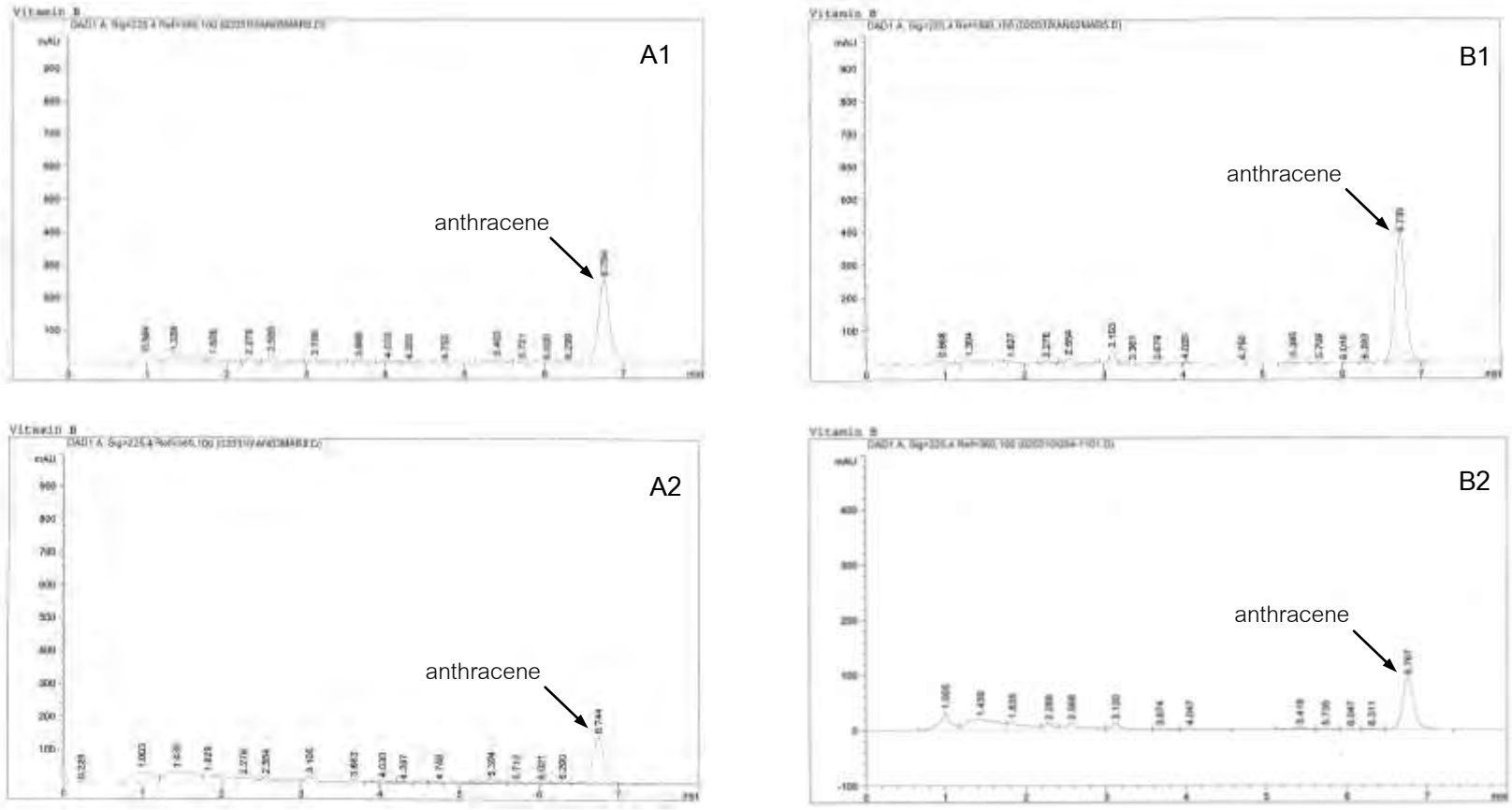
| PAHs | 2 ชั่วโมง | | | 24 ชั่วโมง | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | พื้นที่ใต้กราฟ ชุดควบคุม | พื้นที่ใต้กราฟ แลคเคส | เปอร์เซ็นต์ การย่อยสลาย | พื้นที่ใต้กราฟ ชุดควบคุม | พื้นที่ใต้กราฟ แลคเคส | เปอร์เซ็นต์ การย่อยสลาย |
| anthracene | 3,590.50±219.91* | 919.50±23.33 | 74.32±2.22 | 18,705.00±1661.70 | 2,254.50±430.63 | 87.80±3.39 |
| phenanthrene | 18,415.50±557.706 | 12,541.50±19.09 | 31.86±2.24 | 9,203.00±651.95 | 5,272.50±84.15 | 42.60±3.15 |
| fluoranthene | 16,486.50±1150.46 | 10,543.50±762.97 | 35.88±4.78 | 10,121.50±762.97 | 1,608.00±418.60 | 84.22±2.95 |
| pyrene | 14,661.00±86.28 | 3466.50±105.36 | 76.35±0.86 | 12,396.00±808.93 | 1,918.00±728.32 | 84.30±6.90 |
| benzo(a)pyrene | 8,914.50±782.77 | 5,107.00±400.22 | 42.69±0.54 | 12,801.00±432.75 | 6,490.00±758.02 | 49.37±4.21 |

