ชื่อแผนงานวิจัย ศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อโครงการวิจัย การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

กิจกรรมที่ 1 การศึกษา พัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และการผลิตเอนไซม์เพื่อผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวล

การทดลองที่ 1.1 การคัดเลือกและศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสจากจุลินทรีย์

คณะผู้ดำเนินงานวิจัย

นางสาวภรณี สว่างศรี	นักวิชาการโรคพืชชำนาญการ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางบุญเรือนรัตน์รัตน์ เรืองวิเศษ	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

ligninolytic enzymes ประกอบด้วยเอนไซม์ Laccase และ peroxidase (lignin peroxidases, manganese peroxidases, manganese-independent peroxidases) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติในการย่อยสลายลิกนิน ซึ่งเป็นส่วนของพืชที่ย่อยสลายและกำจัดได้ยากที่สุด การกำจัดลิกนินที่ใช้กันทั่วไปมักจะอาศัยปฏิกิริยาทางกายภาพ หรือ ทางเคมี (กรด, ด่าง) ทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีที่เป็นอันตราย ดังนั้นการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (Ligninolytic enzymes) จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาและเพิ่มมูลค่าวัสดุจากชีวมวลเซลลูโลสให้มีประสิทธิภาพสูงสุด งานวิจัยนี้ได้ดำเนินคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ พบเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตและผลิต ligninolytic enzymes บนอาหารแข็งทดสอบที่มีสาร Azure-B ABTS และ Guaiacol จำนวนทั้งสิ้น 20 ไอโซเลท ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ดี เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน พบว่าเชื้อไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด 3 ไอโซเลท คือ Rigido G1 และหลินจือ โดยให้ค่าการวิเคราะห์ reducing sugar พบว่า เชื้อไอโซเลท G1 ให้ค่า reducing sugar สูงที่สุด เท่ากับ 11.2 mg/ml รองลงมาคือ ไอโซเลท Rigido (1.59 mg/ml) และ หลินจือ (1.49 mg/ml) ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) พบว่า ไอโซเลท Rigido ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 4.51 mg/ml รองลงมาคือ ไอโซเลท G1 (3.06 mg/ml) และหลินจือ (2.6 mg/ml) ตามลำดับ เมื่อทำการจำแนกชนิดของเชื้อไอโซเลท G1 หลินจือ และ Rigido โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ internal transcribed spacer โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบส เมื่อนำลำดับเบสมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า คล้ายคลึงกับเชื้อรา 2 ชนิดคือ *Ganoderma lucidum* และ *Rigidoporus microporus* ที่ความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์

รหัสการทดลอง 03-07-56-01-01-00-01-56

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร รังสิต ธัญบุรี ปทุมธานี 12110 ประเทศไทย

การทดสอบผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเบื้องต้น โดยไอโซเลท Rigido พบว่าเมื่อกระตุ้นให้เชื้อผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวที่มีลิกนิน 1% เป็นองค์ประกอบ นาน 7 วัน แล้วนำส่วนของเอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzymes) ที่ได้ไปกรองผ่าน membrane ขนาด 10K และ 30K ด้วยเครื่อง Tangential Flow Filtration (TFF) จากนั้นทำให้เป็นผงแห้งโดยวิธี freeze drying method ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ laccase โดยวิธี Bioassay plate technique พบว่ามีสภาวะที่เหมาะสมอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40-50^{0}C และเมื่อนำไปวิเคราะห์แยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี Native Page โดยย้อมเจลด้วยสาร ABTS พบว่าสามารถตรวจพบโปรตีน (เอนไซม์ laccase) 2 ขนาด ซึ่งมีขนาดประมาณ 40 และ 60 kDa เมื่อเทียบกับโปรตีนขนาดมาตรฐาน

คำนำ

ปัจจุบันความตระหนักถึงความยั่งยืนด้านทรัพยากรอาหาร พลังงานและสิ่งแวดล้อม มีมากขึ้นอันเนื่องมาจากสภาวการณ์ของโลกที่เปลี่ยนแปลงไป ทุกประเทศทั่วโลกเริ่มให้ความสนใจกับการใช้ประโยชน์จากชีวมวลจำพวกลิกโนเซลลูโลส เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งจากโรงเรือน ภาคการเกษตรและอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ เศษวัสดุจาการเกษตร (ซังข้าวโพด, กากชานอ้อย) วัสดุเหลือทิ้งจากไม้ (ขี้เลื่อยจากทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง) ขยะจากกระบวนการแปรรูปอาหาร และเศษกระดาษ ฯลฯ ซึ่งชีวมวลเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตพลังงานเอทานอล เซลลูโลสบริสุทธ์ และเยื่อกระดาษ เป็นต้น นับเป็นการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ได้อย่างคุ้มค่าสูงสุด

ลิกนินมีอยู่มากในพืชรองลงมาจากเซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ในไม้เนื้อแข็ง มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 18-25% ไม้เนื้ออ่อน มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 25-35% ของเนื้อเยื่อแห้ง ส่วนพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 10-30% ของเนื้อเยื่อแห้ง ลิกนิน เป็นองค์ประกอบของชีวมวลลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นส่วนที่ย่อยสลายและกำจัดได้ยากที่สุด เนื่องจากมีองค์ประกอบของโครงสร้างที่เป็น phenyl propane เชื่อมต่อกันด้วยพันธะหลายชนิดสานต่อกันอย่างไม่มีระเบียบทำให้มีโครงสร้างที่ซับซ้อน (irregular noncrystaline structure) แทรกอยู่ที่ผนังเซลล์ของพืช ทำให้ถูกย่อยสลายได้ยาก ทั้งยังเป็นสารประกอบ Aromatic มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ ไม่ละลายในกรด แต่สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นด่างความเข้มข้นสูง และที่อุณหภูมิสูง ประมาณ 130-280 องศาเซลเซียส และอาจถูกออกซิไดซ์ได้ในบรรยากาศ จึงถูกทำลายหรือย่อยสลายได้ค่อนข้างยาก ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากชีวมวลลิกโนเซลลูโลสจึงจำเป็นต้องมีขั้นตอน pretreatment เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้ย่อยง่ายขึ้นและเพื่อกำจัดส่วนของลิกนินออก ส่งผลให้กระบวนการผลิตมีความยุ่งยากและซับซ้อนมากยิ่งขึ้น เทคโนโลยีการกำจัดลิกนินที่ใช้กันทั่วไปมักจะอาศัยปฏิกิริยาทางกายภาพ หรือ ทางเคมี (กรด, ด่าง) ซึ่งมักจะปลดปล่อยสารตกค้างในปนเปื้อนมาในสภาพแวดล้อม ซึ่งต้องถูกจำกัดให้อยู่ในค่ามาตรฐาน เนื่องจากสารดังกล่าวเป็นพิษต่อคน สัตว์และพืช อีกทั้งยังย่อยสลายได้ยาก การย่อยสลายลิกนินด้วยวิธีทางเคมีมักทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีที่เป็นอันตราย ทั้งยังกำจัดลิกนินออกได้เพียงบางส่วนเท่านั้น หลายประเทศจึงพยายามใช้วิธีทางชีวภาพมากขึ้น กล่าวคือการใช้จุลินทรีย์หรือผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ (เอนไซม์) ซึ่งข้อดีของการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายเมื่อเทียบกับวิธีทางกายภาพและเคมี นั่นคือ ปฏิกิริยาไม่รุนแรงเหมือนปฏิกิริยาเคมี ส่งผล

