

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา

ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ประกาศกฎบัตร

รายงานวิจัย

เรื่อง

การคัดเลือกเชื้อราที่มีกิจกรรมย่อยสลายลิกนินจากแหล่งธรรมชาติ

(Screening for Ligninolytic Fungi from Natural Sources)

100128

โดย

ศิริโฉม พุ่งแก้ว

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2542

ประกาศคุณูปการ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2542 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์บางอย่างในการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอขอบคุณ นายสุริยา ร้อยพุทธ นิสิตชั้นปีที่ 4 วิชาเอกจุลชีววิทยาที่มีส่วนร่วมในการวิจัยบางส่วน

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ได้ให้การสนับสนุนและส่งเสริมการทำวิจัยนี้เป็นอย่างดี

ศิริโณม พุ่งแก้ว

มกราคม 2543

บทคัดย่อ

จากการนำเชื้อราจำนวน 76 ไอโซเลตที่แยกได้จากราย่อยสลายไม้และไม้ผุที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทยมาคัดเลือกหาเชื้อราที่มีกิจกรรมย่อยสลายลิกนิน โดยวิธีตรวจวัดการย่อยสลายสี Poly R-478 ของเชื้อราที่เจริญในอาหารเหลวในสถานะที่ไม่มีการเขย่า สามารถคัดเลือกเชื้อราที่ย่อยสลายสีได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลต หรือคิดเป็นประมาณร้อยละ 17 ของราที่แยกได้ทั้งหมด จากการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคสของราทั้ง 13 ไอโซเลตในอาหารเหลวที่สภาวะเดิมพบเฉพาะกิจกรรมของแลคเคสในราที่ย่อยสลายสีได้ดีจำนวน 8 ไอโซเลตแต่ตรวจไม่พบกิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดสในราที่ย่อยสีได้ทั้ง 13 ไอโซเลตรวมทั้งราอ้างอิง *Sporotrichum pulverulentum* TISTR 3326 และ *Trametes versicolor* TISTR 3324

Abstract

Sixty seven fungal isolates obtained from wood decay fungi and decay wood samples collected from various natural sources of Thailand were screened for ligninolytic activities. Poly R-478 dye decolorization of the static fungal culture used as the screening method resulted in 13 fungal isolates (about 17% of total isolates) with decolorizing ability. These isolates were then tested for production of lignin peroxidase and laccase activity in the same condition. The results indicate that 8 of 13 isolates displaying laccase activity whereas lignin peroxidase activity was not detected in all 13 isolates, as well as in reference fungal strains, *Sporotrichum pulverulentum* TISTR 3326 and *Trametes versicolor* TISTR 3324.

บทคัดย่อและร่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

- 2.1 โครงสร้างและแหล่งที่พบถักนิน
- 2.2 เชื้อราที่ด้อยถักนิน
- 2.3 ชีวิตของราที่ด้อยถักนินโดยเชื้อ
- 2.4 การตรวจวัดการด้อยถักนินโดยวิธีโกลิโมวีก
- 2.5 การใช้ประโชนจากถักนินถักนินถักนิน
- 2.6 ร่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

- 3.1 วัสดุอุปกรณ์
- 3.2 วิธีการทดลอง
 - 3.2.1 การเก็บตัวอย่าง
 - 3.2.2 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์
 - 3.2.3 การตรวจวัดการด้อยถักนิน Poly R-478
 - 3.2.4 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

บทที่ 4 ผลการทดลอง

- 4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราบริสุทธิ์
- 4.2 การตรวจวัดการด้อยถักนิน Poly R-478
- 4.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์
- 4.4 การจำแนกเชื้อรา

สารบัญ

ประกาศนุญการ

บทคัดย่อภาษาไทย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

สารบัญตาราง

สารบัญภาพ

คำย่อ

บทที่ 1 บทนำ

บทที่ 2 เอกสารและรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างและแหล่งที่พบลิกนิน

2.2 เชื้อราที่ย่อยสลายลิกนิน

2.3 ชีวเคมีของการย่อยสลายลิกนินโดยเชื้อรา

2.4 การตรวจวัดการย่อยสลายลิกนินโดยใช้ดีโพลีเมอร์

2.5 การใช้ประโยชน์จากกิจกรรมการย่อยสลายลิกนิน

2.6 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.2 วิธีทดลอง

3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

3.2.2 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์

3.2.3 การตรวจวัดการย่อยสลายดี Poly R-478

3.2.4 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราบริสุทธิ์

4.2 การตรวจวัดการย่อยสลายดี Poly R-478

4.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

4.4 การจำแนกเชื้อรา

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

39

เอกสารอ้างอิง

43

ภาคผนวก ก

47

ภาคผนวก ข

48

- 1 จำนวนตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยและจำนวนไอโซโทปของเรโซแนนซ์ได้ 27
- 2 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ของยีส *Poly R-478* ที่ระยะเวลาต่าง เมื่อเติมดีในอัตรา 4 วันที่ย่อยในอาหารเหลวสูตรจำกัดในไนโตรเจน ในสถานะไม่มีการเพาะ 28
- 3 เปรียบเทียบปริมาณการลดลงของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร จากเวลา 0 ชม. ถึง 120 ชม. ($\Delta A_{520}/A_{520}$) ของยีส *Poly R-478* ได้ 29
- 4 ปริมาณแบคทีเรียที่ผลิตโดยยีส *Poly R-478* และราอ้างอิง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดในไนโตรเจนในสถานะไม่มีการเพาะ เป็นเวลา 5 และ 7 วัน 36

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 จำนวนตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยและจำนวนไอโซเลทของเชื้อราที่แยกได้	3
2 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ของดี Poly R-478 ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเติมสีในเชื้อราอายุ 4 วันที่เจริญในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจน ในสภาวะไม่มีการเขย่า	22
3 เปรียบเทียบปริมาณการลดลงของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร จากเวลา 0 ชม. ถึง 120 ชม. ($\Delta A_{520}/A_{350}$) ของราที่ย่อยสลายดี Poly R-478 ได้	23
4 ปริมาณแลคเคสที่ผลิตโดยราที่ย่อยสลายดี Poly R-478 และราอ้างอิง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจนในสภาวะไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 5 และ 7 วัน	24
5 ลักษณะแบคทีเรียของราที่ผลิต KKS	25
6 ลักษณะแบคทีเรียของราที่ผลิต KKS	26
7 ลักษณะแบคทีเรียของราที่ผลิต KC2	27
8 ลักษณะแบคทีเรียของราที่ผลิต KC6	27
9 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ของดี Poly R-478 โดยราที่ย่อยสลายดีได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจน ในสภาวะไม่มีการเขย่า	30
10 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ของดี Poly R-478 โดยราที่ย่อยสลายดีได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจน ในสภาวะไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 120 ชม.	31
11 อัตราส่วนค่าการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของดี Poly R-478 โดยรา P10	32
12 อัตราส่วนค่าการลดลงของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ของดี Poly R-478 โดยราที่ย่อยสลายดีได้ปานกลาง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจน ในสภาวะไม่มีการเขย่า	33
13 อัตราส่วนค่าการลดลงของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ของดี Poly R-478 โดยราที่ย่อยสลายดีได้น้อย เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจน ในสภาวะไม่มีการเขย่า	34

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างของลิกนิน	3
2 โครงสร้างของ coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ p-coumaryl alcohol	4
3 การออกซิเดชันแบบถ่ายเทอิเล็กตรอนเพียง 1 ตัวจากวงแหวนอะโรมาติกโดยกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส	7
4 ลักษณะเบสไดโอคาร์พของรารหัส P3	23
5 ลักษณะเบสไดโอคาร์พของรารหัส P10	23
6 ลักษณะเบสไดโอคาร์พของรารหัส KY3	24
7 ลักษณะเบสไดโอคาร์พของรารหัส KY5	24
8 ลักษณะเบสไดโอคาร์พของรารหัส KY8	25
9 ลักษณะเบสไดโอคาร์พของรารหัส KY22	25
10 ลักษณะเบสไดโอคาร์พของรารหัส KK5	26
11 ลักษณะไม้ผุที่แยกได้รารหัส KK9	26
12 ลักษณะเบสไดโอคาร์พของรารหัส KC2	27
13 ลักษณะเบสไดโอคาร์พของรารหัส KC6	27
14 การเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนค่ากลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ของสี Poly R-478 โดยราที่ย่อยสลายสีได้ดี เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจน ในสถานะไม่มีการเขย่า	30
15 ลักษณะการางลงของสี Poly R-478 ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเชื้อราที่ย่อยสลายสีได้ดี หลังการเติมสีเป็นเวลา 120 ชม.	31
16 สเปกตรัมแสดงการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของสี Poly R-478 โดยรา P10	32
17 การเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนค่ากลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ของสี Poly R-478 โดยราที่ย่อยสลายสีได้ปานกลาง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจน ในสถานะไม่มีการเขย่า	33
18 การเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนค่ากลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ของสี Poly R-478 โดยราที่ย่อยสลายสีได้น้อย เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจน ในสถานะไม่มีการเขย่า	34

ภาพที่

หน้า

19 ปริมาณแลกเคสที่ผลิตโดยราที่ข่อยสลายสี Poly R-478 และราอ้างอิง 2 สายพันธุ์
เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจนในสภาวะไม่มีการเขย่า
เป็นเวลา 5 และ 7 วัน

37

คำย่อ

บทนำ

คำย่อ

คำเต็ม

^๐ซ

องศาเซลเซียส

ชม.

ชั่วโมง

นม.

นาโนเมตร

มล.

มิลลิลิตร

A

Absorbance

%

เปอร์เซ็นต์

บทที่ 1

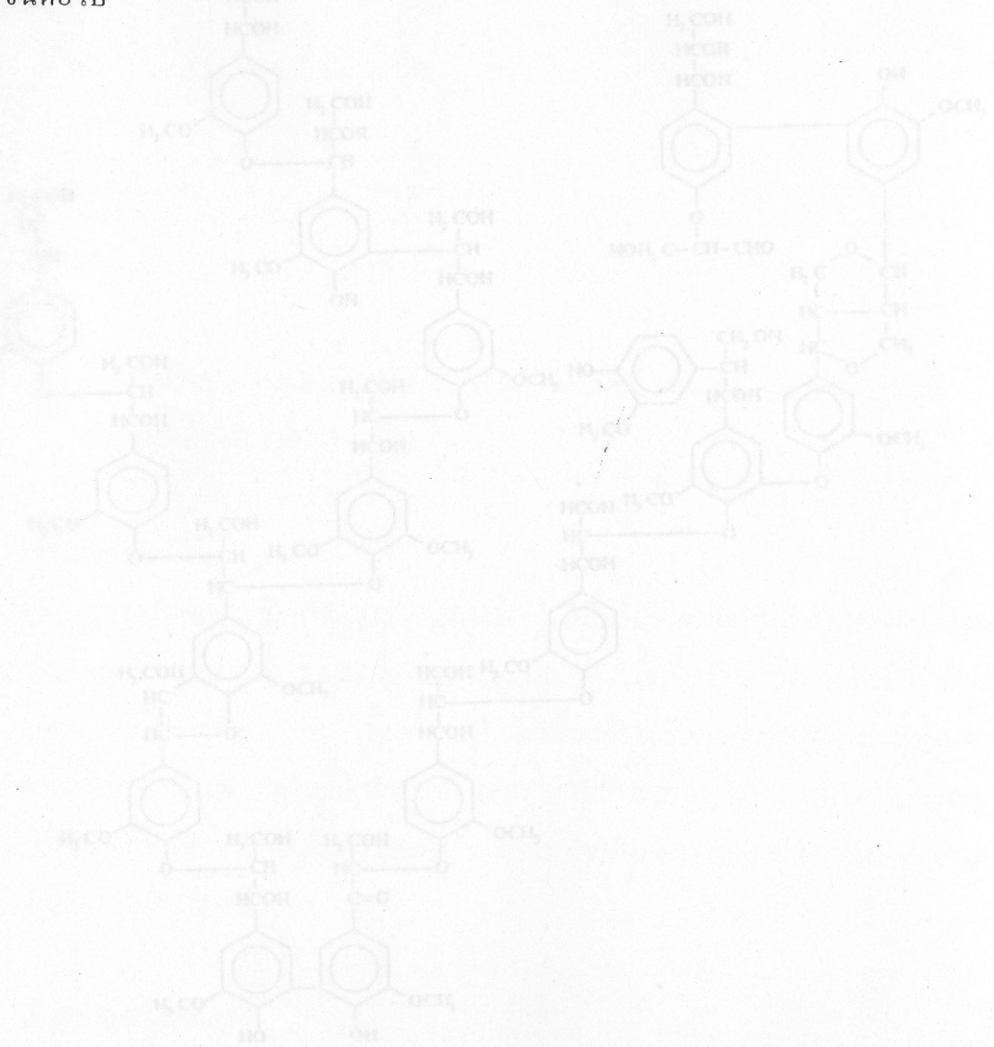
บทนำ

ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบโพลิเมอร์ที่พบเป็นส่วนประกอบในพืชในปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดโครงสร้างและความแข็งแรงของเนื้อไม้ ลิกนินเป็นโพลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบสามมิติ มีหน่วยย่อยเป็นสารประเภทฟีนิล โพรพานอยด์ (phenyl propanoid) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ C-C และ C-O-C แบบต่างๆ ด้วยเหตุที่ลิกนินมีโครงสร้างที่ซับซ้อนและไม่เป็นระเบียบ ดังนั้น จึงทำให้ยากต่อการถูกย่อยสลายหรือทำให้แตกออกโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ซึ่งคุณสมบัตินี้นับว่าเป็นผลดีต่อพืชในแง่การป้องกันการเข้าทำลายพืชโดยเชื้อโร อย่างไรก็ตาม พบว่าจุลินทรีย์บางชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ราขาว (white-rot fungi) ซึ่งเป็นรากกลุ่มหนึ่งในพวกราย่อยสลายไม้ (wood decay fungi) มีระบบเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนิน (ligninolytic enzymes) เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่เอนไซม์ประเภทเปอร์ออกซิเดสและออกซิเดสหลายชนิด ที่สำคัญคือเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidases) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidases) และแลคเคสหรือฟีนอลออกซิเดส เป็นต้น เนื่องจากการย่อยสลายลิกนินโดยเอนไซม์เหล่านี้มีความพิเศษ คือ มีกลไกแบบไม่จำเพาะ (nonspecific) ดังนั้น จึงมีความสนใจในการนำเชื้อราและเอนไซม์จากเชื้อรากลุ่มนี้มาใช้อย่อยสลายสารประกอบเคมีสังเคราะห์ชนิดอื่นที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) เช่นเดียวกับลิกนิน ซึ่งปัจจุบันสารเคมีเหล่านี้เป็นปัญหาสำคัญของการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างของสารเคมีที่มีการทดลองนำเชื้อราย่อยสลายลิกนินมาใช้อย่อยสลายได้แก่ สารประกอบ polycyclic aromatic hydrocarbons สารประกอบกลุ่มคลอโรฟีนอล (chlorophenol) สีย้อมสังเคราะห์ (synthetic dyes) รวมทั้งน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีสารสี เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานฟอกเยื่อกระดาษและน้ำทิ้งที่มีกากน้ำตาล เป็นต้น

การตรวจวัดการย่อยสลายสารประกอบใดๆ โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์มีวิธีการคือ การตรวจหาสารตัวกลางหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ ดังได้กล่าวมาแล้วถึงความซับซ้อนและโครงสร้างที่ไม่แน่นอนของลิกนินซึ่งส่งผลให้เตรียมลิกนินในรูปบริสุทธิ์ได้ยาก ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีที่ง่ายและเร็วกว่าวิธีเดิมขึ้นเพื่อตรวจวัดกิจกรรมการย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา ซึ่งวิธีดังกล่าวอาศัยสีย้อมโพลิเมอร์ิก (polymeric dye) ชนิดหนึ่งคือ Poly R-478 เป็นตัวบ่งชี้ของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน เนื่องจาก Poly R-478 มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของแอนทราควิโนน (anthraquinone) ซึ่งมีวงแหวนอะโรมาติกอยู่เช่นเดียวในโครงสร้างของลิกนิน นอกจากนั้นการวัดการย่อยสลายสีย้อมยังใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometry) ได้ ดังนั้น

จึงมีความสะดวกในการคัดเลือกเชื้อราจำนวนมากเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อนยุ่งยาก

ในปัจจุบันเชื้อราย่อยสลายลิกนินที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางมากที่สุดได้แก่ ราขาว *Phanerochaete chrysosporium* อย่างไรก็ตามการคัดเลือกหาเชื้อเพื่อราชนิดใหม่ที่มีกิจกรรมย่อยสลายลิกนินก็ยังมีความจำเป็น ทั้งนี้เนื่องจากอาจทำให้ได้ราที่มีคุณสมบัติดีขึ้น เช่น ย่อยสลายสารเคมีชนิดหนึ่งได้เร็วและสมบูรณ์มากขึ้น หรือย่อยสลายสารเคมีได้หลากหลายมากขึ้น เป็นต้น และเนื่องจากประเทศไทยซึ่งตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นจึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ รวมทั้งเชื้อรามาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการเก็บรวบรวมเชื้อรากลุ่มย่อยสลายไม้เพื่อนำมาตรวจหากิจกรรมย่อยสลายลิกนินโดยการวัดอัตราการย่อยสลายสี Poly R-478 จากนั้นจึงนำเชื้อราที่ย่อยสลายสีได้ไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินบางชนิด ซึ่งผลการศึกษาจะทำให้คัดเลือกได้เชื้อราสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมย่อยสลายลิกนินสูงจำนวนหนึ่งสำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป



ภาพที่ 1 โครงสร้างของลิกนิน

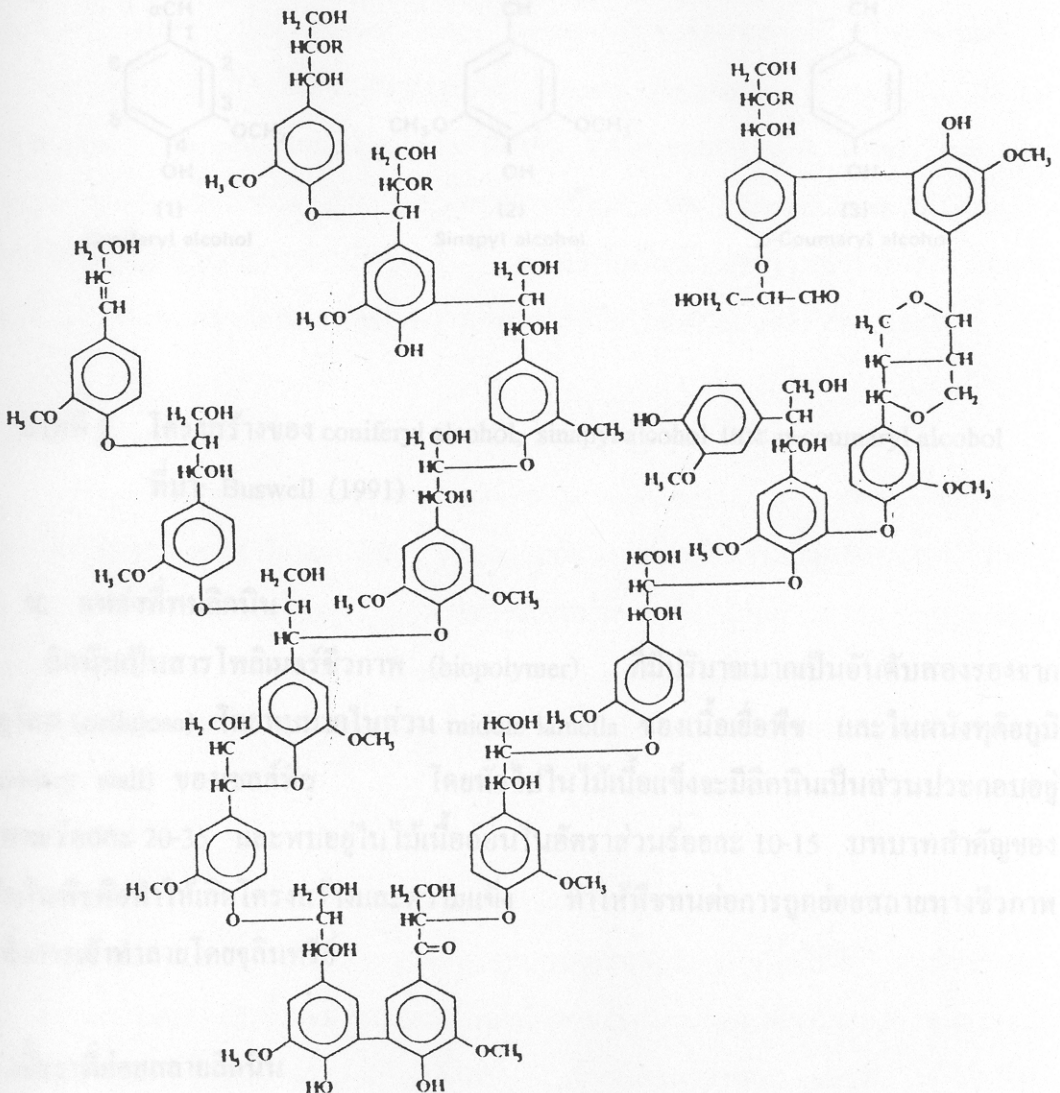
ที่มา: Hamzkill and Messner (1997)

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างและแหล่งที่พบลิกนิน

ก. โครงสร้างของลิกนิน

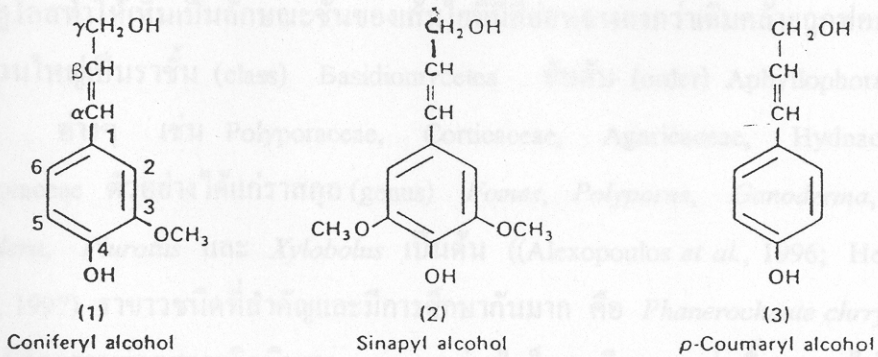
ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบโพลิเมอร์อะโรมาติก (aromatic polymer) มีหน่วยย่อย (monomer) คือ oxyphenylpropanoid ต่อกันด้วยพันธะ C-C และ C-O-C แบบต่างๆ ลิกนินเป็นโพลิเมอร์ที่มีลักษณะ heterogeneous ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ไม่ละลายน้ำ และมีโครงสร้างเป็นแบบสามมิติ ลักษณะโครงสร้างของลิกนินดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของลิกนิน

ที่มา: Heinzkill and Messner (1997)

สารตั้งต้น (precursor) ของโมเลกุลลิกนินได้แก่แอลกอฮอล์ 3 ชนิด คือ p-coumaryl, coniferyl และ sinapyl alcohol (ภาพที่ 2) ลิกนินที่พบในไม้เนื้ออ่อน (softwood lignin) ประกอบด้วยหน่วยย่อยชนิด coniferyl เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ลิกนินที่พบในไม้เนื้อแข็ง (hardwood lignin) จะมีหน่วยย่อยเป็น coniferyl และ sinapyl ในอัตราส่วนเท่าๆ กัน สำหรับลิกนินที่พบในหญ้าจะประกอบด้วยสารตั้งต้นทั้ง 3 ชนิด



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ p-coumaryl alcohol
ที่มา: Buswell (1991)

ข. แหล่งที่พบลิกนิน

ลิกนินเป็นสารโพลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) ที่มีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (cellulose) โดยพบมากในส่วน middle lamella ของเนื้อเยื่อพืช และในผนังทุติยภูมิ (secondary wall) ของเซลล์พืช โดยทั่วไปในไม้เนื้อแข็งจะมีลิกนินเป็นส่วนประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 20-35 และพบอยู่ในไม้เนื้ออ่อนในอัตราส่วนร้อยละ 10-15 บทบาทสำคัญของลิกนินในพืชคือทำให้เกิดโครงสร้างและความแข็งแรง ทำให้พืชทนต่อการถูกย่อยสลายทางชีวภาพ รวมทั้งการเข้าทำลายโดยจุลินทรีย์

2.2 เชื้อราที่ย่อยสลายลิกนิน

แม้ว่าโครงสร้างของลิกนินจะมีความซับซ้อนและยากต่อการถูกย่อยสลายแต่ก็มีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายหรือเปลี่ยนรูปลิกนินได้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ เชื้อราที่ย่อยสลาย

เนื้อไม้หรือราที่ทำให้เนื้อไม้ผุพัง (wood rotting fungi หรือ wood decay fungi) เชื้อราในกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ white-rot, brown-rot และ soft-rot fungi (Alexopoulos *et al.*, 1996; Odier and Artaud, 1992)

White-rot fungi

ได้แก่กลุ่มของราที่ย่อยสลายได้ทั้งเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในพืช โดยสามารถย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสได้เร็วกว่าเซลลูโลส นอกจากนั้นรากลุ่มนี้บางชนิดยังย่อยสลายลิกนินอย่างสมบูรณ์ได้ผลิตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ การที่ราในกลุ่มนี้ถูกเรียกว่าราขาว หรือ white-rot นั้นเนื่องจากจะย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสก่อนเหลือส่วนที่เป็นเซลลูโลสทำให้เห็นเป็นลักษณะชั้นของเส้นใยที่มีสีอ่อนจางลงกว่าเดิมคล้ายถูกฟอกสี ราในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นราชั้น (class) Basidiomycetes อันดับ (order) Aphyllophorales วงศ์ (family) ต่างๆ เช่น Polyporaceae, Corticaceae, Agaricaceae, Hydnaceae และ Thelephoraceae ตัวอย่างได้แก่ราสกุล (genus) *Fomes*, *Polyporus*, *Ganoderma*, *Inonotus*, *Bjerkandera*, *Pluotus* และ *Xylobolus* เป็นต้น ((Alexopoulos *et al.*, 1996; Heinzkill and Messner, 1997) ราขาวชนิดที่สำคัญและมีการศึกษากันมาก คือ *Phanerocheate chrysosporium* เนื่องจากมีกิจกรรมย่อยสลายลิกนินสูง อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าเชื้อราขาวไม่สามารถใช้ลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงชนิดเดียวได้ (Kirk and Farrel, 1987)

Brown-rot fungi

ราในกลุ่มนี้ย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าลิกนิน ดังนั้น เมื่อเจริญบนเนื้อไม้ได้ระยะหนึ่งจะทำให้เนื้อไม้มีสีน้ำตาลและมีลักษณะเป็นก้อนสีเหลี่ยมลูกบาศก์ที่ร่วนเปราะเนื่องจากส่วนของลิกนินเหลืออยู่ ตัวอย่างของราในกลุ่มนี้ ได้แก่ ราชั้น Basidiomycetes บางสกุล เช่น *Poria*, *Polyporus*, *Lenzites*, *Polyporus* และ *Tyromyces* เป็นต้น การย่อยสลายลิกนิน ของราในกลุ่มนี้จะเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์และกลไกในการย่อยยังไม่เข้าใจกันดีนัก

Soft-rot fungi

รากลุ่มนี้หมายถึงราที่ย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในเนื้อไม้ได้ สำหรับความสามารถในการย่อยสลายลิกนินรวมทั้งกลไกที่เกี่ยวข้องยังมีการศึกษากันน้อยมากแต่มีรายงานว่าอัตราการย่อยสลายลิกนินโดยรากลุ่มนี้จะต่ำมาก ตัวอย่างของราพวก soft-rot ได้แก่ราในชั้น Ascomycetes และ Fungi Imperfecti สกุลต่างๆ เช่น *Chaetomium*, *Cephalosporium*, *Graphium*, *Monodictys* และ *Paecilomyces* เป็นต้น

2.3 ชีวเคมีของการย่อยสลายลิกนินโดยเชื้อรา

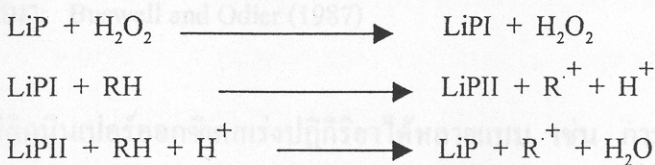
ก. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง

การย่อยสลายลิกนินโดยเอนไซม์จากเชื้อราอาจเกิดโดยกลไกหลายๆ แบบร่วมกัน เช่น การทำให้วงแหวนอะโรมาติกแตกออกโดยการเติมออกซิเจน (oxidative fission) หรือเกิดออกซิเดชันที่หมู่แอลฟาไฮดรอกซิล (α -hydroxyl) การเติมน้ำที่ส่วนแอลฟาคาร์บอนิล (α -carbonyl) และการตัดพันธะเอริลอีเทอร์ (aryl ether) เป็นต้น เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายลิกนินประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดเรียกรวมว่า ligninolytic enzymes ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ประเภทเปอร์ออกซิเดส (peroxidases) และออกซิเดส (oxidases) หลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidases) แลคเคส (laccases) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidases) และเอนไซม์ออกซิเดสชนิดที่ให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 -producing oxidases) เป็นต้น เอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ชนิดที่ผลิตและปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ที่เชื้อราผลิตขึ้นและปล่อยออกมาย่อยสลายลิกนินซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้

1. ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

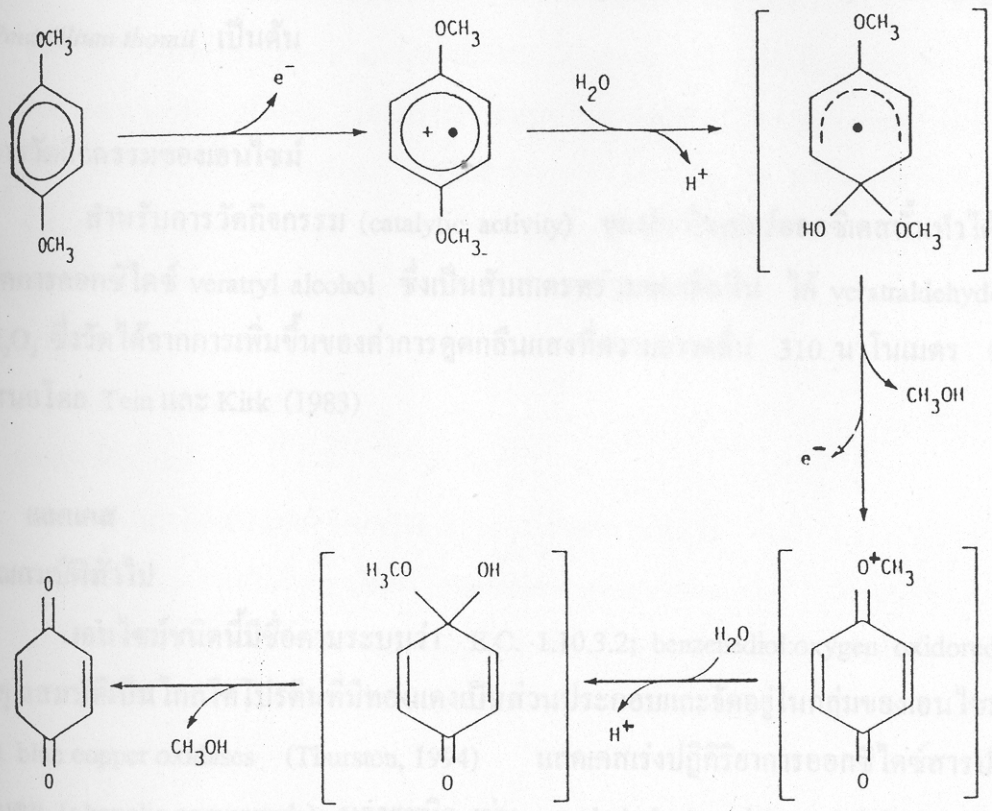
ลักษณะทั่วไป

ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) หรือมีชื่อตามระบบว่า E.C. 1.11.1.14; diarylpropane:oxygen, hydrogen peroxide oxidoreductases พบครั้งแรกในราขาว *Phanerochaete chrysosporium* (Glenn, 1983; Tien and Kirk, 1983) กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นดังนี้คือ เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได้อนุมูลบวก (cation radical) ของ porphyrin π เรียก LiPI ซึ่งจะถูกรีดิวซ์โดยมีการถ่ายเทอิเล็กตรอน 1 ตัว ได้สารตัวกลาง (intermediate) คือ LiPII ซึ่งในปฏิกิริยานี้จะเกิดการออกซิไดส์สารประกอบอะโรมาติก เช่น veratryl alcohol ได้ อนุมูลบวกเอริล (aryl radicals) ปฏิกิริยาทั้งหมดที่เกิดขึ้นมีดังนี้:



การเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบถ่ายเทอิเล็กตรอนเพียง 1 ตัว (one-electron oxidation) ของหมู่อะโรมาติก (ภาพที่ 3) โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากทำให้ได้อนุมูลบวกซึ่งสามารถถูกออกซิไดส์ต่อไปได้เมื่อมีออกซิเจน ซึ่งระบบย่อยสลายลิกนินดังกล่าวมีลักษณะไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้สามารถนำเอนไซม์กลุ่มนี้ไปใช้ออกซิไดส์สารประกอบ

อะโรมาติกอื่นๆ ได้อีกมากมาย ตัวอย่างเช่นสารประกอบ polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated phenol, dioxins และ azo dye เป็นต้น



ภาพที่ 3 การออกซิเดชันแบบถ่ายเทอิเล็กตรอนเพียง 1 ตัวจากวงแหวนอะโรมาติก โดยกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส
ที่มา: Buswell and Odier (1987)

โดยทั่วไปกลไกการออกซิเดชันของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแบ่งได้หลายแบบ เช่น การแตกของ Cα-Cβ (ภาพที่ 3) การออกซิไดซ์ Cα การแตกของพันธะระหว่างอัลคิลและแอริล (alkyl-aryl bond) และการแตกของวงแหวนอะโรมาติก การดึงหมู่เมทอกซิด (demethoxylation) การดึงหมู่เมทิล (demethylation) การเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ตลอดจนการต่อสายโพลิเมอร์ (polymerization)

ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่พบแล้วในปัจจุบันมีมากกว่า 21 ชนิด แต่ละชนิดจะมีความคงตัว (stability) และลักษณะในการเร่งปฏิกิริยา (catalytic reaction) แตกต่างกัน ราชภัฏผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ นอกจาก *P. chrysosporium* แล้วยังพบใน Basidiomycetes อื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น *Phlebia radiata*, *Coriolus versicolor*, *Coriolus hirsutus*, *Plurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta*, *Polyporus ostreiformis* รวมทั้ง Imperfect fungi เช่น *Penicillium thomii* เป็นต้น

