การผลิตแลคเคสจาก *Ganoderma* sp. เพื่อใช้ในการย่อยสลายทางชีวภาพของ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

นายบัณฑิต บุญทา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974 – 14 – 2319 – 5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF LACCASE FORM *Ganoderma* sp. FOR THE BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS

Mr.Bundit Boonta

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 2005

ISBN 974 – 14 – 2319 – 5

481609

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตแลคเคสจาก *Ganoderma* sp. เพื่อใช้ในการย่อยสลายทางชีวภาพของ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
โดย	นายบัณฑิต บุญทา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร.สุชาติ ชะนะมา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

_____ คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____ ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.สุชาติ ชะนะมา)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์)

บัณฑิต บุญทา: การผลิตแลคเคสจาก *Ganoderma* sp. เพื่อใช้ในการย่อยสลายทางชีวภาพของ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons อ.ที่ปรึกษา: รศ. ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อ.ที่ปรึกษาร่วม: อ.ดร.สุชาติ ชะนะมา; 97 หน้า ISBN 974 – 14 – 2319 – 5

การผลิตแลคเคสจากเชื้อรา *Ganoderma lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ SP5 CHEM KKU 1 KC 3 และ BOT พบว่า *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM มีการผลิตแลคเคสดีที่สุด ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแลคเคสในอาหารสูตร Production ปริมาตร 100 มิลลิกรัม พบว่า มีการผลิตแลคเคสดีที่สุด (0.007 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) เมื่อมีการเติม Cu^{2+} 0.4 มิลลิโมลาร์ และตัวยึดเกาะที่เป็นฟองน้ำขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 50 ชิ้น ลงในอาหาร เป็นระยะเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เมื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการอัลตราฟิวเตชัน ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 50 – 80 เปอร์เซนต์ และทำไอออนเอกเชนจ์โครมาโทร-กราฟีที่มีคอลัมน์เป็น HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow สามารถแยกแลคเคสได้ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 20.574 เท่า มีผลผลิตเอนไซม์ 2.787 เปอร์เซนต์ มีค่าแอคติวิตี 0.144 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ เมื่อศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า ทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 4.5 เมื่อใช้โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส การนำแลคเคสไปประยุกต์ใช้ในการเปลี่ยนโครงสร้างทางชีวภาพของสารผสม Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) ทั้ง 16 ชนิด (16 US.EPA) พบว่า แลคเคสที่ผลิตได้สามารถลดปริมาณสารประกอบ PAHs ลงได้ โดยใช้แลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยไอออนเอกเชนจ์โครมาโทรกราฟี พบว่า สารประกอบ PAHs นี้จะถูกย่อยสลายได้ถึง 62.34 เปอร์เซนต์ โดย Naphthalen, acenaphthylene phenanthrene flourene acenaphthene anthracene fluoranthene pyrene และ benzo[*b*]fluoranthene มีอัตราการถูกย่อยสลายได้มาก (มากกว่า 50 เปอร์เซนต์) ในขณะที่ dibenzo[*a,h*]anthracene indeno[1,2,3-*cd*]pyrene benzo[*a*]anthracene benzo[*k*]fluoranthene และ benzo[*a*]pyrene มีอัตราการย่อยสลายที่ (น้อยกว่า 50 เปอร์เซนต์)

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต _____

ปีการศึกษา 2548 ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

4572351723: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: GANODERMA/LACCASE/PAHs/BIODEGRADATION

BUNDIT BOONTA: PRODUCTION OF LACCASE FORM GANODERMA SP. FOR THE BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: SUCHART CHANAMA, Ph.D.; 97 pp. ISBN 974 – 14 – 2319 – 5

Ganodrma lucidum strains SP5, CHEM, KKU 1, KC 3, and BOT were used to produce laccase. The maximum enzyme was observed by *G. lucidum* CHEM (0.007 U/mg). The optimum conditions for these fungi in 100 ml Production medium containing 0.4 mM Cu^{2+} and 1 cm^3 sponge 50 pieces. They were cultivated at 30°C, 150 rpms for 4 days. Enzyme was purified by ultrafiltration, 50-80% ammonium sulphate precipitation, and Ion-exchanged chromatography on HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow. After that, one peak laccase was separated. It have the activity increased 20.574 fold and enzyme yield value 2.787 % and 0.144 u/mg protein Optimum conditions for laccase activities was studied. Laccase have the highest activity at sodium acetate buffer pH 4.5, temperature 50 °C. Application of these laccase for 16 mixture PAHs (16 US.EPA) remediation, these PAHs shown 62.34% total degradation by laccase with partial purified by Ion-exchanged chromatography. Naphthalene, acenaphthylene, phenanthrene, flourene, acenaphthene, anthracene, fluoranthene, pyrene, and benzo[*b*]fluoranthene shown high % degradation rate (more than 50%). While dibenzo[*a,h*]anthracene, indeno[1,2,3-*cd*]pyrene benzo[*a*]anthracene, benzo[*k*]fluoranthene, and benzo[*a*]pyrene show low % degradation rate (less than 50%) by partial purified laccase.