หมายเหตุ * แสดงค่าเฉลี่ย±ช่วงพิสัยที่ได้จากการทดลอง 2 ซ้ำ

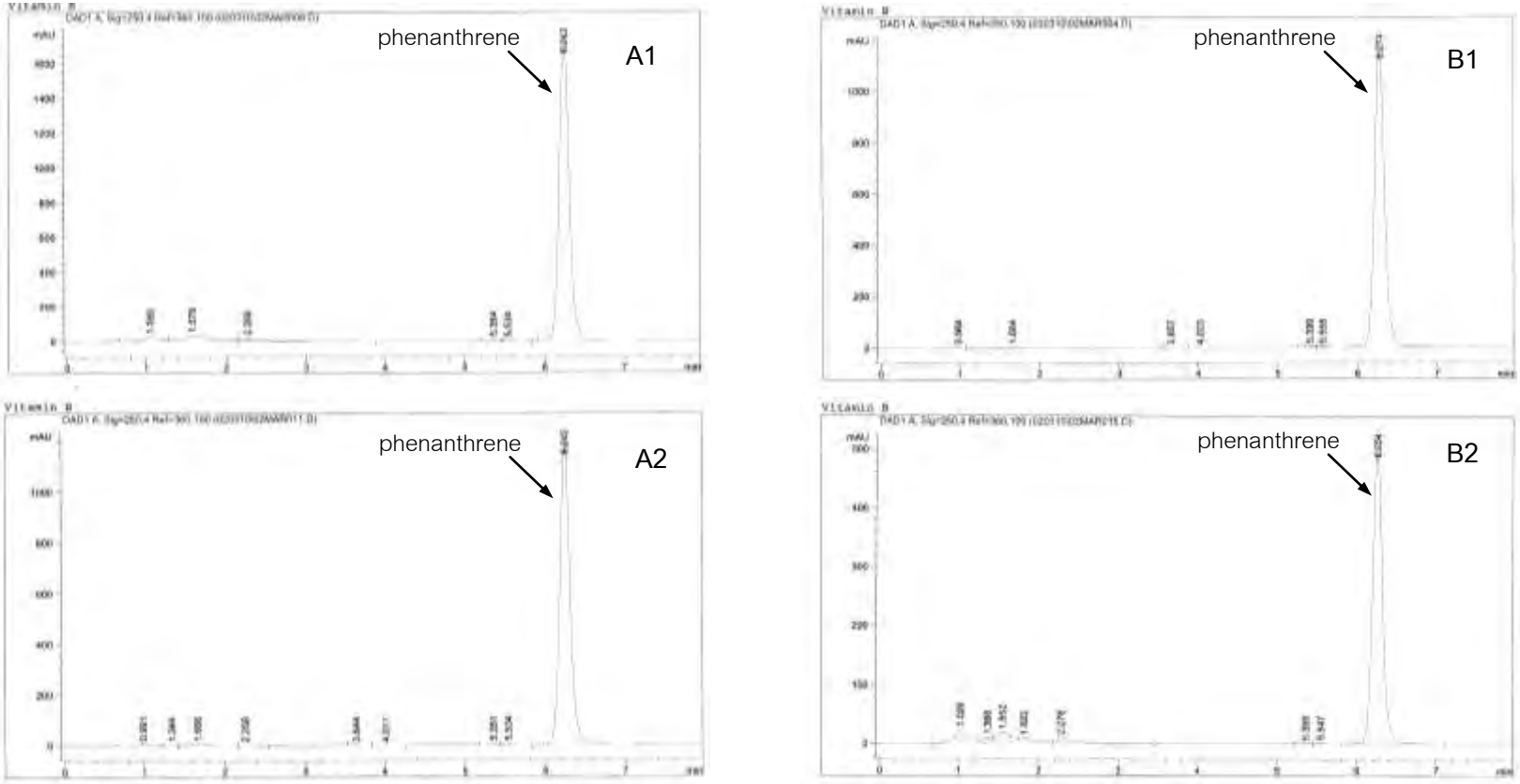
ตารางที่ 15 ผลการย่อย PAHs แต่ละชนิดโดยการใช้แลคเคสร่วมกับเมดิเอเตอร์

