รายงานฉบับสมบูรณ์

การผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อราและการนำไปประยุกต์ใช้ในการฟอกย้อมสีผม (ส่วนที่ 1)

Production of melanin-bleaching enzyme by microorganism and its application in human hair melanin decolorization (part-I)

โดย

รศ. ดร. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2559

(ความเห็นของรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัยเรื่อง การผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อราและการนำไปประยุกต์ใช้ในการฟอกย้อมสีผม (ส่วนที่ 1) Production of melanin-bleaching enzyme by microorganism and its application in human hair melanin decolorization (part-I) ได้รับอนุมัติเงินงบประมาณปีพ.ศ. 2559 เป็นเงิน 300,000 บาท โดยแบ่งเป็นงบดำเนินการสำหรับนักวิจัยเป็นเงิน 272,800 บาท งบสาธารณูปโภคสำหรับมหาวิทยาลัยเป็นเงิน 13,600 บาท งบสาธารณูปโภคสำหรับคณะวิทยาศาสตร์เป็นเงิน 13,600 บาท โครงการวิจัยนี้ดำเนินแล้วเสร็จภายในปีงบประมาณและสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ ทั้งนี้ได้ส่งผลงานวิจัยเพื่อการตีพิมพ์เผยแพร่ระดับชาติในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือและสถานที่ในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ให้การสนับสนุนงบประมาณการทำวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างสูง

รศ. ดร. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมการฟอกสีเมลานินจากตัวอย่างดิน อากาศ น้ำเสีย และเส้นผม รวมทั้งหมด 13 ตัวอย่าง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-30 วัน สามารถคัดแยกเชื้อที่สามารถฟอกสีเมลานินโดยให้บริเวณใสรอบๆ โคโลนีจำนวน 7 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลทคือ ไอโซเลท MA3, MS1, MS2, และ MH1 และเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท MA1, MA2, และ MA4 เมื่อทำการคัดเลือกพบว่าไอโซเลท MA4 มีค่า enzyme activity ratios สูงสุดเท่ากับ 2.04 นำเชื้อราไอโซเลท MA4 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 18S rRNA sequencing และวิเคราะห์เปรียบเทียบหาลำดับเบสที่เหมือนกันที่สุดโดยใช้ BLAST search สามารถจัดจำแนกเชื้อราไอโซเลท MA4 เป็น *Aspergillus flavus* MA4

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งและกระบวนการหมักแบบอาหารเหลวพบว่าเอ็นไซม์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (35.29 units/ml) มีกิจกรรมสูงกว่าเอนไซม์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว (1.08 units/ml) สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คือ ปริมาณขี้เลื่อยและกัวอีคอลที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium คือ 11 กรัม และ 3.0 มิลลิกรัมตามลำดับ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ภายใต้สภาวะการผลิตที่เหมาะสมเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 41.54 units/ml ผลการทดลองที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการขยายขนาดการผลิตเพื่อนำเอนไซม์ฟอกสีเมลานินนำไปใช้ประโยชน์ในการฟอกย้อมสีผมต่อไป

คำสำคัญ เมลานิน เอนไซม์ฟอกสีเมลานิน เชื้อราที่สร้างเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน

Abstract

A total of 13 samples of soil, air, wastewater and human hair were collected and isolated for microbial activity to decolorize melanin. The samples were plated on melanin agar medium, incubated 37 ^{o}C for 7-30 days. It was found that only four of bacteria (MA3, MS1, MS2, and MH1) and three of fungi (MA1, MA2, and MA4) had ability to decolorize the pigment showing clear zone around the colony. After screening, isolate MA4 was the most promising of fungi that provide highest enzyme activity ratio at 2.04. Under morphology study, 18S rRNA sequencing and alignment of DNA using BLAST search, isolate MA4 was identified as *Aspergillus flavus* MA4

Comparison study between production of enzyme-bleaching enzyme using solid state fermentation and submerge fermentation, results showed that the enzyme which produced by this strain using solid state fermentation process provided higher activity than from submerged fermentation process. It was found that the optimum concentration of sawdust and guaicol in sawdust medium for enzyme production were 11 gram and 3.0 milligram, respectively. The initial pH of the medium was 6.0. The culture medium was incubated at 30^{o}C for 3 days. Under optimum condition, the fungus could produce melanin-bleaching enzyme with greatest activity at 41.54 units/ml. Results suggest the possibility of enlarge scale for enzyme production and industrial application

Key words Melanin, melanin-bleaching enzyme, melanin- bleaching enzyme producing fungi

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เส้นผมของคนเราประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน เมลานินและน้ำ (Franbourg and Leroy, 2005) โดยพบว่า 90% ของน้ำหนักผมแห้งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนที่เรียกว่า เคราทิน (keratin) ซึ่งประกอบด้วยซิสเทอีนเป็นจำนวนมาก ผมของคนเรายังประกอบด้วยน้ำประมาณ 10% ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการปรับแต่งคุณสมบัติทางกลของเส้นผม และผมยังประกอบด้วยเม็ดสีหรือเมลานิน (melanin) ปริมาณ 3% ซึ่งจะอยู่ในชั้นกลาง (cortex) ของเส้นผม ทำให้เส้นผมมีสีตามธรรมชาติและเชื้อชาติ (Nagasaki et al., 2008)

ปัจจุบันการย้อมสีผมหรือการเปลี่ยนสีผมเป็นแฟชั่นที่ทุกคนยอมรับเพราะเกี่ยวข้องกับความสวยงามและการเสริมบุคลิกภาพ ซึ่งการเปลี่ยนสีผมนั้นอาจเกิดขึ้นจากหลายเหตุผลด้วยกันคือ บางคนอาจจะเปลี่ยนเพราะปกปิดผมขาว หรือเปลี่ยนเพราะไม่ชอบสีผมเดิม หรืออาจจะเปลี่ยนเพื่อให้เข้ากับบุคลิกของตนเอง หรือบางคนอาจเปลี่ยนตามแฟชั่นตามสมัยนิยม ในการย้อมสีผมจะต้องมีการฟอกสีผมก่อนการย้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งผมของชาวเอเชีย ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ทำให้ย้อมติดสีได้ยาก ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการฟอกสีผมหรือการฟอกสีเมลานินในเส้นผมเพื่อให้สีผมอ่อนลง เพื่อให้ย้อมติดสีย้อมตามต้องการ ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ย้อมผมจะประกอบด้วยสารเคมีที่ใช้สำหรับการฟอกสีผม ได้แก่

1. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) มีสูตรทางเคมีคือ H_2O_2 ทำหน้าที่หลัก 2 ประการ คือ 1) เป็นสารฟอกสี (bleaching หรือ lightening agent) ทำหน้าที่ทำลายเม็ดสีผมหรือเมลานิน ทำให้เส้นผมมีสีอ่อนลง และ 2) เป็นสารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) ทำหน้าที่ปลดปล่อยออกซิเจน เพื่อทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสีย้อมผม ทำให้สีย้อมติดกับผมได้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ผลิตภัณฑ์ย้อมผมไม่ควรมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากกว่า 6% หากผลิตภัณฑ์ใดมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณมากหรือใช้โดยไม่มีการเจือจางจะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อหนังศีรษะ และทำให้เส้นผมแห้งเสียได้

2. แอมโมเนีย (Ammonia) มีสูตรทางเคมีคือ NH_3 เป็นสารที่มีกลิ่นฉุน มีความเป็นด่างสูง จะเป็นส่วนผสมในครีมสี โดยอยู่ในรูปของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ มีฤทธิ์กัดกร่อน ทำให้ชั้นนอก (cuticle) ของเส้นผมเกิดการบวมพองและแตกออก ทำให้สารฟอกสีและสีย้อมซึมผ่านเข้าไปได้ผมชั้นกลาง (cortex) ทำให้สีย้อมติดเส้นผมดีขึ้น เนื่องจากสามารถกัดกร่อนเส้นผมและหนังศีรษะได้ จึงเป็นเหตุให้ผมเสีย รากผมอ่อนแอ ผมร่วง และยังก่อให้การระคายเคืองต่อผิวหนัง ระบบทางเดินหายใจและตาอีกด้วย

ดังจะเห็นได้ว่าการฟอกสีผมด้วยสารเคมีดังกล่าวข้างต้นเป็นการทำลายสุขภาพของเส้นผมอย่างรุนแรง เพราะเป็นการทำลายทั้งเมลานิน โปรตีนเคราทินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเส้นผม รวมทั้งทำลายหนังศีรษะอีกด้วย และยังอาจเกิดอาการแพ้ตามมาเช่น การระคายเคืองต่อหนังศีรษะ ระบบทางเดินหายใจและตา (Nagasaki et al., 2008) ดังนั้น วิธีการฟอกสีผมโดยวิธีทางธรรมชาติ อ่อนโยนต่อเส้นผม ลดการแพ้และระคายเคืองที่เกิดจากสารเคมี จึงเป็นเรื่องหนึ่งที่ได้รับความสนใจ โดยเฉพาะการใช้สารสกัดจากธรรมชาติ อย่างเช่น เอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (melanin-bleaching enzyme) ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายซับสเตรทหรือเมลานินแต่เพียงอย่างเดียว ไม่ทำลายโปรตีนเคราทินและไม่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงอื่นๆ รวมทั้งเส้นผมยังมีคุณภาพที่ดีกว่าการฟอกด้วยสารเคมีอีกด้วย