Field of study Biotechnology Student's signature _____

Academic year 2005 Advisor's signature _____

Co-advisor's signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนได้แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สุชาติ ชะนะมา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาแนะนำ และให้ข้อคิดเห็น ในการทำวิจัยจนงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณขรรค์ชัย ดั้นเมฆ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย และสอนในทุกๆ เรื่องเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณอังศุธร รัชตะวราห์ ที่ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าตลอดมา

ขอขอบคุณคณาจารย์ รวมถึงบุคลากรในภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่เอื้อเฟื้อและช่วยเหลือ เป็นกำลังใจตลอดมาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา คุณลุงป้า และน้องสาว สำหรับความรัก ความอบอุ่น และคอยช่วยเหลือ เป็นกำลังใจให้เสมอมา จนสำเร็จการศึกษาและตลอดไป

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฏ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

วัตถุประสงค์ 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

ขอบเขตการวิจัย 3

บทที่ 2 4

การตรวจเอกสาร 4

การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต (chemobiokinetics) 8

การศึกษาความเป็นพิษเฉพาะด้าน (special toxicity studies) 12

กฎหมายเกี่ยวกับสารประกอบ PAH ในประเทศไทย 18

คุณลักษณะทั่วไปของแลคเคส 31

การนำแลคเคสไปใช้ประโยชน์ 41

บทที่ 3 42

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย 42

วัสดุอุปกรณ์ 42

สารเคมี 43

วิธีดำเนินการวิจัย 47

หน้า

3.1 เชื้อรา *Ganoderma lucidum* ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยมี 5 สายพันธุ์ 47
3.2 การศึกษาการผลิตแลคเคส บนอาหารแข็งสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติม 1% (W/V) Gallic acid 47
3.3 การศึกษาการเจริญของ *G. lucidum* ที่เจริญบนอาหารแข็งชนิด PDA ที่เติม Anthacene 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ DDT 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดัดแปลงจาก B.R.M. Vyas,และคณะ 1994 47
3.4 การศึกษาการผลิตแลคเคสของเชื้อ *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารสูตร Production 48
3.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *G.lucidum* ในอาหารเหลวสูตร PDB 48
3.6 การศึกษาการผลิตแลกเคสของเชื้อ *G.lucidum* ในอาหารเหลวสูตร Production 49
3.7 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ Cu^{2+} ต่อการผลิตแลคเคส 49
3.8 การศึกษาผลของการเติมตัวช่วยยึดเกาะต่อการผลิตแลคเคส 50
3.9 การผลิตเอนไซม์ในปริมาณ 3 ลิตร 50
3.10 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเครื่องอัลตราฟิลเตชัน 51
3.11 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 51
3.12 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน โดยแอนไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี 52
3.13 การศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคส 52
3.14 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคส 52
3.15 การศึกษาย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทางชีวภาพของแลคเคส 52
3.16 การตรวจสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของแลคเคสด้วยเครื่อง HPLC 53

บทที่ 4 54
ผลการทดลอง 54
4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของ *G.lucidum* บนอาหารแข็งสูตร PDA ที่เติม Gallic acid 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร 54

