บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Ganoderma lucidum* บนอาหารแข็งสูตร PDA ที่เติม gallic acid 1 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Ganoderma lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์บนอาหารแข็งสูตร PDA ที่เติม gallic acid 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า เชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถเจริญได้บนอาหารดังกล่าว และแสดงผลของการมีเอนไซม์ในกลุ่มแลคเคส โดยการเกิดสีน้ำตาลแดงบนอาหารที่เติม gallic acid 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งการใช้ gallic acid เป็นสารตั้งต้น เพื่อตรวจสอบการผลิตแลคเคสจากเชื้อรานั้นเป็นวิธีที่ใช้มานานแล้ว ตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1928 โดย Bavendamm แต่อย่างไรก็ตาม สารฟีนอลิกชนิดนี้จะค่อนข้างมีความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา ทำให้เมื่อนำเชื้อรามาเลี้ยงและมีการเติม gallic acid ลงไป จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าเชื้อราที่เจริญในอาหารที่ไม่มีการเติม gallic acid ดังนั้นในการใช้สารฟีนอลิกเพื่อตรวจสอบการผลิตแลคเคสจากเชื้อรานั้น จะต้องคำนึงถึงความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วย ทำให้มีผู้ศึกษาเพิ่ม โดยการใช้สารฟีนอลิกอื่น ๆ เพื่อดูการทำงานของแลคเคส เช่น การใช้ syringaldazin ซึ่งให้สีม่วงแดง alpha-napthal ซึ่งให้สีน้ำเงิน หรือ ม่วง หรืออนุพันธ์ของสารในกลุ่มฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ เช่น rhemazol-brilliant blur R (RBBR) (Nishida et al., 1989) benzidine *o*-anisidine pyrogallol (Rahouti et al., 1985) ซึ่งการเกิดสีนี้เป็นผลมาจากเอนไซม์ในกลุ่มฟีนอลออกซิเดส เช่น แลคเคสจะไปเปลี่ยนโครงสร้างของสารตั้งต้น ในกลุ่มของ dopa quinone ที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตให้กลายไปเป็นเม็ดสี (Griffith, 1994) syringaldazin เป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจสอบการผลิตแลคเคสของเชื้อรา เช่น การใช้ syringaldazin 0.1 เปอร์เซนต์ หยดบนเส้นใยเชื้อราโดยตรง เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์แลคเคส ซึ่งถ้าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ จะให้สีชมพูแดงบนเส้นใย ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ยังพบอีกว่า สารชนิดนี้มีความเป็นพิษต่ำ จึงน่าที่จะเหมาะสำหรับนำไปใช้เพื่อการตรวจสอบการผลิตแลคเคสมากกว่าการใช้ gallic acid (Harkin and Obst, 1973; Mahauti et al., 1995) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบโดยใช้สารฟีนอลิก เช่น สาร gallic acid นี้ บอกได้เพียงคร่าว ๆ ว่า เชื้อรามีการผลิตแลคเคสหรือไม่ และไม่สามารถบอกได้ถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้อย่างละเอียดเท่ากับการวัดแอคติวิตี (กมลชัย 2546)

5.2 การศึกษาการเจริญของ *G.lucidum* ที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็งชนิด PDA ที่เติม anthracene 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ DDT 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษาการเจริญของ *G.lucidum* ที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็งชนิด PDA ที่เติม anthracene 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ DDT 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อราทำโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา พบว่าเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์มีการเจริญเติบโตบนอาหารที่เติมที่ anthracene หรือ DDT ได้แต่จะแตกต่างจากอาหารชุดควบคุมที่ไม่เติม anthracene หรือ DDT เนื่องจากสารประกอบ PAHs นี้เป็นสารจำพวกอะโรมาติกที่มีความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา สอดคล้องกับการทดลองของ Vyas และคณะ (1994) ซึ่งมีการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 (ATCC 34351) *Coriolopsis polyzona* (CCBAS 740) *Trametes versicolor* (CCBAS 614) และเชื้อรา *Pleurotus ostreatus* บนอาหารที่มีการเติม anthracene พบว่า เชื้อราดังกล่าวสามารถเจริญเติบโต และย่อยสลายสารชนิดนี้ได้ แต่จะมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าบนอาหารที่ไม่ได้เติม anthracene สอดคล้องกับการทดลองของ Corona-Cruz และคณะ (1999) ซึ่งศึกษาการเจริญของ *Phanerochaete chrysosporium* ในอาหารที่เติม DDT นอกจากการใช้ anthracene และ DDT ในการตรวจสอบหาเชื้อราที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้นั้น ยังมีสารประกอบอีกหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ได้ เช่น สี Poly R-478 ซึ่งเป็นสีที่มีโครงสร้างเป็นสารในกลุ่มอะโรมาติก (Andersson and Henrysson, 1996) สารผสม PAHs หลาย ๆ ชนิด (Braun-Lullemann et al., 1999)