การฟอกสีเมลานินด้วยเอนไซม์ได้รับความสนใจอย่างมากในด้านการประยุกต์ใช้ทางด้านความสวยความงามและเครื่องสำอาง Woo และคณะ (2004) พบว่าเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* สามารถฟอกสีเมลานินสังเคราะห์ได้ และสามารถนำไปประยุกต์เพื่อพัฒนาเป็นสารเพิ่มความกระจ่างใสในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ Mohorčič และคณะ (2007) คัดแยกเชื้อ *Sporotrichum pruinosum* ซึ่งสังเคราะห์เอนไซม์ฟอกสีเมลานินที่สามารถย่อยสลายเมลานินที่ผิวหนังได้ ในขณะเดียวกัน Nagasaki และคณะ (2008) พบว่า *Ceriporiopsis* sp. MD-1 ที่คัดแยกจากดินในป่าสามารถ

สังเคราะห์เอนไซม์ฟอกสีเมลานินในเส้นผมได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกและคัดเลือกเชื้อราจากแหล่งธรรมชาติที่มีความสามารถฟอกสีเมลานิน พัฒนากระบวนการหมักและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการขยายขนาดการผลิต เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีคุณภาพและราคาถูก สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีในการฟอกสีผมและพัฒนาต่อยอดสู่การพัฒนาเครื่องสำอางกระจ่างใสและผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับเส้นผมที่ยั่งยืนต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกและคัดเลือกเชื้อราจากแหล่งธรรมชาติที่มีความสามารถในการฟอกสีเมลานิน
2. เพื่อจัดจำแนกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการฟอกสีเมลานิน
3. เพื่อศึกษากระบวนการหมักและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) มีสูตรทางเคมีคือ H_2O_2 เป็นสารประกอบเพอร์ออกไซด์ (สารที่ประกอบด้วยออกซิเจนสองตัวและเชื่อมกันด้วยพันธะเดี่ยว) รูปแบบที่ง่ายที่สุด มีสภาพเป็นของเหลวใส หนืดกว่าน้ำเล็กน้อย มีรสขม ไม่อยู่ตัว ซึ่งสามารถสลายตัวเป็นออกซิเจนกับน้ำ เมื่อเจือจางจะเป็นสารละลายไม่มีสี เนื่องจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์สามารถสลายตัวเป็นน้ำได้เมื่อถูกแสงและความร้อน จึงควรเก็บรักษาสารชนิดนี้ไว้ในภาชนะทึบแสง (http://www.rmutphysics.com/charud/naturemystery/sci2/hydrogen/hydrogen6.htm) โดยทั่วไปไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะอยู่ในรูปสารละลายความเข้มข้นตั้งแต่ 3–90% มักใช้เป็นสารฟอกสีในอาหาร สารทำความสะอาด น้ำยาฆ่าเชื้อ ใช้ฆ่าเชื้อโรคบนผิวหนัง ใช้ล้างภาพสีน้ำมันเก่า ๆ ให้สดใสขึ้น ทำน้ำยาบ้วนปาก และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เข้มข้น 90% สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงขับเคลื่อนจรวด การใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ล้างแผล จะใช้ในฐานะยาที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้ออ่อน ๆ เฉพาะที่ เช่น บาดแผลเล็ก ๆ แต่อาจเกิดผลข้างเคียงจากความเป็นพิษ (cytotoxic) ซึ่งรบกวนการสมานแผล ทำให้แผลแสบ และระคายเคือง ดังนั้น จึงควรใช้สารชนิดนี้ในกรณีจำเป็นเท่านั้น (http://narcotic.fda.moph.go.th) นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารฟอกขาวในภาคอุตสาหกรรมฟอกย้อม ซึ่งสามารถใช้ได้ดีกับเส้นใยเกือบทุกชนิด พร้อมทั้งเกิดอันตรายต่อเส้นใยน้อยที่สุด ทำให้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า "สารฟอกขาวสากล" (Universal bleaching agent) การฟอกขาวด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต้องใช้โซเดียมซิลิเกต (Na_2SiO_3) ควบคุมการสลายตัว นอกจากใช้ฟอกเส้นใยแล้ว ยังใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ฟอกงาช้าง และขนนก และอาจใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นสารแอนติคลอร์ (antichlor) ซึ่งใช้ทำลายคลอรีนที่ตกค้างบนเส้นใยหลังผ่านการใช้คลอรีนฟอกขาว (บุญยิ่ง, 2546)

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ย้อมสีผม สามารถใช้ฟอกเส้นผม โดยการนำสารชนิดนี้ไปผสมกับสารชนิดอื่น จนให้สารละลายผสมมีฤทธิ์เป็นด่าง แล้วนำมาฟอกผม จะทำให้เส้นผมมีสีอ่อนลง ง่ายต่อการเปลี่ยนสีผม และยังทำให้สีที่ต้องการย้อมติดกับผมได้ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ยังมีส่วนผสมอยู่ในน้ำยาโกรกผม ซึ่งในยาย้อมผมไม่ควรมีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เกิน 6% แต่ที่พบในท้องตลาดมีตั้งแต่ 3–40% ซึ่งหากใช้โดยไม่มีการเจือจางจะทำให้เกิดอาการระคายเคืองหนังศีรษะ และเส้นผมอาจถูกทำลายได้ ถ้าร่างกายได้รับสารไฮโดนเจนเพอร์ออกไซด์มากเกินกว่าปริมาณที่กำหนดจะทำให้เกิดอาการแพ้ ระคายเคืองกับบริเวณที่สัมผัส เมื่อสัมผัสถูกตา เกิดอาการระคายเคือง ตาแดง ปวดตา สายตาอาจพร่ามัว และอาจทำให้ตาบอดได้ หากผู้บริโภคใช้เป็นประจำ อาจก่อให้เกิดการสะสมและเป็นสาเหตุของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองได้ (De Sanjose et al., 2006) ดังนั้น การใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมาทดแทนการฟอกสีผมด้วยสารเคมี จึงเป็นที่ต้องการใน

อุตสาหกรรมยาย้อมผมเพิ่มมากยิ่งขึ้น เพราะนอกจากจะช่วยแก้ปัญหาในเรื่องของการแพ้ ลดการสะสมสารเคมี ลดปัญหาสุขภาพแล้ว การใช้ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพจะช่วยสร้างภาพลักษณ์ที่ดีต่อผลิตภัณฑ์ย้อมผมดังกล่าวอีกด้วย ดังนั้น การคัดแยกหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน รวมทั้งเทคนิคการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ได้แก่ กระบวนการหมักที่เหมาะสม การพัฒนาสูตรอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ และนำเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นนี้มาให้ทดแทนไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในผลิตภัณฑ์ย้อมสีผม งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง จะทำให้ได้เอนไซม์ที่มีต้นทุนการผลิตที่มีราคาถูก มีความคุ้มทุนในการพัฒนาต่อยอดเพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เป็นการลดการนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศ และยังเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพ เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมไทยแบบยั่งยืนต่อไปในอนาคต

2. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

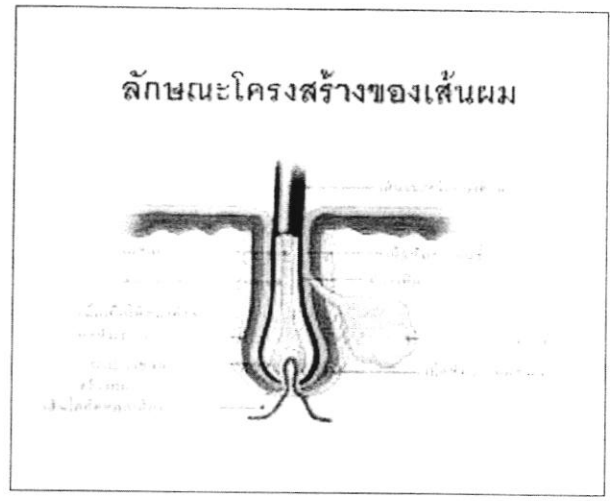
2.1 โครงสร้างของเส้นผมและเมลานิน

เส้นผมของคนเราประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน เมลานินและน้ำ (Franboury and Leroy, 2005) โดยมีสัดส่วนดังนี้ 1) โปรตีนในส้นผมหรือเรียกว่าเคราทิน (keratin) ซึ่งมีมากกว่า 90% ของน้ำหนักแห้งของเส้นผม ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยซิสเทอีนเรสซิดิว 2) น้ำ 10% ของน้ำหนักแห้งของเส้นผม และ 3) เมลานิน 3% ของน้ำหนักแห้งของเส้นผม (Nagasaki et al., 2008) โครงสร้างภายในเส้นผมจะแบ่งเป็น 3 ส่วน และมีผิวผมที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มอยู่ด้านนอกสุด โครงสร้างภายในดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2 ดังนี้