| PAHs | 2 ชั่วโมง | | | 24 ชั่วโมง | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | พื้นที่ใต้กราฟ ชุดควบคุม | พื้นที่ใต้กราฟ แลคเคส | เปอร์เซ็นต์ การย่อยสลาย | พื้นที่ใต้กราฟ ชุดควบคุม | พื้นที่ใต้กราฟ แลคเคส | เปอร์เซ็นต์ การย่อยสลาย |
| anthracene | 2,583.00±1.41* | 794.00±49.50 | 69.26±1.90 | 2,839.00±43.84 | 837.50±7.78 | 70.49±0.73 |
| phenanthrene | 15,193.50±253.85 | 9,129.50±211.42 | 39.89±2.40 | 9,985.00±424.26 | 4,949.00±387.49 | 50.47±1.78 |
| fluoranthene | 14,274.50±103.94 | 10,685.50±252.44 | 25.13±2.31 | 10,594.00±19.80 | 4,022.00±493.56 | 62.04±4.59 |
| pyrene | 12,925.50±3049.75 | 4,110.50±2131.92 | 69.28±9.25 | 10,053.50±20.51 | 2,334.00±1,316.63 | 76.80±13.05 |
| benzo(a)pyrene | 8,475.00±154.15 | 4,315.00±175.36 | 49.37±1.14 | 14,955.50±859.13 | 5,059.50±693.67 | 66.25±2.70 |