5.3 การศึกษาการผลิตแลคเคสของเชื้อ *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารสูตร Production

การศึกษาการผลิตแลคเคสของเชื้อ *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารสูตร Production ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 พบว่าเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM มีการผลิตแลคเคสมากที่สุดในวันที่ 4 และวันที่ 5 เท่ากับ 0.0389 และ 0.0369 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นช่วงที่เชื้อราเข้าสู่ระยะ stationary phase และมีการผลิตแลคเคส ซึ่งเป็น secondary metabolize emzyme (Whitaker et al., 2003) สอดคล้องกับการทดลองของ Steffen และคณะ (2002) ซึ่งศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราหลาย ๆ ชนิดที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มฟีนอลออกซิเดส พบว่า มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ในช่วง stationary phase ในวันที่ 3 ของการผลิตเอนไซม์ โดยในช่วงที่มีการผลิตแลคเคสนี้จะแตกต่างไปตามชนิดของเชื้อรา และอาหารที่ใช้ เช่น Ko และคณะ (2001) ทำการผลิตแลคเคสจากเชื้อรา *Ganoderma lucidum* พบว่ามีการผลิตแลคเคสดีที่สุดในวันที่ 2 ในขณะที่ Rodriguez และคณะ (1999) ผลิตแลคเคสจาก *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (ATCC 24725) พบว่าผลิตแลคเคสได้ดีในวันที่ 8

5.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ Cu^{2+} ต่อการผลิตแลคเคสของเชื้อ *G.lucidum*

การศึกษาผลของการเติม Cu^{2+} ต่อการผลิตแลคเคส พบว่าอาหารสูตร Production มีการผลิตแลคเคสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเข้มข้นของ Cu^{2+} 0.4 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 4 และวันที่ 5 ส่วนที่ความเข้มข้นของ Cu^{2+} ที่ 0.1 0.2 และ0.3 มิลลิโมลาร์ มีการผลิตแลคเคสเพิ่มขึ้นจากอาหารสูตร Production ที่ไม่มีการเติม Cu^{2+} แต่การผลิตแลคเคสน้อยกว่าที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ อาจเป็นผลเนื่องมาจากมีการศึกษาพบว่า Cu^{2+} เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโครงสร้างของแลคเคส (Whitaker et al., 2003) และมีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกในกระบวนการ transcription ของยีนที่ผลิตแลคเคส นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการป้องกันผลจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในการทำงานของเอนไซม์ แต่ถ้าใส่มากเกินไป เช่น มากกว่า 2 มิลลิโมลาร์ อาจจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Galhaup and Haltrich, 2001) นอกจาก Cu^{2+} นี้ยังมีสารอีกหลายชนิด เช่น gallic acid catechol guaiacol tannic acid และ Ag^{+} Cd^{2+} Hg^{2+} Mn^{2+} Zn^{2+} สามารถกระตุ้นให้เชื้อรามีการเจริญเติบโตและผลิตแลคเคสดีขึ้นได้