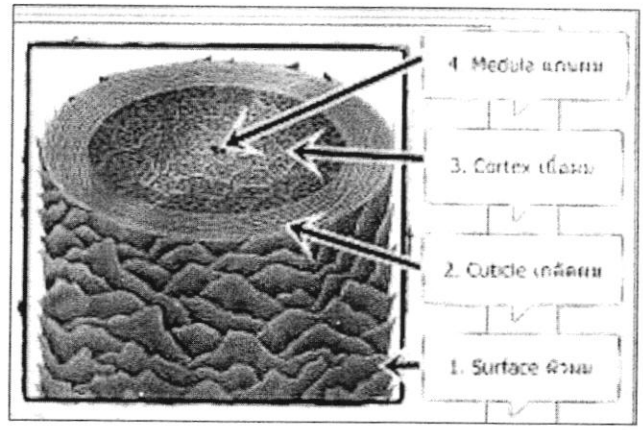
1. ผมชั้นนอกหรือเกล็ดผม (Cuticle) เกล็ดผมประกอบด้วยโปรตีนที่มีลักษณะซ้อนกันอยู่เป็นวงรอบเส้นผมคล้ายเกล็ดปลาซ้อนกันประมาณ 8-10 ชั้น เกล็ดผมไม่มีสี เป็นเซลล์ใสๆ ไม่มีสี โปร่งแสง ช่วยป้องกันการซึมผ่านของสิ่งสกปรกที่จะเข้าไปทำลายเส้นผม และยังปกป้องชั้นผมไม่ให้สูญเสียความชุ่มชื้น เม็ดสีเมลานิน รวมถึงน้ำมันตามธรรมชาติ ซึ่งช่วยให้ผมดูเป็นเงา เกล็ดผมจะเปิดก็ต่อเมื่อมีความร้อน ความชื้น ทั้งจากธรรมชาติและสารเคมีบางตัวเข้ามาทำปฏิกิริยากับเส้นผม ผมที่สุขภาพดีเกล็ดผมจะปิดและเรียงตัวกันดี ส่วนผมที่เริ่มแห้งเสียเกล็ดผมจะฉีกขาดและไม่สามารถเรียงตัวปิดได้ ทำให้เกล็ดผมไม่สามารถปกป้องความชุ่มชื้นภายในและทำให้แห้งเสียเพิ่มขึ้นหากขาดการบำรุง (http://www.handbtoday.com/index.php)

2. ผมชั้นกลางหรือเนื้อผม (Cortex) เป็นชั้นที่มีเม็ดสีหรือรงควัตถุเมลานิน (Melanin) อยู่ การมีเมลานินอยู่ในเส้นผมชั้นกลางนี้จะทำให้เส้นผมมีสีไปตามเมลานินซึ่งถูกควบคุมด้วยสารพันธุกรรม ซึ่งเรียกว่าสีธรรมชาติของเส้นผม ซึ่งหากเม็ดสีนี้ลดน้อยลงหรือขาดเม็ดสีนี้ก็จะทำให้สีตามธรรมชาติจางลงหรือเกิดผมหงอกขาวขึ้นได้ การเปลี่ยนสีผมแบบใช้สารเคมีก็จะเป็นการทำให้เม็ดสีเหล่านี้เปลี่ยนแปลงนั่นเอง รวมถึงการดัดผมหรือการยืดผมก็ทำให้สารในผมชั้นกลางเปลี่ยนแปลงเช่นกัน (http://www.nsm.or.th/index.php)

3. ผมชั้นในหรือแกนผม (Medulla) เป็นชั้นที่อยู่ในสุดของเส้นผมหรือเรียกว่าแกนผม เกิดจากโปรตีนและไขมัน แกนผมไม่มีบทบาทในการทำงาน ส่วนมากจะพบในผมที่มีสภาพแข็งแรง และผมเส้นเล็กมักไม่มีแกนผม (http://www.handbtoday.com/index.php)



ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของเส้นผม (ที่มา : http://bergamotclub.com/index.php)

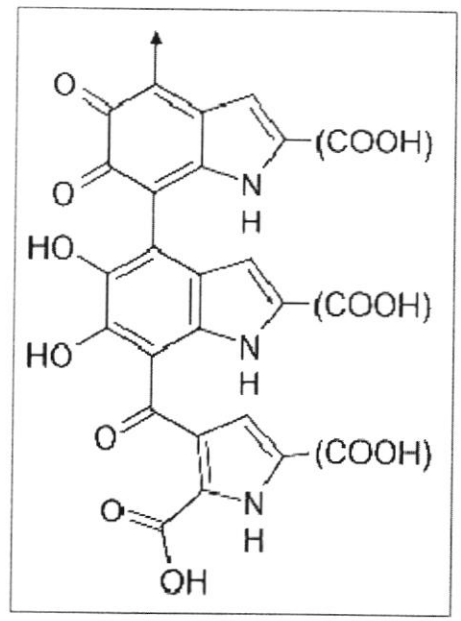


ภาพที่ 2 โครงสร้างภายในเส้นผม (ที่มา : http://topicstock.pantip.com)

เมลานิน (Melanin) เป็นรงควัตถุธรรมชาติสีดำหรือน้ำตาล เป็นสารพอลิเมอร์ที่พบทั่วไปในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ มีบทบาทหน้าที่หลายอย่างเช่น การปกป้องแสงแดด (photoprotection) การควบคุมอุณหภูมิ (thermoregulation) การดักจับอนุมูลอิสระ (free radical sinks) การดักจับแคทไอออน (cation chelators) และเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotics) เมลานินในจุลินทรีย์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการปกป้องเซลล์จากสภาวะกดดันหรือสภาวะไม่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียที่สังเคราะห์เมลานินจะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะมากขึ้น (Lin et al., 2005) สำหรับเมลานินของฟังไจจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ในการต้านทานต่อความแห้งแล้ง อุณหภูมิสูง รังสีอัลตร้าไวโอเลต ปกป้องเซลล์จากสารฆ่าเชื้อ และเอนไซม์ย่อยสลายต่างๆ และยังเกี่ยวข้องกับการก่อโรคในพืชอีกด้วย (Bulter and Day, 1998a) เมลานินในพืชจะมีความสำคัญในการทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้นเช่นกับเมลานินของแมลงจะเกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของเปลือกนอก (Riley, 1997) ในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มักพบเมลานินเป็นองค์ประกอบสำคัญของผิวหนังและเส้นผม โดยเมลานินมีหน้าที่หลักคือ จะช่วยดูดซับแสงที่มากเกินไปและช่วยปกป้องร่างกายจากการทำลายของรังสีอัลตร้าไวโอเลตจากแสงแดด (Henson, 2001) เมลานินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบ่งตามเฉดสีได้ 2 ชนิดคือ 1) Pheomelanin เป็นเมลานินที่มีเฉดสีเหลืองถึงสีแดง และ 2) Eumelanin เป็นเมลานินเฉดสีดำหรือน้ำตาล เป็นชนิดที่พบมาก

ที่สุดในร่างกายของมนุษย์ โดยเฉพาะที่เส้นผม (Riley, 1997) รวมทั้งที่ผิวหนัง ตา หูส่วนในและสมอง (Clancy and Simom, 2001)

เมลานินเป็นองค์ประกอบสำคัญในผมชั้นกลางหรือ cortex ซึ่งชนิดและปริมาณของเมลานินจะทำให้เส้นผมของแต่ละคนมีสีที่แตกต่างกัน เมลานินมีโมเลกุลขนาดใหญ่เกิดจากการปฏิกิริยาออกซิเดทีฟพอลิเมอร์ไรเซชันของฟีนอลและ/หรือสารประกอบอินโดล เมลานินออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้กว้างและหลากหลาย (Manivasagan et al., 2013) แม้ว่าโครงสร้างของเมลานินยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัด Prota (2000) ได้รายงานว่าเมลานินเป็นสารเฮตเทอโรจีนัสพอลิเมอร์ ประกอบด้วยสารจำพวกอินโดล (indole) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนซ์ สารเหล่านี้ได้แก่ 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone, 5-6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, และ indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid Woo และคณะ (2004) รายงานว่าเมลานินมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับลิกนิน (lignin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเซลล์พืชและถ่านหิน เนื่องจากประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลและอินโดลมาต่อกันเป็นพอลิเมอร์เช่นเดียวกัน ทั้งนี้โครงสร้างโมเลกุลของเมลานินแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลของเมลานิน (ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Melanin)

2.2 ผลิตภัณฑ์ย้อมผม

ผลิตภัณฑ์ย้อมผมหรือเปลี่ยนสีผมในท้องตลาด แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. ยาย้อมผมชนิดชั่วคราว ประกอบด้วยสีที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เวลาย้อมจะเคลือบบนชั้นนอกของเส้นผม ซึ่งสีนี้จะหลุดออกภายหลังจากการสระผมด้วยแชมพูเพียงครั้งหรือสองครั้ง ผลิตภัณฑ์ที่พบในท้องตลาด ได้แก่

- คัลเลอร์รินส์ (Color rinse) มีหลักการใช้โดยสระผม ซับน้ำให้แห้ง ทาคัลเลอร์รินส์ลงบนเส้นผม อาจเริ่มจากผมบริเวณท้ายทอย หวี หรือแปรงให้ทั่ว ไม่ต้องล้างออก หรืออาจทิ้งไว้ประมาณ 2-5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำอุ่น สเปรย์เบา ๆ ที่ผม ซึ่งทั้งนี้ต้องปฏิบัติตามวิธีใช้ของแต่ละตำรับ

- ดินสอทาสีผม (Hair crayons) ใช้สำหรับปกปิดเส้นผมที่เริ่มหงอกหรือตกแต่งผมที่งอกออกมาใหม่หลังการย้อม วิธีการใช้ทำโดยให้ปลายของแท่งดินสอนี้เปียกน้ำแล้วทาตลอดบนเส้นผมหงอก เริ่มตั้งแต่หนัง

ศีรษะ เนื่องจากดินสอทาสีผมประกอบด้วยไขมัน ดังนั้น การย้อมผมครั้งต่อไปต้องแน่ใจว่าล้างเอาไขมันออกจากเส้นผมหมดสิ้น

- สีพ่นสำหรับผม (Color sprays) มักบรรจุในกระป๋องฉีดพ่น มีสีเงิน สีทอง สำหรับใช้ในกรณีพิเศษ

2. ยาย้อมผมชนิดกึ่งถาวร ประกอบด้วยสีที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ซึ่งสามารถซึมเข้าไปถึงชั้นกลางของเส้นผมได้ สีจะคงทนได้นาน 3-5 สัปดาห์ ที่นิยมได้แก่ แชมพูย้อมสีผม โลชั่น โฟมย้อมสีผม