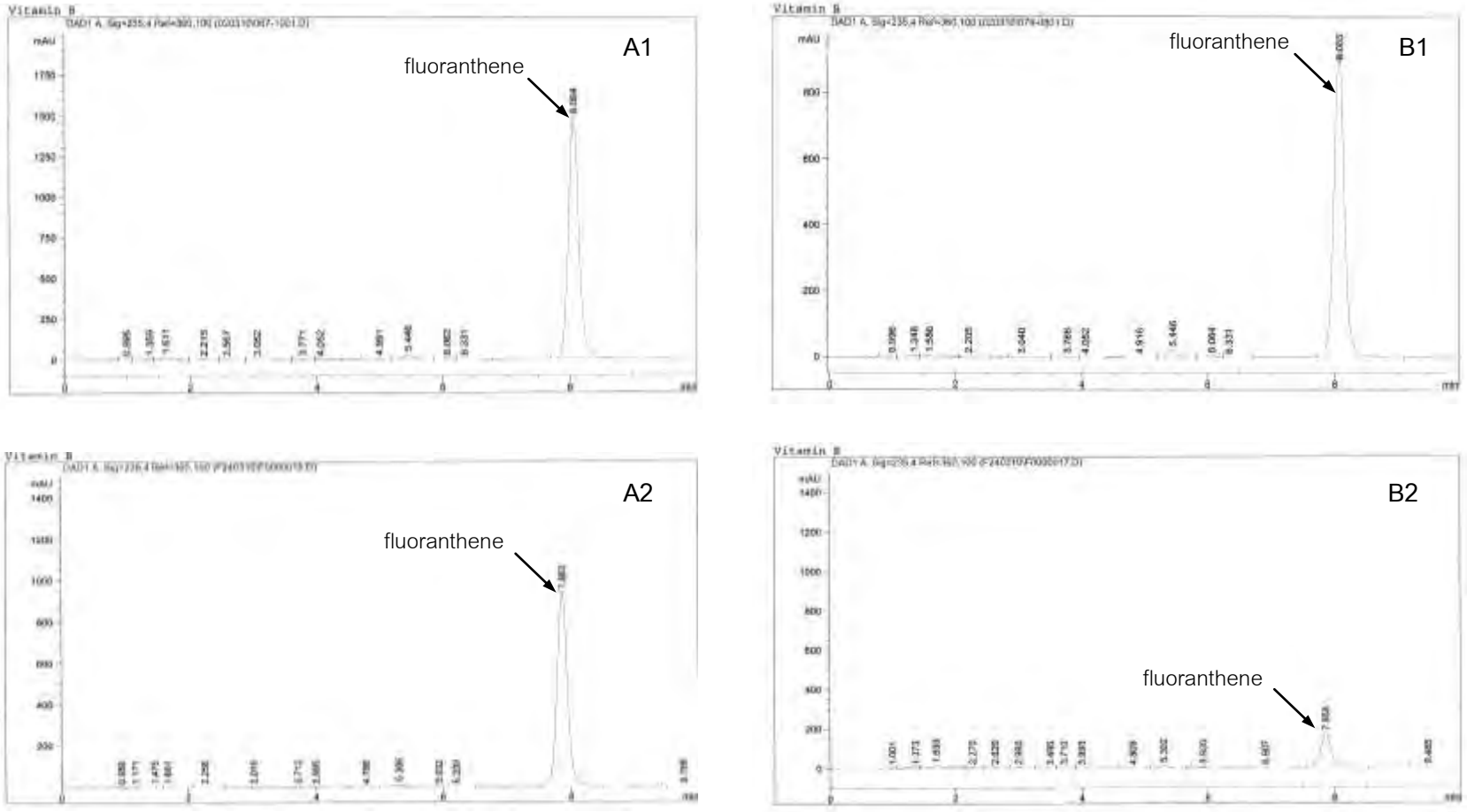
หมายเหตุ * แสดงค่าเฉลี่ย±ช่วงพิสัยที่ได้จากการทดลอง 2 ซ้ำ