หน้า

4.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของ *G.lucidum* ที่เจริญบนอาหารแข็งชนิด PDA ที่เติม anthracene 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ DDT 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 55
4.3 การศึกษาการผลิตแลตเคสของเชื้อรา *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารสูตร Production 58
4.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *G.lucidum* ในอาหารเหลวชนิด PDB 60
4.5 การศึกษาการผลิตแลกเคสของเชื้อ *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM ในอาหารเหลวสูตร Production medium 61
4.6 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ Cu2+ ต่อการผลิตแลคเคสของเชื้อ *G.lucidum* 62
4.7 การศึกษาผลของการเติมตัวช่วยยึดเกาะต่อการผลิตแลคเคส 63
4.8 การผลิตเอนไซม์ในปริมาณ 3 ลิตร และการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนโดยการใช้เครื่องอัลตราฟิลเตชัน 64
4.9 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 65
4.10 การทำให้บริสุทธิ์ด้วยแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี 66
4.11 การศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคส 69
4.12 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคส 70
4.13 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทางชีวภาพของแลคเคสด้วยเครื่อง HPLC 71

บทที่ 5 74
วิจารณ์ผลการทดลอง 74
5.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อรา Ganoderma lucidum บนอาหารแข็งสูตร PDA ที่เติม gallic acid 1 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร 74
5.2 การศึกษาการเจริญของ *G.lucidum* ที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็งชนิด PDA ที่เติม anthracene 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ DDT 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 75
5.3 การศึกษาการผลิตแลตเคสของเชื้อ G.lucidum ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารสูตร Production 75

หน้า

5.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ Cu2+ ต่อการผลิตแลคเคสของเชื้อ *G.lucidum* 76
5.5 การศึกษาผลของการเติมตัวช่วยยึดเกาะต่อการผลิตแลคเคส 76
5.6 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนด้วยการทำอัลตราฟิลเตชัน และการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 76
5.7 การทำให้บริสุทธิ์ด้วยแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี 77
5.8 ค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ... 78
5.9 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทางชีวภาพของแลคเคสด้วยเครื่อง HPLC 78

บทที่ 6 80
สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ 80
6.1 การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตแลคเคสได้ดี 80
6.2 ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแลคเคสจากเชื้อรา *Ganoderma lucidum* สายพันธุ์ CHEM 80
6.3 ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 81
6.4 การทำให้แลคเคสบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีไอออนเอกซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี. 81
6.5 การนำแลคเคสไปทำย่อยสลายสารประกอบ PAHs 83

รายการอ้างอิง 84
ภาคผนวก 91
ภาคผนวก ก 92
ภาคผนวก ข 94
ภาคผนวก ค 96
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 97

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณของ PAH ที่ปล่อยออกมากับไอเสียรถยนต์ 5
ตารางที่ 2 สารประกอบ PAH 16 ชนิดที่หน่วยงาน U.S. Environmental Protection Agency ได้ประกาศว่าก่อให้เกิดมลพิษ 7
ตารางที่ 3 LD50 ของ PAH ในสัตว์ทดลอง 11
ตารางที่ 4 การจัดกลุ่ม PAH โดย International Agency for Research on Cancer 13
ตารางที่ 5 เชื้อราบางชนิดที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs 20
ตารางที่ 6 ปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นของสารอะโรมาติกบางชนิด 21
ตารางที่ 7 สารที่เป็นมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมที่ถูกออกซิไดซ์ได้โดยเชื้อราที่ย่อยสลายลิกนินบางชนิด 26
ตารางที่ 8 ตัวอย่างสายพันธุ์ไวท์รอทที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส 32
ตารางที่ 9 สารที่มีความสามารถในการตรวจสอบการทำงานของแลคเคส 35
ตารางที่ 10 ค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิต่อการทำงานของแลคเคส 37
ตารางที่ 11 สารตั้งต้น และค่า molar extinction coefficient 39
ตารางที่ 12 การทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 40
ตารางที่ 13 อัตราส่วนของส่วนผสมที่ใช้บ่มร่วมกันในการศึกษาการทำปฏิกิริยากับ PAHs 53
ตารางที่ 14 แอคติวิตีของแลคเคสของเชื้อรา *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ตั้งแต่วันที่ 1-7 59
ตารางที่ 15 ปริมาตรและแอคติวิตีของแลคเคสก่อนและหลังการอัลตราฟิลเตชัน 64
ตารางที่ 16 ขั้นตอนการทำแลคเคสให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอน 65
ตารางที่ 17 ขั้นตอนการทำแลคเคสให้บริสุทธิ์ 68
ตารางที่ 18 เปอร์เซนต์การย่อยสลายสารประกอบ PAH 73
ตารางที่ 19 ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแลคเคสจากเชื้อรา *Ganoderma lucidum* สายพันธุ์ CHEM 80
ตารางที่ 20 ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 81
ตารางที่ 21 ขั้นตอนการทำแลคเคสให้บริสุทธิ์ 82