ให้สิ่งแวดล้อมยั่งยืน โดยเฉพาะการเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์มีความจำเพาะกับสับสเตรทมากกว่า จึงทำให้การลงทุนถูกกว่าวิธีทางกายภาพ เอนไซม์ทำงานในสภาวะแวดล้อมที่ไม่รุนแรงและไม่มีการสูญเสียสับสเตรทในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการย่อยสลายลิกนินทางเคมีนั้นทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขอนามัยและสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์บางชนิดทั้งแบคทีเรียและราสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้ เช่น เชื้อรากลุ่ม Basidiomyces, Ascomyces เชื้อรามีประสิทธิภาพในการสลายลิกนินได้ดีกว่าแบคทีเรียซึ่งไม่สามารถสลายลิกนินได้สมบูรณ์

การย่อยสลายลิกนินทางชีวภาพ อาศัยเอนไซม์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในช่วงเมทาบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolism) จากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ Lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) และ Laccase (Lac) โดยเฉพาะเอนไซม์แลคเคส จัดเป็นเอ็นไซม์ในกลุ่ม extracellular glycoprotein สามารถย่อยสลายสารทั้งพวก phenolic และ non-phenolic compounds เช่น guaiacol, 2,6-dimethoxyphenol, p-phenylene diamine, syringaldizine (N,N'-bis(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzy–lidenehydrazine)) และ ABTS (2,2'-azinbis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) เอ็นไซม์นี้มีขนาดประมาณ 60-80 kDa ประกอบด้วย 520-550 กรดอะมิโน มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ 15-20% และมี copper 2-4 อะตอมต่อโมเลกุลของเอ็นไซม์ มีรายงานการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน laccase ในราชนิดต่างๆ ได้แก่ *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* (Ascomycete), *Coriolus birsutus*, *Plebia radiata Agaricus bisporus* (Basidiomycetes) และมีรายงานว่าเชื้อรา white-rot fungi ส่วนมากสามารถผลิต laccase และหลั่งออกมานอกเซลล์ เอ็นไซม์ laccase สามารถย่อยสลาย lignin model compounds และ phenolic hydroxyl ได้เป็น phenoxy radicals โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็คตรอน กลุ่มราที่สามารถผลิต laccase ได้ดี คือ *Trametes* (*Polyporus*, *Coriolus*) *versicolor* (Bollag and Leonowicz, 1984) *Pleurotus ostreatus* (Sannia *et al*., 1986) ส่วน *Phanerochaete chrysosporium* เป็นกลุ่มของ white-rot fungi ที่ไม่สามารถผลิต laccase ได้

การใช้ประโยชน์จาก ligninolytic enzyme ในด้านต่างๆ

- Delignification เป็นการย่อยสลายลิกนินในเนื้อเยื่อไม้ซึ่งมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ Kirk *et al.* (1980) รายงานว่า การผลิตเอ็นไซม์จากเชื้อรา white – rot เพื่อย่อยสลายลิกนิน พบว่าช่วยประหยัดพลังงานและสารเคมี ในระบบการผลิตเยื่อโดยชีววิธี นอกจากนี้ได้มีการศึกษาระบบการย่อยลิกนินโดยเอ็นไซม์ laccase, MnP และ LiP ใน white-rot fungi ชนิดต่างๆ พบว่าเอ็นไซม์ที่ได้มีความสามารถในการย่อยลิกโนเซลลูโลสได้เหมือนกัน แต่มีความแตกต่างด้าน molecular weight, optimum pH และคุณสมบัติอื่นๆ โดยเอ็นไซม์ laccase จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสได้สูงเมื่อมีสารพวก phenolic เป็นตัวกระตุ้น (Mai *et al*., 2000) สาร phenolic นี้เป็นพิษต่อราแต่ไม่เป็นอันตรายต่อยีสต์ Larsson *et al.* (2001) ได้ทำการตัดต่อยีน laccase จาก *Trametes* เข้าสู่ระบบของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอ็นไซม์ให้สูงขึ้น พบว่าสามารถเกิดการย่อยสลายเนื้อไม้ได้ดี และทนต่อสารพวก phenolic ได้

- Bioremediation เอ็นไซม์จากจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารที่ย่อยยากที่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้ เช่น กระบวนการกำจัดสีในน้ำทิ้งโดยเชื้อราสร้างเอนไซม์นอกเซลล์กลุ่มลิกนิโนไลติก (Ligninolitic

enzyme) สำหรับสีของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมมีทั้งสีแท้และสีปรากฏ โดยสีแท้มักเป็นน้ำเสียจากอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มและอบไม้ยางพารา ส่วนสีปรากฏเกิดจากสารแขวนลอยในน้ำจากสีของน้ำเสียเองเนื่องจากการปนเปื้อนมาแต่แรกในน้ำเสีย เช่น สีของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมทอผ้า ฟอกย้อม เยื่อกระดาษ ซึ่งสีที่เกิดขึ้นเป็นสีปรากฏจากสารเคมี ในกระบวนการผลิต รวมทั้งลิกนินและแทนนิน (วราภรณ์ และคณะ, 2550) โดย Walker and Weatherley (2000) ศึกษาการดูดซับสีกลุ่มแอนทราควิโนนโดยเชื้อ *Bacillus gordonae, B. benzeovorans* และ *Ps. putida* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดสีเท่ากับร้อยละ 13, 19 และ 18 ตามลำดับ และการย่อยสลายสีรีแอคทีฟ Red 2 พบว่า สามารถกำจัดได้ดีโดยกระบวนการเอสบีอาร์แบบแอนแอโรบิก-แอโรบิก แบคทีเรียที่มีความสำคัญในการกำจัดสี 3 สกุล คือ *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. และ *Klebsiella* sp. (ฒาลิศา, 2542)

Debendra and Gupta (2005) รายงานการใช้เชื้อรา *Aspergillus fumigates* ผลิตสารแลคเคส เปอร์แมงกานิส และไซลาเนส ซึ่งมีประสิทธิภาพกำจัดสีโดยย่อยสลายลิกนินในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0-9.0

วีรานุช และคณะ (2551) ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Burkholderia glumae* ในการย่อยสลายสีรีแอกทีฟในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่า กระบวนการบำบัดแบบไม่เติมอากาศให้ผลเร่งการกำจัดสีได้ดีกว่าการบำบัดแบบเติมอากาศ โดยสามารถขจัดสีในน้ำทิ้งได้ร้อยละ 76 ในเวลา 7 วัน

ปัทมา และ ภคมน (2551) ศึกษาการใช้ราในการกำจัดสีย้อมผ้า โดยทดลองนำราชนิด *Lentinus polychrous* Lev. ซึ่งอยู่ในรูปของเส้นใยแห้งที่ได้จากการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์ (fluidized bed drying) กำจัดสีจากโรงงานฟอกย้อม พบว่าสามารถกำจัดสีได้รวมทั้งการทำแห้งเป็นวิธีง่ายและสะดวก อีกทั้งสามารถประหยัดพลังงานทำให้มีต้นทุนต่ำ จิรเวท และคณะ (2552) และ อรชีรา และคณะ (2552) ใช้เชื้อรา *Datronia* sp. KAPI0039 ในการผลิตเอนไซม์ แลคเคส และ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ซึ่งทำให้สีรีแอคทิฟของน้ำทิ้งจากโรงงานฟอกย้อมสิ่งทอลดลง

