



วารสารวิชาการ วิศวกรรมศาสตร์ ม.อบ. UBU Engineering Journal

บทความวิจัย

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสจาก *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07 ด้วยวิธีการแบบปัจจัยเดียวและวิธีการพื้นผิวตอบสนอง

Optimization of laccase production from *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07 using one factor at a time and response surface methodologies

วิทวัส ทูมแสน^{1,4} เนตรณิส ตันเต็มทรัพย์² สุมนา สิริพัฒนานกุล-ราษฎร์ภักดี¹ ภิญญ์ติตา มุงการดี¹ โสภณ บุญลือ^{3,*}

¹ สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

² สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

³ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

⁴ โปรแกรมวิจัยการพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการจัดการมลพิษจากอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษน้ำตาลและสีฟอกย้อมในระดับอุตสาหกรรม และชุมชน เพื่อการจัดการที่ยั่งยืน ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย

Wittawat Toomsan^{1,4} Netnapid Tantemsapya² Pinthita Mungkarndee¹ Sumana Siripattanakul-Ratpukdi¹ Sophon Boonlue^{3,*}

¹ Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² School of Environmental Engineering, Institutes of Engineering, Suranaree University of Technology 30000, Thailand

³ Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴ Research Program on Development of Appropriate Technologies for Coloring Agent Removal from Textile Dyeing, Pulp & Paper, and Sugar Industries for sustainable Management, Center of Excellence on Hazardous Substance, Center of Excellence on Hazardous Substance Management (HSM), Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

* Corresponding author.

E-mail: bsopho@kku.ac.th; Telephone: 089 186 2646

วันที่รับบทความ 9 มิถุนายน 2563; วันที่แก้ไขบทความ ครั้งที่ 1 21 กรกฎาคม 2563; วันที่ตอบรับบทความ 3 สิงหาคม 2563

บทคัดย่อ

งานวิจัยมีเป้าหมายเพื่อคัดแยกจากตัวอย่างเห็ดที่เก็บมาจากอุทยานแห่งชาติลำคลองงู จังหวัดกาญจนบุรี ประเทศไทย และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากรา จากการศึกษพบว่าราที่มีความสามารถในการผลิตแลคเคสมี 3 ตัวอย่าง ได้แก่ KKU-LKNG-04, KKU-LKNG-07 และ KKU-LKNG-16 ซึ่งเมื่อระบุชนิดของราโดยการวิเคราะห์ยีนบริเวณ ITS rRNA พบว่าราเหล่านี้ (KKU-LKNG-04, KKU-LKNG-07 และ KKU-LKNG-16) มีความคล้ายคลึงกับกับราสายพันธุ์ *Ganoderma lucidum*, *Megasporoporia* sp. และ *Rigidoporus vinctus* ตามลำดับ ราที่มีศักยภาพในการสามารถผลิตแลคเคสได้มากที่สุด คือ *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07 โดยใช้ขานอ้อยในการเลี้ยงราโดยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง การเพาะเลี้ยงราได้ศึกษาผลของปัจจัยในการผลิตเอนไซม์แลคเคสด้วยวิธีปัจจัยเดียวและได้ทำนายสภาวะเพาะเลี้ยงราที่เหมาะสมด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน ซึ่งผลการทดลองด้วยวิธีปัจจัยเดียวพบว่าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ฟิเอช และอุณหภูมิในการบ่มเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงราอย่างชัดเจน ซึ่งเมื่อทำนายสภาวะเพาะเลี้ยงราที่เหมาะสมได้ผลการผลิตเอนไซม์แลคเคสด้วย *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07 สูงสุดภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ฟิเอช และอุณหภูมิในการบ่ม เท่ากับ 4.17 กรัมต่อลิตร 8.45 และ 29.55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยสามารถผลิตแลคเคสได้ 5.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงราด้วยสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวพบว่า *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07 สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส

ได้ 5.48 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ทำนายไว้ ผลการศึกษาบ่งชี้ความเป็นไปได้ในการผลิตแลคเคสจากราและการทำนายสภาวะการผลิตที่เหมาะสมซึ่งเป็นประโยชน์ในการค้าในอนาคต

คำสำคัญ

แลคเคส *Megasporoporia* sp. การหมักแบบอาหารแข็ง สภาวะที่เหมาะสม

Abstract

This study aims to isolate fungi from Lam Khlong Ngu National Park, Kanchanaburi, Thailand and optimize laccase production. The result showed that three fungal isolates could produce laccase including KKU-LKNG-04, KKU-LKNG-07 and KKU-LKNG-16. Based on ITS rRNA gene analysis, these fungi (KKU-LKNG-04, KKU-LKNG-07 and KKU-LKNG-16) were similar to *Ganoderma lucidum*, *Megasporoporia* sp. and *Rigidoporus vinctus*, respectively. The potential fungus isolate which gave the highest laccase production under solid-state fermentation using sugarcane bagasse as a substrate, was *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07. Determination of factors on fungal cultivation related to laccase production was applied one factor at a time method and optimized by response surface methodology using Box-Behnken approach. The results from one factor at a time method revealed that concentration of nitrogen source, pH and temperature obviously influenced fungal cultivation. For optimization of laccase production, the highest laccase production (5.58 U/mL) from fungi *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07 was predicted under conditions including concentration of nitrogen source, pH and temperature of 4.17 g/L, 8.45 and 29.55 °C, respectively. Later, the laccase production experiment under the optimized conditions was performed. *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07 produced laccase of 5.48 U/mL which was closed to the predicted value. These results indicated the potential of laccase production and optimization which would be useful for further commercial application.