3. ยาย้อมผมชนิดถาวร ยาย้อมผมชนิดนี้ติดทนบนเส้นผม และทนต่อการสระด้วยแชมพู ซึ่งยาย้อมผมชนิดถาวรนี้มี 2 ชนิด คือ ยาเคลือบสีผม ซึ่งสีจะสะสมที่ชั้นนอกของเส้นผมเท่านั้น แบ่งออกเป็น

- สมุนไพรย้อมผม (Vegetable Dyes) สีจะเคลือบติดบนเส้นผมคงทน โดยมีผลต่อชั้นนอกสุดของเส้นผม แต่ไม่เปลี่ยนโครงสร้างของเส้นผม ได้แก่ ยาย้อมผมที่มีส่วนผสมของใบจากต้นเฮนนาให้สีทองและสีแดง

- เกลือโลหะย้อมผม (Metallic Dyes) ได้แก่ ยาเคลือบผมที่มีส่วนประกอบของตะกั่วอะซีเตต เชื่อว่าเกิดปฏิกิริยาระหว่างตะกั่วอะซีเตตและซัลเฟอร์ในเคราติน ทำให้เกิดตะกั่วซัลไฟด์เคลือบติดบนเส้นผม ต้องทาซ้ำ เพื่อให้ได้สีตามต้องการ

- สีผสม (Compounds dyes) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสมุนไพรย้อมผม และเกลือโลหะย้อมผม และอีกชนิดหนึ่งคือ ยาย้อมผมชนิดที่ซึมเข้าเส้นผม ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในการเปลี่ยนสีผม ยาย้อมผมชนิดนี้ประกอบด้วยน้ำยา 2 ส่วน ซึ่งอาจจะบรรจุในขวดหรือหลอดบีบ คือ

ส่วนที่ 1 ครีมสี เป็นของเหลวหรือครีม ซึ่งประกอบด้วยสีที่ใช้ในการเปลี่ยนสีผม ที่เรียกว่าสีออกซิเดชัน ได้แก่ พาราฟีนิลีนไดอะมีน (p-Phenylenediamine, PPD) และพาราโทลูอีนไดอะมีน (p-Toluenedia mine, PTD ซึ่งอยู่ในสภาวะด่างประมาณ 8-11 จากการเติมแอมโมเนีย (ammonia) ซึ่งจะทำให้ชั้นนอกของเส้นผมบวม พอง และแยกออก ทำให้สีซึมเข้าสู่ชั้นกลางของเส้นผม แต่ถ้าน้ำยาเป็นด่างมากจะละลายชั้นนอกของเส้นผม ทำให้ผมหยาบกระด้าง นอกจากนี้ยังมีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวที่ช่วยให้สีซึมเข้าเส้นผมได้ดี สารกลุ่มริซอร์ซินอล (resorcinol) เป็นสารที่เมื่อทำปฏิกิริยากับสีที่ถูกออกซิไดซ์แล้วจะได้สารที่มีโมเลกุลใหญ่ขึ้นเกิดเป็นสีเฉดต่าง ๆ และสารที่ทำให้ข้นเพื่อให้สีไม่ไหลออกจากเส้นผม

ส่วนที่ 2 น้ำยาโกรกหรือ developer ประกอบด้วย 6% ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ซึ่งทำหน้าที่ฟอกสีผมและออกซิไดซ์สีในขวดที่ 1 ให้เกิดสีย้อมผม หากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความเข้มข้นมากกว่า 6% จะทำลายเส้นผมและระคายเคืองหนังศีรษะ แต่ถ้าความเข้มข้นต่ำกว่านี้ก็จะไม่สามารถออกซิไดซ์สีพาราได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการใช้ยาย้อมผมชนิดนี้ต้องผสมน้ำยาทั้ง 2 ส่วนทันทีก่อนใช้ย้อมผม เพื่อให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ปล่อยออกซิเจนอิสระไปออกซิไดซ์สีให้เกิดสีสำหรับการเปลี่ยนสีผม

2.3 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Rättö และคณะ (2001) ศึกษาเชื้อรา 17 สายพันธุ์และแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์เกี่ยวกับประสิทธิภาพในการฟอกสีเมลานินที่สังเคราะห์จาก bluestain fungus *Aureobasidium pullulans* ซึ่งก่อปัญหากับไม้แปรรูปสำหรับการทำเฟอร์นิเจอร์ต่างๆ ทำให้คุณค่าทางเศรษฐกิจของไม้ลดลง จากการวิจัยพบว่าฟังไจ 4 สายพันธุ์ คือ *Bjerkandera adusta* VTT-D-99746, *Galactomyces geotrichum* VTT-D-84228, *Trametes hirsute* VTT-D-95443 และ *Trametes versicolor* VTT-D-99747 สามารถฟอกสีเมลานินบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้ และจะมีประสิทธิภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัดมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารสมบูรณ์ พบว่ากิจกรรมการฟอกสีเมลานินของ *G. geotrichum* อยู่บนไมซีเลียมและขับออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ

Woo และคณะ (2004) ศึกษาการฟอกสีเมลานินโดยใช้เอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) ที่สกัดจาก white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* ปฏิกิริยาการฟอกสีแสดง

ความสัมพันธ์ Michaelis-Mentens ในเรื่องเกี่ยวกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาและความเข้มข้นของซับสเตรต 2 ชนิดคือ เมลานินและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ค่าคงที่ของพลจนศาสตร์เมื่อใช้เมลานินเป็นซับสเตรตคือ V_{max} เท่ากับ 0.1 OD_{475}/min และค่า K_m เท่ากับ 99.7 mg/L ส่วนค่าคงที่ของพลจนศาสตร์เมื่อใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นซับสเตรตคือ V_{max} เท่ากับ 0.08 OD_{475}/min และค่า K_m เท่ากับ 504.9 mg/L การไม่เติมไฮโดรเจนเพอร์ ออกไซด์ลงในปฏิกิริยาจะมีผลต่อการฟอกสี แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มีความจำเป็นต่อการเกิดปฏิกิริยา

Mohorčič และคณะ (2007) คัดเลือกเชื้อราจากดินและอากาศที่มีกิจกรรมการย่อยสลายเมลานินและพบว่า *Sporotrichum pruinosum* เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการฟอกสีเมลานินสังเคราะห์ คณะผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงโดยกระบวนการหมักด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในสภาวะที่มีอากาศเพื่อผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมี Mn^{2+} เป็นส่วนประกอบสำคัญ ต้องเติมแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่จำกัดและพบว่า Zn^{2+} เป็นสารยับยั้งการผลิตเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์แบบกวน (stirred bioreactor) ที่ต้องการการตรึงไมซีเลียมและใช้ความเร็วต่ำสุดในการกวน คณะผู้วิจัยได้นำเอนไซม์ที่มีบริสุทธิ์ส่วนมาทดสอบการฟอกสีของ skin corneocytes และส่วนอิพิเดอร์มิสทั้งหมดของ prototype III และ IV งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการฟอกสีเมลานินของผิวหนังและความเป็นไปได้ในใช้เอนไซม์ฟอกสีเมลานินในเครื่องสำอางผิวกระจ่างใส

Nagasaki และคณะ (2008) ได้คัดแยกเชื้อ *Ceriporiopsis* sp. ได้จากดินในป่า สามารถสังเคราะห์เอ็กตร้าเซลลูลาเอนไซม์ (extracellular enzymes) ที่สามารถฟอกสีเมลานินของเส้นผมมนุษย์ได้ จากการศึกษาส่วนของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์ประกอบด้วย 3 ส่วนเอนไซม์คือ E1, E2-1, และ E2-2 เอนไซม์ต้องการไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมในการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์นี้ยังสามารถออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลอื่นๆ เช่น quaiacol ยกเว้น 3,4-dimethoxybenzyl alcohol ค่าสเปกตร้าของเอนไซม์ทั้งสามชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 406 nm แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เหล่านี้มีฮีม (heme) เป็นองค์ประกอบ

Khammuang และ Sarnthima (2013) ศึกษาการฟอกสีเมลานินสังเคราะห์โดยเอนไซม์หยาบของแลคเคส (crude laccase) ที่สังเคราะห์โดย *Lentinus polychrous* ในสภาวะที่มีและไม่มีตัวกลางรีด็อกซ์ (redox mediators) ผลการวิจัยพบว่ากิจกรรมฟอกสีเมลานินมีค่าเท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ที่พีเอชเท่ากับ 6.5 ภายในเวลา 3 ชั่วโมงในสภาวะที่มี 2,2-azinobis (3-ethybenzothiazoline-6-sulfonate) diammonium salt (ABTS) ส่วนในสภาวะที่ไม่มีตัวกลางรีด็อกซ์จะมีกิจกรรมฟอกสีเมลานินเพียง 22 เปอร์เซ็นต์ที่พีเอชเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมในสภาวะที่ไม่มีและมีตัวกลาง ABTS มีค่าเท่ากับ 55 และ 35 องศาเซลเซียสตามลำดับ การใช้ตัวกลางรีด็อกซ์ธรรมชาติวานิลลิน (vanillin) ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 mmol/L ทำให้กิจกรรมฟอกสีเมลานินมีค่าเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์

US Patent 2006/0051305 A1, US Patent 2009/0041692 A1 และ EP1583512 B3 ได้ใช้เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ไอโซไซม์เอสวันที่บริสุทธิ์ (lignin peroxidase isozyme H1; LiP H1) จากเชื้อรา *Phanerochate chrysosporium* มาใช้ในการฟอกสีเมลานิน พบว่าเอนไซม์ LiP H1 สามารถลดสีเมลานินได้อย่างชัดเจนที่ระดับความเข้มข้น 0.4-0.5 mM และในปฏิกิริยาต้องมี veratal alcohol (1.5 mM) และไฮโดรเจนเพอร์ออไวด์ (700 mM) ร่วมอยู่ด้วย