- Ethanol production โดยใช้ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้ทนต่อสารพวก phenolic และสามารถสลายลิกโนเซลลูโลส โดยถ่ายยีน laccase จากรากลุ่ม white-rot คือ *Trametes versicolor* เข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยต่อยีนภายใต้ PGK1 promoter เป็นการปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลส (Larsson *et al*., 2001)

อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกในด้านอื่นๆ อาทิเช่น การย่อยสลายของสารกำจัดแมลงศัตรูพืชพวก Isoxaflutole ซึ่งตกค้างในดินและพืช ในรูปแบบของ diketonitrile โดยเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* และ *T. versicolor* ได้เป็น benzoic acid มีการแยกเอนไซม์ laccase บริสุทธิ์จาก *Coriolopsis gallica* เพื่อใช้ในการย่อยสลายสาร carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene และ dibenzothiophene (Bressler *et al.,* 2000)

ดังนั้นการศึกษาและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (Ligninolytic enzymes) จึงมีประโยชน์ต่อการพัฒนาศักยภาพการผลิตเอทานอลจากชีวมวลเซลลูโลสให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งจะมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกำลังการผลิตพลังงานในอนาคต สามารถเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือใช้ให้กลับมาใช้ประโยชน์ได้อย่างคุ้มค่ามากยิ่งขึ้น ทั้งยังช่วยลดปัญหาการสะสมของสารเคมีตกค้างที่เป็นอันตรายจากกระบวนการ

ย่อยสลายลิกนินในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมถึงการรองรับยุทธศาสตร์การส่งเสริมการผลิตพลังงานทดแทนภายในประเทศของภาครัฐในอนาคตอีกด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
3. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (incubator shaker)
4. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (Thermal Cycle 9700)
6. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310 Genetic Analyzer
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
8. ชุดถ่ายภาพเจล Gel Documentation
9. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ ไมโครปิเปต ขนาด P1,000 P200 P20 และ P2 ไมโครลิตร
10. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
11. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)
12. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
13. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
14. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310
15. ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ไพรเมอร์ ITS : ITS1(forward), ITS4 (reverse)
16. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ
    - Potato dextrose agar (PDA)
    - Nutrient agar (NA)

วิธีการ

1. **การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส (ลิกนิน) จากแหล่งต่างๆ ที่เก็บรวบรวมไว้แล้วจากห้องปฏิบัติการ**

ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ โดยเชื้อราสามารถนำมาเลี้ยงในอาหารแข็ง potato dextrose agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน ส่วนเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงในอาหารแข็ง nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน จากนั้นเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลิกนิน ได้แก่ เอนไซม์แลคเคส (laccase) และเพอร์รอกซิเดส (peroxidase) มีดังนี้ เตรียมอาหารแข็งที่ใช้ในการทดสอบ ligninolytic enzymes (lignin peroxidase และ Mn peroxidase) ประกอบด้วยสัดส่วนของสารเคมีชนิดต่างๆ คือ KH2PO4 จำนวน 1.00 กรัม C4H12N2O4 0.50 กรัม MgSO4.7H2O 0.50 กรัม CaCl.2H2O 0.01 กรัม Yeast Extract 0.01 กรัม CuSO4.5H2O 0.001 กรัม Fe(SO4)3 0.001 กรัม และ MnSO4.H2O 0.001 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร agar powder 16.00 กรัม และ เติม 0.01% Azure-B / Guaiacol / ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ หลังจากนั้นเติม 20% glucose solution ที่ผ่านการกรอง (1 มล. ต่อ LBM ปริมาตร 100 มล.) แล้วนำไปเทลงจานเลี้ยงเชื้อต่อไป นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่มีการเจริญเติบโตของเส้นใยจนเต็มจานเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA แล้วตัดเอาชิ้นส่วนของเส้นใยของเชื้อราโดยใช้ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. และใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอตักชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของรา นำมาวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารที่มีองค์ประกอบของสาร Azure-B Guaiacol และ ABTS นำไปบ่มในที่มืด ที่สภาวะอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส นาน 5-10 วัน หลังจากนั้นตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

ปฏิกิริยาบนอาหาร Azure-B agar มีการผลิตเอนไซม์ peroxidase จะให้สีใสรอบโคโลนี = + , หากไม่มีการสร้าง peroxidase จะให้สีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงรอบโคโลนี = -

ปฏิกิริยาบนอาหาร Guaiacol มีการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำตาลแดง = +, ไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหาร = -

ปฏิกิริยาบนอาหาร ABTS มีการผลิตเอนไซม์ Laccase จะมีการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเขียวรอบโคโลนี = + , หากไม่มีการสร้าง Laccase ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารรอบโคโลนี = -

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อมาเลี้ยงเพื่อกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในอาหารเหลว LBM ที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 1% [ประกอบด้วย KH_2PO_4 จำนวน 1.00 กรัม $C_4H_{12}N_2O_4$ 0.50 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.50 กรัม $CaCl.2H_2O$ 0.01 กรัม Yeast Extract 0.01 กรัม $CuSO_4.5H_2O$ 0.001 กรัม $Fe(SO_4)_3$ 0.001 กรัม และ $MnSO_4.H_2O$ 0.001 กรัม ลิกนิน 10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ หลังจากนั้นเติม 20% glucose solution ที่ผ่านการกรอง (1 ml ต่ออาหาร LBM ปริมาตร 100 ml)] นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 rpm นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เก็บเอาเฉพาะส่วนใสไว้ทำการทดลองต่อไป

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์บนอาหารที่มีสารบ่งชี้

เตรียมอาหารแข็งที่มีส่วนประกอบของสารบ่งชี้แต่ละชนิด ดังนี้ Azure-B/ Guaiacol/ ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) 0.01% เจาะรูให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ดูดส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยอดลงในอาหารแข็งข้างต้น นำไปบ่มในที่มืดที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาบนอาหารแข็ง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ดังนี้

- ปฏิกิริยาบนอาหาร Azure-B agar หากมีการผลิตเอนไซม์ peroxidase จะให้วงสีใส
- ปฏิกิริยาบนอาหาร Guaiacol หากมีการผลิตเอนไซม์ Laccase จะให้วงสีน้ำตาลแดง
- ปฏิกิริยาบนอาหาร ABTS มีการผลิตเอนไซม์ Laccase จะให้วงสีเขียว

2.2 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบลิกนินในอาหาร

2.2.1 การตรวจสอบผลผลิตน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น

โดยวิธีการตรวจเช็คผลผลิตน้ำตาลกลูโคสที่ได้ ด้วยสารละลายเบเนดิกส์ ดังนี้ ดูดส่วนใสของสารละลายเชื้อ และสารละลายเบเนดิกส์ อย่างละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที บันทึกการตรวจวัดปฏิกิริยาโดยสังเกตจากสีของสารละลายเบเนดิกส์ (สีฟ้า) หากสีของสารละลายเบเนดิกส์เปลี่ยนและมีตะกอนสีน้ำตาลที่ก้นหลอด = +, ไม่เปลี่ยนสีของสารละลายเบเนดิกส์= -

2.2.2 การตรวจวัดค่าน้ำตาลรีดิวซ์

โดยนำส่วนใส ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง ตรวจเช็คปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS reagent (DNS 10 กรัม, โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต 300 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร) ทดสอบปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย DNS reagent 1 ml น้ำกลั่น 2 ml นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5-8 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง จากนั้นจึงนำไปวัดหาค่าน้ำตาลรีดิวซิงค์เปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

2.2.3 การตรวจวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ใช้ชุดตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Pierce® BCAProtein Assay Kit (Thermoscientific, USA) ปฏิบัติตามคำแนะนำ โดยนำส่วนใส 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย WR ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^0C นาน 30 นาที จึงนำไปวัดค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมด เปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA)