Keywords

laccase; *Megasporoporia* sp.; solid-state fermentation; optimization

1. คำนำ

อุทยานแห่งชาติลำคลองงู เป็นพื้นที่ป่าไม้เบญจพรรณ และป่าดิบแล้งที่มีความอุดมสมบูรณ์มากแห่งหนึ่งในประเทศไทยและเป็นแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญในจังหวัดกาญจนบุรี ด้วยลักษณะพื้นที่อุดมสมบูรณ์ดังกล่าวทำให้มีความหลากหลายของทางชีวภาพในพื้นที่สูงเช่นกัน ดังนั้นนอกเหนือจากการใช้ประโยชน์พื้นที่เพื่อการท่องเที่ยวจึงมีความเป็นไปได้ในการศึกษาตลอดจนการใช้ประโยชน์สิ่งมีชีวิตในพื้นที่ ทั้งนี้ สิ่งมีชีวิตที่สำคัญของระบบนิเวศวิทยาป่าไม้ คือ จุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์เป็นทั้งผู้ผลิต (Producer) และ ผู้ย่อยสลาย (Decomposer) ของห่วงโซ่ในระบบ สำหรับพื้นที่อุทยานแห่งชาติลำคลองงูซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความชื้นจุลินทรีย์ที่สำคัญและมีบทบาทในพื้นที่ ได้แก่ รา จากการศึกษาในอดีตพบว่าในพื้นที่ป่าในจังหวัดกาญจนบุรีมีเห็ดและราหลากหลายชนิดมาก เช่น *Termitomyces* sp., *T. microcapus*, *T. albuminosus*, *T. striatus*, *Aspergillus* sp., *Ganoderma applanatum*,

Ganoderma lucidum, *Schizophyllum commune*, *Microporus xanthopus* และ *Trametes* sp. เป็นต้น [1–3]

การใช้ประโยชน์จากรูปแบบที่เหมาะสมวิธีทางหนึ่ง คือ การสกัดเอนไซม์ (Enzyme) เพื่อใช้ในการผลิตในอุตสาหกรรมเกษตร อาหาร และยา ตลอดจนประยุกต์ใช้ในการบำบัดมลพิษสิ่งแวดล้อมได้ [4] โดยเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ผลิตและใช้ทางการค้าอย่างกว้างขวาง คือ เอนไซม์แลคเคส (Laccase) หรือ benzenediol: oxygen oxidoreductase (EC 1.10.3.2) [5] เอนไซม์แลคเคสเป็นของกลุ่มโพลีฟีนอลออกซิเดสที่มีอะตอมทองแดงในศูนย์กลาง หรือเรียกว่า มัลติคอปเปอร์ออกซิเดส (multi-copper oxidase) ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์แลคเคสสามารถพบได้พืช, แมลง, แบคทีเรีย และรา [6] แลคเคสเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นน้อยจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย [7] แลคเคสจึงสามารถย่อยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์หลากหลายประเภท [8] ตัวอย่างเช่น ในงานสิ่งแวดล้อมสามารถนำเอนไซม์แลคเคส

ไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายมลสารต่าง ๆ เช่น โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) [9], การกำจัดยาฆ่าแมลง [10] และ การกำจัดสีของน้ำเสีย [11] เป็นต้น

สำหรับราที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้นั้นมีหลายสายพันธุ์ โดยราสายพันธุ์ในชั้น (Class) Ascomycetes และ Basidiomycetes เป็นราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสได้เป็นอย่างดี [12] นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงราอีกหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส เช่น *Podospira anserine*, *Agaricus bisporus*, *Rhizoctonia praticola*, *Pholiota aegerita*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus hirsutus* และ *Neurospora crassa* [5] ทั้งนี้วิธีการและสภาวะเลี้ยงรามีผลต่อการผลิตเอนไซม์อย่างชัดเจน จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการศึกษาเลี้ยงราโดยการหมักแบบอาหารแข็ง (solid-state fermentation) ส่งผลให้ราผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าอาหารเหลว (Both) [13] แต่สภาวะที่เพาะเลี้ยง เช่น แหล่งแร่ธาตุ พีเอช หรือ อุณหภูมิ มีช่วงที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป

จากแนวคิดการใช้ประโยชน์สิ่งมีชีวิตในพื้นที่อุทยานแห่งชาติและความเป็นไปได้ในการสกัดเอนไซม์จากรา ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์ตามแนวคิดดังกล่าว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อหาราที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ โดยการศึกษาครอบคลุมการคัดเลือกราจากอุทยานแห่งชาติลำคลองงู การคัดเลือกราที่มีศักยภาพในการผลิตแลคเคสภายใต้การเพาะเลี้ยงหมักแบบอาหารแข็ง รวมทั้งการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคส ในงานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมตามหลักการทางสถิติด้วยวิธีการทดลองแบบปัจจัยเดียว (one factor at a time method) และวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) โดยใช้แผนการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นกัน (Box-Behnken Design) ผลจากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงราที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสในระดับนำร่อง ตลอดจนขยายไปสู่การผลิตเพื่อการค้าได้ในอนาคตต่อไป

2. วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 การคัดแยกราที่ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้

ตัวอย่างเห็ดเพื่อใช้คัดแยกราที่ใช้ในการทดลองได้ทำการเก็บจากอุทยานแห่งชาติลำคลองงู จังหวัดกาญจนบุรี (พิกัด UTM Zone 48, N 14.841922, E 98.951560) โดยมีจำนวนทั้งสิ้น 28 ตัวอย่าง หลังจากนั้นได้นำชิ้นส่วนของดอกเห็ดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นฟิตีเอ (potato dextrose agar) และบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เชื้อราบริสุทธิ์ซึ่งเชื้อราบริสุทธิ์ที่ได้รับถูกเก็บรักษาไว้บนอาหารวุ้นฟิตีเอภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการคัดเลือกเชื้อราที่มีความเป็นไปได้ในการผลิตเอนไซม์แลคเคส ได้ทำการเพาะเลี้ยงตัวอย่างราที่ได้ในอาหารวุ้นฟิตีเอเติม 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ [14] ซึ่งราที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสจะทำให้บริเวณรอบโคโลนีเปลี่ยนสีจากไม่มีสีกลายเป็นสีเขียวเข้ม ซึ่งบ่งชี้ว่าราที่ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ ทั้งนี้ราที่ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ระบุสายพันธุ์ด้วยวิธีการเทคนิคยีน ITS rRNA (รายละเอียดแสดงในหัวข้อต่อไป)

2.2 การคัดเลือกราที่มีศักยภาพผลิตเอนไซม์แลคเคสด้วยหมักแบบอาหารแข็ง

การคัดเลือกราที่มีศักยภาพผลิตเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดกระทำการทดลองโดยหาความสัมพันธ์ระหว่างราแต่ละชนิดและประเภทของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์สูงสุด ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรซึ่งได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ไร่ข้าวสาลี และซังข้าวโพด เป็นแหล่งคาร์บอน วัสดุเหล่านี้ทำให้แห้งโดยการผึ่งในบรรยากาศหลังจากนั้นวัสดุเหล่านี้บดให้มีขนาด 3.0 - 4.0 มิลลิเมตร