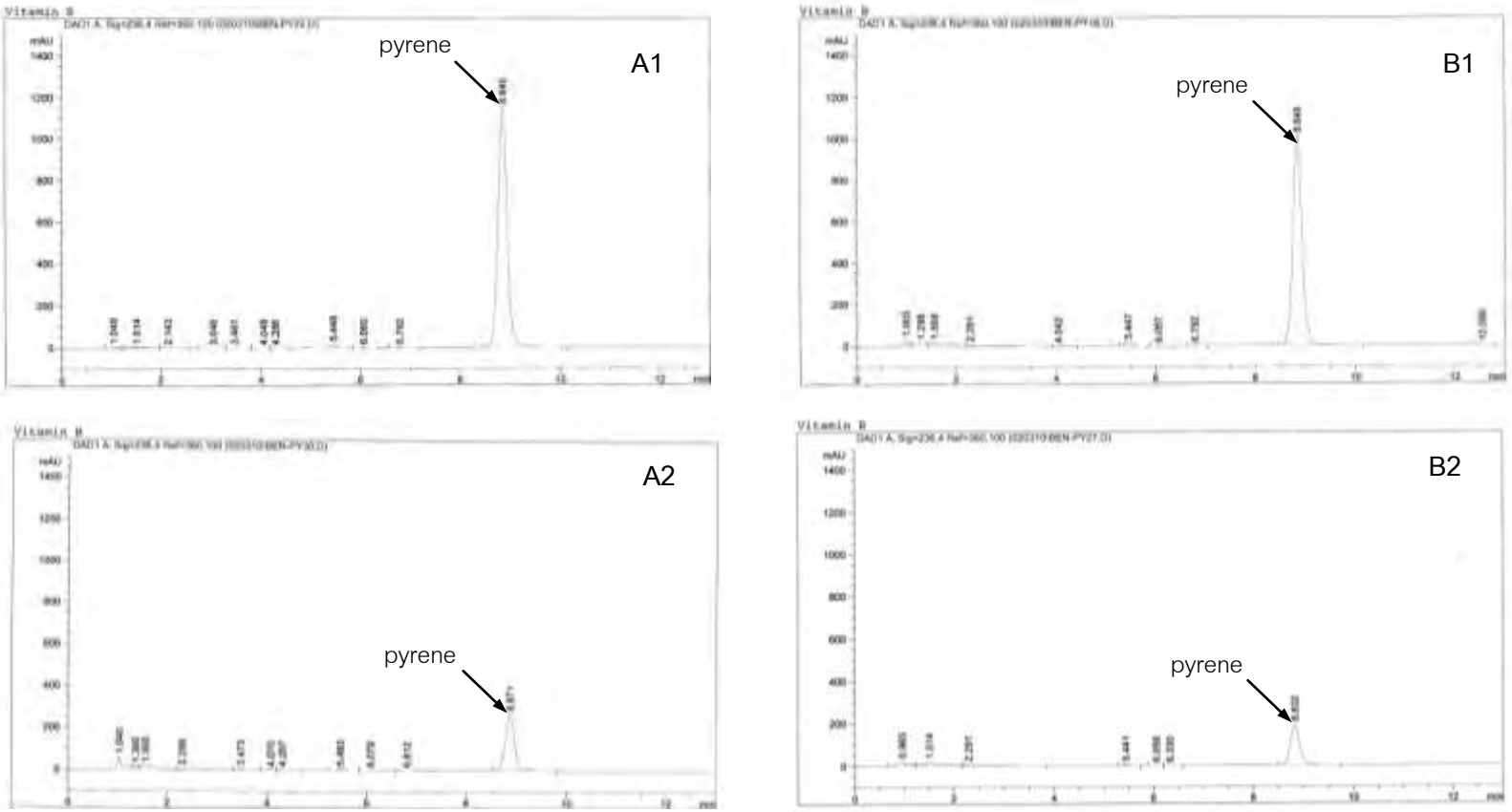

รูปที่ 41 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของการย่อยสลาย anthracene ความเข้มข้น 100 ppm โดยการใช้แลคเคสที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา (A) 2 ชั่วโมง และ (B) 24 ชั่วโมง โดย (1) แสดงชุดควบคุม และ (2) แสดงชุดการทดลอง