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 ในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 มล. โดยใส่ชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ 5 ชิ้น/ฟลาสก์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าความเร็ว 180 rpm นาน 3 วัน สังเกตเมื่อเส้นใยของเชื้อเจริญให้ถ่ายเชื้อใส่ลงในอาหารเหลวที่มี lignin เป็นองค์ประกอบ ปริมาตร 50 มล. แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าความเร็ว 180 rpm นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที แล้วจึงนำส่วนของเหลวมาทดสอบบนอาหารแข็งที่มีสาร Azure-B, Guaiacol และ ABTS ที่สภาวะอุณหภูมิ 40°C, 50°C, 60°C และ 70 °C นาน 24 ชม. ตรวจเช็คผลการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาบนอาหาร ดังข้อ 2.1

4. การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเบื้องต้น

ทำการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินโดยการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ในอาหาร Lignin Modifying Enzyme Basal Media (LBM) ที่มีลิกนิน (เปลือกต้นยูคาลิปตัส) 1% เป็นองค์ประกอบ เลี้ยงกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์นาน 7 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเอาเฉพาะส่วนใสที่อุณหภูมิ 4°c ความเร็วรอบ 8,000 rpm ที่ นาน 15

นาที แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองที่มีความละเอียด 0.45 ไมโครเมตร นำเอนไซม์อย่างหยาบที่ได้ไปทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นแล้วนำเอนไซม์อย่างหยาบที่ได้ไปทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยวิธีการกรองด้วยเครื่อง Tangential Flow Filtration (TFF) โดยผ่าน membrane ขนาด 10K และ 30K และทำให้เป็นผงแห้งโดยใช้วิธี freeze drying method จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนโดยวิธี Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Native Page) และย้อมสีเจลเพื่อดูปฏิกิริยาด้วยสาร ABTS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40^{0}C นาน 15-30 นาที จนสังเกตเห็นแถบปฏิกิริยาของเอนไซม์ชัดเจน

5. การจำแนกชนิดของเชื้อราย่อยสลายลิกนินโดยเทคนิคชีวโมเลกุล

5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อราบนอาหารสูตร PDA ที่มีแผ่นกระดาษแก้วไว้วางบนผิวหน้าอาหาร เลี้ยงเชื้ออายุ 5-7 วัน ขูดเส้นใยของเชื้อราประมาณ 0.1-0.3 กรัม ใส่โกร่งบดด้วยไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด เติม Extraction buffer ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และ proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 6 ไมโครลิตร บดให้เข้ากันอีกครั้ง เทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ผสมทุกๆ 10 นาทีด้วยเครื่อง Vortex เติม chloroform : isoamylalcohol (24:1) 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาช้าๆ นาน 5 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc 0.3 เท่า และ isopropanol 0.6 เท่า ของปริมาตรน้ำใส ผสมให้เข้ากันเบาๆ แช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย washing solution 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer : RNase (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (25:1) 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บรักษา ดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer (PERKIN ELMER MBA2000) ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 และตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส (Agarose gel electropholesis) โดยการหยอดดีเอ็นเอลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1X TBE buffer ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แช่แผ่นวุ้นในเอธิเดียมโบรไมด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)

5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ITS ของเชื้อราด้วยคู่ไพร์เมอร์

Forward : ITS1 5’-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3’

Reverse : ITS4 5’-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3’ (Daniel and Jorge, 2007)

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด PCR ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร

4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS1 (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS4 (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 30 รอบ
55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (α)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส โดยวิธี Electrophoresis โดยผสมผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร แยกผลผลิต PCR ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์

5.3 การเตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ และการตรวจวิเคราะห์ผล

เตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดย นำผลผลิต PCR ที่เหลือจากจากข้อ 6.2 ปริมาตร 17 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc ปริมาตร 3.4 ไมโครลิตร และ 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 85 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex นาน 10 วินาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ระหว่างนี้นำมาผสมโดยพลิกกลับหลอดไปมาทุก 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน PCR ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย ddH_2O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ โดยวิธี Electrophoresis บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel (ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร)

5.4 การหาลำดับเบสในส่วนของบริเวณ ITS

5.4.1 การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร

BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1	2	ไมโครลิตร
Ready Reaction buffer	1	ไมโครลิตร
Primer ITS1/(ITS4) (5 ไมโครโมลาร์)	1.6	ไมโครลิตร
dH_2O	4.4	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) อุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

96 องศาเซลเซียส	1 นาที	จำนวน 1 รอบ
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	จำนวน 25 รอบ
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 นาที	
4 องศาเซลเซียส	infinity (α)	

5.4.2 การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้อ 6.4.1 มาล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำปฏิกิริยาดังกล่าว ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม stock solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร : 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยตะกอนให้แห้งในที่มืด

5.4.3 การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้อยู่ที่ก้นหลอด แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ย้ายลงน้ำแข็งทันที

5.4.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 5.4.3 เข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

เวลาและสถานที่

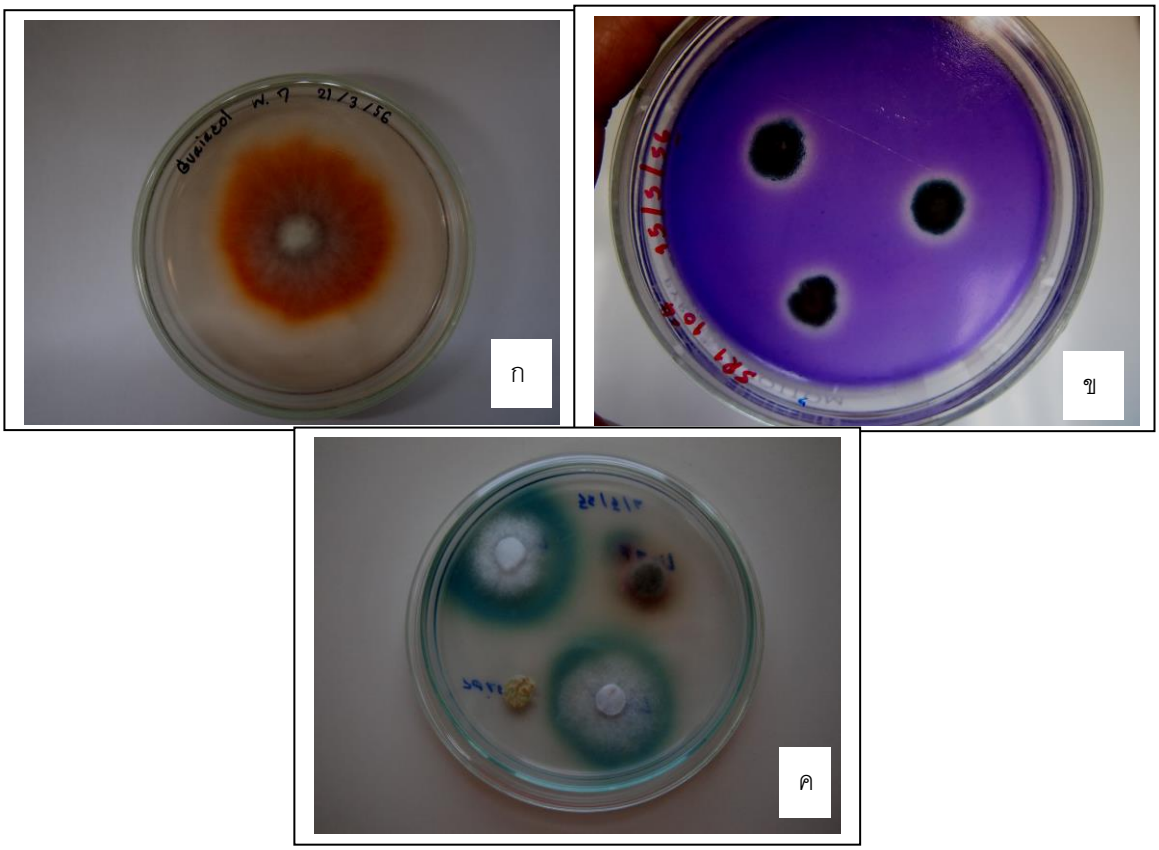
ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2555 **สิ้นสุด** กันยายน 2557 **รวม 2 ปี**