จากนั้นนำวัสดุแต่ละชนิดที่เตรียมไว้มา 5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมสารอาหารเสริม 11 มิลลิลิตร สารอาหารเสริมประกอบด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 3 กรัมต่อลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ CaCl_2 0.5 กรัมต่อลิตร แล้วจึงปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของวัสดุให้เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 M และทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ต่อมานำราที่เลี้ยงไว้บนอาหารฟิตีเอขนาดเส้นผ่าน

ศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร จำนวน 5 ชิ้น และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 11 วัน

จากนั้นทำการสกัดเอนไซม์แลคเคสโดยการเติม McIlvaine buffer (พีเอช 8.0) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในแต่ละชุดการทดลอง นำขวดรูปชมพู่ไปแช่ยาที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนใสที่ได้มา วิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ โดยราที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดได้รับคัดเลือกเป็นราที่มีศักยภาพผลิตเอนไซม์แลคเคสและใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.3 การศึกษาผลของปัจจัยในการผลิตเอนไซม์แลคเคส

การศึกษามูลของปัจจัยในการผลิตเอนไซม์แลคเคสของงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการทดลองแบบปัจจัยเดียว วิธีการนี้เป็นการหาผลของแต่ละปัจจัยทีละครั้ง เมื่อได้ค่าที่ดีที่สุดก็คงค่านั้นไว้แล้วทำการหาผลของปัจจัยชนิดต่อไป ทั้งนี้การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนต่อไป

โดยปัจจัยที่ใช้ในการทดลองนี้ ประกอบด้วย แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน พีเอช และอุณหภูมิ ซึ่งมีลำดับการดำเนินการตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปัจจัยและช่วงที่ใช้ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์จากรา

ลำดับ	ปัจจัย	ช่วงที่ใช้ในการศึกษา
1	แหล่งไนโตรเจน	แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ เปปโตน เคซีน โซเดียมไนเตรท สารสกัดจากยีสต์ และ สารสกัดจากเนื้อ
2	ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน	2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 4.5 กรัมต่อลิตร
3	พีเอชเริ่มต้นของสารอาหารเสริม(ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟูริก)	3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 และ 12.0
4	อุณหภูมิที่ใช้บ่ม	25, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส

สำหรับวิธีการเลี้ยงราเพื่อผลิตแลคเคสใช้วิธีการเพาะเลี้ยงหมักแบบอาหารแข็งตามขั้นตอนที่ 2.2 โดยใช้ฟางข้าว ชานอ้อย รำข้าวสาลี และซังข้าวโพด เป็นวัสดุ

2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แลคเคสด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แลคเคสใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง โดยใช้แผนการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นกัน ได้กำหนดตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร ซึ่งคัดเลือกตัวแปรจากปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในขั้นตอนที่ผ่านมา ผลการทดลองในขั้นตอนคัดเลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิ เป็นตัวแปรอิสระซึ่งกำหนดสัญลักษณ์ คือ X_1 , X_2 และ X_3 ตามลำดับ ตัวแปรอิสระกำหนดช่วงค่าการศึกษา 3 ระดับ โดยอาศัยช่วงของค่าที่เหมาะสมจากการทดลองแบบปัจจัยเดียวแสดงดังตารางที่ 2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับตัวแปรตามสามารถอธิบายได้ดังสมการการถดถอยของพื้นผิวการตอบสนอง (response surface regression: RSREG)

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

เมื่อ Y คือ การตอบสนอง (การผลิตเอนไซม์แลคเคส) β_0 , β_i ($i = 1, 2, 3$) และ β_{ij} ($i = 1, 2, 3; j = 1, 2, 3$) คือสัมประสิทธิ์ของโมเดล ส่วน X_i และ X_j คือตัวแปรอิสระ โดยใช้โปรแกรม Minitap 16 สำหรับวิเคราะห์ข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ANOVA ได้กำหนดนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 หรือระดับความเชื่อมั่นทาง สถิติ 95% และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ต่าง ๆ

2.5 วิธีวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส

การหากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสอาศัยหลักการออกซิเดชันของ ABTS โดยการตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบยูวี (UV spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) โดยนำน้ำส่วนใส 50 มิลลิลิตร มาเติม McIlvaine buffer (พีเอช 4.0) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 850 ไมโครลิตร และเติม ABTS เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยหนึ่งยูนิต (U)

ของกิจกรรมเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น (ABTS) ภายในเวลา 1 นาที

2.6 การระบุสายพันธุ์ของรา

การจัดจำแนกเชื้อราโดยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS (internal transcribed spacer) rRNA ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Moller et al. (1992) เมื่อได้ดีเอ็นเอของราแต่ละชนิด จะนำไปเพิ่มปริมาณส่วนของยีนบริเวณ ITS rDNA ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยอาศัยไพรเมอร์จำเพาะคือ ITS1 (5'-TCCGTAGGTAACCTGCGG - 3') และ ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATCG - 3')

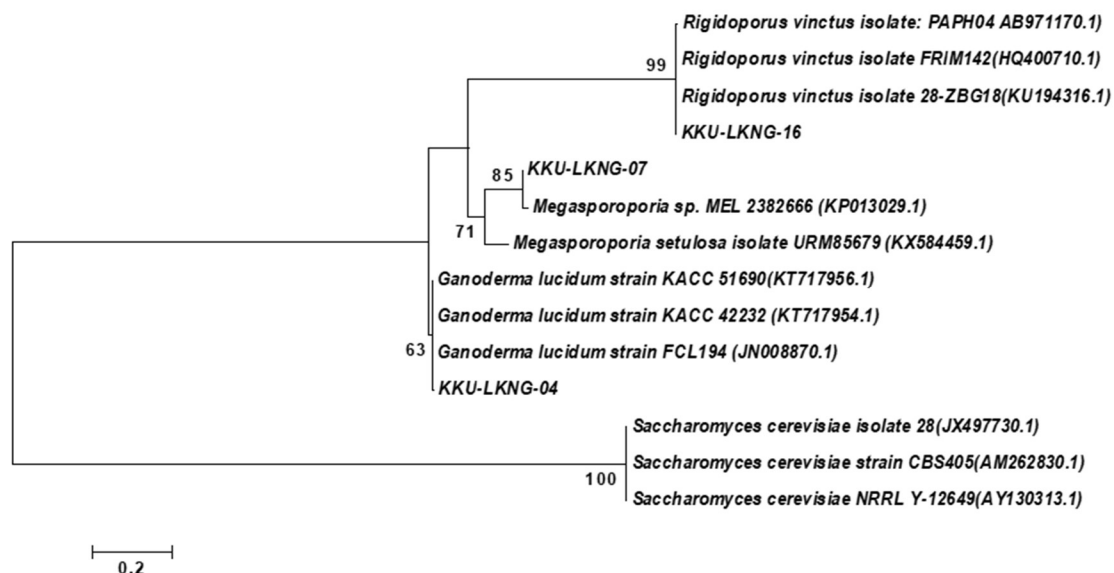
โดยปฏิกิริยาของพีซีอาร์ (PCR Reaction) เริ่มต้นด้วยขั้นตอน initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 30 รอบ ของขั้นตอน denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้ด้วย

วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเจลอะกาโรส นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาทำบริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์สำเร็จรูป (K0702, Thermo fisher, USA) แล้วจึงนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencer) โดย บริษัท First BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้นทำการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม CLUSTALX [16] นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank โดยโปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) และทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสายวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) เวอร์ชัน 5.2

3. ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

3.1 การคัดแยกและระบุสายพันธุ์ราที่ผลิตแลคเคสได้

การคัดแยกราจากเห็ดเพื่อนำมาทดสอบหาศักยภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคสด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ABTS พบว่ามีรา 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ที่ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ ซึ่งได้แก่ ตัวอย่างรา KKU-LKNG-04 KKU-



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ของสายวงศ์วานวิวัฒนาการสายพันธุ์ของตัวอย่างรา โดยใช้ ITS rRNA

LKNG-07 และ KKU-LKNG-16 โดยได้บันทึกในฐานข้อมูลชีวภาพ (Genbank) ของ DNA Data Bank of Japan เป็น DDBJ accession number LC269925, LC269926 และ

LC269928 ตามลำดับ

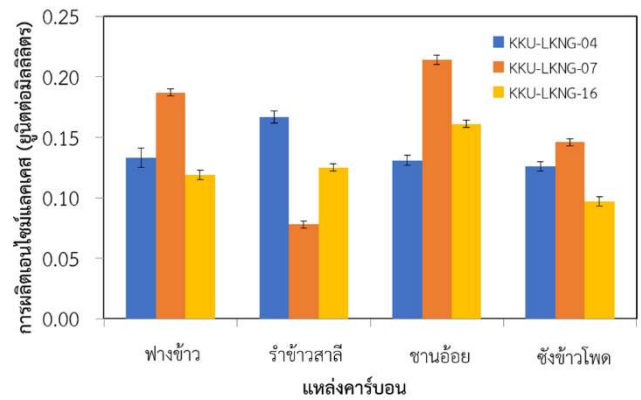
จากการบ่งชี้สายพันธุ์ด้วยเทคนิคอื่น ITS rRNA พบว่าราทั้ง 3 ตัวอย่าง คือ KKU-LKNG-04, KKU-LKNG-07 และ KKU-

LKNG-16 มีความคล้ายคลึง *Ganoderma lucidum*, *Megasporoporia* sp. และ *Rigidopolus vinctus* อยู่ที่ 99, 100 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังความสัมพันธ์ของสายวงศ์วานวิวัฒนาการด้วยการวิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการชาติพันธุ์ (Phylogenetic analysis) ของยีน ITS rRNA ที่แสดงในรูปที่ 1

ผลจากการศึกษาสามารถบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในการคัดแยกราจากป่า อาทิ อุทยานแห่งชาติลำคลองงู มาใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าอุทยานแห่งชาติลำคลองงูมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงเป็นเหตุให้พบราที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้หลายชนิด ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thongkred และคณะ [17] ซึ่งระบุว่าป่าในจังหวัดกาญจนบุรี มีราหลากหลายชนิดเช่นกัน

3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ราที่มีศักยภาพผลิตเอนไซม์แลคเคสด้วยวิธีการหมักแบบของแข็ง

การศึกษาเพื่อคัดเลือกรามีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคสเริ่มต้นจากการนำรา 3 สายพันธุ์ คือ *Ganoderma lucidum* KKU-LKNG-04, *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07 และ *Rigidopolus vinctus* KKU-LKNG-16 ไปเลี้ยงในอาหารด้วยการหมักแบบอาหารแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกันคือ ฟางข้าว ชานอ้อย รำข้าวสาลี และซังข้าวโพด พบว่าเมื่อสกัดเอนไซม์แลคเคสจากรา *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07 ด้วยชานอ้อยนั้น มีปริมาณเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดคือ 0.28 หน่วยต่อมิลลิกรัม แสดงดังรูปที่ 2 จากการทดลองนี้รา *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07 และชานอ้อยได้นำไปศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตเอนไซม์แลคเคสในขั้นตอนต่อไป จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Anwar และคณะ [18] พบว่าชานอ้อยมีสัดส่วนของลิกนิน (20%) มากกว่า ฟางข้าว รำข้าวสาลี และซังข้าวโพด ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของราและความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคส นอกจากนี้ Ferreira และคณะ [19] พบว่ารา *Aspergillus japonicus* สามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ 0.4 หน่วยต่อมิลลิกรัม และการที่ชานอ้อยมีสัดส่วนของลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic biomass) สูง ทำให้เราสามารถเจริญเติบโตได้ดี