US Patent 2006/0051305 A1, US Patent 2009//0041692 A1 และ EP1583512 B3 ได้ใช้เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ไอโซไซม์เอสวันที่บริสุทธิ์ (lignin peroxidase isozyme H1; LiP H1) จากเชื้อรา *Phanerochate chrysosporium* มาเป็นส่วนผสมในครีมหมักผม เมื่อใช้สารละลายด่างเปิดเกล็ดผมแล้ว

นำครีมหมักผมดังกล่าวมาฟอกสีผมในหลอดทดลอง พบว่าสีผมจางลงอย่างชัดเจน ภายในเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับสีผมที่ไม่ได้ฟอกด้วยเอนไซม์ดังกล่าว

3. วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อจากตัวอย่างและการทำเชื้อให้บริสุทธิ์

ทำการเก็บตัวอย่างจากดินตามบริเวณโคนต้นไม้ใหญ่ โดยใช้พลั่วตักดิน ขุดลึกจากผิวดินลงไป 5-10 เซนติเมตร ใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาด รัดยางปากถุงให้แน่น เมื่อนำกลับมาห้องปฏิบัติการ นำมาอบให้ตัวอย่างแห้ง บดให้ละเอียดร่อนด้วยตะแกรงและเก็บในภาชนะที่มิดชิด สำหรับตัวอย่างเส้นผมและน้ำเสียให้เก็บใส่ภาชนะที่สะอาดปลอดเชื้อพร้อมติดฉลากชนิดของตัวอย่าง วัน-เวลาและสถานที่เก็บ ทำการเจือจางลำดับส่วนด้วย normal saline solution (0.85% NaCl) ปลอดเชื้อ เลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสมมาทำการ spread plate บนอาหาร melanin agar medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-30 วัน จนกว่าจะเห็นโคโลนีและบริเวณใส สำหรับตัวอย่างอากาศให้วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium บริเวณกลางห้องที่ต้องการเก็บตัวอย่าง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-30 วัน จนกว่าจะเห็นโคโลนีและบริเวณใส ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี cross streak technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมที่ไม่เติมเมลานิน ทำซ้ำจนเชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มหน้าวุ้นเอียง ให้เททับด้วย 20% glycerol (sterile) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์เอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (Screening of melanin-bleaching enzyme producing microorganisms)

นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมที่ไม่ได้เติมเมลานิน บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน จนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ cork border no. 5 เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญ นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเมลานินสังเคราะห์เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน โดยสังเกตดูวงใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อทุกวัน ทำการบันทึกข้อมูลจำนวนวันที่เกิดวงใสและขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น คำนวณหาอัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity ratios) คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่มีอัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity ratios) สูงสุดเพื่อการทดลองต่อไป

$$\text{Enzyme activity ratios} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี}}$$

3. การจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล

เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงชนิดหรือชื่อวิทยาศาสตร์ของจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์เอนไซม์ฟอกสีเมลานิน โดยอาศัยการตรวจดูลักษณะของเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แล้วเปรียบเทียบลักษณะกับเอกสารอ้างอิงมาตรฐานเชื้อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มและใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสของเชื้อจุลินทรีย์ในฐานข้อมูลสากล โดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราบน malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 วัน ทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อราโดยใช้ E.Z.N.A. Forensic DNA isolation Kit (Ormega Bio-Tek) และนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยาโพลีเมอร์เรสเชนรีเอกชั่น (Polymerase Chain Reaction; PCR) โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นดี

ในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้ปฏิกิริยาผสมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM of each primer (ITS5 and ITS4) และ 1U *Taq* DNA polymerase อุณหภูมิที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ เริ่มต้นด้วยอุณหภูมิ initial denaturation ที่ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยวงรอบอุณหภูมิ 35 วงรอบที่ประกอบด้วย 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1:30 นาที ตามด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปส่องดูภายใต้ ultraviolet (UV) transilluminator จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง automated DNA sequence (Macrogen Inc., Korea) แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ 18S rRNA gene sequence ในฐานข้อมูลของ EMBL database โดยใช้ BLAST search

4. กระบวนการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ระหว่างการหมักแบบ submerged fermentation ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin production medium (Mohurčiv et al., 2007) และการหมักแบบ solid state fermentation ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium กระบวนหมักที่เชื้อสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ได้มากที่สุดจะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

4.1 กระบวนการหมักแบบ submerged fermentation

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบน malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เตรียมสปอร์ซัสเพ็นชันด้วย 0.1% Tween 80 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปรับความเข้มข้นของสปอร์ซัสเพ็นชันให้เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเพาะสปอร์ซัสเพ็นชัน 1 เปอร์เซ็นต์ลงใน enzyme production medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พีเอชเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วทำการสกัดเอนไซม์โดยการกรองผ่าน black ribbon แล้วนำสารละลายที่กรองได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อัตราความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสหรือเอนไซม์หยาบที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (Nakasaki et al., 2008)

4.2 กระบวนการหมักแบบ solid state fermentation

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบน malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เตรียมสปอร์ซัสเพ็นชันด้วย 0.1% Tween 80 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปรับความเข้มข้นของสปอร์ซัสเพ็นชันให้เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเพาะสปอร์ซัสเพ็นชัน 1 เปอร์เซ็นต์ลงใน sawdust medium ปริมาตร 10 มิลลิกรัม ปรับความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายเกลือแร่ที่มีพีเอชเท่ากับ 6.0 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอนไซม์ด้วย 0.2 M acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นนำมากรองผ่าน black ribbon นำสารละลายที่กรองได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อัตราความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสหรือเอนไซม์หยาบที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (Nakasaki et al., 2008)

5. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน

จากผลการทดลองในข้อ 4 พบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation จึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยกระบวนการหมักดังกล่าว

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

5.1 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบน malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เตรียมสปอร์ซัสเพ็นชันด้วย 0.1% Tween 80 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปรับความเข้มข้นของสปอร์ซัสเพ็นชันให้เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเพาะสปอร์ซัสเพ็นชัน 1 เปอร์เซ็นต์ลงใน sawdust medium ปริมาตร 10 มิลลิกรัม ปรับความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายเกลือแร่ที่มีพีเอชเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 และ 9.0 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอนไซม์ด้วย 0.2 M acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นนำมากรองผ่าน black ribbon นำสารละลายที่กรองได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อัตราความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสหรือเอนไซม์หยาบที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (Nakasaki et al., 2008)

5.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบน malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เตรียมสปอร์ซัสเพ็นชันด้วย 0.1% Tween 80 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปรับความเข้มข้นของสปอร์ซัสเพ็นชันให้เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเพาะสปอร์ซัสเพ็นชัน 1 เปอร์เซ็นต์ลงใน sawdust medium ปริมาตร 10 มิลลิกรัม ปรับความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายเกลือแร่ที่มีพีเอชเท่ากับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 35 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอนไซม์ด้วย 0.2 M acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นนำมากรองผ่าน black ribbon นำสารละลายที่กรองได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อัตราความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสหรือเอนไซม์หยาบที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (Nakasaki et al., 2008)

5.3 ช่วงเวลาที่เหมาะสม

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบน malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เตรียมสปอร์ซัสเพ็นชันด้วย 0.1% Tween 80 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปรับความเข้มข้นของสปอร์ซัสเพ็นชันให้เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเพาะสปอร์ซัสเพ็นชัน 1 เปอร์เซ็นต์ลงใน sawdust medium ปริมาตร 10 มิลลิกรัม ปรับความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายเกลือแร่ที่มีพีเอชเท่ากับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5.2 เป็นเวลา 3, 5, 7 และ 9 วัน เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอนไซม์ด้วย 0.2 M acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นนำมากรองผ่าน black ribbon เก็บตัวอย่างชีวมวลและนำสารละลายที่กรองได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อัตราความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสหรือเอนไซม์หยาบที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (Nakasaki et al., 2008)

5.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบน malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เตรียมสปอร์ซัสเพ็นชันด้วย 0.1% Tween 80 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปรับความเข้มข้นของสปอร์ซัสเพ็นชันให้เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเพาะสปอร์ซัสเพ็นชัน 1 เปอร์เซ็นต์ลงใน sawdust medium ที่มีปริมาณขี้เลื่อยระดับต่างๆ คือ 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ 15 กรัมต่อลิตร ปรับความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายเกลือแร่ที่มีพีเอชเท่ากับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5.2 เป็นเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 5.3 เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอนไซม์ด้วย 0.2 M acetate

buffer pH 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นนำมากรองผ่าน black ribbon นำสารละลายที่กรองได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อัตราความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสหรือเอนไซม์หยาบที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (Nakasaki et al., 2008)