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 สารประกอบ PAHs 16 ชนิด และอนุพันธ์ ที่หน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของประเทศสหรัฐอเมริกาประกาศให้เป็นสารที่ทำให้เกิดมลพิษ 6
ภาพที่ 2 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย เชื้อรากลุ่มไวท์รอท และเชื้อราอื่น ๆ 22
ภาพที่ 3 การเข้าทำปฏิกิริยากับ pyrene ของ *Penicillium glabrum* 23
ภาพที่ 4 การเข้าทำปฏิกิริยากับ pyrene ของ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 23
ภาพที่ 5 กระบวนการออกซิเดชันในการทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs โดยเชื้อรากลุ่มไวท์รอท 24
ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาแลคเคสออกซิเดชันในการเปลี่ยน ρ -diphenols ไปเป็น ρ -diquinones 27
ภาพที่ 7 การเกิดกระบวนการออกซิเดชันของสาร syringadazine 28
ภาพที่ 8 การเกิดปฏิกิริยา 2,6-dimethoxyphenol oxidase 28
ภาพที่ 9 ปฏิกิริยาของ Rhus Laccase 29
ภาพที่ 10 ปฏิกิริยาของแลคเคสบางชนิดที่พบจากพืช 29
ภาพที่ 11 ปฏิกิริยาของแลคเคสบางชนิดที่พบจากเชื้อรา 29
ภาพที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของสารตั้งต้นบางชนิดที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของแลคเคส 30
ภาพที่ 13 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารสูตร PDA ที่เติม Gallic acid 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร 54
ภาพที่ 14 การเกิดวงสีน้ำตาลรอบโคโลนีของเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ บนอาหารสูตร PDA ที่เติม Gallic acid 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร 55
ภาพที่ 15 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ KKU1 บนอาหารสูตร PDA ที่มีการเติม anthracene หรือ DDT ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม 56
ภาพที่ 16 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ BOT บนอาหารสูตร PDA ที่มีการเติม anthracene หรือ DDT ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม 56
ภาพที่ 17 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ KC3 บนอาหารสูตร PDA ที่มีการเติม anthracene หรือ DDT ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม 57
ภาพที่ 18 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM บนอาหารสูตร PDA ที่มีการเติม anthracene หรือ DDT ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม 57

หน้า

ภาพที่ 19 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ SP5 บนอาหารสูตร PDA ที่มีการเติม anthracene หรือ DDT ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม 58
ภาพที่ 20 แอคติวิตีของแลคเคสของเชื้อรา *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ตั้งแต่วันที่ 1-7 59
ภาพที่ 21 การเจริญเติบโตบนอาหารแข็งสูตร PDA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 60
ภาพที่ 22 น้ำหนักแห้งของเชื้อ *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM ในอาหารเหลวสูตร PDB ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 61
ภาพที่ 23 การผลิตแลคเคสของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM ในอาหารสูตร Production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 62
ภาพที่ 24 ค่าแอคติวิตีของแลคเคสที่แปรผันกับความเข้มข้นของ Cu^{2+} ที่ 0.1 ถึง 0.5 มิลลิโมลาร์ ... 63
ภาพที่ 25 แอคติวิตีของแลคเคสในอาหารที่เติมตัวช่วยยึดเกาะและไม่เติมตัวช่วยยึดเกาะ 64
ภาพที่ 26 แอคติวิตีของแลคเคสที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีน ตั้งแต่ 0 – 100 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมซัลเฟต 66
ภาพที่ 27 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แอคติวิตีของแลคเคส และปริมาณของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 67
ภาพที่ 28 แอคติวิตีของแลคเคสเมื่อแปรผันกับชนิดของบัฟเฟอร์ และค่าความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ที่ 3-7 69
ภาพที่ 29 ค่าแอคติวิตีของแลคเคสในโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ที่แปรผันอุณหภูมิ ตั้งแต่ 30-90 องศาเซลเซียส 71
ภาพที่ 30 โครมาโทแกรมของชุดควบคุม 71
ภาพที่ 31 โครมาโทแกรมของ laccase 72
ภาพที่ 32 แอคติวิตีของแลคเคสในอาหารที่เติมตัวช่วยยึดเกาะและไม่เติมตัวช่วยยึดเกาะ 80