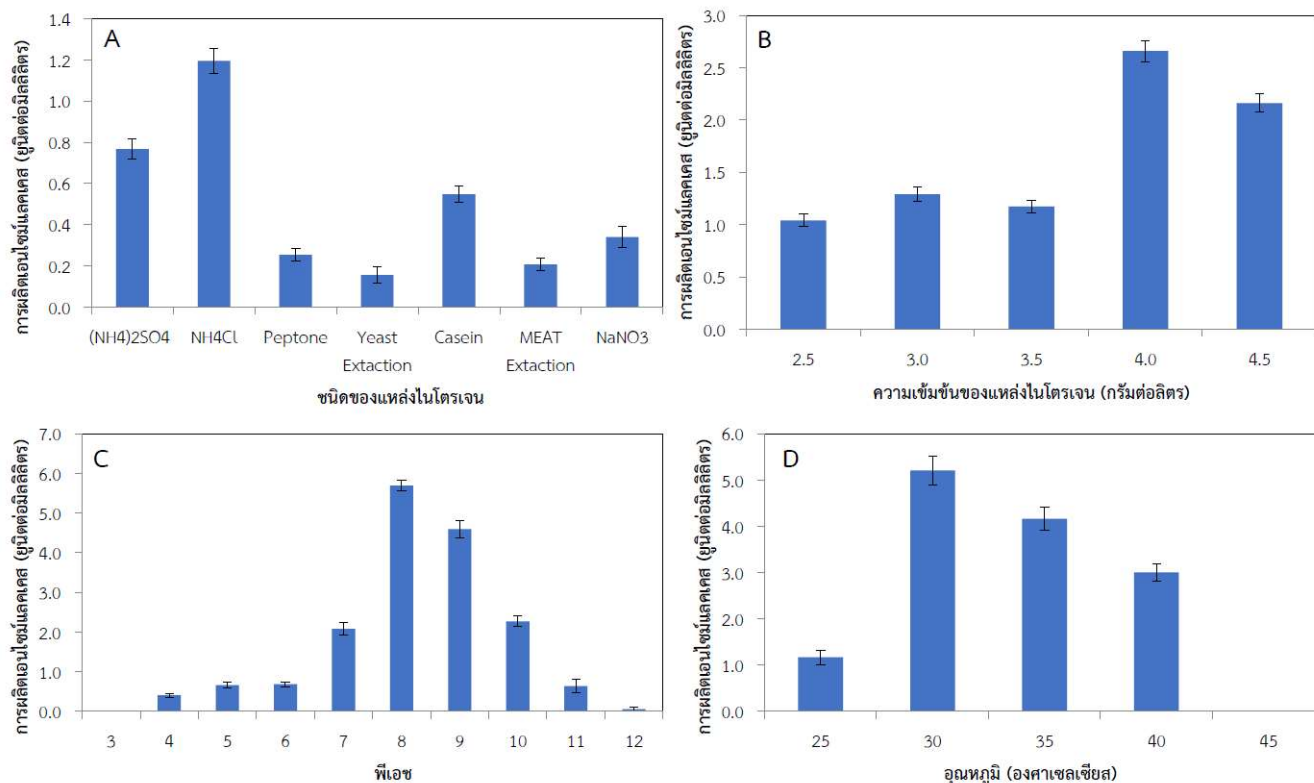
รูปที่ 2 ผลของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคส

3.3 การศึกษาผลของปัจจัยในการผลิตเอนไซม์แลคเคส

การศึกษาลักษณะของปัจจัยแบบปัจจัยเดียว (One factor at a time method) เพื่อหาผลของปัจจัยเบื้องต้นสำหรับผลิตเอนไซม์แลคเคส โดยขั้นแรกของการทดลองคือการศึกษอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคส ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ เปปโตน เคซีน โซเดียมไนเตรต สารสกัดจากยีสต์ และสารสกัดจากเนื้อ พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์แลคเคสสูงสุดคือ 1.20 หน่วยต่อมิลลิกรัม (รูปที่ 3A) ดังนั้นแอมโมเนียมคลอไรด์จึงถูกเลือกใช้สำหรับศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนสำหรับผลิตเอนไซม์แลคเคส ค่าความเข้มข้นที่ศึกษาคือ 2.5 ถึง 4.5 กรัมต่อลิตร และจากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เหมาะสมคือ 4.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณเอนไซม์แลคเคสสูงสุดที่ 2.66 หน่วยต่อมิลลิกรัม (รูปที่ 3B) หลังจากนั้นตามด้วยการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับผลิตเอนไซม์แลคเคส พบว่าพีเอช 8 มีผลทำให้เราสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสสูงสุดคือ 5.69 หน่วยต่อมิลลิกรัม (รูปที่ 3C) และสภาวะสุดท้ายเป็นการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจพบเอนไซม์แลคเคสสูงสุด 5.60 หน่วยต่อมิลลิกรัม (รูปที่ 3D) ซึ่งเห็นได้ว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นั้นเป็นค่าที่ใช้ตั้งแต่เริ่มต้นของการทดลองนี้ อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07 นั้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มรา Mesophile [20]

จากการศึกษาของ Zhu และคณะ [21] ได้รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนและมีความซับซ้อนของโมเลกุลนั้นทำให้ราเจริญได้ไม่ดีเท่าสารที่มีความซับซ้อนต่ำซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่มีสารสกัดจากยีสต์และสารสกัดจากเนื้อ ส่งผลให้การเจริญเติบโตได้ต่ำกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ส่วนค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของรา

Megasporoporia sp. KKU-LKNG-07 มีความคล้ายคลึงกับรา *Pleurotus* sp. จากการศึกษาของ Bhattacharya และคณะ [22] คือพีเอช 7.99 ในขณะที่ Nandal และคณะ [23] พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แลคเคสของรา *Corioloopsis caperata* อยู่ที่ 5.0



รูปที่ 3 ผลของปัจจัยต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคส (A) ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (B) ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (C) พีเอช และ (D) อุณหภูมิ

3.4 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคสโดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง

จากผลของปัจจัยต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสเห็นได้ว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยส่งผลให้ปริมาณแลคเคสมีค่าสูงขึ้นเรื่อยๆ หลังจากนั้นได้กำหนดพารามิเตอร์สำคัญ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคส โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ ได้แก่ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของสารอาหารและอุณหภูมิแสดงดังตารางที่ 2 การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นกันถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ผลของปัจจัยทั้งสาม การศึกษาครั้งนี้ได้มีปัจจัยทั้งหมด 3 ปัจจัย ได้แก่ X_1 คือความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน X_2 คือพีเอชเริ่มต้นของสารอาหาร และ X_3 คืออุณหภูมิ ซึ่งได้ชุดการทดลองทั้งหมดสิบห้าการทดลอง ผลการทดลองได้ดำเนินการเพื่อตรวจสอบ

ผลการผลิตเอนไซม์แลคเคส นอกจากนี้ค่าทำนายจะถูกคำนวณโดยใช้การวิเคราะห์การถดถอยของแต่ละชุดการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ปัจจัยและค่าที่ใช้สำหรับการออกแบบการทดลองโดยแบบบ็อกซ์-เบห์นกัน