5.5 การศึกษาผลของการเติมตัวช่วยยึดเกาะต่อการผลิตแลคเคส

การศึกษาผลของตัวช่วยยึดเกาะ พบว่า การเติมตัวช่วยยึดเกาะที่เป็นฟองน้ำจำนวน 50 ชิ้น ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในอาหารสูตร Production ที่มีการเติม Cu^{2+} ความเข้มข้น 0.4 มิลลิ-โมลาร์ พบว่า มีการผลิตแลคเคสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ คือ มีการผลิตแลคเคสที่ 0.05461 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือ ที่ 0.00507 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่เติมตัวช่วยยึดเกาะ สอดคล้องกับการทดลองของกมลชัย ชะเอม (2546) นอกจากการใช้ฟองน้ำแล้วยังมีตัวช่วยยึดเกาะอีกหลายชนิด ซึ่งมีผู้นำมาศึกษา และพบว่ามีผลในการเพิ่มการผลิตแลคเคสจากเชื้อรา เช่น nylon, polyurethane sponge เป็นต้น (Rodriguez et al., 1999)

5.6 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนด้วยการทำอัลตราฟิลเตชัน และการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

การผลิตแลคเคสและทำให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน ได้ทำการปั่นเหวี่ยงเก็บสารละลายส่วนใสโดยใช้ความเร็วรอบของการปั่น 6,000 รอบต่อนาที จากนั้นจึงนำมากรองผ่านเครื่องอัลตราฟิลเตชัน ซึ่งเลือกใช้แผ่นกรองที่ทำจาก polycarbonate มี MW cut off เท่ากับ 10 กิโลดาลตัน เนื่องจากโมเลกุลของแลคเคสมีขนาด 60 – 80 กิโลดาลตัน (Whitaker et al., 2003) ต่างจากการทดลองของ Jill และคณะ (1996) ซึ่งผลิตแลคเคสจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดย

กรองผ่านตัวกรองที่มีขนาดของ MW cut off เท่ากับ 100 กิโลดาลตัน จากการทดลองนี้ พบว่า สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ได้ 2.675 เท่า มีผลผลิตเอนไซม์ 63.137 เปอร์เซนต์ ซึ่งอาจมีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ไปบางส่วน เนื่องจากการกรองอาจทำให้เอนไซม์บางส่วนหลุดไป หรือ การใช้ก๊าซไนโตรเจน เพื่อช่วยในการเพิ่มความดันในการกรองเอนไซม์ อาจทำให้เกิดการออกซิไดซ์กับเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์บางส่วนสูญเสียสภาพได้

ในการศึกษาการทำให้แลคเคสบริสุทธิ์ด้วยการตกตะตอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตนั้น สามารถทำได้หลายวิธี เช่น ใช้เอทธานอล หรือ แอมโมเนียมซัลเฟต (Whitaker et al., 2003) สำหรับการทดลองนี้ เมื่อเอนไซม์ที่ผ่านการทำอัลตราฟิลเตชันมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเติมความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตครั้งละ 10 เปอร์เซนต์ พบว่า เอนไซม์ตกตะกอนได้ดีในช่วงการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 50 – 80 เปอร์เซนต์กรัมต่อปริมาตร พบว่า สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ได้ 12.185 เท่า มีผลผลิตเอนไซม์ 9.514 เปอร์เซนต์ คล้ายกับการทดลองของ Pickard และคณะ (1999) ซึ่งทำการผลิตแลคเคสจาก *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 และทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 0 – 80 เปอร์เซนต์กรัมต่อปริมาตร แต่อย่างไรก็ตามการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในขั้นตอนนี้ อาจทำให้เอนไซม์บางส่วนหาย หรือ เสียสภาพไปในระหว่างการตกตะกอน การไดอะไลซีส และการปนเปื้อนของโลหะหนัก (เสาวนีย์ อาภาวสิน, 2547)

5.7 การทำให้บริสุทธิ์ด้วยแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการใช้คอลัมน์ HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow ซึ่งเป็นแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี ที่มีความเป็นรูพรุนสูง หลักการแยกจะอาศัยความแตกต่างของประจุโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งสารตัวกลางที่ใช้แยกนี้มีประจุเป็นบวก เมื่อผ่านเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า มีโปรตีนออกมา 1 พีค แสดงว่าโปรตีนนี้ไม่จับกับคอลัมน์ จากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0 – 1 โมลาร์) เข้าไป พบว่า จะมีพีคโปรตีนหลุดมาอีก 3 พีค คือ พีคที่ 2 3 และ 4 เมื่อนำโปรตีนทั้ง 4 พีคนี้มาวัดแอคติวิตีของแลคเคส พบว่า มีเพียงพีคที่ 2 เท่านั้น ที่มีค่าแอคติวิตีของแลคเคส แต่บางการทดลอง เช่น Yaver และคณะ (1996) พบว่า แลคเคสจากเชื้อราบางชนิด เช่น *Trametes villosa* เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีไอออนเอกซ์เชนจ์ โครมาโทรกราฟี ซึ่งมีตัวดูดซับเป็น Q-Sepharose (Pharmacia) สามารถแยกแลคเคสออกมาได้ถึง 4 พีค ซึ่งแต่ละพีคจะมีค่าแอคติวิตีที่แตกต่างกัน สำหรับการทดลองนี้ สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ได้ 20.574 เท่า มีผลผลิตเอนไซม์ 2.787 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ อย่างไรก็