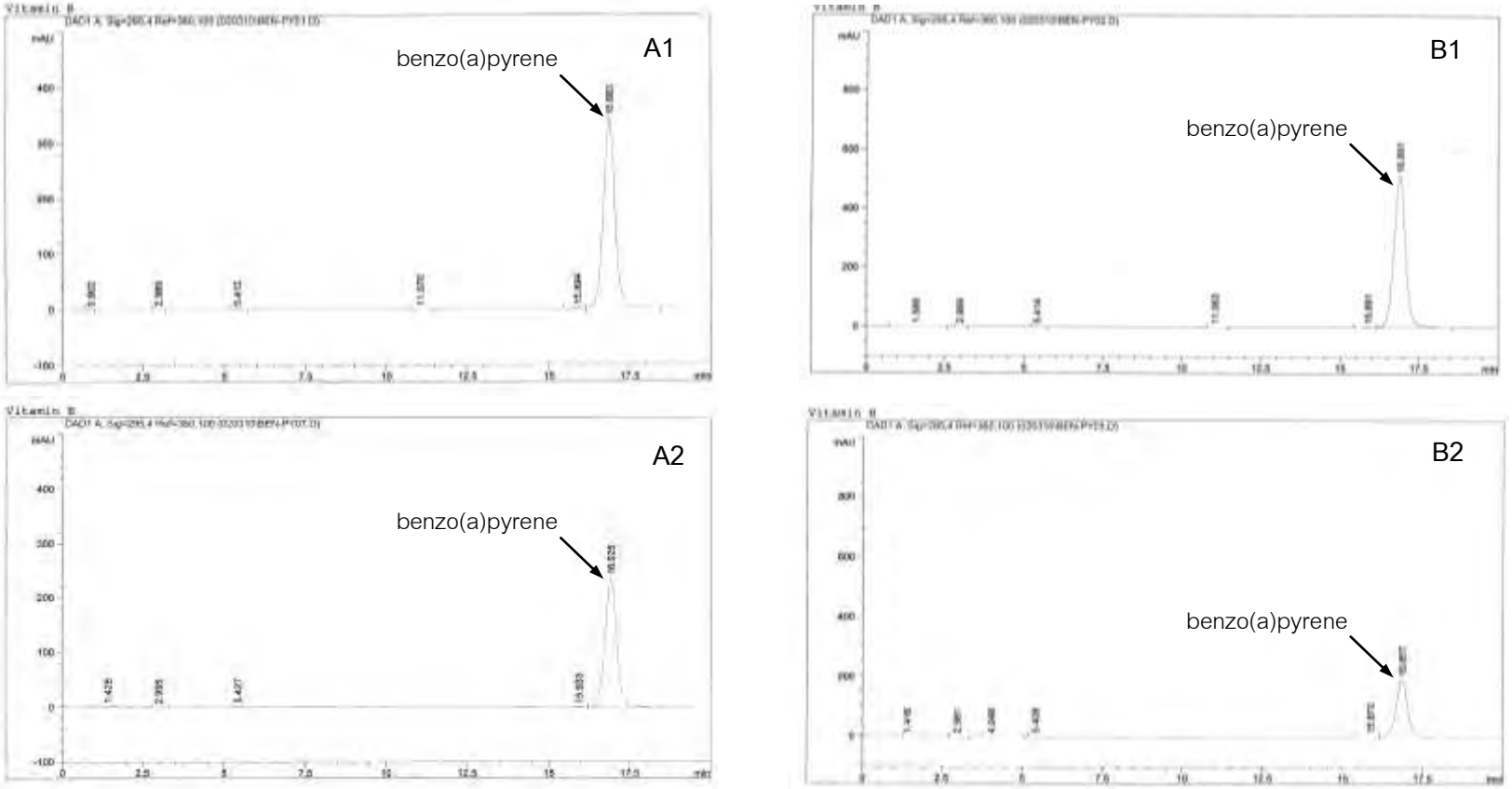

รูปที่ 42 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของการย่อยสลาย phenanthrene ความเข้มข้น 100 ppm โดยการใช้แลคเคสที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา (A) 2 ชั่วโมง และ (B) 24 ชั่วโมง โดย (1) แสดงชุดควบคุม และ (2) แสดงชุดการทดลอง




รูปที่ 43 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของการย่อยสลาย fluoranthene ความเข้มข้น 100 ppm โดยการใช้แลคเคสที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา (A) 2 ชั่วโมง และ (B) 24 ชั่วโมง โดย (1) แสดงชุดควบคุม และ (2) แสดงชุดการทดลอง




รูปที่ 44 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของการย่อยสลาย pyrene ความเข้มข้น 100 ppm โดยการใช้แลคเคสที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา (A) 2 ชั่วโมง และ (B) 24 ชั่วโมง โดย (1) แสดงชุดควบคุม และ (2) แสดงชุดการทดลอง




รูปที่ 45 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของการย่อยสลาย benzo(a)pyrene ความเข้มข้น 100 ppm โดยการใช้แลคเคสที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา (A) 2 ชั่วโมง และ (B) 24 ชั่วโมง โดย (1) แสดงชุดควบคุม และ (2) แสดงชุดการทดลอง

# ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ปวีณา เกิดเมื่อวันที่ 27 มกราคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก เมื่อปี พ.ศ. 2550 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโ ลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2553

## ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

ขณะศึกษาได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจาก “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 11 ครั้งที่ (1/2553) ภาคปลาย ปีการศึกษา2552 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การเสนอผลงาน

Thongkred, P., Lotrakul, P., Prasongsuk S., Punnapayak, H. 2009. ISOLATION AND SCREENING OF ANTHRACENE-DEGRADING WHITE-ROT FUNGI. In Proceeding of The 21st Annual Meeting and International Conferrence of Thai Society for Biotechnology: 375-381. Queen Sirikit National Convention Center Bangkok, Thailand. September 24-25, 2009.