ปัจจัย	สัญลักษณ์	ค่าระดับ		
		-1	0	+1
ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	X_1	3.5	4.0	4.5
พีเอชเริ่มต้นของสารอาหาร	X_2	7.0	8.0	9.0
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	X_3	25	30	35

ตารางที่ 3 ชุดการทดลองและค่าทำนายจาก 3 ปัจจัย ที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสโดยบ็อกซ์-เบห์นกิน

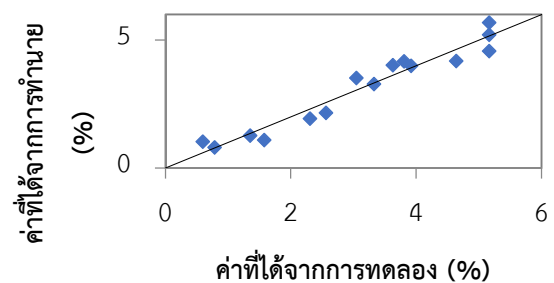
ชุดการทดลอง	ปัจจัย			การผลิตเอนไซม์แลคเคส (ยูนิตต่อมิลลิตร)	
	แหล่งไนโตรเจน (X_1)	พีเอช (X_2)	อุณหภูมิ (X_3)	ค่าจากการทดลอง	ค่าทำนาย
1	4	7	35	1.27	1.35
2	4.5	8	25	4.17	3.80
3	4	8	30	5.69	5.16
4	4	8	30	5.22	5.16
5	4	8	30	4.57	5.16
6	4.5	7	30	2.16	2.56
7	3.5	8	25	1.10	1.57
8	4	9	35	3.29	3.32
9	4.5	8	35	3.52	3.05
10	4	7	25	0.82	0.78
11	3.5	9	30	4.02	3.63
12	3.5	7	30	1.04	0.59
13	4.5	9	30	4.19	4.63
14	4	9	25	3.99	3.92
15	3.5	8	35	1.94	2.30

การวิเคราะห์การถดถอยทางสถิติโดย ANOVA แสดงในตารางที่ 4 จากตารางจะเห็นว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสอย่างมีนัยสำคัญ จะมีค่า p -value น้อยกว่า 0.05 ซึ่งได้แก่ X_1 X_2 X_1^2 X_2^2 และ X_3^2 เมื่อวิเคราะห์ค่า F ของ Lack of Fit ($F=1.54$) พบว่ามีค่าน้อยกว่าค่า F -Critical ของ Lack of Fit (19.16) และค่า p -value มีค่ามากกว่า 0.05 ($P=0.417$) ดังนั้นค่าความผิดพลาดต่อการทำนายของแบบจำลองนี้ไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือสมการและผลการทำนายมีความน่าเชื่อถือ

การคำนวณหาการผลิตเอนไซม์แลคเคสสามารถคำนวณได้โดยสมการ (2) และเมื่อเทียบผลการทดลองที่ได้กับค่าทำนายพบว่าค่าทั้งสองมีความใกล้เคียงกัน โดยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มีค่าเท่ากับ 0.9433 ซึ่งแสดงว่าแบบจำลองมีค่าความเชื่อมั่น 94.33% และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจปรับแก้ (adjusted R^2) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.8412 ซึ่งแสดงว่าแบบจำลองมีค่าความเชื่อมั่น 84.12 เปอร์เซ็นต์ ในการทำนายการตอบสนอง แสดงดังรูปที่ 4

$$Y = -259.45 + 41.27X_1 + 26.09X_2 + 4.64X_3 - 0.06X_2X_3 - 3.94X_1^2 - 1.32X_2^2 - 0.06X_3^2 - 0.48X_1X_2 - 0.15X_1X_3 \quad (2)$$

ผลของปัจจัยทั้งสามที่มีต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสแสดงในรูปที่ 5 จะเห็นได้ว่าการผลิตเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและพีเอชสูงขึ้น (ไนโตรเจนมากกว่า 4.0 กรัมต่อลิตร และ พีเอชมากกว่า 8.0) และผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคส พบว่าเมื่อเลี้ยงราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้เราสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ดีที่สุด



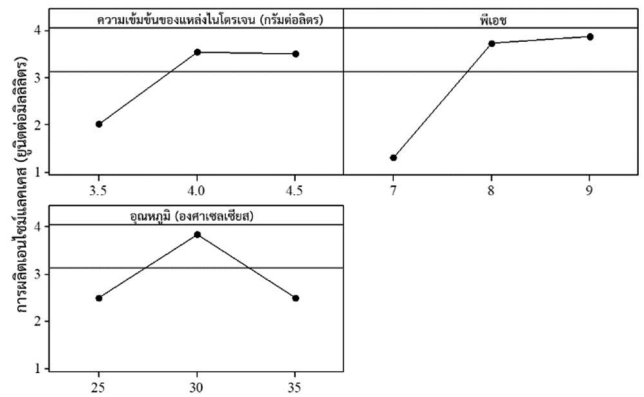
รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ของสัมประสิทธิ์การถดถอยจากการทดลองและการทำนายด้วยสมการ

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์การถดถอยโดยการทดลองจาก บ็อกซ์-เบนกิน