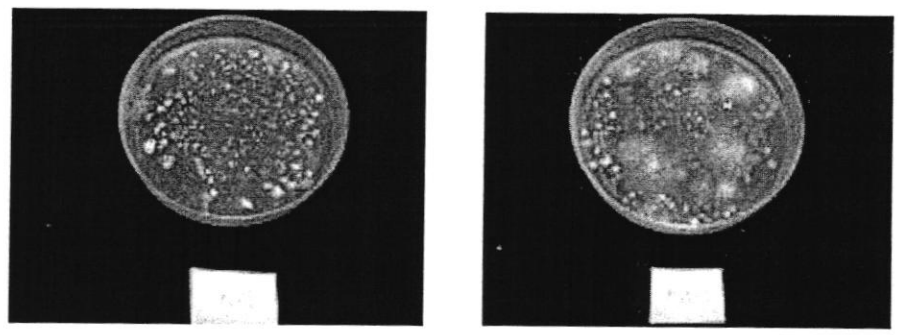
5.5 ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเหนี่ยวนำ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบน malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เตรียมสปอร์ซัสเพ็นชันด้วย 0.1% Tween 80 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปรับความเข้มข้นของสปอร์ซัสเพ็นชันให้เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเพาะสปอร์ซัสเพ็นชัน 1 เปอร์เซ็นต์ลงใน sawdust medium ที่มีขี้เลื่อยปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 6.5 และมีปริมาณ guaiacol ระดับต่างๆ คือ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายเกลือแร่ที่มีพีเอชเท่ากับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5.2 เป็นเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 5.3 เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอนไซม์ด้วย 0.2 M acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นนำมากรองผ่าน black ribbon นำสารละลายที่กรองได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อัตราความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสหรือเอนไซม์หยาบที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (Nakasaki et al., 2008)

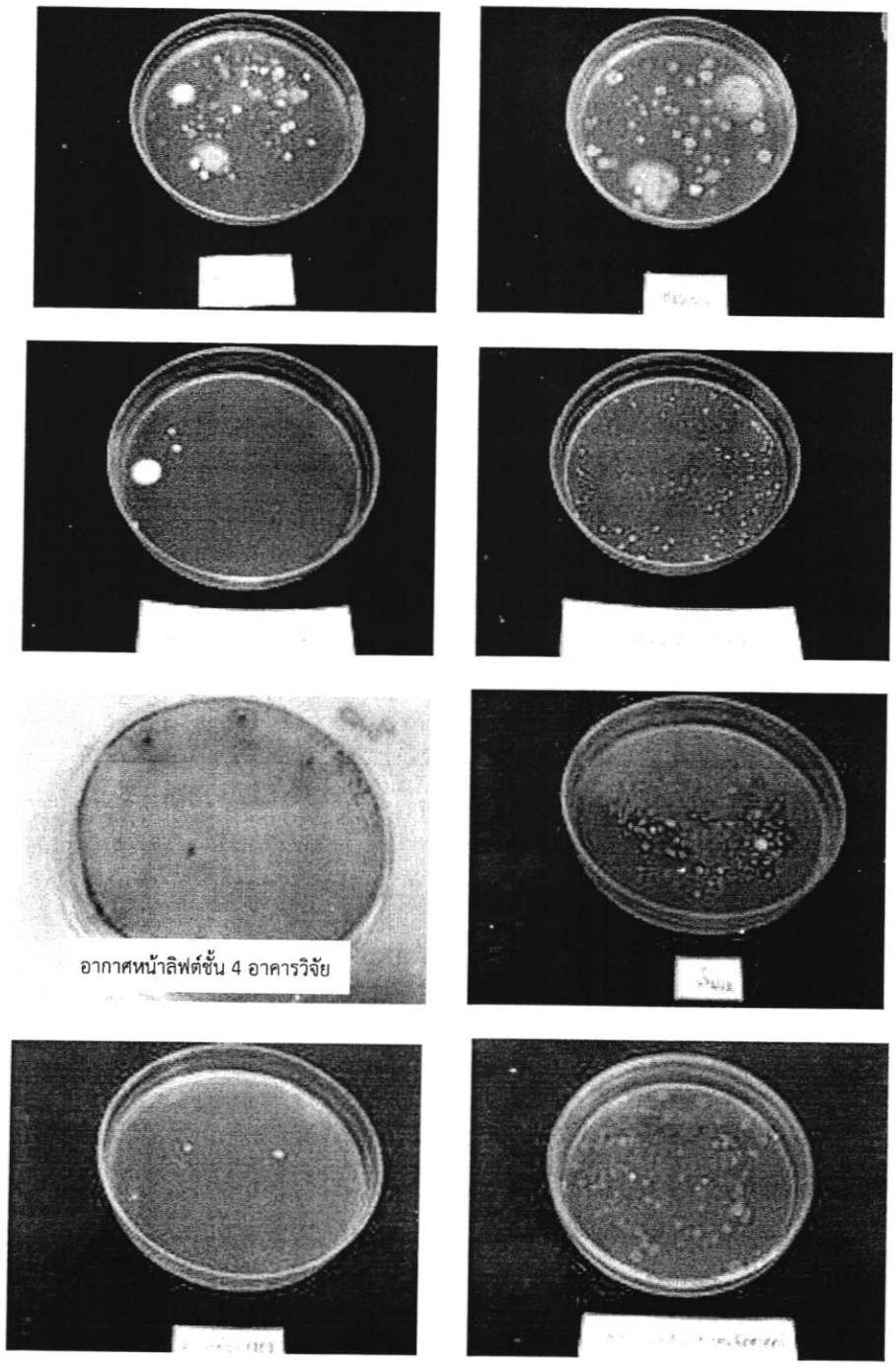
4. ผลการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถฟอกสีเมลานิน (Isolation of melanin-bleaching microorganisms)

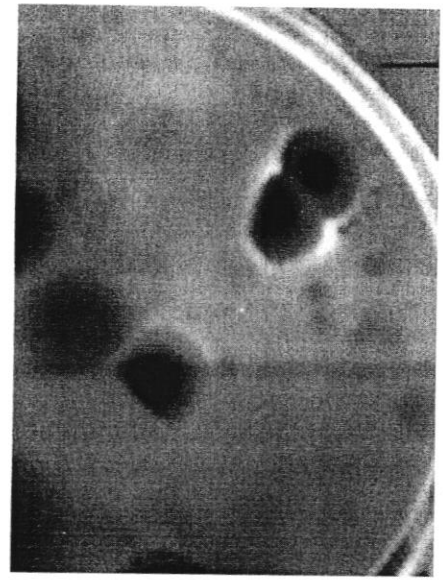
ทำการเก็บตัวอย่างในบริเวณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ได้แก่ตัวอย่างดินบริเวโคนต้นไม้ใหญ่ ตัวอย่างอากาศ ตัวอย่างน้ำเสีย และตัวอย่างเส้นผม รวมทั้งหมด 13 ตัวอย่าง มาทำการแยกเชื้อบนอาหาร melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-30 วัน ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อที่ให้บริเวณใสได้จำนวน 7 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลทคือ ไอโซเลท MA3, MS1, MS2, และ MH1 และเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท MA1, MA2, และ MA4 ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 4 เก็บสายพันธุ์ที่บริสุทธิ์เพื่อการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยอาหาร Melanin agar medium บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4 (ต่อ)



ภาพที่ 5 ลักษณะการเกิดบริเวณใสของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 1 ไอโซเลทที่สร้างบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

รหัสเชื้อ	ชนิดเชื้อจุลินทรีย์	แหล่งตัวอย่าง
MA-1	รา	อากาศหน้าลิฟต์อาคารวิจัย
MA-2	รา	อากาศหน้า SC458
MA-3	แบคทีเรีย	อากาศภายใน SC458
MA-4	รา	อากาศภายใน SC458
MS-1	แบคทีเรีย	ดินบริเวณโคนต้นมะม่วง
MS-2	แบคทีเรีย	ดินบริเวณโคนต้นทองกราว
MH-1	แบคทีเรีย	เส้นผม

2. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์เอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (Screening of microorganism producing melanin-bleaching enzyme)

นำเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 7 ไอโซเลทที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยสังเกตดูวงใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อทุกวัน ทำการบันทึกข้อมูลการเกิดวงใสและขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น คำนวณหาอัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity ratios) ผลการทดลองพบว่าไอโซเลท MA4 มีค่า enzyme activity ratios สูงสุดเท่ากับ 2.04 ในระยะเวลา 3 วัน รองลงมาคือไอโซเลท MA1 มีค่า enzyme activity ratios สูงสุดเท่ากับ 1.45 ในระยะเวลา 4 วัน ดังแสดงในตารางที่ 2-8 จึงคัดเลือกไอโซเลท MA4 เพื่อการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและ enzyme activity ratios ของเชื้อราไอโซเลท MA1 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน

เวลา (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)	Enzyme activity ratios
1	0	0.83	0
2	1.98	1.8	1.1
3	3.13	2.58	1.21
4	3.85	2.65	1.45
5	4.02	3.15	1.27
6	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND

ND = ไม่สามารถวัดได้เนื่องจากเชื้อเจริญเต็มพื้นที่

Enzyme activity ratios = อัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์

ตารางที่ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและ enzyme activity ratios ของเชื้อราไอโซเลท MA2 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน

เวลา (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)	Enzyme activity ratios
1	0	1.33	0
2	0	1.93	0
3	0	2.00	0
4	0	2.60	0
5	0	3.58	0
6	0	4.93	0
7	0	5.23	0

Enzyme activity ratios = อัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์

ตารางที่ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและ enzyme activity ratios ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MA3 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน

เวลา (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)	Enzyme activity ratios
1	0	0.65	0
2	0	0.83	0
3	0	1.05	0
4	0	1.15	0
5	0	1.20	0
6	0	1.35	0
7	0	1.48	0

Enzyme activity ratios = อัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์

ตารางที่ 5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและ enzyme activity ratios ของเชื้อราไอโซเลท MA4 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน

เวลา (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)	Enzyme activity ratios
1	0	0.63	0
2	1.53	0.95	1.61
3	3.12	1.53	2.04
4	3.78	2.55	1.48
5	4.35	3.35	1.30
6	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND

ND = ไม่สามารถวัดได้เนื่องจากเชื้อเจริญเต็มพื้นที่

Enzyme activity ratios = อัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์

ตารางที่ 6 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและ enzyme activity ratios ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MS1 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน

เวลา (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)	Enzyme activity ratios
1	0	0.63	0
2	0	0.75	0
3	0	0.83	0
4	0	1.0	0
5	0	1.25	0
6	0	1.35	0
7	0	1.48	0

Enzyme activity ratios = อัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์

ตารางที่ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและ enzyme activity ratios ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MS2 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน

เวลา (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)	Enzyme activity ratios
1	0	0.55	0
2	0	0.59	0
3	0	0.60	0
4	0	0.78	0
5	0	0.85	0
6	0	1.00	0
7	0	1.23	0

Enzyme activity ratios = อัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์

ตารางที่ 8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและ enzyme activity ratios ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MH3 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน

เวลา (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)	Enzyme activity ratios
1	0	0.60	0
2	0	0.75	0
3	0	0.83	0
4	0	1.08	0
5	0	1.50	0
6	0	1.98	0
7	0	2.23	0

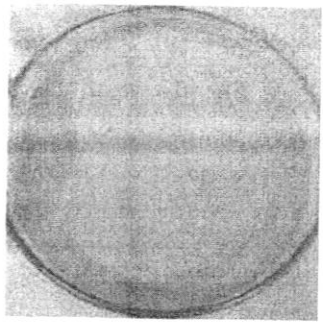
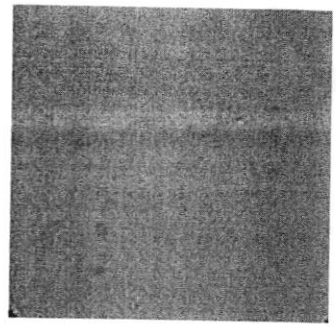
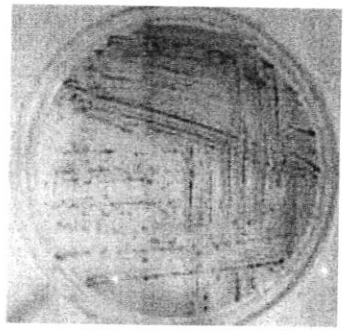
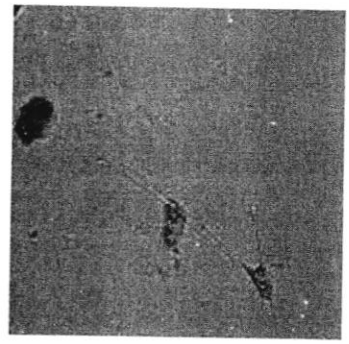
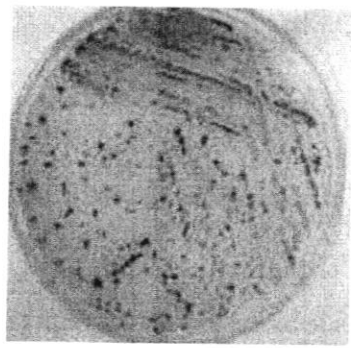
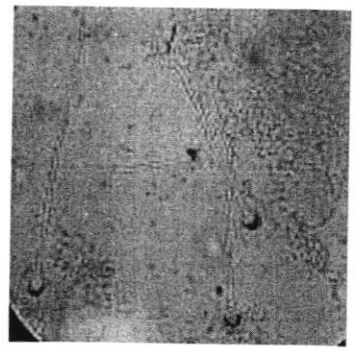
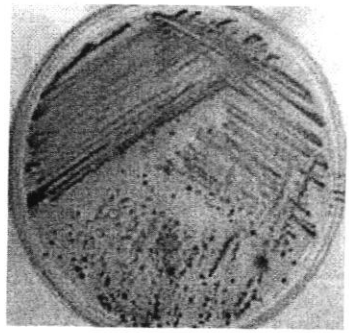
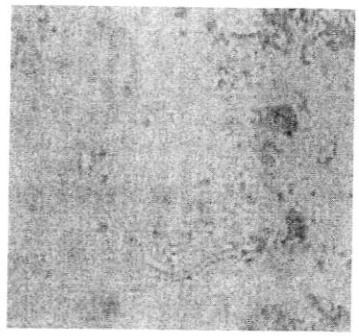
Enzyme activity ratios = อัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์

3. การจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล

การศึกษาเพื่อให้ทราบถึงชนิดหรือชื่อวิทยาศาสตร์ของเชื้อราที่สังเคราะห์เอนไซม์ฟอกสีเมลานิน โดยอาศัยการตรวจดูลักษณะของเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แล้วเปรียบเทียบลักษณะกับเอกสารอ้างอิงมาตรฐานเชื้อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มและใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสของเชื้อจุลินทรีย์ในฐานข้อมูลสากล เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อเพิ่มจำนวน rDNA gene ด้วยปฏิกิริยาโพลีเมอร์เรสเชนรีเอกชั่น (Polymerase Chain Reaction; PCR) และนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส (sequencing) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับ 18S rRNA gene sequence ในฐานข้อมูลของ EMBL database โดยใช้ BLAST search

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท MA 4 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 5 และ 7 วัน พบว่าโคโลนีเชื้อรามีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ มีสีเขียว มีเส้นใยสีขาวบนอาหารและลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา MA 4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40x เชื้อราสร้างเส้นใยที่มีผนังกั้นและสร้างสปอร์ที่เรียกว่า โคนิเดีย ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท MA4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาต่างๆ

อายุของเชื้อรา (วัน)	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x
1		
3		
5		
7		

เมื่อนำเชื้อราไอโซเลท MA4 มาจัดจำแนกระดับสปีชีส์ด้วยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 18S rDNA fragments โดยใช้ primer pairs ITS5/ITS4 และนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส แล้วนำลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ Internal Transcribed Spacer (ITS) ที่ได้ไปเปรียบเทียบหาลำดับเบสที่เหมือนกันที่สุดในฐานข้อมูลของ EMBL database โดยใช้ BLAST search ผลการสืบค้นข้อมูลพบว่า ลำดับเบสของเชื้อราไอโซเลท MA4 ดังภาพที่ 6 สอดคล้อง 100 เปอร์เซ็นต์กับลำดับเบสของ *Aspergillus flavus* isolate TDPEF52 ดังนั้นเชื้อราไอโซเลท MA4 คือ *Aspergillus flavus* MA4

5′-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGA
GCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCAGGCCGCCGG
GGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAG
TTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCACTGATGAAGAACGCA
GCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC
CCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGG
TCGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGT
ATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGT
TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA-3′
Length 599 bases

ภาพที่ 6 ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ Internal Transcribed Spacer (ITS) ของเชื้อราไอโซเลท MA4 จากคู่ไพรเมอร์ ITS5/ITS4

4. กระบวนการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

จากการศึกษากระบวนการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *A. flavus* MA4 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเมื่อทำการหมักแบบ submerge fermentation เชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 1.08 units/ml และกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation เชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 35.29 units/ml ดังแสดงในตารางที่ 10 และกระบวนการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน คือ กระบวนการหมักแบบ solid state fermentation ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA4 ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งจึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์หยาบสาหรับการฟอกสีเมลานินต่อไป

ตารางที่ 10 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ submerged fermentation และ solid state fermentation โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

กระบวนการหมัก	กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml)		
	Ex 1	Ex 2	เฉลี่ย
Submerged fermentation	0.88	1.27	1.08
Solid state fermentation	34.58	36	35.29

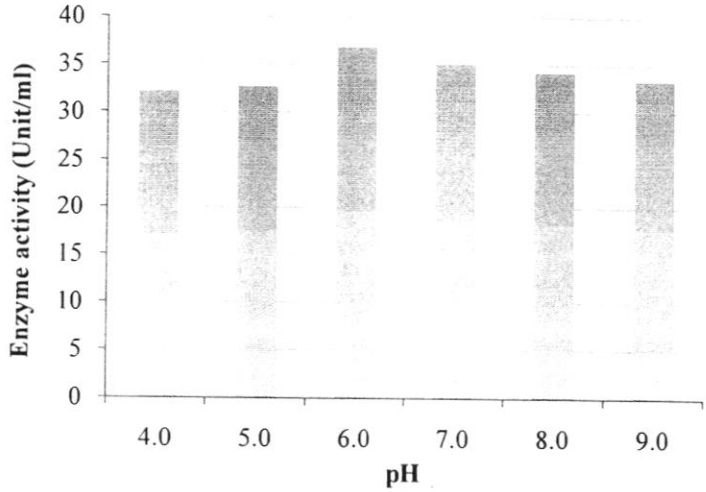
5. สภาวะที่เหมาะสมในการหมักแบบ solid state fermentation เพื่อการผลิตเอนไซม์

5.1 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

การศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *A. flavus* MA4 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย mineral salt ที่มีพีเอชระดับต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, และ 9.0 เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 32.17 32.74 36.88 35.17 34.27 และ 33.41 units/ml ตามลาดับ ดังแสดงในตารางที่ 11 และภาพที่ 7 ดังนั้น พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยการหมักแบบ solid state fermentation คือ พีเอชเท่ากับ 6.0 ซึ่งเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินใกล้เคียงกันเท่ากับ 36.88 units/ml

ตารางที่ 11 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml)		
	Ex 1	Ex 2	เฉลี่ย
4.0	30.07	34.27	32.17
5.0	33.38	32.09	32.74
6.0	40.31	33.44	36.88
7.0	37.53	32.81	35.17
8.0	35.40	33.13	34.27
9.0	31.50	35.32	33.41