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส : ลิกนิน

จากการเก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ที่เก็บรวบรวมไว้แล้วจากห้องปฏิบัติการ ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนิน แต่พบเชื้อราที่สามารถเจริญเติบโตและผลิต ligninolytic enzymes บนอาหารแข็งทดสอบที่มีสาร Azure-B ABTS และ Guaiacol เมื่อนำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5-10 วัน พบการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของอาหาร โดยไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์แลคเคส จะพบการเปลี่ยนสีบนอาหารที่มีสาร ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] และ Guaiacol เป็นสีเขียว และสีน้ำตาล ตามลำดับ แต่หากมีการผลิตเอนไซม์ peroxidase จะพบการเกิดวงใสบนอาหารที่มีสาร Azure-B (ภาพที่ 1) จากผลการทดลองพบว่า สามารถคัดเลือกได้เชื้อราที่ผลิต ligninolytic enzymes ได้ทั้งสิ้น 20 ไอโซเลท ซึ่งผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ดี ดังตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีบนอาหารแข็งทดสอบที่มีสารบ่งชี้ (Azure-B ABTS และ Guaiacol) จากเชื้อที่ผลิต ligninolytic enzymes ; ปฏิกิริยาบนอาหารที่มีสาร Guaiacol (ก) Azure-B (ข) และ ABTS (ค)

ตารางที่ 1 แสดงผลปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของอาหารที่มีสารบ่งชี้ Guaiacol Azure - B และ ABTS

ไอโซเลท	ปฏิกิริยาบนอาหารทดสอบ			แหล่ง
	Guaiacol	Azure - B	ABTS	
W1	+	-	+	สถาบันวิจัยยาง จ.สงขลา
W2	+	-	+	สถาบันวิจัยยาง จ.สงขลา
W3	+	-	+	สถาบันวิจัยยาง จ.สงขลา
W4	+	-	+	สถาบันวิจัยยาง จ.สงขลา
W5	+	-	+	สถาบันวิจัยยาง จ.สงขลา
W6	+	-	+	สถาบันวิจัยยาง จ.สงขลา
W7	+	-	+	สถาบันวิจัยยาง จ.สงขลา
W8	+	-	+	สถาบันวิจัยยาง จ.สงขลา
W9	+	-	+	สถาบันวิจัยยาง จ.สงขลา
W10	+	-	+	สถาบันวิจัยยาง จ.สงขลา
เป๋าฮื้อ2	+	-	+	กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สทช.
กระด้าง1	+	-	+	กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สทช.
แครง	-	-	-	กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สทช.
หลินจือ1	+	+	+	กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สทช.
นางรม	+	-	+	กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สทช.
หูหนู	+	-	+	กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สทช.
ขอนขาว3	+	-	+	กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สทช.
หอม4	+	-	+	กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สทช.
Rigido	+	+	+	แปลงยางพารา จ.สุราษฎร์ธานี
G1	+	+	+	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากเชื้อจุลินทรีย์

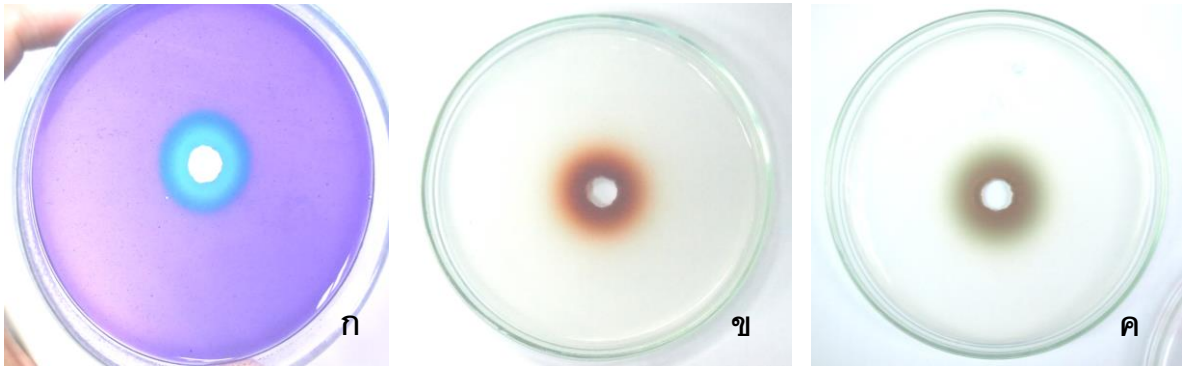
จากการผลิตเอนไซม์อย่างหยาบที่ได้จากการกระตุ้นด้วยลิกนิน เมื่อนำเอนไซม์อย่างหยาบมาทดสอบประสิทธิภาพในบนอาหารที่มีสารบ่งชี้ (Azure-B Guaiacol และ ABTS) นาน 24 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลท Rigido G1 และ หลินจือ ให้ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของปฏิกิริยา (วงสี) ได้สูงที่สุด ดังตารางที่ 2

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบลิกนินให้เป็นน้ำตาลกลูโคสด้วยสารละลายเบเนดิกส์ โดยการนำสารละลายอาหาร+สารเบเนดิกส์ ไปต้มในน้ำเดือด สามารถตรวจพบตะกอนสีน้ำตาล ซึ่งสามารถแปลผลได้ว่าเชื้อเห็ดส่วนใหญ่สามารถย่อยลิกนินให้ได้น้ำตาลกลูโคสได้ดี ส่วนการวิเคราะห์ค่า reducing sugar พบว่า เชื้อไอโซเลท G1 ให้ค่า reducing sugar สูงที่สุด เท่ากับ 11.2 mg/ml รองลงมาคือ ไอโซเลท Rigido (1.59 mg/ml) และ หลินจือ (1.49 mg/ml) ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) พบว่า ไอโซเลท Rigido ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 4.51 mg/ml รองลงมาคือ ไอโซเลท G1 (3.06 mg/ml) และหลินจือ (2.6 mg/ml) ตามลำดับ ดังภาพที่ 2 ตารางที่ 3 นอกจากนี้ยังพบว่าเปลือกยูคาลิปตัสยังสามารถ

กระตุ้นการสร้างเอนไซม์ย่อยลิกนินได้ดีเช่นเดียวกับลิกนินที่ผลิตป็นการค้า จึงเลือกใช้เปลือกยูคาลิปตัสในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของปฏิกิริยาบนอาหารที่มีสารบ่งชี้ของเอนไซม์อย่างหยาบที่ได้รับการกระตุ้นด้วยอาหารที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ

ไอโซเลท	**ค่าเฉลี่ย ∅ ของปฏิกิริยา (วงสี) บนอาหารที่มีสารบ่งชี้ (มม.)**		
	Azure-B	Guaiacol	ABTS
w.1	13	12	13
w.2	12	13	14
w.3	12	14	15
w.4	11	12	14
w.5	13	15	12
w.6	14	12	14
w.7	12	17	12
w.8	14	12	15
w.9	15	13	13
w.10	14	13	15
ขอนขาว3	16	15	18
หอม 4	16	17	19
หลินจือ	20	22	22
กระด้าง1	16	15	18
นางรม	16	15	14
หูหนู	16	14	14
เป๋าฮื้อ	16	15	14
Rigido	22	22	19
G1	20	18	19

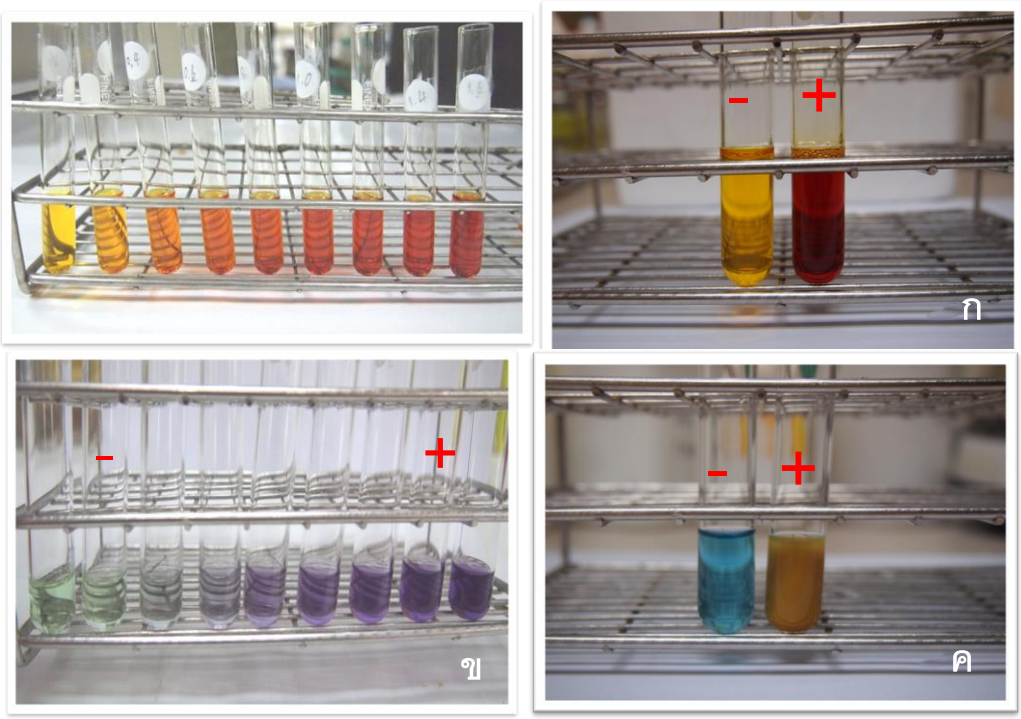


ภาพที่ 2 การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิต ligninolytic enzymes บนอาหารแข็งที่มีสารบ่งชี้ Azure-B Guaiacol และ ABTS ตามลำดับ

ก. ปฏิกิริยาบนอาหาร Azure-B agar ที่มีการผลิตเอนไซม์ peroxidase

ข. ปฏิกิริยาบนอาหาร Guaiacol ที่มีการผลิตเอนไซม์ laccase

ค. ปฏิกิริยาบนอาหาร ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] ที่มีการผลิตเอนไซม์ laccase



ภาพที่ 2 **ก.** การวิเคราะห์ค่าน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) **ข.** การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) **ค.** การทดสอบผลผลิตน้ำตาลกลูโคสด้วยสารละลายเบเนดิกส์

<u>ตารางที่ 3</u> แสดงผลของปฏิกิริยาการทดสอบน้ำตาลกลูโคสโดยสารละลายเบเนดิกส์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ และปริมาณโปรตีน ที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่กระตุ้นการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในอาหารที่มีเปลือกยูคาลิปตัสเป็นองค์ประกอบ 1 %

No.	ปฏิกิริยาการทดสอบน้ำตาลกลูโคส โดยสารละลายเบเนดิกส์*	ปริมาณน้ำตาล รีดิวซิงค์	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
w.1	+	0.30	0.81
w.2	+	0.60	1.36
w.3	+	0.30	0.97
w.4	-	0.32	1.05
w.5	-	0.29	1.08
w.6	-	0.19	0.83
w.7	-	0.27	1.10
w.8	-	0.37	1.54
w.9	++	0.52	1.90
w.10	+	0.35	1.27
ขอนขาว3	+	0.41	1.15
หอม 4	+	0.63	1.21
หลินจือ	+	1.49	2.60
กระด้าง1	++	0.57	1.16
นางรม	++	0.74	1.90
หูหนู	++	0.76	2.09
เป๋าฮื้อ	++	0.68	1.98
Rigido	++	1.59	4.51
G1	++	1.12	3.06

<u>หมายเหตุ</u> * สังเกตจากสีของสารละลายเบเนดิกส์ (สีฟ้า) หากสีของสารละลายเบเนดิกส์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล/มีตะกอนสีน้ำตาลที่ก้นหลอด = +, ไม่เปลี่ยนสีของสารละลายเบเนดิกส์= -

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส

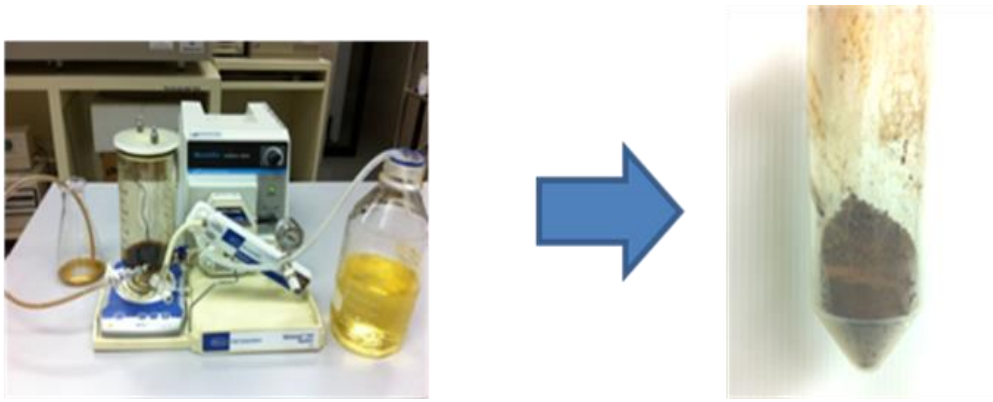
นำเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท คือ G1, Rigido และ หลินจือ ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเปลือกยูคาลิปตัส (ลิกนิน) 1% เป็นองค์ประกอบ ปริมาตร 50 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าความเร็ว 180 rpm นาน 7 วัน แล้วนำเอาส่วนใส หรือ crude enzyme มาทดสอบบนอาหารที่มีสาร Azure-B, Guaiacol และ ABTS ที่สภาวะอุณหภูมิ 40°C, 50°C, 60°C และ 70°C นาน 24 ชม. เมื่อตรวจเช็คผลการเกิดปฏิกิริยา พบว่า crude enzyme ที่ได้ เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40°C และ 50°C เชื้อส่วนใหญ่มีกิจกรรมที่ดีบนอาหารที่มีสาร Azure-B และ Guaiacol ส่วนอาหารที่มีสาร ABTS ตรวจพบกิจกรรมที่ดีที่อุณหภูมิ 40°C ดังตารางที่ 4