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

สำหรับการวัดกิจกรรม (catalytic activity) ของลิกนินเปอร์ออกซิเดสนั้นทำได้โดยการวัดการออกซิไดซ์ veratryl alcohol ซึ่งเป็นสับสเตรทร่วมของลิกนิน ได้ veratraldehyde เมื่อมี H_2O_2 ซึ่งวัดได้จากการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ตามวิธีที่เสนอโดย Tein และ Kirk (1983)

2. แลคเคส

คุณสมบัติทั่วไป

เอนไซม์ชนิดนี้มีชื่อตามระบบว่า E.C. 1.10.3.2; benzenediol:oxygen oxidoreductases มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนที่มีทองแดงเป็นส่วนประกอบและจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ที่เรียกว่า blue copper oxidases (Thurston, 1994) แลคเคสเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) หลายชนิด เช่น catechol, hydroquinone, 2,6-dimethoxyphenol และ syringaldazine แบบที่ถ่ายเทเพียง 1 อิเล็กตรอน (one-electron oxidation) ได้สารตัวกลางกับอนุมูลฟีนอกซีอิสระ (free phenoxy radicals) นอกจากนั้น ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์ของแลคเคสยังทำหน้าที่เป็นสับสเตรทร่วม (co-substrate) หรือ mediator ในปฏิกิริยาออกซิเดชันได้อีกด้วย (Bourbonnais และ Paice, 1990) แลคเคสเร่งปฏิกิริยาได้หลายแบบเช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น การแตกออกระหว่างหมู่แอลคิลกับหมู่เอเรล การแตกระหว่าง $C\alpha$ กับ $C\beta$ และการแตกของหมู่ฟีนอล 2 หมู่ นอกจากนั้นยังเร่งปฏิกิริยาการดึงหมู่เมทอกซิล และ หมู่เมทิล ตลอดจนการต่อสายโพลิเมอร์และการตัดสายโพลิเมอร์ (depolymerization) อีกด้วย

เชื้อราที่มีรายงานว่าผลิตแลคเคสได้มีหลายชนิด ที่สำคัญคือราในชั้น Basidiomycetes สกุลต่างๆ เช่น *Agaricus*, *Bjerkandera*, *Coprinus*, *Fomes*, *Ganoderma*, *Phanerocheate*, *Phlebia*, *Plurotus*, *Polyporus*, และ *Trametes* เป็นต้น นอกจากนั้นยังพบแลคเคสในราชั้น Ascomycetes หลายสกุล เช่น *Neurospora*, *Podospora* และ *Xylaria* เป็นต้น สำหรับรา

พวก Imperfect ที่ผลิตแลคเคสได้ ได้แก่ *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium* และ *Trichoderma* เป็นต้น

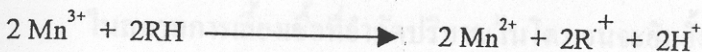
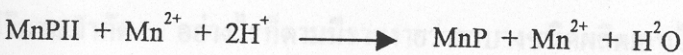
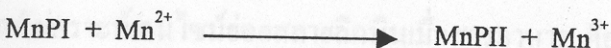
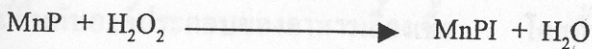
การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

การวัดกิจกรรมของแลคเคสอาศัยหลักการออกซิไดซ์สับสเตรทของเอนไซม์ชนิดนี้หลายชนิด เช่น syringaldazine, phenol red รวมทั้ง ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) เป็นต้น สำหรับวิธีที่เสนอโดย Bollag และ Leonowicz (1984) นั้นจะใช้ syringaldazine เป็นสับสเตรท และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 525 นาโนเมตรที่เปลี่ยนแปลงเพื่อคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ สำหรับวิธีวัดกิจกรรมที่ใช้ ABTS เป็นสับสเตรทนั้นจะวัดการออกซิไดซ์ ABTS โดยเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Barbosa *et al.*, 1996)

3. แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

คุณสมบัติทั่วไป

แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) มีชื่อตามระบบว่า E.C. 1.11.1.13; Mn(II):H₂O₂ oxidoreductase พบครั้งแรกในรา *Phanerochaete chrysosporium* (Kuwahara *et al.*, 1984) ปัจจุบันพบไอโซเอนไซม์ของ MnP แล้วหลายชนิด MnP เป็นไกลโคโปรตีนที่เร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ชนิดหนึ่งอิเล็กตรอนของสารประกอบฟีนอลและสารประกอบที่ไม่ใช่ฟีนอล เมื่อมี Mn(II) ดังสมการต่อไปนี้



จากสมการจะเห็นว่าปฏิกิริยาเริ่มต้นเกิดระหว่าง MnP กับ H₂O₂ ได้สารตัวกลางคือ MnPI ซึ่งจะออกซิไดซ์ Mn(II) ได้ Mn(III) และ Mn(III) จะถูกทำให้คงตัวโดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดอินทรีย์ เช่น แลคเตต, มาโลเนต หรือ ออกซาเลต และจะออกซิไดซ์สารประกอบอะโรมาติก ได้อินนูลฟีนอกซี หรืออินนูลบวกแอริล

ราที่ผลิต MnP ได้ ได้แก่ basidiomycetes หลายชนิด เช่น *P. chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Coriolus versicolor*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta*, *Ganoderma australis* และ *Polyporus ostreiformis* เป็นต้น

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

การวัดกิจกรรมของ MnP อาศัยหลักการวัดการออกซิไดซ์ Mn^{2+} เป็น Mn^{3+} เมื่อมี guaiacol และ H_2O_2 ที่ความยาวคลื่น 465 nm ตามวิธีที่เสนอโดย Paszczynski และคณะ (1988) แต่เนื่องจาก guaiacol ก็เป็นสับสเตรทของแลคเคสด้วย ดังนั้นจึงต้องนำกิจกรรมทั้งหมดหักออกจากกิจกรรมเมื่อไม่มี H_2O_2 และกิจกรรมเมื่อไม่มี Mn^{2+} ซึ่งจะได้ค่ากิจกรรมของแลคเคส

3. ออกซิเดสที่ผลิต H_2O_2

คุณสมบัติโดยทั่วไป

เอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่พวกที่ทำให้เกิด H_2O_2 ในปฏิกิริยา มีทั้งประเภทที่สร้างแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์และประเภทที่ไม่ปล่อยออกนอกเซลล์ ตัวอย่างของเอนไซม์ออกซิเดสประเภทที่ผลิตและปล่อยออกมานอกเซลล์ ได้แก่ แอริลแอลกอฮอล์ออกซิเดสที่มี FAD (FAD-containing aryl alcohol oxidase) พบในรา *P. chrysosporium* (Kersten and Kirk, 1987) นอกจากนั้นยังพบเอนไซม์ที่ผลิตและไม่ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ เช่น glucose oxidase, methyl oxidase และ acyl CoA oxidase เป็นต้น ในราชนิดนี้ด้วย

ข. การควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์

ระบบเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินมีการศึกษากันมากในรา *P. chrysosporium* พบว่าการผลิตเอนไซม์ขึ้นกับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปพบว่าราชนิดนี้รวมทั้งราอื่นๆ ส่วนใหญ่มักสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเมื่อสารอาหาร คือ ไนโตรเจน คาร์บอน หรือ กำมะถันมีปริมาณจำกัด อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าราบางชนิดผลิตเอนไซม์ได้ในสภาวะไม่จำกัดไนโตรเจน ในสภาพการเลี้ยงเชื้อที่จำกัดปริมาณไนโตรเจนจะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ MnP แต่เอนไซม์แลคเคสจะถูกสังเคราะห์สูงสุด ออกซิเจนมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์โดยการสังเคราะห์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสใน *P. chrysosporium* ถูกยับยั้งเมื่อมีออกซิเจนจำกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Kirk et al., 1978) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าราสังเคราะห์ MnP ถูกควบคุมโดย Mn และการมีกรดอินทรีย์ สารประกอบบางชนิดสามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้ ตัวอย่างเช่น gallic acid และ 2,5-xylidine เหนี่ยวนำการสังเคราะห์แลคเคสของ *Botrytis cinerea*, *Neurospora crassa* และ *Trametes versicolor* (Gigi et al., 1981; Bollag and Leonowicz, 1984) นอกจากนั้นแลคเคสถูกเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ใน *Phlebia radiata* เมื่อมี veratry alcohol (Kantelinen et al., 1989) เป็นต้น

2.4 การตรวจวัดการย่อยสลายลิกนินโดยใช้สีโพลิเมอร์

โดยทั่วไปการคัดเลือกหากิจกรรมการย่อยสลายลิกนินเนื่องจากเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อราทำได้โดยเลี้ยงเชื้อด้วยสับسترที่มีลิกนินหรือลิกนินที่ติดฉลาก C^{14} ในโมเลกุล และวัดสารตัวกลาง (intermediates) หรือผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end products) ที่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามวิธีนี้ใช้เวลามากและมีความยุ่งยาก นอกจากนั้นยังมีปัญหาเรื่องสับسترซึ่งไม่มีจำหน่ายเป็นการค้า จึงต้องสังเคราะห์ขึ้นใช้เอง ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สะดวกในการใช้คัดเลือกลูทีนารีจำนวนมากๆ ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีวัดกิจกรรมย่อยสลายลิกนินที่ง่ายและสะดวกมากขึ้น วิธีดังกล่าวใช้สีย้อมประเภทโพลิเมอร์ (polymeric dyes) ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกเช่นเดียวกับลิกนินเป็นสับسترของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินแทน ซึ่งสีเหล่านั้นได้แก่ สี Poly B เช่น Poly B-411, สี Poly R เช่น Poly R-481 และ Poly R-478 และสี Poly Y เช่น Poly Y-606 เป็นต้น วิธีการวัดโดยใช้สีโพลิเมอร์นี้มีข้อดีหลายประการ คือเป็นสับسترที่มีราคาไม่แพง และมีการผลิตเพื่อจำหน่ายในรูปบริสุทธิ์ นอกจากนั้นสีเหล่านี้ยังมีความคงตัวและละลายได้ดี สมบูรณ์ มีความเป็นพิษต่อลูทีนารีต่ำ และเนื่องจากสีโพลิเมอร์มีขนาดโมเลกุลใหญ่จึงไม่ถูกนำเข้าเซลล์ ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นการวัดกิจกรรมที่เกิดขึ้นภายนอกเซลล์เนื่องจากเอนไซม์ชนิดปล่อยออกนอกเซลล์เช่นเดียวกับกรณีของลิกนิน กล่าวโดยรวมแล้ว วิธีวัดการย่อยสลายสีโพลิเมอร์ที่พัฒนาขึ้นซึ่งใช้วิธีวัดทางสเปกโตรโฟโตเมตริกเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และสามารถหาปริมาณได้ นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า การย่อยสลายสีย้อมเหล่านี้สอดคล้องกับการเริ่มต้นของกิจกรรมย่อยสลายลิกนินของเอนไซม์อีกด้วย (Gold *et al.*, 1988)

วิธีการวัดการจางลงของสี

การวัดการจางลงของสี เนื่องจากถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (decolorization assays) ทำได้โดยเติมสารละลายสีลงไปในภาชนะเลี้ยงเชื้อเหลวให้มีความเข้มข้น 0.01-0.02% จากนั้นจึงวัดการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดที่จำเพาะสำหรับสีแต่ละชนิด ในบางกรณีสีมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 2 ค่าจะใช้ค่าอัตราส่วนที่ลดลงของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนั้นๆ เป็นเกณฑ์ ตัวอย่างเช่น ถ้าใช้สี Poly R-481 ให้วัดที่ความยาวคลื่น 513 และ 362 นาโนเมตร ในขณะที่ถ้าใช้สี Poly R-478 ให้วัดที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร เป็นต้น นอกจากนั้นยังอาจตรวจสอบการย่อยสลายสับจานอาหารแข็งที่ผสมสีก็ได้ ถ้าเกิดการย่อยสลายจะเกิดวงใส (clear halo) ได้โคโลนี แต่วิธีนี้ไม่สามารถหาปริมาณการย่อยสลายได้

2.5 การประยุกต์ใช้เชื้อราที่ย่อยสลายลิกนิน (Buswell and Odier, 1987; Orth and Tien, 1995; Heinzkill and Messner, 1997)

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่าเชื้อราในกลุ่มย่อยสลายลิกนินสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด ที่สำคัญคือ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการแตกของวงแหวนอะโรมาติก นอกจากนั้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ประเภทนี้ยังมีลักษณะแบบไม่จำเพาะเจาะจง ดังนั้นจึงสามารถเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลได้หลากหลายซึ่งรวมทั้งสารประกอบสังเคราะห์ที่ย่อยสลายได้ยากและเป็นมลพิษสำคัญของสิ่งแวดล้อม ได้มีการศึกษาเพื่อนำเชื้อราย่อยสลายลิกนินและเอนไซม์จากเชื้อรากลุ่มนี้มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ตัวอย่างเช่น การฟอกขาวเยื่อไม้เพื่อใช้ผลิตกระดาษ การบำบัดน้ำทิ้งที่มีสีสังเคราะห์ปนเปื้อน ตลอดจนการย่อยสลายสารประกอบเคมีที่มีพิษหลายชนิด เช่น สารประกอบพวก polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) และยาฆ่าแมลง เป็นต้น

2.5.1 การผลิตเยื่อกระดาษและการฟอกขาวเยื่อกระดาษ

ได้มีการทดลองใช้เชื้อราขาวและออกซิเดทิฟเอนไซม์จากเชื้อราในกลุ่มนี้บางชนิด เช่น *Trametes versicolor* (Bourbonnais et al., 1995) และ *Phanerocheate chrysosporium* (Michel et al., 1991) เพื่อย่อยสลายลิกนินที่ปนอยู่ในเนื้อไม้ในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแทนการใช้ด่างและความร้อนซึ่งไม่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า “biopulping” นอกจากนั้นยังมีการใช้เชื้อราย่อยสลายลิกนินที่เหลืออยู่ในเยื่อไม้ที่ได้จากกระบวนการที่ใช้ด่างเพื่อฟอกสีเยื่อไม้ให้ขาวขึ้นแทนการใช้สารฟอกขาว ซึ่งเรียกว่ากระบวนการ “biobleaching” กระบวนการชีวภาพที่อาศัยเชื้อราดังกล่าวมีข้อดีในแง่การลดค่าใช้จ่ายด้านพลังงานไฟฟ้าและสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ นอกจากนั้น สารประกอบมีพิษที่เกิดจากกระบวนการ เช่น สารประกอบอะโรมาติกที่มีคลอรีนซึ่งเป็นอนุพันธ์ของลิกนินและมีความทนทานต่อการย่อยสลายในสภาวะการบำบัดปกติอาจปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย นอกจากนั้น การที่ลิกนินถูกย่อยสลายโดยเชื้อราดังกล่าวยังช่วยทำให้ความเป็นพิษของน้ำทิ้งจากกระบวนการลดลงอีกด้วย อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อราและเอนไซม์ของเชื้อรายังมีปัญหาเรื่องการที่เชื้อราไม่สามารถใช้ลิกนินโดยตรงได้ตอนเริ่มต้น นอกจากนั้นการใช้เอนไซม์ยังอาจมีปัญหาเรื่องการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้งเส้นใยเซลลูโลสที่ได้อาจมีความแข็งแรงลดลง

2.5.2 การบำบัดน้ำเสียและการฟื้นฟูสภาพทางชีวภาพ

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินทำงานแบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อโครงสร้างของลิกนินดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นจึงได้มีการทดลองนำเชื้อราย่อยสลายลิกนินและเอนไซม์จากเชื้อราเหล่านี้มาใช้อย่อยสลายสารเคมีที่ย่อยสลายได้ยากหลายชนิดซึ่งรวมทั้ง สีเอโซ และสี

ย้อมประเภทอื่นๆ ยามาแมลง เช่น DDT (1,1-bis(4-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane),
 ลินเดน (2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl) และ PCB (polychlorinated biphenyl) รวมทั้ง
 ใช้ย่อยสลายสารประกอบฟีนอล และ PAHs เป็นต้น (Ollika *et al.*, 1993; Spadaro *et al.*, 1992;
 Paszczynski *et al.*, 1992) นอกจากนั้น ยังมีรายงานการใช้เชื้อราขาวหลายชนิดช่วยกำจัด
 สีคล้ำที่เกิดจากลิกนินและอนุพันธ์ของลิกนินที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตเยื่อ
 กระดาษอีกด้วย (Livernoche *et al.*, 1983; Livernoche *et al.*, 1982)

2.5.3 การผลิตสารให้กลิ่นรส

มีการทดลองใช้เอนไซม์จากราขาวบางชนิดเป็นคะตะลิสต์ชีวภาพ (biocatalyst) เพื่อ
 ผลิตสารต่างๆ ที่มีประโยชน์รวมทั้งสารให้กลิ่นรส ตัวอย่างเช่น การผลิต vanillin ซึ่งเป็นสาร
 แต่งกลิ่นจากโมโนเมอร์หรือไดเมอร์ของลิกนิน เช่น coniferyl alcohol, eugenol, ferulic acid
 เป็นต้น โดยอาศัยลิกนินเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งการผลิต vanillin โดยวิธีนี้
 น่าสนใจเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จัดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติซึ่งมีความปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับ
 มากกว่าที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