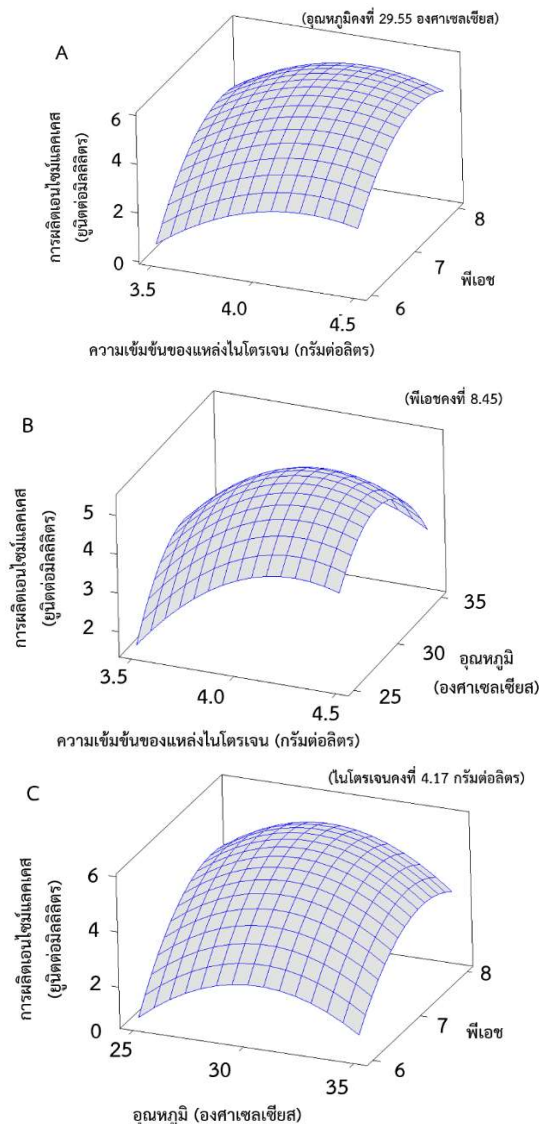
Source	Sum of Squares	DF	Mean squares	F-value	P-value
Model	34.53	9	3.84	9.24	0.012*
X ₁	4.42	1	4.42	10.61	0.022*
X ₂	13.04	1	13.04	31.40	0.003*
X ₃	<0.01	1	<0.01	<0.01	0.977
X ₁ X ₂	0.23	1	0.23	0.55	0.492
X ₁ X ₃	0.56	1	0.56	1.34	0.300
X ₂ X ₃	0.33	1	0.33	0.80	0.411
X ₁ ²	2.29	1	3.58	8.61	0.032*
X ₂ ²	5.42	1	6.46	15.57	0.011*
X ₃ ²	8.24	1	8.24	19.85	0.007*
Residual	2.08	5	0.42		
Lack of Fit	1.45	3	0.48	1.54	0.417
Pure Error	0.63	2	0.31		
Cor Total	36.61	14			

หมายเหตุ: R² = 0.9433, Adjust R² = 0.8412, Std. Dev. = 0.64 * P < 0.05 = Significant

ผลของปัจจัยที่มีต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อรา *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07 โดยพื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคส โดยความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและค่าพีเอชแสดงในรูปที่ 6A พบว่าในช่วงของความเข้มข้นไนโตรเจน 3.8 - 4.5 กรัมต่อลิตร และพีเอชมีค่าระหว่าง 7.9-9.0 ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์แลคเคสมากกว่า 5.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในส่วนของรูปที่ 6B แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและอุณหภูมิ พบว่าการผลิตเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้นเป็น 5.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในช่วงของความเข้มข้นไนโตรเจน 3.9-4.4 กรัม และอุณหภูมิ 27.5-32.0 องศาเซลเซียส และความสัมพันธ์ของอุณหภูมิกับพีเอช แสดงดังรูปที่ 6C โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 27.5-32.0 องศาเซลเซียส และพีเอช 8.0-9.0 ทำให้การผลิตเอนไซม์แลคเคสมีค่ามากกว่า 5.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร

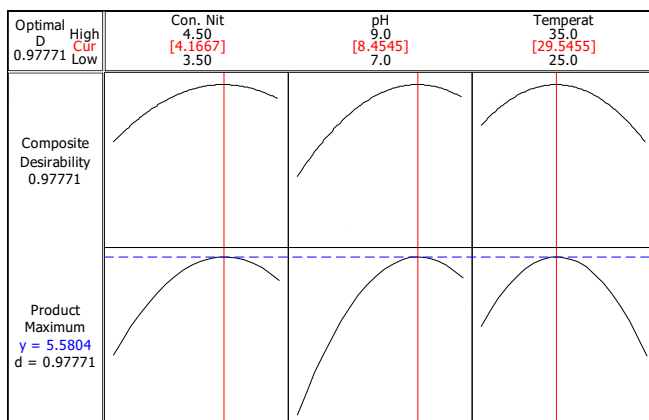


รูปที่5 ผลของปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคส



รูปที่6 (A) ความสัมพันธ์ของไนโตรเจนและพีเอช (B) ความสัมพันธ์ของไนโตรเจนและอุณหภูมิ (C) ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและพีเอช บนพื้นผิวตอบสนองสามมิติ ต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสของรา *Megasporoporia* sp. KKU-LKNG-07

สภาวะการผลิตเอนไซม์แลคเคสที่เหมาะสมตามที่คาดการณ์ต่อ คือความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 4.17 กรัมต่อลิตร พีเอช 8.45 และ อุณหภูมิ 29.55 องศาเซลเซียส ทำให้การผลิตเอนไซม์แลคเคสสูงสุดที่ 5.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 7 อย่างไรก็ตามเมื่อนำค่าสภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้ไปใช้ในการเลี้ยงรา *Megasporoporia sp.* KKU-LKNG-07 พบว่าสามารถทำให้ราผลิตเอนไซม์แลคเคสอยู่ที่ 5.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ทำนายไว้ ผลการทดลองนี้ชี้ชัดว่าปัจจัยที่ศึกษาเป็นปัจจัยที่มีต่อการผลิตแลคเคสอย่างชัดเจน รวมทั้งการใช้หลักการทางสถิติช่วยให้สามารถทำนายสภาวะเพาะเลี้ยงราซึ่งผลิตเอนไซม์แลคเคสได้อย่างแม่นยำ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนี้เป็นประโยชน์ในอนาคตหากมีการขยายเป็นระดับการผลิตเพื่อการพาณิชย์



รูปที่ 7 ค่าการทำนายสภาวะที่เหมาะสมของสามปัจจัยต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสของรา *Megasporoporia sp.* KKU-LKNG-07

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์กับงานวิจัยในอดีต จากการศึกษาที่ผ่านมา Senthivelan และคณะ [24] ได้ทำการศึกษาลักษณะที่เหมาะสมของรา *Penicillium chrysogenum* ในการผลิตเอนไซม์แลคเคสโดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง พบว่าเมื่อทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงราจะทำให้เราสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ 3.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Levin และคณะ [25] ได้เลี้ยงราที่สภาวะที่เหมาะสม โดยสามารถตรวจพบแลคเคส 0.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยภาพรวมจากผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสามารถกล่าวได้ว่าเอนไซม์จากราในการศึกษานี้มีปริมาณสูง ดังนั้นในการนำรานี้ไปใช้งานเพื่อผลิตเอนไซม์แลคเคสในอนาคตมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