<u>ตารางที่</u> 4 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสบนอาหารที่มีสารบ่งชี้เป็นองค์ประกอบ 3 ชนิด คือ Azure-B, Guaiacol และ ABTS ที่สภาวะอุณหภูมิ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส

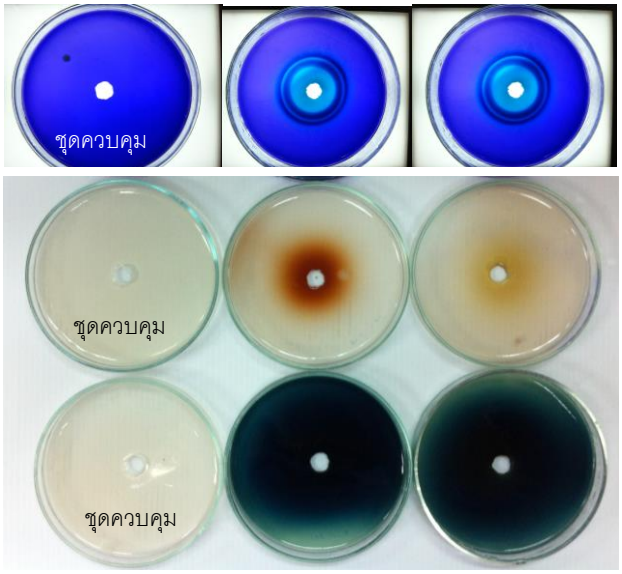
No.	Ø ปฏิกิริยาบนอาหาร Azure-B ที่อุณหภูมิต่างๆ (มม.)				Ø ปฏิกิริยาบนอาหาร Guaiacol ที่อุณหภูมิต่างๆ (มม.)				Ø ปฏิกิริยาบนอาหาร ABTS ที่อุณหภูมิต่างๆ (มม.)			
	40°C	50°C	60°C	70°C	40°C	50°C	60°C	70°C	40°C	50°C	60°C	70°C
หลินจือ	30	30	28	26	21	22	17	-	21	-	-	-
Rigido	33	27	22	22	25	28	18	-	38	33	-	-
G.1	30	26	23	23	21	20	18	-	28	-	-	-

4. การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเบื้องต้น

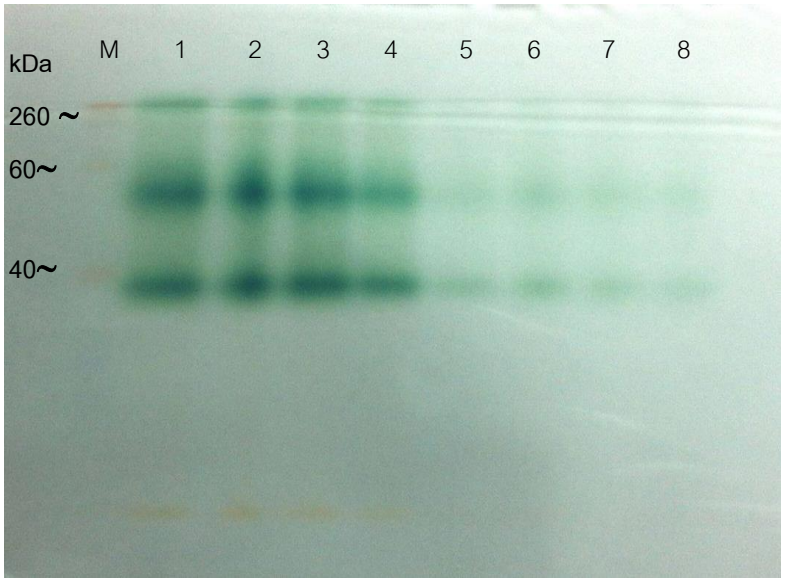
ทำการคัดเลือกไอโซเลท Rigido เป็นตัวแทนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน โดยวิธีการกระตุ้นให้เชื้อผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว Lignin Modifying Enzyme Basal Media (LBM) ที่มีลิกนิน (เปลือกต้นยูคาลิปตัส) 1% เป็นองค์ประกอบ เมื่อทำการเลี้ยงกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์นาน 7 วัน แล้วนำเอนไซม์อย่างหยาบที่ได้ไปทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยใช้วิธีการกรองด้วยเครื่อง Tangential Flow Filtration (TFF) โดยผ่าน membrane ขนาด 10K และ 30K จากนั้นทำเป็นรูปผงแห้งโดยวิธี freeze drying method ดังภาพที่ 3 จากนั้นนำเอาผงเอนไซม์ (ligninolytic enzymes) ที่ผลิตได้ ละลายด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำไปทดสอบโดยวิธี Bioassay plate technique ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ laccase และ peroxidase ดังภาพที่ 4 และเมื่อนำไปวิเคราะห์แยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี Native Page และย้อมเจลด้วยสาร ABTS พบว่าสามารถตรวจพบขนาดโปรตีน 2 ขนาด ซึ่งมีขนาด~ 40 และ 60 kDa ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 3 วิธีการกรองด้วยเครื่อง Tangential Flow Filtration (TFF) โดยผ่าน membrane ขนาด 10K และเอนไซม์รูปแบบผงแห้งที่ผ่านวิธีการ freeze drying method



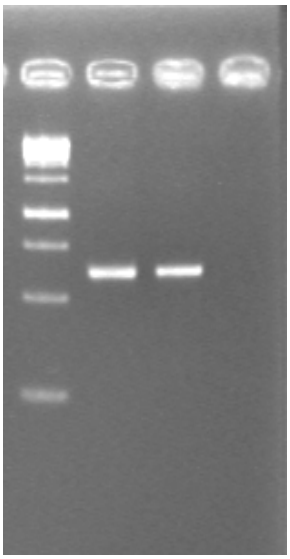
ภาพที่ 4 กิจกรรมของ ligninolytic enzymes (รูปแบบผงแห้ง) เมื่อทดสอบบนอาหารแข็งที่มีสารบ่งชี้ 3 ชนิด คือ Azure-B, Guaiacol และ ABTS เป็นองค์ประกอบ ตามลำดับ โดยวิธี Bioassay plate technique ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 40 °C นาน 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 5 การวิเคราะห์แยกขนาดโปรตีน (ligninolytic enzymes) โดยวิธี Native-Page และย้อมเจลด้วยสาร ABTS ได้โปรตีน 2 ขนาด ~ 40 และ 60 kDa

5. การจำแนกชนิดของเชื้อราย่อยสลายลิกนินโดยเทคนิคชีวโมเลกุล

จำแนกเชื้อไอโซเลท G1 หลินจือ Rigido ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน โดยนำเชื้อแต่ละไอโซเลทเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อขูดเส้นใยมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ internal transcribed spacer โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบส ดังภาพที่ 6 นำลำดับเบสจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า คล้ายคลึงกับเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Ganoderma lucidum* และ *Rigidoporus microporus* ที่ความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่



ภาพที่ 6 ผลผลิต PCR เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ internal transcribed spacer โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบส

ตารางที่ 4 เชื้อไอโซเลท G1 หลินจือ และ Rigido เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI

ไอโซเลท	สปีชีส์	เปอร์เซ็นต์ Identity	Accession Number
G1	*Ganoderma lucidum*	99%	FJ379262.1
หลินจือ	*Ganoderma lucidum*	99%	JN008869.1
Rigido	*Rigidoporus microporus*	99%	KM246744.1