2.5.4 การเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ประเทศไทยมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมากมาย เช่น ฟางข้าว หญ้า และเศษไม้
 เป็นต้น ซึ่งองค์ประกอบสำคัญของวัสดุเหล่านี้ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ได้แก่
 คาร์โบไฮเดรต เช่น เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โดยนำมาเปลี่ยนให้คาร์โบไฮเดรตอยู่ในรูปที่
 ถูกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ง่ายขึ้นโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม
 ลิกนินที่มีอยู่ในวัสดุเหล่านี้จะจำกัดการไฮโดรไลซ์คาร์โบไฮเดรตโดยเอนไซม์ ดังนั้น
 จึงต้องมีขั้นตอนการกำจัดลิกนินที่ปนอยู่ออกก่อนโดยอาจใช้กระบวนการทางกายภาพ เช่น
 การบด การใช้ความร้อน หรือใช้วิธีทางเคมี เช่น การไฮโดรไลซ์ด้วยกรดหรือด่าง การ
 กำจัดลิกนินโดยกิจกรรมของราที่ย่อยสลายลิกนินเช่นเดียวกับกระบวนการ biopulping นับเป็น
 อีกแนวทางหนึ่งที่เป็นไปได้ในการกำจัดลิกนิน ซึ่งได้ผลพลอยได้คือทำให้ปริมาณโปรตีนและ
 คาร์โบไฮเดรตของวัสดุเหลือทิ้งเพิ่มขึ้นซึ่งมาจากมวลชีวภาพของเชื้อราซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการ
 เลี้ยงสัตว์ นอกจากการเปลี่ยนรูปวัสดุเหลือทิ้งที่เป็นของแข็งแล้วยังมีการทดลองเลี้ยงเชื้อราใน
 น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษซึ่งนอกจากจะได้ผลผลิตเป็นมวลชีวภาพแล้วยังสามารถ
 ลดค่า BOD และ COD ของน้ำทิ้งลงได้ด้วย

2.6 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Glenn และ Gold (1983) ศึกษาเปรียบเทียบการใช้สปีโพลิเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ Poly B-411, Poly R-481 และ Poly Y-606 เพื่อเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการตรวจวัดกิจกรรมการย่อยสลายลิกนินของรา *Phanerocheate chrysosporium* พบว่าการย่อยสลายสปีโพลิเมอร์มีลักษณะหลายประการที่สอดคล้องกับการย่อยสลายลิกนิน กล่าวคือการย่อยสลายสปีโพลิเมอร์เกิดขึ้นหลังจากการเจริญเต็มที่แล้ว ถูกยับยั้งเมื่อมีไนโตรเจนปริมาณสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อและถูกกระตุ้นด้วยออกซิเจน นอกจากนั้นสารที่ยับยั้งการย่อยสลายลิกนิน เช่น thiourea, azide และ 4'-O-methylisoeugenol ยังสามารถยับยั้งการย่อยสลายสปีโพลิเมอร์ได้ด้วยเช่นเดียวกัน และพบว่าสายพันธุ์กลายของ *P. chrysosporium* ที่ไม่มีเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและกิจกรรมย่อยสลายลิกนินไม่สามารถย่อยสลายสปีโพลิเมอร์พวกนี้ได้ ซึ่งผลทั้งหมดทำให้สรุปได้ว่าการย่อยสลายสปีโพลิเมอร์ทั้งสามชนิดของเชื้อราดังกล่าวเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการย่อยสลายลิกนิน

Bollag และ Leonowicz (1984) ดำรงการผลิตแลคเคสในรา basidiomycetes, ascomycetes และ deuteromycetes หลายชนิด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า และเติม 2,5-xylydine ลงในในเชื้อที่เจริญเต็มที่แล้ว พบว่าการผลิตแลคเคสจะเพิ่มขึ้นในราบางชนิด เช่น *Fomes annosus*, *Pholiota mulabilis*, *Plurotus ostreatus* และ *Trametes versicolor*

Gold และ คณะ (1988) ศึกษาการย่อยสลายสปีโพลิเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ Poly B-411, Poly R-481 และ Poly Y-606 โดยรา *Phanerocheate chrysosporium* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจน (nitrogen-limited medium) ที่ประกอบด้วยกลูโคส 2%, diammonium tartrate 1.2 mM ใน sodium 2,2-dimethylsuccinate buffer (pH 4.5), 20 mM และสารละลายเกลือแร่ พบว่าเชื้อราเริ่มย่อยสลายสปีโพลิเมอร์ Poly B และ Poly R ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยในกรณีของสปีโพลิเมอร์ Poly B อัตราการย่อยสลายสปีโพลิเมอร์จะสูงสุดในวันที่ 8 จากนั้นจะลดลง ในขณะที่การย่อยสลายสปีโพลิเมอร์ Poly R จะยังคงมีต่อไปจนถึงวันที่ 11 สำหรับสปีโพลิเมอร์ Poly Y นั้นถูกย่อยสลายได้ช้าและตรวจไม่พบกิจกรรมการย่อยสลายเมื่อไม่มีการให้ออกซิเจนบริสุทธิ์ในขณะเลี้ยงเชื้อ

Walder และคณะ (1988) เปรียบเทียบการย่อยสลายลิกนินของรา white-rot 6 ชนิด ได้แก่ *Chrysosporium pruinsum*, *Coriolus versicolor*, *Plurotus ostreatus*, *Bjerkandera adustus*, *Trametes cingulata* และ *Fomes lignosus* กับของ *P. chrysosporium* พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ ราบางสายพันธุ์จะถูกกระตุ้นด้วย veratryl

alcohol และพบว่าการย่อยสลายลิกนินเกิดในสภาวะที่ไม่มีการเขย่าได้เร็วกว่าในสภาวะที่มีการเขย่าในบางชนิด ในขณะที่ผลการทดลองเป็นในทางตรงกันข้ามในรายชนิดอื่น นอกจากนั้นยังพบว่าการจางลงของสี remazol blue ที่เติมลงไปในขณะที่เลี้ยงเชื้อจะแสดงถึงการเริ่มเกิดกิจกรรมย่อยสลายลิกนินของราเหล่านี้ได้

Field และคณะ (1993) รายงานการแยกได้จากไม้ผุและดินจำนวน 1000 ตัวอย่างที่เก็บจากประเทศเนเธอร์แลนด์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีผงลิกโนเซลลูโลส guaiacol และ benomyl เป็นส่วนผสม สามารถแยกเชื้อราบริสุทธิ์ได้ทั้งสิ้น 127 ไอโซเลท และเมื่อนำราทั้งหมดมาทดสอบการย่อยสลายสี Poly R-478 พบว่าที่ย่อยได้จำนวน 67 ไอโซเลท และนำราที่ย่อยสลายสีได้เร็ว จำนวน 6 ไอโซเลทมาทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) บางชนิดในอาหารเหลวสูตรแร่ธาตุที่มีกลูโคส 10 กรัมต่อลิตรและมี PAH 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ราที่ย่อยสลาย PAH ได้ดีที่สุดคือ *Bjerkandera* sp.BOS55 ซึ่งกำจัด anthracene และ benzo[a]pyrene ได้ร้อยละ 99.2 และ 83.1 ตามลำดับภายในเวลา 28 วัน

Ollikka และคณะ (1993) ศึกษาการย่อยสลายสีย้อมประเภทต่างๆ ได้แก่ สีเอโซ สีไตรฟีนิลมีเทน (triphenyl methane dyes) สีเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic dyes) และสีโพลีเมอริก รวม 10 ชนิด โดยรา *P. chrysosporium* พบว่าสีส่วนใหญ่ถูกจางสีลงไปมากกว่า 75% ของสีเดิม ยกเว้นสี Congo red, Poly R-478 และ Poly T-128 นอกจากนั้นยังตรวจสอบการย่อยสลายสีโดยไอโซเอนไซม์บริสุทธิ์ของลิกนินเปอร์ออกซิเดส 3 ชนิด พบว่าให้ผลใกล้เคียงกับการย่อยสลายโดยไอโซเอนไซม์ไม่บริสุทธิ์ แสดงว่าลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสี และการเริ่มการย่อยสลายไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มของเปอร์ออกซิเดส นอกจากนั้นการย่อยสลายจะเกิดได้ดีเมื่อมี veraryl alcohol ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Dey และคณะ (1994) รายงานการศึกษาเอนไซม์ชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ของรากลุ่ม brown rot คือ *Polyporus ostreiformis* หลายชนิดรวมทั้งเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน พบว่าราชนิดนี้ผลิตเอนกานีสเปอร์ออกซิเดสและลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ 40 หน่วยต่อลิตร และ 50 nkal ต่อลิตร ตามลำดับเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจน เมื่อตรวจวัดการย่อยสลายลิกนินจากฟางข้าวพบว่าถูกย่อยสลายได้ร้อยละ 18.6 ของลิกนินทั้งหมด อย่างไรก็ตามราชนิดนี้สามารถย่อยสลายสี congo red ซึ่งเป็นย้อมประเภทเอโซ (azo dye) เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.003 ได้ถึงร้อยละ 99 ภายในเวลา 9 วัน

Barbosa และคณะ (1996) รายงานการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของราจากไม้ผุ ดินและขอนไม้จากบริเวณต่างๆ ของรัฐออสเตอร์เลียตะวันตกได้จำนวน 40 ไอโซเลท และนำมาตรวจวัดกิจกรรมการย่อยสลายลิกนินด้วยวิธีวัดการย่อยสลายสี Poly R-478 โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยกลูโคส 1% และสี 0.02% ในสถานะที่มีการเขย่าเป็นเวลา 12 วัน ประเมินการย่อยสลายสีจากการลดลงของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 513 และ 326 นาโนเมตร ผลการทดลองพบเชื้อรา 10 ไอโซเลทที่ย่อยสลายสีได้ โดยสายพันธุ์ที่ย่อยสลายได้ดี ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Botryosphaeria* sp. และ *Coniochaeta* sp. จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินพบว่าเชื้อราทั้งสาม รวมทั้งรา *P. chrysosporium* ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิงไม่มีกิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แต่พบกิจกรรมของแลคเคสในรา *Botryosphaeria* sp. และ *Coniochaeta* sp. นอกจากนั้น ยังพบว่ากิจกรรมของแลคเคสของ *Botryosphaeria* sp. ถูกกระตุ้นเมื่อมี veratryl alcohol ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Wunch และคณะ (1997) รายงานการทดสอบความสามารถของราเส้นสาย 17 สายพันธุ์ 13 ชนิด ในการฟอกจางสี Poly R-478 พบว่าการฟอกจางสีโดยรา *Aspergillus* เกิดขึ้นได้ทั้งเมื่อใช้เส้นใยที่มีชีวิตและถูกทำให้ไม่มีชีวิต แสดงว่าเป็นการดูดซับสีไม่ใช่การย่อยสลายสี นอกจากนั้นพบว่าเส้นใยของรา *Marasmiellus troyanus*, *Pleurotus sapidus* และ *P. ostreatus* ฟอกจางสีได้ดีแต่การฟอกจางสีโดยสารละลายเอนไซม์เกิดขึ้นได้ดีที่สุดในรา *Laetiporus sulphureus* เมื่อทดสอบการย่อยสลาย benzo[a] pyrene ด้วยเส้นใยและสารละลายเอนไซม์พบว่ามีรา 6 ชนิดที่กำจัด benzo[a]pyrene ได้มากกว่าร้อยละ 40 นอกจากนั้นยังพบว่าการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับการย่อยสลายสี Poly R-478

Zheng และคณะ (1999) รายงานการแยกรา *Penicillium* สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถย่อยสลายสีโพลีเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ Poly R-478 และ Poly S-119 โดยเปรียบเทียบการย่อยสลายสีเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ที่มีสีผสมอยู่ 0.01% และวัดการย่อยสลายสีจากการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ในกรณีของสี Poly R-478 และ 472 นาโนเมตร ในกรณีของสี Poly S-119 ผลการทดลองพบว่า องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการย่อยสลายสีของ *Penicillium* สายพันธุ์นี้

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

ก. เครื่องแก้วและวัสดุ

1. หลอดทดลอง (test tube)
2. ฟลาสก์ (flask)
3. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
4. ปิเปต (pipette)
5. ปากคีบ (forcept)
6. ใบมีดสำหรับตัด

ข. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Malt extract agar (DIFCO)
2. Malt extract agar ผสม streptomycin 550 ไมโครกรัม/ลิตร
3. Glucose
4. Diammonium tartrate
5. Dimethyl succinate
6. Poly-R 478 (SIGMA)
7. ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (FLUKA)
8. Hydrogen peroxide
9. Veratryl alcohol
10. Veratraldehyde
11. d-Tartaric acid
12. Citric acid
13. Calcium chloride
14. Potassium dihydrogen phosphate

ก. เครื่องมือ

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ชนิดควบคุมอุณหภูมิ ของ Unicam รุ่น UV-500
2. กล้องจุลทรรศน์
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

ง. เชื้อราอ้างอิง

1. *Sporotrichum pulverulentum* TISTR 3326
2. *Trametes versicolor* TISTR 3224

เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ได้จากหน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ ในรูปของผงแห้ง (lyophilized powder) นำมาเพาะเชื้อบนจานอาหาร malt extract agar ตามวิธีที่แจ้งไว้ และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดวุ้นเอียง malt extract agar

3.2 วิธีทดลอง

3.2.1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเบสิดิโอคาร์พ (basidiocarp) ของราที่ขึ้นบนกิ่งไม้หรือต้นไม้ตาย และเศษกิ่งไม้ผุจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย โดยแยกเก็บแต่ละตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกที่สะอาด บันทึกรายละเอียดของแต่ละตัวอย่าง รวมทั้งถ่ายภาพไว้ และนำมายังห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด

3.2.2 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์

นำเบสิดิโอคาร์พของราแต่ละชนิดมาแยกเชื้อบริสุทธิ์บนจานอาหารแข็ง ดังนี้

1. ตีงเบสิดิโอคาร์พด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อหลายๆ ครั้งจนหมดสิ่งปนเปื้อน วางบนจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ
2. ใช้ใบมีดคมๆ ที่ฆ่าเชื้อแล้วเสียด้านเข้าไปในเบสิดิโอคาร์พ ใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบส่วนเนื้อภายในเล็กน้อย นำมาวางบริเวณกลางผิวอาหารวุ้น malt extract agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ streptomycin กดเบาๆ ให้ติดตัวอย่างกับผิวอาหาร
3. บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เมื่อมีเส้นใยเจริญให้ใช้ใบมีดปลอดเชื้อตัดส่วนเส้นใยบริเวณปลายที่ไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น นำไปวางบนจานอาหารจานใหม่ ทำซ้ำหลายๆ ครั้งจนได้เชื้อบริสุทธิ์

สำหรับตัวอย่างเศษไม้ผุให้ใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบส่วนเนื้อไม้ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวนำมาวางบนจานอาหาร malt extract agar นำไปบ่มเพาะเชื้อและแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีเดียวกัน

เก็บเชื้อราที่แยกได้จากแต่ละโคโลนีซึ่งเรียกว่า “ไอโซเลท” ไว้ในหลอดอาหารวุ้นแข็ง malt extract agar สำหรับการศึกษาต่อไป

3.2.3 การตรวจวัดการย่อยสลายสี Poly-R 478

นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมดรวมทั้งเชื้อราอ้างอิง *S. pulverulentum* และ *T. versicolor* มาทดสอบการย่อยสลายสี Poly R-478 ดังนี้

1. เพาะเลี้ยงเชื้อราบนจานอาหาร malt extract agar ที่อุณหภูมิห้องจนเจริญเกือบเต็มผิวหน้าจาน
2. ใช้ใบมีดปลอดเชื้อตัดเส้นใยของเชื้อราบริเวณด้านนอกของโคโลนีเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มม. ใช้ปากคีบปลอดเชื้อถ่ายชิ้นเส้นใยจำนวน 10 ชิ้นลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรจำกัดไนโตรเจน (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 30 มล. นำไปวางบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องในสภาวะไม่มีการเขย่า
3. เมื่อครบเวลา 4 วัน เติมสารละลายสี Poly R-478 (กำจัดเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรองขนาดช่อง 0.45 ไมครอน) ให้มีความเข้มข้นของสีในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.02%
4. ตรวจวัดการย่อยสลายสีทุกวัน ดังนี้
 - 4.1 ปิเปตนำเลี้ยงเชื้อ 1 มล. ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเส้นใยออก เก็บส่วนของเหลว
 - 4.2 เจือจางตัวอย่าง 0.1 มล. ด้วยน้ำกลั่น 0.9 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม
 - 4.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 350 และ 520 นาโนเมตร คำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 350 นาโนเมตร

3.2.4 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสของราที่ย่อยสลายสี Poly R-478 ได้ และเชื้อราอ้างอิง ตามวิธีดังต่อไปนี้

1. เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะไม่มีการเขย่า ตามวิธีในข้อ 3.2.3
2. เมื่อครบเวลา 5 และ 7 วัน ปิเปตนำเลี้ยงเชื้อ 1 มล. ปั่นเหวี่ยงแยกเส้นใยออก นำส่วนของเหลวมาหาคิจกรรมเอนไซม์แต่ละชนิด ดังนี้

ก. ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

วัตถุประสงค์การทดลองลิกนินเปอร์ออกซิเดสตามวิธีที่เสนอโดย Tein และ Kirk (1983) ดังนี้

(1) ปิเปตส่วนผสมต่อไปนี้ลงในหลอดสำหรับวัด (cuvette):

- สารละลาย sodium tartrate (pH 2.5), 25 mM 300 ไมโครลิตร
- veratryl alcohol, 2mM 300 ไมโครลิตร
- สารละลายเอนไซม์ 300-700 ไมโครลิตร
- hydrogen peroxide, 0.4 mM 120 ไมโครลิตร

(2) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงโดยควบคุมอุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยาที่ 30°C

(3) คำนวณยูนิตของเอนไซม์จาก:

1 หน่วยของลิกนินเปอร์ออกซิเดส หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ออกซิไดซ์ veratryl alcohol 1 mmol ภายในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่ใช้วัด

(4) คำนวณความเข้มข้นของเอนไซม์ (หน่วยต่อมล.)