4. สรุปผลการศึกษา

ตัวอย่างที่เด็ดจากอุทยานแห่งชาติลำคลองงู จ.กาญจนบุรี ประเทศไทย ทั้งหมด 28 ตัวอย่าง เมื่อทำการเลี้ยงราจากตัวอย่างที่เจดจนบุรีสุทธิ และนำไปคัดแยกที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสพบว่ามีรา 3 ชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สามารถระบุสายพันธุ์ของเรา คือ *Ganoderma lucidum* KKU-LKNG-04, *Megasporoporia sp.* KKU-LKNG-07 และ *Rigidoporus vinctus* KKU-LKNG-16 เมื่อนำราทั้งสามสายพันธุ์ไปเลี้ยงด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็งโดยปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอน เพื่อหาความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคส พบว่าเมื่อเลี้ยงรา *Megasporoporia sp.* KKU-LKNG-07 โดยใช้ขานอ้อยผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่า 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เมื่อหาปัจจัยที่มีผลและการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้วิธีแบบปัจจัยเดียวและวิธีการพื้นผิวตอบสนองแบบบล็อกซ์-เบห์นกินแบบ 3 ปัจจัย พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคส คือ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 4.17 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอช 8.45 และอุณหภูมิ 29.55 องศาเซลเซียส การผลิตแลคเคสที่ทำนายจากโปรแกรมและทดสอบจริง (5.58 และ 5.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) มีค่าใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามในอนาคตควรมีงานต่อเนื่องในประเด็นการนำเอนไซม์นี้ทดสอบประยุกต์ใช้งานในลักษณะต่าง ๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย (ศสอ.) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์วิจัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและสารอันตราย คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- [1] Sutjaritvorakul T, Permpoonsinsup W, Srigobue P, Koomsubsiri A. The Study of Seasonal and Climate Changes on Macrofungi Biodiversity in the Community Forest at Sai Yok District, Kanchanaburi Province, Thailand. *International*

- Journal of Agricultural Technology*. 2017; 13(3):425–31.
- [2] Khayeng H. Local knowledge of Ethnic Groups on Termite Mushroom Conservation at BRT Research Reports 2007. 2007;444–9.
- [3] Nopparat C, Jatupornpipat M, Rittiboon A. Isolation of Phosphate Solubilizing Fungi in Soil From Kanchanaburi, Thailand. *KMITL Science and Technology Journal*. 2007 ;7:137–46.
- [4] Zheng F, An Q, Meng G, Wu XJ, Dai YC, Si J, et al. A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification, characterization, and application. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017 ;102:758–70.
- [5] Kulikova NA, Klein OI, Stepanova E V., Koroleva O V. Use of basidiomycetes in industrial waste processing and utilization technologies: Fundamental and applied aspects (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011 ;47(6):565–79.
- [6] Baldrian P. Fungal laccases- occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006 ;30(2):215–42.
- [7] Onsarn A, Ratanapongleka K. Effect of Environmental Conditions and Kinetics of Laccase on Dicofol Removal. *Engineering Journal Chiang Mai University*. 2019 ;26(3):12–24.
- [8] Yang J, Xu X, Ng TB, Lin J, Ye X. Laccase gene family in *Cerrena* sp. HYB07: Sequences, heterologous expression and transcriptional analysis. *Molecules*. 2016;21(8).
- [9] Lee H, Jang Y, Choi YS, Kim MJ, Lee J, Lee H, et al. Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs. *Journal of Microbiological Methods*. 2014;97(1):56–62.
- [10] Torres-Duarte C, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R. Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system. *Chemosphere*. 2009 ;77(5):687–92.
- [11] Ratanapongleka K, Phetsom J. Decolorization of Synthetic Dyes by Crude Laccase from *Lentinus Polychrous* Lev. *International Journal of Chemical Engineering*. 2014 ;5(1):26–30.
- [12] Senthivelan T, Kanagaraj J, Panda RC. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco- friendly approach - A review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2016 ;21(1):19–38.
- [13] Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gomez S de J, Díaz-Godínez G, Augur C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 2003 ;13(2–3):157–67.
- [14] Jaber SM, Kalsom U, Shah M, Zuriyati A, Asa' ari M, Ariff AB. Optimization of Laccase Production by Locally Isolated *Trichoderma muroiana* IS1037 Using Rubber Wood Dust as Substrate. *BioResources*. 2017 ;12(2):3834–49.
- [15] Moller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*. 1992 ;20(22):6115–6.
- [16] Cázares- García SV, Vázquez- Garcidueñas MS, Vázquez-Marrufo G. Structural and Phylogenetic Analysis of Laccases from *Trichoderma*: A Bioinformatic Approach. *PLoS One*. 2013 ;8(1).
- [17] Thongkred P, Lotrakul P, Prasongsuk S, Imai T, Punnapayak H. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a tropical isolate of *Pycnoporus coccineus* and its laccase. *ScienceAsia*. 2011 ;37(3):225–33.
- [18] Anwar Z, Gulfraz M, Irshad M. Agro- industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio- energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2014 ;7(2):163–73.
- [19] Ferreira FL, Dall' Antonia CB, Shiga EA, Alvim LJ, Pessoni RAB. Sugarcane bagasse as a source of

carbon for enzyme production by filamentous fungi. *Hoehnea*. 2018 ;45(1):129–33.

- [20] Kumar R, Kaur J, Jain S, Kumar A. Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2016 ;14(1):125–31.
- [21] Zhu C, Bao G, Huang S. Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ACCC 52857) induced through yeast extract and copper. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2016 ;30(2):270–6.
- [22] Bhattacharya SS, Garlapati VK, Banerjee R. Optimization of laccase production using response surface methodology coupled with differential evolution. *New Biotechnology*. 2011 ;28(1):31–9.
- [23] Nandal P, Ravella SR, Kuhad RC. Laccase production by *Coriolopsis caperata* RCK2011: Optimization under solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. *Scientific Reports*. 2013 ;3:1–7.
- [24] Senthivelan T, Kanagaraj J, Panda RC, Narayani T. Screening and production of a potential extracellular fungal laccase from *Penicillium chrysogenum*: Media optimization by response surface methodology (RSM) and central composite rotatable design (CCRD) . *Biotechnology Reports*. 2019 ;23:e00344.
- [25] Levin L, Herrmann C, Papinutti VL. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 2008 ;39(1):207–14.