ตาม อาจนำเอนไซม์ไปผ่านขั้นตอนโครมาโทกราฟีเพิ่มขึ้นอีก เช่น ผ่านคอลัมน์ชนิดเดิม หรือนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยวิธี size exclusion chromatography เป็นต้น

5.8 ค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

เนื่องจากแลคเคสผลิตได้จากเชื้อราหลายชนิด และมีได้หลาย Isoforms ดังนั้นภาวะค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานจะแตกต่างกันไป แต่มักอยู่ในช่วงที่เป็นกรดมากกว่าเป็นด่าง นอกจากนี้ การใช้สารตั้งต้นและสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน เพื่อตรวจสอบการทำงานของแลคเคสจะทำให้ค่าที่ได้แตกต่างกันไปด้วย (Sariaslani, 1989) จากผลการทดลองพบว่า แลคเคสจาก *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM สามารถทำงานได้ดีที่ภาวะความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 เมื่อใช้โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ แต่ถ้าความเป็นด่างเพิ่มขึ้นมากจะยับยั้งการทำงานของแลคเคส ซึ่งมีผลการทดลองสอดคล้องกับ Ko และคณะ (2001) ซึ่งศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคสจาก *Ganoderma lucidum* และพบว่ามีภาวะที่เหมาะสมที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 เมื่อใช้ในขณะที่อะซิเตตบัฟเฟอร์ และ *o*-tolidine เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา ในขณะที่ Jill และคณะ (1996) พบว่า แลคเคสจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6 และ 7 เมื่อใช้ syringaldazine เป็นสารตั้งต้น

เมื่อพิจารณาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ จากการทดลองพบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคสเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ต่างจากการทดลองของ Ko และคณะ (2001) ที่พบว่าแลคเคสทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 20 – 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Whitaker และคณะ (2003) ว่าแลคเคสจะทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิที่หลากหลาย โดยขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ คือ อาจมีค่าตั้งแต่ 25 – 80 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อราส่วนมากจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคสค่อนข้างสูง (ที่อุณหภูมิมากกว่า 50 องศาเซลเซียส)

5.9 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทางชีวภาพของแลคเคสด้วยเครื่อง HPLC

จากการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพโดยการบ่มแลคเคสร่วมกับสารประกอบ PAHs (16 U.S. EPA) เป็นระยะเวลา 3 วันภายใต้สภาวะที่กำหนด พบว่า แลคเคสมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ให้ลดลงได้ภายใน 3 วัน โดยการย่อยสลายนี้จะเห็นได้จากผลของโครมาโทแกรมภายในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับชุดของแลคเคส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไอออนเอกซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี มีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs แตกต่างกันไปในแต่ละชนิด

มี PAH บางชนิดที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ เช่น dibenzo[*a,h*]anthracene ย่อยได้เพียง 7.88 เปอร์เซนต์โดยรวมแล้วสามารถย่อยสลายได้ถึง 62.34 เปอร์เซนต์ ซึ่งสอดคล้องกับ Pickard และคณะ(1999) ซึ่งบ่มแลคเคสที่ได้จากเชื้อ coriolopsis gallica สายพันธุ์ UAMH 8260 และสายพันธุ์อื่น ๆ อีก 9 สายพันธุ์ ร่วมกับสารประกอบ PAHs 3 ชนิดได้แก่ Anthracene Pyrene และ Phenanthrene เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าการย่อยสลายสารประกอบ PAHs แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อรา