ข. แลคเคส

วัตถุประสงค์ของเอนไซม์แลคเคสตามวิธีของ Barbosa และคณะ (1996)

(1) ปิเปตส่วนผสมต่อไปนี้ลงในหลอดแก้ว:

- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid, 50mM 50 ไมโครลิตร
- citrate-phosphate buffer (McIlvaine buffer), 120 mM, pH 3.0 150 ไมโครลิตร
- สารละลายเอนไซม์ 50-500 ไมโครลิตร

(2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 5 นาที

(3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

(4) คำนวณหน่วยของแลคเคสจาก:

1 หน่วยของแลคเคส หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ออกซิไดซ์ ABTS 1 μ mol ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ใช้วัด

(5) คำนวณความเข้มข้นของแลคเคสในสารละลาย (หน่วยต่อมล.)

6.2.5 การจำแนกเชื้อราเบื้องต้น

นำราไอโซเลทที่ย่อยสลายดี Poly R-478 ได้ดีที่สุดเลือกได้มาศึกษาลักษณะโครงสร้างเส้นใยและสปอร์โดยการทำ slide culture (ภาคผนวก ข) และศึกษาลักษณะของเบสิดิโอคาร์พจากภาพถ่ายเพื่อจัดจำแนกระดับสกุล

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราบริสุทธิ์

จากการเก็บตัวอย่างเบสิดิโอคาร์พของราจากพืชและดินในบริเวณป่าดงดิบชื้นในภาคใต้ของประเทศไทย ได้เชื้อราเบสิดิโอคาร์พบริสุทธิ์ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ CM, KC, KK, P และ KY ซึ่งสามารถแยกเชื้อราบริสุทธิ์ได้ดังสรุปต่อไปนี้

สรุปข้อ 1. จากการนำตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย มาแยกเชื้อราไอโซเลทของเชื้อราเบสิดิโอคาร์พได้

แหล่งเก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง		จำนวนไอโซเลท	รหัสของรา
	เห็ดคิงบอดี	เห็ดไม้คู้	ที่แยกได้	
เกาะช้าง อ.ตราด	7	-	4	KC
เกาะลันตา อ.เกาะลันตา	8	-	7	CM
เกาะลิดร อ.ลิดร	10	2	8	KK
ป่าดิบ อ.นบพิตำ	14	-	19	P
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง	28	3	34	KY
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง	5	-	4	RM, PT
รวม	72	5	76	

การแยกเชื้อราเบสิดิโอคาร์พของราจากพืชและดินในบริเวณป่าดงดิบชื้นในภาคใต้ของประเทศไทย ได้เชื้อราเบสิดิโอคาร์พบริสุทธิ์ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ CM, KC, KK, P และ KY ซึ่งสามารถแยกเชื้อราบริสุทธิ์ได้ดังสรุปต่อไปนี้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

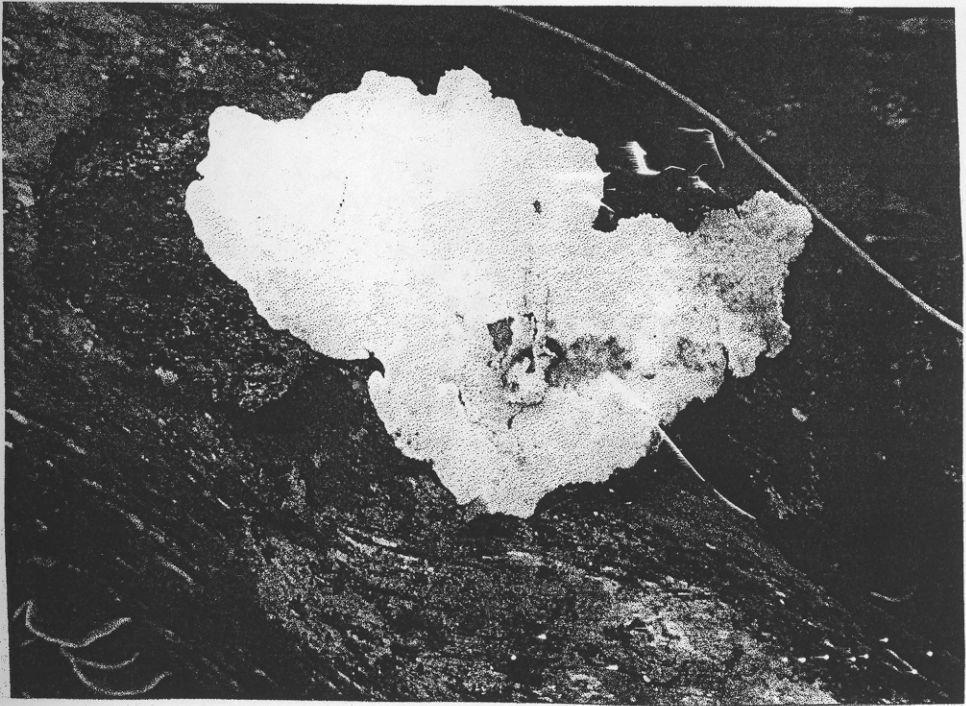
1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราบริสุทธิ์

จากการเก็บตัวอย่างเบสิดิโอคาร์พของราย่อยสลายไม้และชิ้นส่วนไม้ผุจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย และนำมาเพาะแยกเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract agar ที่ผสม streptomycin สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ดังสรุปไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย และจำนวนไอโซเลทของเชื้อราที่แยกได้

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง		จำนวนไอโซเลท ที่แยกได้	รหัสของรา
	ฟรุตติงบอดี	เศษไม้ผุ		
เกาะช้าง จ. ตรัง	7	-	4	KC
เขาชะเมา จ. ระยอง	8	-	7	CM
เขาเขียว จ. ชลบุรี	10	2	8	KK
น้ำตก จ. แพร่	14	-	19	P
น้ำตกเหวนรก จ. ปราจีนบุรี	28	3	34	KY
แหล่งอื่นๆ ใน จ. ชลบุรี	5	-	4	RM, PT
รวม	72	5	76	

สำหรับลักษณะเบสิดิโอคาร์พของราย่อยสลายไม้และลักษณะของไม้ผุที่นำมาแยกเชื้อราบริสุทธิ์ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 4 ถึงภาพที่ 13



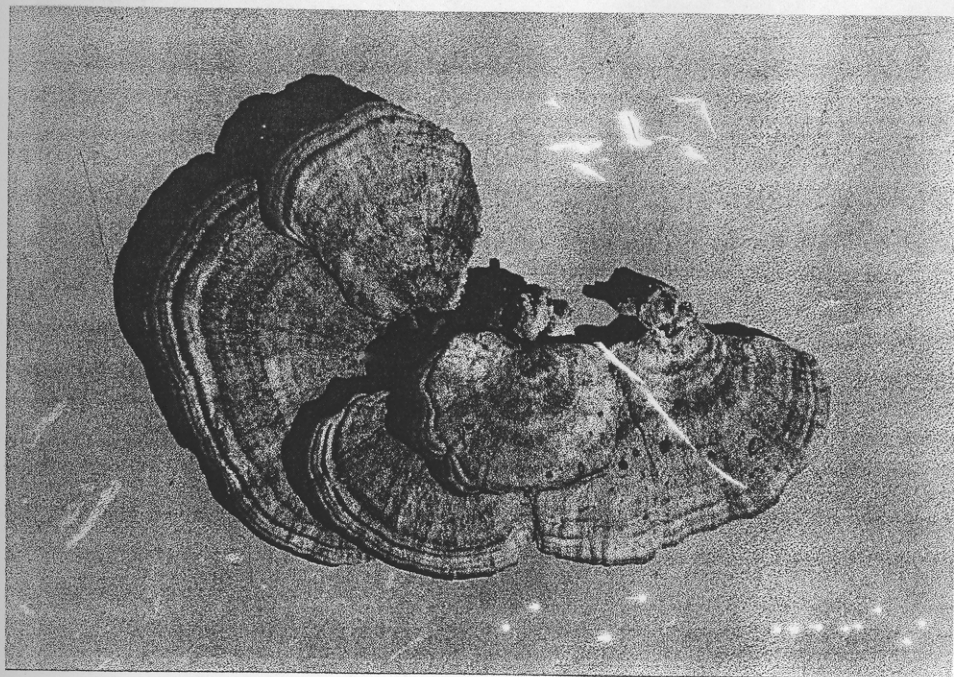
ภาพที่ 4 ลักษณะเบสิติโอคาร์พของรารหัส P3



ภาพที่ 5 ลักษณะเบสิติโอคาร์พของรารหัส P10

137404

579.5
๗451n
พ. 4



ภาพที่ 6 ลักษณะเบสิดิโকার์พของรารหัส KY3



ภาพที่ 7 ลักษณะเบสิดิโকার์พของรารหัส KY5



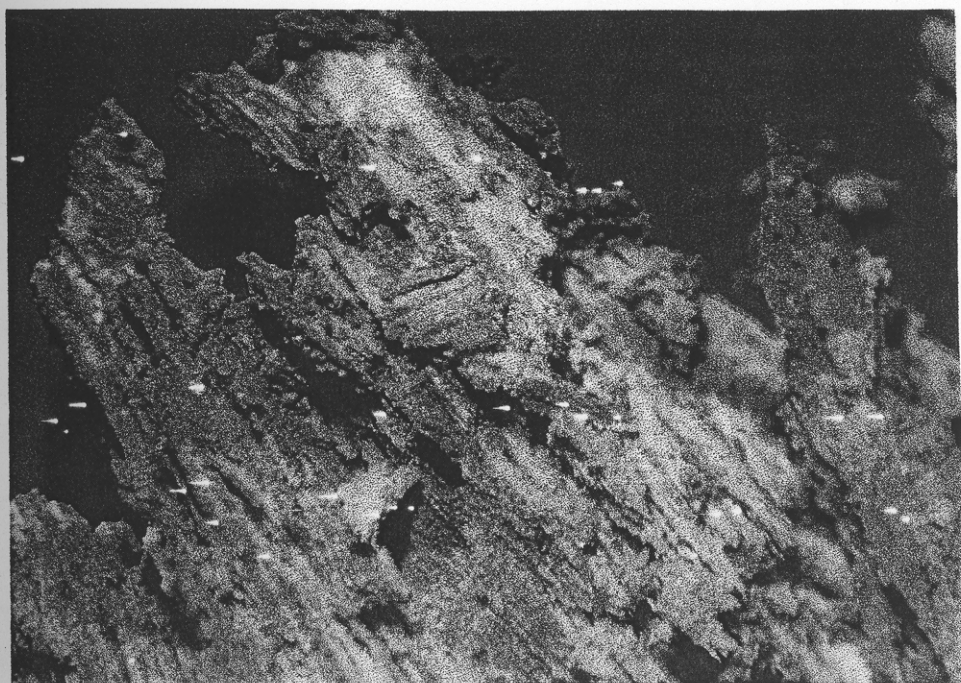
ภาพที่ 8 ลักษณะเบลีดิโอคาร์พของรารหัส KY8



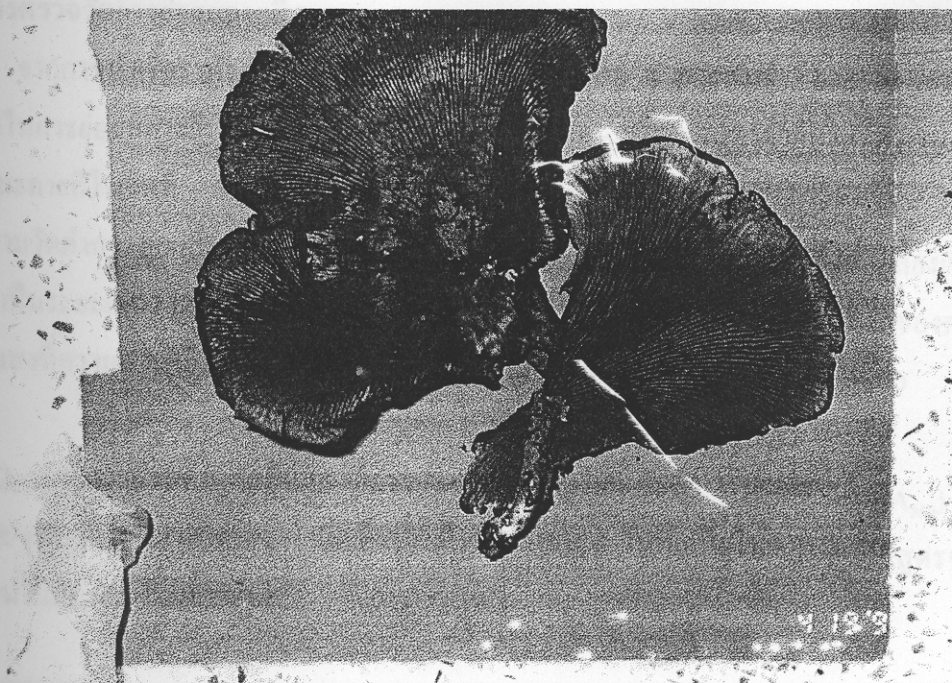
ภาพที่ 9 ลักษณะเบลีดิโอคาร์พของรารหัส KY22



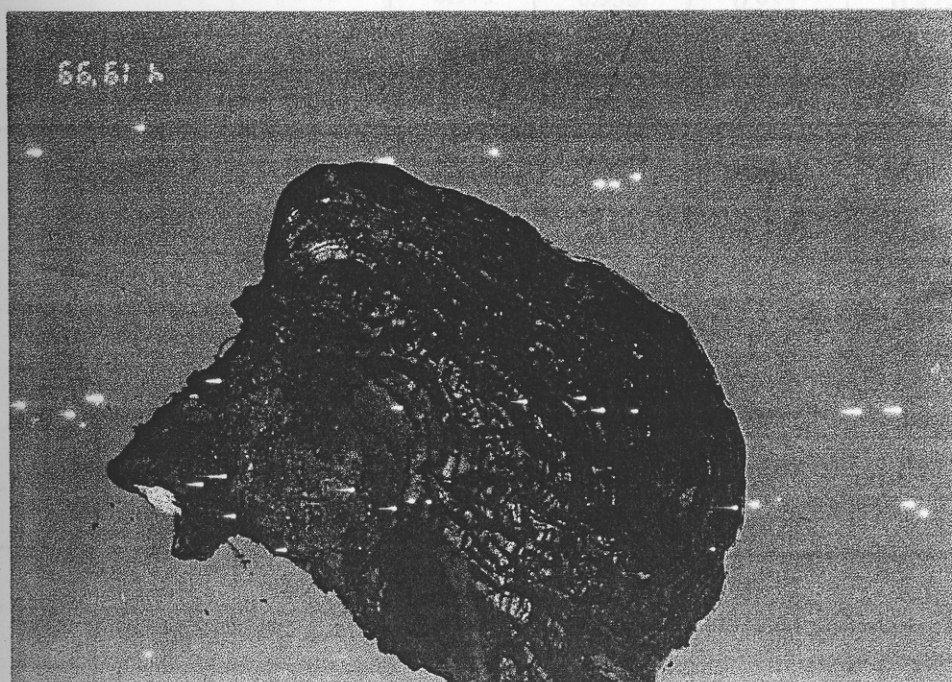
ภาพที่ 10 ลักษณะเบสิดิโอรพของรารหัส KK5



ภาพที่ 11 ลักษณะของไม้ผุที่แยกได้รารหัส KK9



ภาพที่ 12 ลักษณะของเบสิติโอคาร์พของรารหัส KC2



ภาพที่ 13 ลักษณะของเบสิติโอคาร์พของรารหัส KC6

4.2 การตรวจวัดการย่อยสลายสี Poly R-478

จากการนำเชื้อราทั้ง 76 ไอโซเลทและเชื้อราอ้างอิงอีก 2 สายพันธุ์ มาตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายสี Poly R-478 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจน และเติมสารละลายสีในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นของสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.02% เมื่อติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 350 และ 520 นาโนเมตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชม. เป็นระยะเวลา 120 ชม. (5 วัน) พบจำนวน 13 ไอโซเลทที่ทำให้อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นทั้งสองค่าลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 อัตราส่วนค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ของสี Poly R-478 ที่ระยะเวลาด่างๆ เมื่อเติมสีลงในเชื้อราอายุ 4 วันที่เจริญในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจนในสภาวะไม่มีการเขย่า

ชื่อหรือรหัส	A_{520}/A_{350}					
	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	120 ชม.
ชุดควบคุม	1.238	1.191	1.200	1.236	1.231	1.228
<i>S. pulverulentum</i>	1.169	1.126	1.102	1.180	1.233	1.194
<i>T. versicolor</i>	1.009	0.986	0.979	0.956	0.935	0.878
CM4	1.125	0.819	0.811	0.744	0.650	0.620
KC7	1.160	0.948	0.903	0.875	0.805	0.715
P4.2	0.665	0.522	0.468	0.431	0.420	0.420
P7	0.761	0.630	0.630	0.441	0.429	0.406
P10	1.129	0.895	0.769	0.544	0.366	0.283
P14	0.913	0.709	0.635	0.538	0.501	0.448
KK5	1.146	0.991	0.746	0.594	0.427	0.328
KY2.2	1.175	0.961	0.785	0.709	0.698	0.614
KY6.3	1.260	1.132	0.685	0.463	0.403	0.284
KY8	1.120	1.061	1.036	0.892	0.719	0.563
KY14.2	0.830	0.662	0.570	0.541	0.485	0.446
KY25.1	1.080	1.026	0.853	0.804	0.703	0.614
RM	0.789	0.739	0.691	0.583	0.547	0.505