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการเก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ที่เก็บรวบรวมไว้แล้วจากห้องปฏิบัติการ พบเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตและผลิต ligninolytic enzymes บนอาหารแข็งทดสอบที่มีสาร Azure-B ABTS และ Guaiacol จากผลการทดลองพบว่า สามารถคัดเลือกได้เชื้อราที่ผลิต ligninolytic enzymes ได้ทั้งสิ้น 20 ไอโซเลท ซึ่งผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ดี

การทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากเชื้อจุลินทรีย์ พบเชื้อรา 3 ไอโซเลท คือ Rigido G1 และ หลินจือ ให้ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของปฏิกิริยา (วงสี) ได้สูงที่สุด เมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายเบเนดิกส์ พบว่า เชื้อเห็ดส่วนใหญ่สามารถย่อยลิกนินให้ได้น้ำตาลกลูโคสได้ดี ส่วนผลการวิเคราะห์ค่า reducing sugar พบว่า เชื้อไอโซเลท G1 ให้ค่า reducing sugar สูงที่สุด เท่ากับ 11.2 mg/ml รองลงมาคือ ไอโซเลท Rigido (1.59 mg/ml) และ หลินจือ (1.49 mg/ml) ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) พบว่า ไอโซเลท Rigido ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 4.51 mg/ml รองลงมาคือ ไอโซเลท G1 (3.06 mg/ml) และหลินจือ (2.6 mg/ml) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเปลือกต้นยูคาลิปตัสยังสามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ย่อยลิกนินได้ดีเช่นเดียวกับลิกนินที่ผลิตป็นการค้า และ crude enzyme ที่ได้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40°C และ 50°C

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเบื้องต้น โดยการกระตุ้นให้เชื้อผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว Lignin Modifying Enzyme Basal Media (LBM) ที่มีลิกนิน (เปลือกต้นยูคาลิปตัส) 1% เป็นองค์ประกอบ เมื่อทำการเลี้ยงกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์นาน 7 วัน แล้วนำเอนไซม์อย่างหยาบที่ได้ไปทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นและเลือกเอาเฉพาะโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงที่ต้องการ โดยใช้วิธีการกรองด้วยเครื่อง Tangential Flow Filtration (TFF) โดยผ่าน membrane ขนาด 10K และ 30K จากนั้นทำเป็นรูปผงแห้งโดยวิธี freeze drying method จากนั้นนำไปทดสอบโดยวิธี Bioassay plate technique ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ laccase และ peroxidase และเมื่อนำไปวิเคราะห์แยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี Native Page พบว่าสามารถตรวจพบขนาดโปรตีน 2 ขนาด ซึ่งมีขนาดประมาณ 40 และ 60 kDa

การจำแนกชนิดของเชื้อไอโซเลท G1 หลินจือ และ Rigido โดยเทคนิคชีวโมเลกุล ในส่วนของ internal transcribed spacer โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบส เมื่อนำลำดับเบสมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า คล้ายคลึงกับเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Ganoderma lucidum* และ *Rigidoporus microporus* ที่ความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำเชื้อ *Ganoderma lucidum* และ *Rigidoporus microporus* ทั้ง 3 ไอโซเลท (G1 หลินจือ และ Rigido) ไปพัฒนาต่อยอดการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลังงานจากชีวมวลลิกโนเซลลูโลส การกำจัดสีของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมทอผ้า ฟอกย้อม เยื่อกระดาษ การย่อยสลายของสารกำจัดแมลงศัตรูพืชพวก Isoxaflutole เป็นต้น
2. สามารถต่อยอดงานวิจัยโดยการโคลนยีนที่ความคุมการผลิตเอนไซม์ laccase และ peroxidase จากเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท (G1 หลินจือ และ Rigido) เพื่อการผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์ทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สถาบันวิจัยยาง จ.สงขลา และกลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ในการอนุเคราะห์เชื้อสำหรับใช้ในงานวิจัย และนายคำแหง แก้งคำ พนักงานราชการ ตำแหน่งนักวิชาการเกษตร สำหรับความช่วยเหลือในงานวิจัยด้านต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

จิรเวท เจตน์จันทร์, อรชีรา เพ็ชร์ช้อย, พิลาณี ไวถนอมสัตย์, วราภรณ์ อภิวัฒนาภิวัต, ต่อพงศ์ กรีฑาชาติ และ สาวิตรี จันทรานุรักษ์. 2552. การลดสีน้ำทิ้งที่มีลิกนินเป็นส่วนประกอบโดยเชื้อราเส้นใยสีขาว *Datronia* sp. KAPI0039. ใน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 : สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (น. 236-244). กรุงเทพฯ.

ฒาลิศา เนียมมณี. 2542. การกำจัดสีรีแอกทีฟเรด 2 ในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแบคทีเรียเด่น ในกระบวนการเอสบีอาร์แบบแอนแอโรบิก-แอโรบิก. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, สหสาขาวิชา (วิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปัทมา พลอยสว่าง และภคมน จิตประเสริฐ. 2551. อิทธิพลของสภาวะแวดล้อมและการกระตุ้นการเจริญต่อการกำจัดสีย้อมผ้าโดย *Lentinus polychrous* Lev. ที่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์. *ใน*การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 : สาขาอุตสาหกรรมเกษตร, (น.270-277). กรุงเทพฯ.

วราภรณ์ อภิวัฒนาภิวัต, ต่อพงศ์ กรีธาชาติ และ พิลาณี ไวถนอมสัตย์. 2550. การลดสีน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเยื่อและกระดาษโดย โอโซนออกซิเดชัน. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45:สาขาสถาปัตยกรรมศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (หน้า. 825-834).กรุงเทพฯ.

วีรานุช หลาง, ธนสิริ มีชัย และ วิชชุพร จันทร์ศรี. 2551. ความสามารถในการกำจัดสีย้อมผ้าประเภทรีแอกทีฟของ *Burkholderia glumae.* Environment and Natural Resources Journal. 6; 66-81.

อรชีรา เพ็ชร์ช้อย, พิลาณี ไวถนอมสัตย์, วราภรณ์ อภิวัฒนาภิวัต, จิรเวท เจตน์จันทร์, นิพนธ์ ตังคณานุรักษ์ และศวพร ศุภผล. 2552. การย่อยสลายทางชีวภาพของสีรีแอคทิฟโดยเชื้อราเส้นใยสีขาว *Datronia* sp. KAPI0039. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (น. 245-252). กรุงเทพฯ.

Bressler, D.C., P.M. Fedorak and M.A. Pickard. 2000. Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazle, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Coriolopsis gallica*. Biotech. Lett. 22: 1119-1125.

Debendra K. S. and R. Gupta. 2005. Evaluation of ligninolytic microorganisms for efficient decolorization of a small pulp and paper mill effluent. Process Biochemistry, 40: 1573-1578.

Kirk, T.K., T. Higuchi, and H.M. Chang, 1980. Lignin Biodegradation; Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Larsson, S., P. Cassland and L.j. Jonsson. 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibition in lignocellulose hydrolysates heterologous expression of laccase. Appl. Environ. Microb. 67: 1163-1170.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265-275.

Mai, C., W. Schormann, O. Milstein and A. Huttermann. 2000. Enhanced stability of laccase in presence of phenolic compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 510-514.

Nelson, N. 1944. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153 : 375-380.

Sannia, G., P. Giardina, M. Lana, M. Rossi and V. Buonocore. 1986. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. Biotechnol. Lett. 8: 797-800.

Walker G.M. and L.R. Weatherley. 2000. Biodegradation and biosorption of acid anthraquinone dye. Env Pollut. 108, 219-23.