หมายเหตุ จำนวนชม.ที่แสดงในตารางหมายถึงระยะเวลาหลังการเติมสี Poly R-478 ลงไปในการเลี้ยงเชื้อ

จากข้อมูลในตารางที่ 2 สามารถคำนวณค่าผลต่างระหว่าง A_{520}/A_{350} ที่เวลา 0 ชม. และ 120 ชม. และคิดเป็นร้อยละของค่าอัตราส่วนที่ลดลงของราแต่ละไอโซเลทได้ดังแสดงในตารางที่ 3

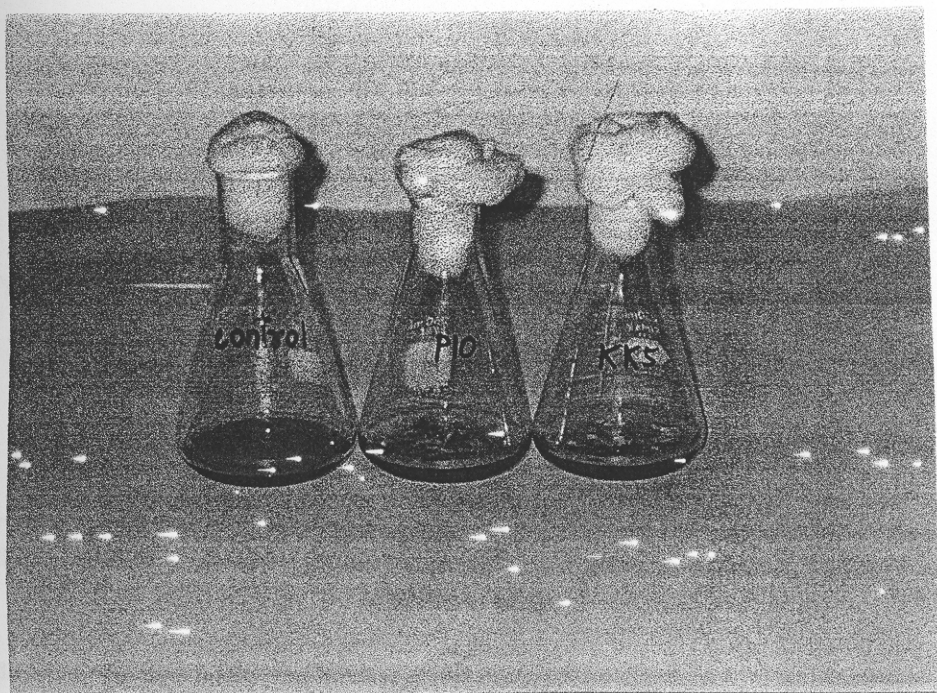
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณการลดลงของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร จากเวลา 0 ชม. ถึง 120 ชม. หลังเติมสี ($\Delta A_{520}/A_{350}$) ของราที่ย่อยสลายสี Poly R-478 ได้

ชื่อหรือรหัสของรา	$\Delta A_{520}/A_{350}$	ร้อยละ
<i>S. pulverulentum</i>	0.000	0
<i>T. versicolor</i>	0.131	13.1
CM4	0.505	50.5
KC7	0.445	44.5
P4.2	0.245	24.5
P7	0.355	35.5
P10	0.846	84.6
P14	0.365	36.5
KK5	0.818	81.8
KY2.2	0.561	56.1
KY6.3	0.876	87.6
KY8	0.716	71.6
KY14.2	0.384	38.4
KY25.1	0.466	46.6
RM	0.284	28.4

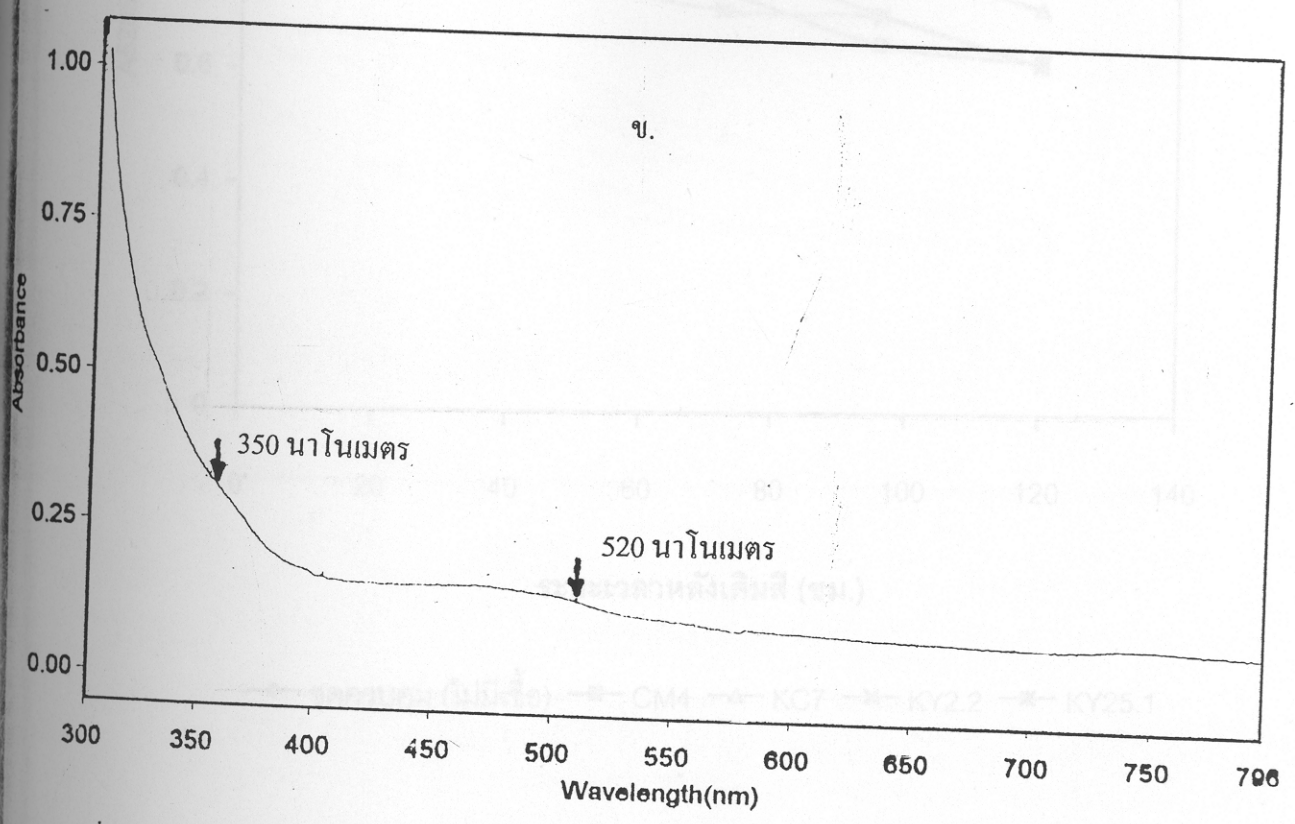
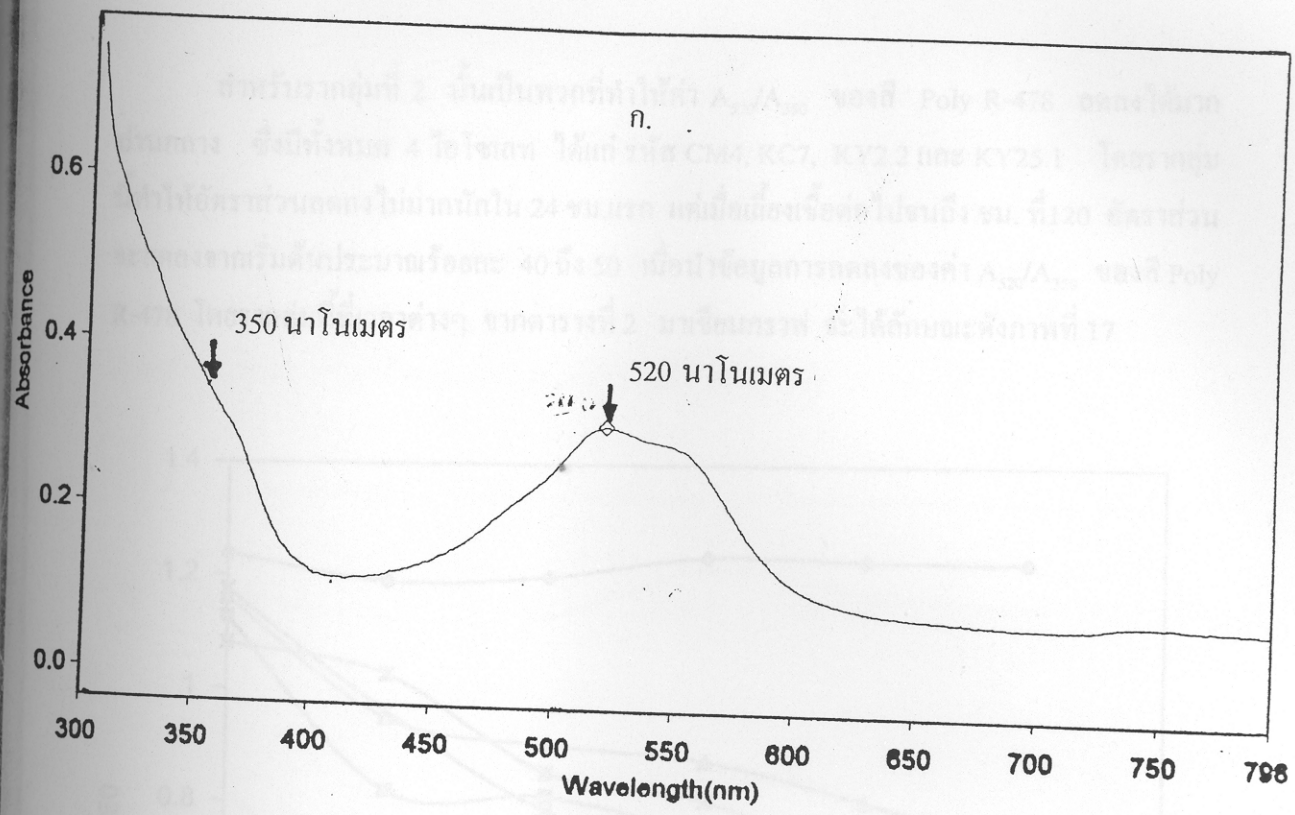
จากตารางที่ 2 และตารางที่ 3 จะพบว่ามีราที่ย่อยสลายสีได้จำนวนทั้งหมด 13 ไอโซเลท โดยอาจแบ่งรากล้านี้ออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นราที่ทำให้อัตราส่วน A_{520}/A_{350} ลดลงจากเริ่มแรกได้มากกว่าร้อยละ 50 ซึ่งมีจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ รารหัส P10, KK5, KY6.3 และ

จากกราฟในภาพที่ 14 จะพบว่ารารหัส KK5 และ P10 ทำให้อัตราส่วน A_{520}/A_{350} ของสี Poly R-478 ลดลงมากภายในเวลา 24 ชม. หลังการเติมสี โดยรารหัส KK5 ทำให้อัตราส่วนดังกล่าวลดลงมากที่สุดคือ 0.46 หน่วยภายในเวลา 24 ชม. ในขณะที่รารหัส P10 ทำให้อัตราส่วนลดลงน้อยกว่า คือ 0.24 หน่วยภายในระยะเวลาเท่ากัน และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเชื้อราทั้งสองจะทำให้ค่าอัตราส่วน A_{520}/A_{350} ลดลงอีกเป็นลำดับจนถึง ชม.ที่ 120 หลังเติมสีอัตราส่วนจะลดลงจากเริ่มต้นเดิมสีร้อยละ 81.8 และ 84.6 ตามลำดับ สำหรับรารหัส KY 6.3 นั้นพบว่าทำให้อัตราส่วน A_{520}/A_{350} ลดลงเพียงเล็กน้อยภายใน 24 ชม.แรก กล่าวคือ ลดลงจากเมื่อเริ่มเติมสี 0.24 หน่วย แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปอีก 24 ชม. พบว่าอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงอีก 0.48 หน่วย จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ จนถึงชม. ที่ 120 ค่าอัตราส่วนจะลดลงจากเริ่มต้นร้อยละ 97.6 ส่วนรา KY8 นั้น พบว่าทำให้อัตราส่วน A_{520}/A_{350} ลดลงอย่างช้าๆ ในช่วง 24 ชม.แรกหลังเติมสี จากนั้นจะลดลงด้วยอัตราที่เร็วขึ้นและเมื่อถึง ชม. ที่ 120 หลังเติมสีอัตราส่วนจะลดลงจากชม. ที่ 0 ร้อยละ 55.7 (ตารางที่ 3)

นอกจากนั้น สิ่งที่เกิดขึ้นได้อีกประการหนึ่งของราในกลุ่มแรกนี้ก็คือ ราในกลุ่มแรกนี้จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อจากลงและมีสีเปลี่ยนอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 15) สำหรับสเปกตรัมแสดงการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสี Poly R-478 เนื่องจากการถูกย่อยสลายโดยเชื้อรานี้แสดงตัวอย่างไว้ในภาพที่ 16



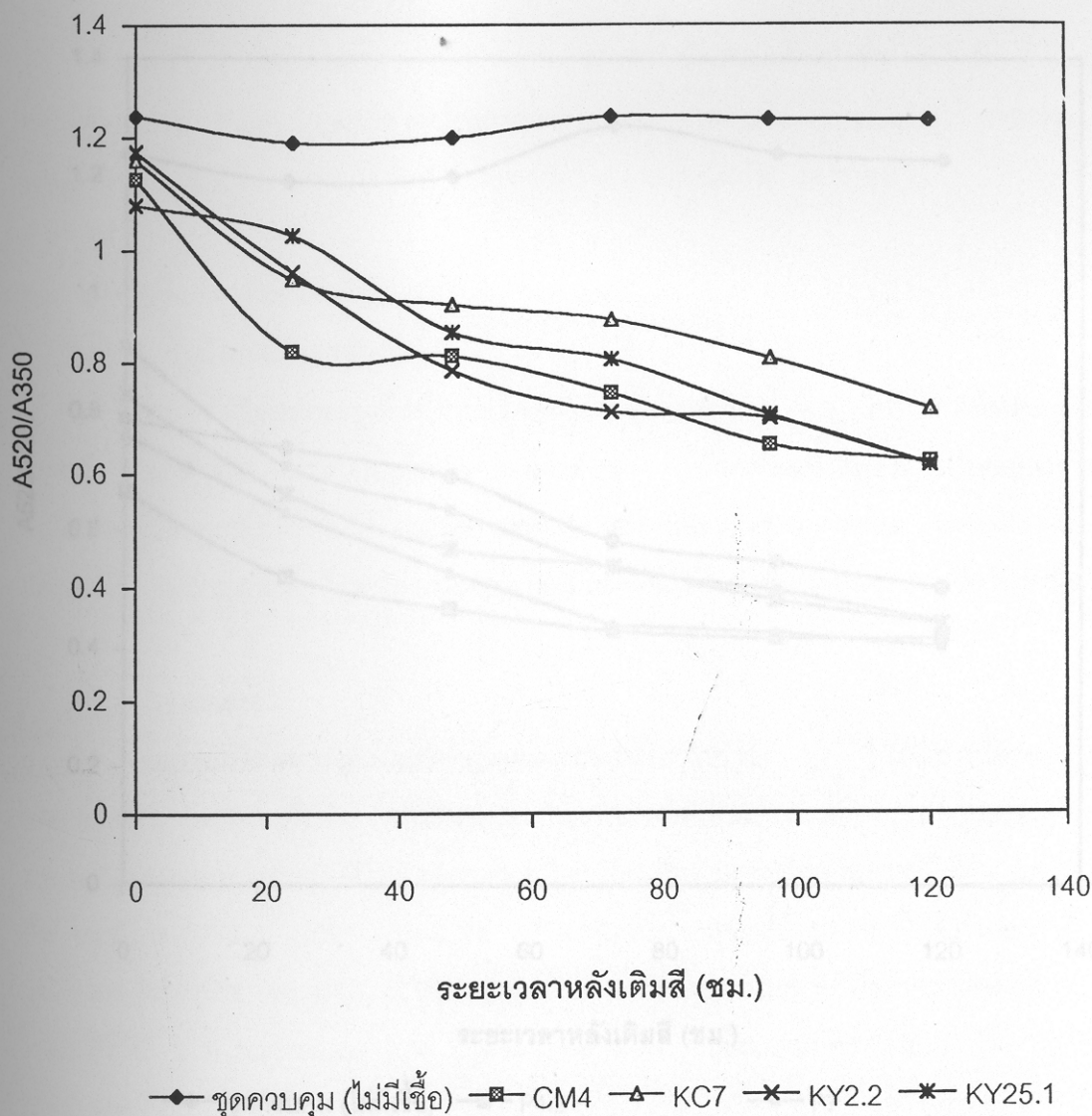
ภาพที่ 15 ลักษณะการจากลงของสี Poly R-478 ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยราที่ย่อยสลายสีได้ดี หลังการเติมสีเป็นเวลา 120 ชม.



ภาพที่ 16 สเปกตรัมแสดงการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของสี Poly R-478 โดยราP10

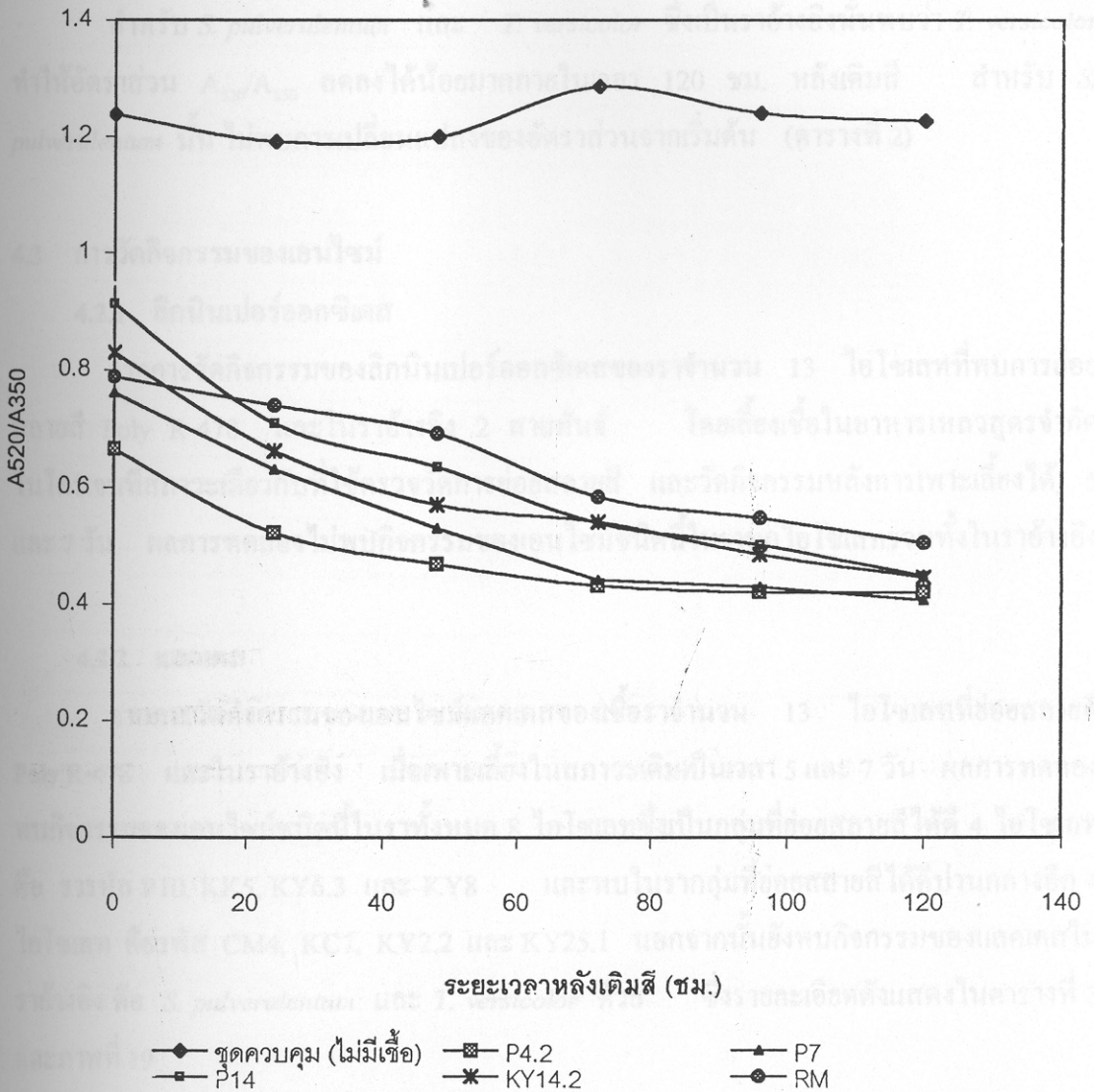
ก. หลังเติมสี 0 ซม. ข. หลังเติมสี 96 ซม.

สำหรับรากลุ่มที่ 2 นั้นเป็นพวกที่ทำให้ค่า A_{520}/A_{350} ของสี Poly R-478 ลดลงได้มาก ปานกลาง ซึ่งมีทั้งหมด 4 ไอโซเลท ได้แก่ รหัส CM4, KC7, KY2.2 และ KY25.1 โดยรากลุ่มนี้ทำให้อัตราส่วนลดลงไม่มากนักใน 24 ชม.แรก แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปจนถึง ชม. ที่ 120 อัตราส่วนจะลดลงจากเริ่มต้นประมาณร้อยละ 40 ถึง 50 เมื่อนำข้อมูลการลดลงของค่า A_{520}/A_{350} ของสี Poly R-478 โดยรากลุ่มนี้ที่เวลาต่างๆ จากตารางที่ 2 มาเขียนกราฟ จะได้ลักษณะดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ของสี Poly R-478 โดยราที่ย่อยสลายสีได้ดีปานกลาง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจนในสภาวะไม่มีการเขย่า

สำหรับรากกลุ่มที่ 3 นั้นเป็นพวกที่ย่อยสลายได้เล็กน้อย นอกจากนั้นยังมีความแตกต่างจากรากกลุ่มที่ 1 และรากกลุ่มที่ 2 คือ เป็นกลุ่มที่ทำให้อัตราส่วน A_{520}/A_{350} ลดลงตั้งแต่เริ่มเติมสี โดยลดลงถึงเกือบร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อ และเมื่อบ่มเพาะเชื้อต่อไปค่าอัตราส่วนจะลดลงอย่างช้าๆ และเมื่อถึงชม. ที่ 120 อัตราส่วนจะยังคงมีค่าค่อนข้างสูงอยู่ และเมื่อ นำข้อมูลของอัตราส่วน A_{520}/A_{350} ของสี Poly R-478 ที่เวลาต่างๆ โดยเชื้อราในกลุ่มนี้จากตารางที่ 2 มาเขียนกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลง จะได้ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ของสี Poly R-478 โดยราที่ย่อยสลายได้เล็กน้อย เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจนในสภาวะไม่มีการเขย่า

จากกราฟในภาพที่ 18 จะพบว่าแม้ว่าราเหล่านี้จะทำให้อัตราส่วน A_{520}/A_{350} ของสี Poly R-478 ลดลงมากเมื่อเริ่มเดิมสี แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปจนถึง 120 ชม. อัตราส่วนจะลดลงอย่างช้าๆ ตัวอย่างเช่น รารหัส P4.2 ทำให้ A_{520}/A_{350} ลดลงเพียง 0.14 หน่วย ภายในเวลา 24 ชม. แรกหลังเดิมสี จากนั้นจะทำให้อัตราส่วนลดลงอย่างช้าๆ จนถึงชม. ที่ 120 หลังเดิมสี สำหรับรารหัสอื่นนั้นพบว่าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในทำนองเดียวกัน และเมื่อถึง ชม. ที่ 120 หลังเดิมสี อัตราส่วนจะลดลงจากชม. ที่ 0 หลังเดิมสีไม่เกินร้อยละ 50 เท่านั้น (ตารางที่ 3)

สำหรับ *S. pulverulentum* และ *T. versicolor* ซึ่งเป็นราอ้างอิงนั้นพบว่า *T. versicolor* ทำให้อัตราส่วน A_{520}/A_{350} ลดลงได้น้อยมากภายในเวลา 120 ชม. หลังเดิมสี สำหรับ *S. pulverulentum* นั้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนจากเริ่มต้น (ตารางที่ 2)

4.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

4.2.1 ลิกันินเปอร์ออกซิเดส

จากการวัดกิจกรรมของลิกันินเปอร์ออกซิเดสของราจำนวน 13 ไอโซเลทที่พบการย่อยสลายสี Poly R-478 และในราอ้างอิง 2 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดในโตรเจนที่สภาวะเดียวกับที่ใช้ตรวจวัดการย่อยสลายสี และวัดกิจกรรมหลังการเพาะเลี้ยงได้ 5 และ 7 วัน ผลการทดลองไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในราทุกไอโซเลทรวมทั้งในราอ้างอิง

4.2.2 แลคเคส

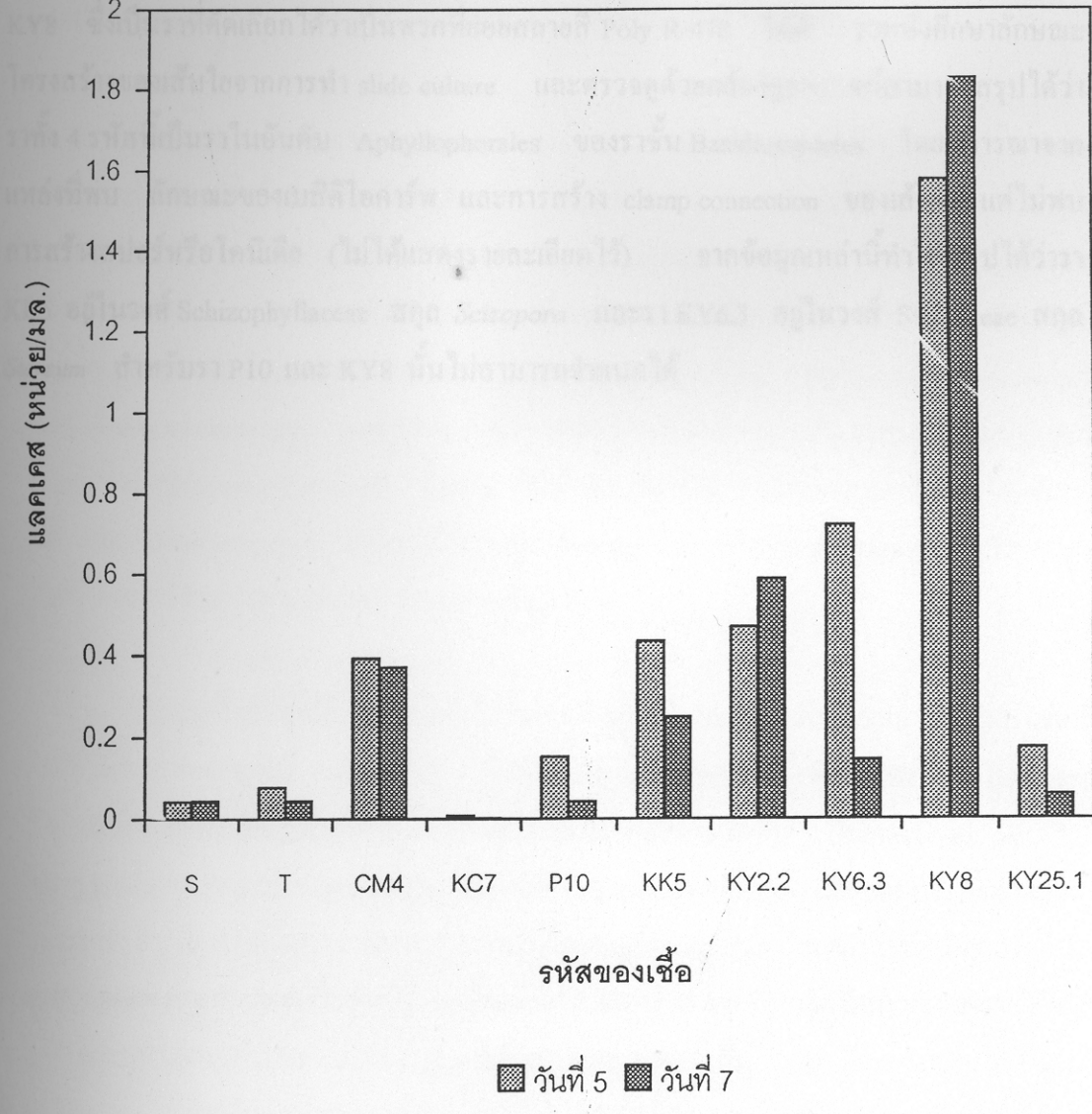
จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสของเชื้อราจำนวน 13 ไอโซเลทที่ย่อยสลายสี Poly R-478 และในราอ้างอิง เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเดิมเป็นเวลา 5 และ 7 วัน ผลการทดลองพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในราทั้งหมด 8 ไอโซเลทซึ่งเป็นกลุ่มที่ย่อยสลายสีได้ดี 4 ไอโซเลทคือ รารหัส P10, KK5, KY6.3 และ KY8 และพบในรากุ่มที่ย่อยสลายสีได้ดีปานกลางอีก 4 ไอโซเลทคือ รหัส CM4, KC7, KY2.2 และ KY25.1 นอกจากนั้นยังพบกิจกรรมของแลคเคสในราอ้างอิง คือ *S. pulverulentum* และ *T. versicolor* ด้วย ซึ่งรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 19

ตารางที่ 3 ปริมาณแผลกเคสที่ผลิตโดยราที่ข่อยสลายสี Poly R-478 และราอ้างอิง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจน ในสภาวะไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 5 และ 7 วัน

ชื่อหรือรหัสของเชื้อรา	ปริมาณของแผลกเคส (หน่วย/มล.)	
	วันที่ 5	วันที่ 7
<i>Sporotrichum pulverolentum</i>	0.042	0.044
<i>Trametes versicolor</i>	0.078	0.044
CM4	0.392	0.37
KC7	0.004	0.002
P4.2	-	-
P7	-	-
P10	0.152	0.042
P14	-	-
KK 5	0.542	0.248
KY2.2	0.468	0.588
KY6.3	0.072	0.144
KY8	1.576	1.82
KY14.2	-	-
KY25.1	0.172	0.058
RM	-	-

4.4 การจำแนกเชื้อรา

จากผลการจำแนกเชื้อราที่พบและลักษณะของสายพันธุ์ Poly R-478 และสายพันธุ์อื่นๆ ที่พบในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจนในสภาวะไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 5 และ 7 วัน



ภาพที่ 19 ปริมาณแลคเตสที่ผลิตโดยราที่ข่อยสลายดี Poly R-478 และราอ้างอิง 2 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรจำกัดไนโตรเจนในสภาวะไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 5 และ 7 วัน

4.4 การจำแนกเชื้อรา

จากการศึกษาแหล่งที่พบและลักษณะของเบสิดิโอคาร์พของรา P10, KK5, KY6.3 และ KY8 ซึ่งเป็นราที่คัดเลือกได้ว่าเป็นพวกที่ย่อยสลายดี Poly R-478 ได้ดี รวมทั้งศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยจากการทำ slide culture และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สามารถสรุปได้ว่าราทั้ง 4 รหัสนี้เป็นราในอันดับ Aphyllophorales ของราชชั้น Basidiomycetes โดยพิจารณาจากแหล่งที่พบ ลักษณะของเบสิดิโอคาร์พ และการสร้าง clamp connection ของเส้นใย แต่ไม่พบการสร้างสปอร์หรือโคนเดีย (ไม่ได้แสดงรายละเอียดไว้) จากข้อมูลเหล่านี้ทำให้สรุปได้ว่ารา KK5 อยู่ในวงศ์ Schizophyllaceae สกุล *Scizopora* และรา KY6.3 อยู่ในวงศ์ Stereaceae สกุล *Stereum* สำหรับรา P10 และ KY8 นั้นไม่สามารถจำแนกได้

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะของเบสิดิโอคาร์พของรากกลุ่มย่อยสลายไม้ที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย โดยพิจารณารูปร่างลักษณะของเบสิดิโอคาร์พทั้งด้านบนและด้านล่าง รวมทั้งลักษณะเนื้อสัมผัสและอาศัยวิธีการจัดจำแนกรากย่อยสลายไม้ตาม Fergus (1960) และ Alexopolos *et. al.*, (1996) ทำให้ทราบว่ารากที่นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์เป็นราในชั้น Basidiomycetes อันดับ Aphyllophorales วงศ์ Polyporaceae, Ganodermaceae, Stereaceae, Cantharellaceae และ Hymenochaetaceae สกุลต่างๆ ซึ่งราเหล่านี้เป็นสมาชิกของกลุ่มราขาว (white-rot fungi) และ ราน้ำตาล (brown-rot fungi) นั้นเอง นอกจากนั้นยังพบว่าราที่เพาะแยกได้บางไอโซเลทไม่ใช้รากกลุ่ม Basidiomycetes แต่อาจเป็นรากกลุ่ม Ascomycetes หรือ Fungi Imperfecti เนื่องจากพบว่าสร้างสปอร์จำนวนมากบนอาหาร malt extract agar

เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ของราแต่ละไอโซเลทที่แยกได้มาตรวจวัดกิจกรรมการย่อยสลายลิกนิน โดยวิธีวัดการย่อยสลายสี Poly R-478 ซึ่งเป็นสีโพลีเมอริกชนิดหนึ่งที่มีการย่อยสลายโมเลกุลของมันโดยเชื้อราบางชนิดมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการย่อยสลายลิกนิน (Barbosa *et. al.*, 1996) และการย่อยสลายสารประกอบ PAHs บางชนิด (Field *et. al.*, 1993) โดยเติมสารละลายสีลงไป ในราอายุ 4 วันที่เจริญในอาหารเหลวที่จำกัดไนโตรเจนและกลูโคส ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่าหรือการให้ออกซิเจนและเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 5 วัน (120 ชม.) และวัดการย่อยสลายสีได้จากการลดลงของอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 350 นาโนเมตร (A_{520}/A_{350}) ซึ่งเป็นค่าความยาวคลื่นที่ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงได้มากที่สุดของสี Poly R-478 (Field *et. al.*, 1993) ผลการศึกษาพบว่าที่ย่อยสลายสีได้จำนวน 13 ไอโซเลท ซึ่งสามารถแบ่งราเหล่านี้แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 เป็นราที่ย่อยสลายสีได้ดี โดยทำให้อัตราส่วน A_{520}/A_{350} ลดลงจากเริ่มแรกมากกว่าร้อยละ 70 ภายในเวลา 120 ชม. หลังเติมสี ซึ่งราในกลุ่มนี้มี 4 ไอโซเลท ได้แก่ รรรหัส P10, KK5, KY6.3 และ KY8 โดยทำให้ค่าอัตราส่วนลดลงจากเดิมร้อยละ 84.6, 81.8, 87.6 และ 71.6 ตามลำดับ กลุ่มที่ 2 เป็นราที่ย่อยสลายสีได้ดีปานกลาง โดยทำให้ค่า A_{520}/A_{350} ลดลงจากเดิมน้อยกว่าร้อยละ 60 ภายในเวลา 120 ชม.เท่ากัน ราในกลุ่มนี้มี 4 ไอโซเลท ได้แก่ รหัส CM4, KC7, KY2.2 และ KY25.1 โดยทำให้อัตราส่วนลดลงร้อยละ 50.5, 44.5, 56.1 และ 46.6 ตามลำดับ สำหรับราในกลุ่มที่ 3 นั้นทำให้ A_{520}/A_{350} ลดลงน้อยกว่าร้อยละ 40 ซึ่งมีจำนวน 5 ไอโซเลท ได้

แก่ P4.2, P7, P14, KY14.2 และ RM โดยราเหล่านี้ทำให้อัตราส่วนลดลงจากเมื่อเริ่มเดิมที ร้อยละ 24.5, 35.5, 36.5, 38.4 และ 25.4 ตามลำดับ นอกจากนั้นยังมีข้อสังเกตในรากกลุ่มที่ 3 อีกประการหนึ่งคือราในกลุ่มนี้ทำให้ค่า A_{520}/A_{350} ลดลงจากเดิมทันทีหลังการเติมสีลงไปในการเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างเช่น ในกรณีของ P4.2 ค่าอัตราส่วนที่วัดได้ในชม.ที่ 0 หลังเติมสีจะลดลงเป็น 0.665 เมื่อเทียบกับของชุดควบคุมซึ่งมีค่า 1.299 (ไม่ได้แสดงรายละเอียดไว้) แต่เมื่อบ่มเพาะเชื้อต่อไปค่าอัตราส่วนจะค่อยๆ ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นและในชม.ที่ 120 หลังการเติมสีจะยังมีค่าอัตราส่วนค่อนข้างสูงอยู่ คือเท่ากับ 0.420 หรือคิดเป็นอัตราส่วนที่ลดลงเพียงร้อยละ 24.5 จากเริ่มต้นเดิมที ซึ่งสาเหตุของการลดลงของค่าอัตราส่วนดังกล่าวทันทีหลังการเติมสีในรากกลุ่มที่ 3 นั้น อาจอธิบายได้ว่าเกิดจากการดูดซับสีของเส้นใยราซึ่งสังเกตได้จากการที่สีของเส้นใยราจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดงของสี Poly R-478 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wunch และคณะ (1997) ที่พบการดูดซับสี Poly R-478 โดยเส้นใยของราบางชนิด ในขณะที่รา 2 กลุ่มแรกจะไม่พบการดูดซับสีของเส้นใยหรือพบน้อยมาก

สำหรับราอ้างอิง 2 สายพันธุ์ซึ่งได้แก่ *P. chrysosporium* TISTR และ *T. versicolor* TISTR นั้น พบว่าทำให้ค่า A_{520}/A_{350} ของสี Poly R-478 เปลี่ยนแปลงไปน้อยมากภายในระยะเวลา 120 ชม. (ตารางที่ 2) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถกระตุ้นระบบเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้น้อย เนื่องจากมีรายงานว่า *P. chrysosporium* มีกิจกรรมการย่อยสลายลิกนินสูงเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C (Waldner et al., 1988) และมีการให้ออกซิเจนบริสุทธิ์รวมทั้งมีคาร์บอนและไนโตรเจนปริมาณจำกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Tien and Kirk, 1983) นอกจากนั้นการผลิตเอนไซม์ยังถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นบางชนิด เช่น veratryl alcohol และ Mn (IV) (Gouto and Ratto, 1998) อย่างไรก็ตามในการวิจัยนี้ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องซึ่งต่ำกว่า 37°C นอกจากนั้นยังไม่มีมีการให้ออกซิเจนหรือตัวกระตุ้นแก่เชื้อราแต่อย่างใดในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ สำหรับ *T. versicolor* นั้นแม้ว่าไม่มีรายงานว่าออกซิเจนมีผลต่อการย่อยสลายสี Poly R-478 และการย่อยสลายลิกนินแต่อาจมีปัจจัยด้านอื่นมาเกี่ยวข้อง เช่น สารอาหาร รวมทั้งสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ เป็นต้น

เนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายสี Poly R-478 ของเชื้อรามีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของระบบเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (Field et al., 1993; Barbosa et al., 1996) ดังนั้นจึงได้นำทั้ง 13 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้ข้างต้นรวมทั้งราอ้างอิง 2 สายพันธุ์มาตรวจวัดการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่สำคัญ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และเอนไซม์แลคเคส โดยเลี้ยงเชื้อราในสภาวะเดียวกับที่ใช้ตรวจวัดการย่อยสลายสี Poly R-478 และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกส่วนเส้นใยออกแล้ว โดยวัดในวันที่ 5 และ วันที่ 7

ของการเลี้ยงเชื้อ ผลการศึกษาไม่พบกิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดสในราทั้ง 13 ไอโซเลท รวมทั้งร่าอ้างอิง (บทที่ 4 ข้อ 4.2.1) การที่ตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้นั้นอาจเป็นเพราะเชื้อราที่คัดเลือกได้นี้ไม่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินชนิดนี้ หรืออาจผลิตได้ในร่าบางไอโซเลทแต่สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตในปริมาณที่ตรวจวัดได้ ทั้งนี้เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ต้องการสภาวะการเนื้อมาน้ำที่จำเพาะดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สำหรับแลคเคสนั้นพบกิจกรรมในรา 8 ไอโซเลทและพบในร่าอ้างอิงทั้ง 2 สายพันธุ์ด้วย (ตารางที่ 3) โดยพบว่าร่าทั้ง 8 ไอโซเลทดังกล่าวเป็นร่าที่จัดไว้ในกลุ่มที่ 1 (ย่อยสลายสีได้ดี) และกลุ่มที่ 2 (ย่อยสลายสีได้ปานกลาง) ดังนั้น แลคเคสน่าจะเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งของระบบเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสี Poly R-478 ของเชื้อร่า และเป็นที่ยืนยันว่าการย่อยสลายสี Poly R-478 ของเชื้อร่ามีความสัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์แลคเคส ซึ่งผลที่ได้ดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Barbosa และคณะ (1996) ที่พบกิจกรรมของแลคเคสในร่าที่ย่อยสลายสี Poly R-478 ได้แต่ไม่พบกิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดสหรือแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส อย่างไรก็ตามตรวจไม่พบกิจกรรมของแลคเคสในร่ากลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นพวกร่าที่ดูดกลืนสีไว้ในเส้นใยและทำให้ค่า A_{520}/A_{350} ลดลงเพียงเล็กน้อยภายในเวลา 120 ชม. ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าการย่อยสลายสีอย่างช้าๆ ของร่าในกลุ่มนี้ ไม่น่าเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของแลคเคส แต่อาจเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินชนิดอื่น เช่น แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ซึ่งมีรายงานว่ามียับยั้งในการย่อยสลายสี Poly R-478 ในร่า *P. chrysosporium* (Gold et al., 1988) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวแต่อย่างใด สำหรับร่าอ้างอิงทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นพบกิจกรรมของแลคเคสด้วย แต่เนื่องจากพบว่าการย่อยสลายสี Poly R-478 ของร่าทั้งสองเกิดขึ้นช้ามาก ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าการย่อยสลายสีของร่าทั้ง 2 สายพันธุ์นี้เกิดขึ้นโดยระบบเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่ต่างออกไป

เมื่อพิจารณาปริมาณแลคเคสที่เชื้อร่าแต่ละสายพันธุ์ผลิตขึ้นที่ระยะเวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อพบว่าร่าทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่) เมื่อบ่มเชื้อต่อไปจนถึงวันที่ 7 ส่วนใหญ่ยังพบกิจกรรมของแลคเคส แต่อาจมีปริมาณเพิ่มขึ้นหรือลดลง ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการวัดการย่อยสลายสี ทั้งนี้เนื่องจากพบว่าอัตราส่วน A_{520}/A_{350} ของสีเริ่มลดลงในชม. ที่ 24 หลังการเติมสี ซึ่งเท่ากับวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการผลิต Poly R-478 กับการผลิตแลคเคสได้เนื่องจากไม่ได้วัดการเจริญของร่าแต่ละไอโซเลท นอกจากนั้น ยังไม่ได้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินชนิดอื่นที่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสีด้วย

จากผลการศึกษาทั้งหมดทำให้สามารถคัดเลือกกราดที่ย่อยสลายสี Poly R-478 ได้ดีจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ รหัส P10, KK5, KY6.3 และ KY8 ซึ่งผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ ในการศึกษาระยะต่อไปควรมีการศึกษาในแง่ต่างๆเพิ่มเติม เช่น การตรวจวัดกิจกรรมของระบบเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเพิ่มเติม การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลในการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากกิจกรรมการย่อยสลายลิกนินของราเหล่านี้ต่อไป

Rabon, A.M., Dekker, K.P.R., and St. Hardy, G.E. (1996). Yeastyl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. *Let. Appl. Microbiol.* 23:93-96.

Bellay, J.M. and Leonowicz, A. (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(4):849-854.

Biswell, J.A. (1991). Fungal degradation of lignin. In: *Handbook of Applied Mycology*, vol. 1, Arora, D.K., Rai, B., Mukerji, K.G., and Knudsen, G.R. (editors), Marcel Dekker, Inc., New York, pp.423-450.

Dey, J., Ghosh, T.K. and Bhattacharya, R. (1994). Production of some extracellular enzymes by a ligninolytic fungus-producing laccase, *Polyporus ostreiformis*, and its comparative studies on lignin degradation and dye decoloration. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(11): 4213-4218.

de Bont, J.A., de Jong, E., Prieto Costa, G., and de Bont, J.A.M. (1993a). Screening for laccase-producing fungi for the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11:44-49.

de Bont, J.A., de Jong, E., Prieto Costa, G., Heussels, E., and de Bont, J.A.M. (1993b). Screening for TMB degradation - able for fungi *Hyphoderma* sp. BOS55, a promising new isolate. In: *Biotechnology and Environment Research: A Basis for Proper Protection*, Eijssackers, H.J.P. and Munnix, F. (ed.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp.647-651.

เอกสารอ้างอิง

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. (1996). Phylum Basidiomycota: Order Aphyllophorales. In: *Introductory Mycology*, 4th edition. John Wiley & Sons, Inc., New York. pp.569-573.
- Babosa, A.M., Dekker, R.F.H., and St Hardy, G.E. (1996). Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. *Lett. Appl. Microbiol.* 23:93-96.
- Bollag, J.M. and Leonowicz, A. (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(4):849-854.
- Buswell, J.A. (1991). Fungal degradation of lignin. In: *Handbook of Applied Mycology*, vol 1, Arora, D.K., Rai, B., Mukerji, K.G., and Knudsen, G.R. (editors), Marcel Dekker, Inc., New York. pp.425-480.
- Dey, S., Maiti, T.K. and Bhattacharyya, B.C. (1994). Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Polyporus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(11): 4213-4218.
- Field, J.A., de Jong, E., Feijoo- Costa, G., and de Bont, J.A.M. (1993a). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11:44-49.
- Field, J.A., de Jong, E., Feijoo- Costa, G., Heessels, E., and de Bont, J.A.M. (1993b). Screening for PAH degrading white-rot fungi: *Bjerkandera* sp. BOS55, a promising new isolate. In: *Integrated Soil and Sediment Research: A Basis for Proper Protection*. Eijsackers, H.J.P. and Hamers, T.(eds.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp.647-651.

- Fergus, C.L. (1960). *Illustrated genera of wood decay fungi*. Burgess Publishing Co., Minnesota, USA. 132pp.
- Gigi, O., Marbach, I., Mayer, A.M. (1981). Properties of gallic acid-induced extracellular laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytochem.* 20:1211-1213.
- Glenn, J.K. (1983). An extracellular H_2O_2 -requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by white-rot basidiomycete *Phanerocheate chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:1077-1083.
- Glenn, J.K. and Gold, M.H. (1983). Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerocheate chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(6):1741-1747.
- Gold, M.H., Glenn, J.K., and Alic, M. (1988). Use of polymeric dyes in the lignin biodegradation assays. *Methods Enzymol.* 161:74-78.
- Heinzkill, M. and Messner, K. (1997). The ligninolytic system of fungi. In: *Fungal Biotechnology*. Anke, T. (ed.). Chapman & Hall, Weinheim. pp.213-227.
- Kantelinen, A., Hatakka, A., Viikari, L. (1989). Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiata*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31:234-239.
- Kersten, P.J., Kirk, T.K. (1987). Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H_2O_2 production by *Phanerocheate chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169:2195-2201.
- Kirk, T.K., Farrell, R.L. (1987). Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:465-505.
- Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J. et al. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerocheate chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117:277-285.

- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. *et al.* (1984). Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerocheate chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169(2):247-250.
- Michel, F.C. Jr., Dass, B., Grulke, E.A. *et al.* (1991). Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerocheate chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(8):2368-2373.
- Odier, E. and Artaud, I. (1992). Degradation of lignin. In: *Microbial Degradation of Natural Products*. Winkelmann, G. (ed.). VCH Publishers. Inc., NY. Pp.161-191.
- Ollika, P., Alhonmaki, K., Leppanen, V.M. *et al.* (1993). Decolorization of azo, trimethyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerocheate chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(12):4010-4016.
- Orth, A.B. and Tien, M. (1995). Biotechnology of lignin degradation. In: *The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental System for Basic and Applied Research*. Esser, K. and Lemke, P.A. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 287-302.
- Paszczynski, A., Crawford, R.L. and Huynh, V.B. (1988). Manganese peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods Enzymol.* 161:264-270.
- Paszczynski, A., Pasti-Grigsby M.B., Goszczynski, S. *et al.* (1992). Minerization of sulfonated azo-dyes and sulfanilic acid by *Phanerocheate chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(11):3598-3604.
- Rothschild, N., Hadar, Y., Dosoretz, C. (1995). Ligninolytic system formation by *Phanerocheate chrysosporium* in air. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5):1833-1838.
- Spadaro, J.T., Gold, M.H., Renganathan, V. (1992). Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerocheate chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(8):2397-2401.

- Thurston, F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.* 140:19-26.
- Tien, M., Kirk, T.K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* and burds. *Science*. 221:661-663.
- Tuor, U., Winterhalter, K., Fiechter, A. (1995). Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* 41:1-17.
- Waldner, R., Leisola, M.S.A., and Fiechter, A. (1988). Comparison of ligninolytic abilities of selected white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:400-407.
- Wunch, K.G., Feibelman, T. and Bennett, J.W. (1997). Screening for fungi capable of removing benzo[a]pyrene in culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:620-624.
- Zheng, Z., Levin, R.E., Pinkham, J.L., and Shetty, K. (1999). Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. *Proc. Biochem.* 34:31-37.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีดังต่อไปนี้

Malt extract agar (Difco)

Maltose	12.75	กรัม
Dextrin	2.75	กรัม
Glycerol	2.35	กรัม
Bacto peptone	0.78	กรัม
Bacto agar	15.0	กรัม

PH 4.7 ± 0.2

Malt extract agar ที่มี streptomycin

เติมสารละลาย streptomycin sulphate (กำจัดเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรองขนาดช่อง 0.45 ไมครอน) 50 มิลลิกรัมต่อมล. 1 มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract agar หลอมเหลวอุณหภูมิ 45-50⁰ซ ปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่จานเพาะเชื้อ

Nitrogen-limited medium (ดัดแปลงจาก Gold *et. al.*, 1988)

Glucose	10.10	กรัม
Diammonium tartrate	0.221	กรัม
Dimethylsuccinate	2.92	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.0	กรัม
Magnesium sulphate heptahydrate	1.45	กรัม
Calcium chloride	0.132	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 4.5

ภาคผนวก ข

Slide culture technique

มีขั้นตอนการทำดังนี้

- (1) เพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร malt extract agar จนไม่ซีดเลียมเจริญเกือบเต็มจาน หรือจนสร้างสปอร์
- (2) เตรียมจานเพาะเชื้อเปล่า ภายในวางแท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม 1 อัน ซึ่งมีแผ่นสไลด์ วางอยู่ด้านบน นำไปฆ่าเชื้อ
- (3) ใช้ใบมีดหรือเข็มเขี่ยเชื้อขนาดใหญ่ปลายงอตัดอาหารวุ้น malt extract agar เป็น รูปสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 x 0.5 ซม. นำมาวางบนแผ่นแก้วในจาน
- (4) เขี่ยสปอร์หรือเส้นใยของเชื้อราที่ต้องการศึกษา นำมาแตะลงบนด้านทั้ง 4 ของชิ้น วุ้น ปิดด้านบนของชิ้นวุ้นด้วยกระจกปิดสไลด์ปิดคเชื้อ
- (5) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนเห็นเส้นใย
- (6) นำกระจกปิดสไลด์และสไลด์ที่มีเชื้อราเจริญไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์