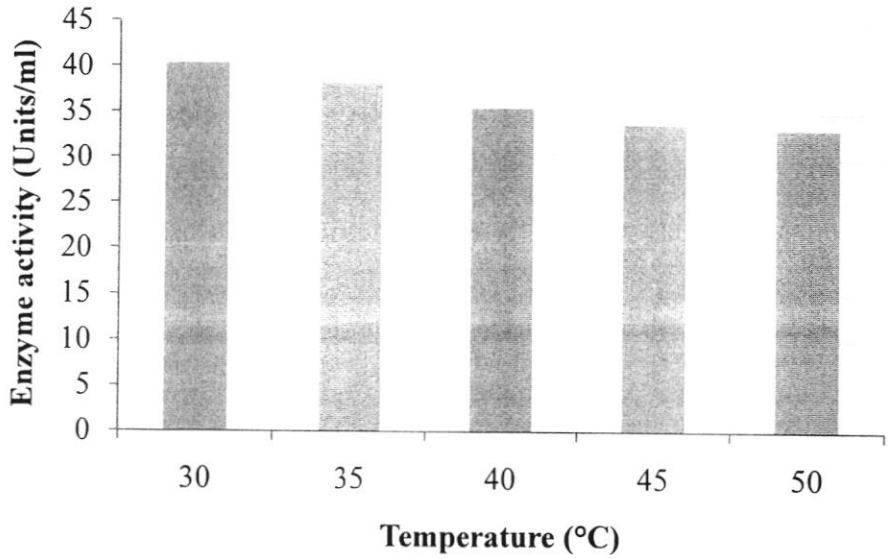
ภาพที่ 7 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

5.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA 4 เพื่อผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 35 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 40.18 38.10 35.41 33.63 units/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 12 และภาพที่ 8 ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อราโดยการหมักแบบ solid state fermentation คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุดเท่ากับ 40.18 units/ml ซึ่งเชื้อราส่วนใหญ่จะสามารถเจริญที่อุณหภูมิ 0-35 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2554) จึงแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จึงเป็นสภาวะที่เชื้อราสามารถเจริญได้ดีและผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุด

ตารางที่ 12 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml)		
	Ex 1	Ex 2	เฉลี่ย
30	39.13	41.23	40.18
35	39.41	36.80	38.10
40	38.18	32.63	35.41
45	34.57	32.70	33.63
50	32.86	33.44	33.15



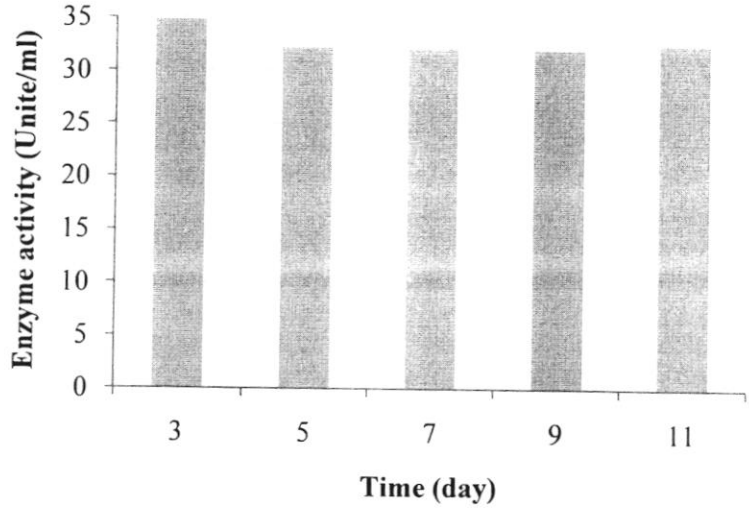
ภาพที่ 8 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน

5.3 ช่วงเวลาที่เหมาะสม

การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA 4 เพื่อผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium โดยปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย mineral salt ที่มีพีเอชเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสตามช่วงเวลาต่างๆ ผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการหมักในช่วงเวลา 3 5 7 9 และ 11 วัน เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 34.78 32.24 32.24 32.04 และ 32.55 units/ml ตามลาดับ ดังแสดงในตารางที่ 13 และภาพที่ 9 ดังนั้นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อราโดยการหมักแบบ solid state fermentation คือ 3 วัน ซึ่งเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุดเท่ากับ 34.78 units/ml เมื่อทำการเก็บตัวอย่างชีวมวลโดยการชั่งน้าหนักแห้ง ผลการทดลองพบว่าน้ำหนักชีวมวล (น้ำหนักแห้ง) ที่ช่วงเวลา 3 5 7 9 และ 11 วัน มีค่าเท่ากับ 1.74 0.24 0.32 0.34 และ 0.33 กรัม ตามลำดับ ดังนั้นช่วงเวลาที่เชื้อรามีการเจริญดีที่สุด คือ 3 วัน ซึ่งตัวอย่างชีวมวล (น้ำหนักแห้ง) มีค่าเท่ากับ 1.74 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 13 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาต่างๆ

ช่วงเวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml)		
	Ex 1	Ex 2	เฉลี่ย
3	34.44	35.12	34.78
5	32.76	31.39	32.24
7	32.53	31.94	32.24
9	31.93	32.15	32.04
11	33.52	31.57	32.55



ภาพที่ 9 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาต่างๆ

ตารางที่ 14 น้ำหนักชีวมวลที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาต่างๆ

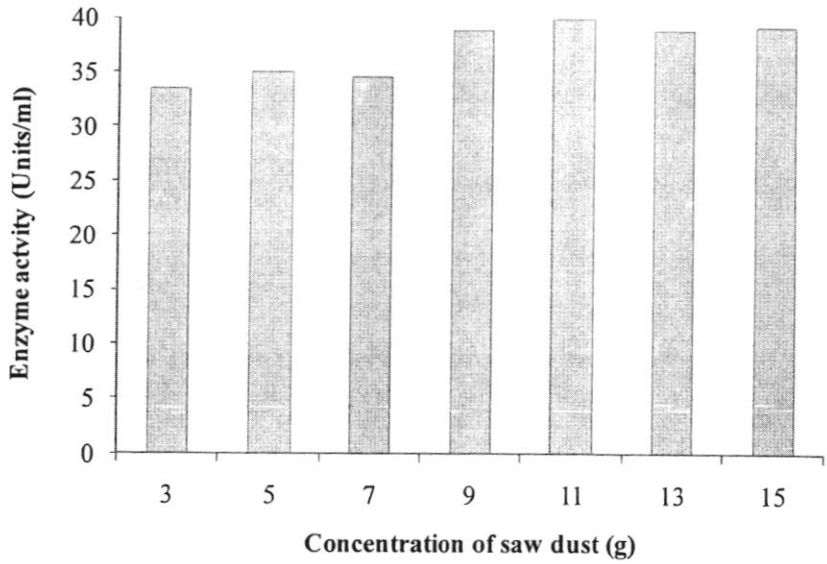
ช่วงเวลา (วัน)	น้ำหนักชีวมวล (กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	Ex 1	Ex 2	เฉลี่ย
3	0.39	3.09	1.74
5	0.45	0.04	0.24
7	0.56	0.09	0.32
9	0.59	0.10	0.34
11	0.29	0.37	0.33

5.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA 4 เพื่อผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีปริมาณความเข้มข้นของขี้เลื่อยระดับต่างๆ โดยปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย mineral salt ที่มีพีเอชเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีปริมาณของขี้เลื่อยเท่ากับ 3 5 7 9 11 13 และ 15 กรัม เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 33.53 34.99 34.54 38.80 40.03 38.90 และ 39.13 units/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 15 และภาพที่ 10 ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นของขี้เลื่อยที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อราโดยการหมักแบบ solid state fermentation คือ 11 กรัม ซึ่งเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุดเท่ากับ 40.03 units/ml

ตารางที่ 15 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีปริมาณความเข้มข้นของขี้เลื่อยระดับต่างๆ ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (กรัม)	กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml)		
	Ex 1	Ex 2	เฉลี่ย
3	32.90	34.16	33.53
5	34.76	35.23	34.99
7	35.08	34.00	34.54
9	37.72	39.88	38.80
11	40.90	39.15	40.03
13	38.70	39.10	38.90
15	39.29	38.98	39.13



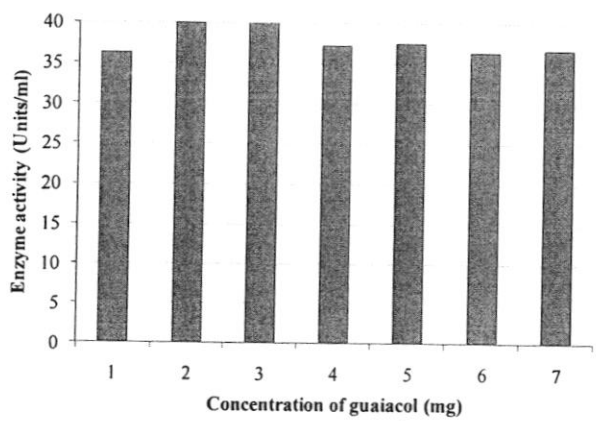
ภาพที่ 10 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีปริมาณความเข้มข้นของขี้เลื่อยระดับต่างๆ ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

5.5 ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเหนี่ยวนำ

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเหนี่ยวนำกัวอีคอล (guaiacol) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA 4 เพื่อผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีปริมาณความเข้มข้นของ guaiacol ระดับต่างๆ โดยปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย mineral salt ที่มีพีเอชเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีปริมาณความเข้มข้นของกัวอีคอลเท่ากับ 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 กรัม เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 36.31 40.03 41.54 37.23 37.47 36.41 และ 36.73 units/ml ตามลาดับ ดังแสดงในตารางที่ 16 และภาพที่ 11 ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นของกัวอีคอลที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อราโดยการหมักแบบ solid state fermentation คือ 3.0 กรัม ซึ่งเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุดเท่ากับ 41.54 units/ml

ตารางที่ 16 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีปริมาณความเข้มข้นของขี้เลื่อย 11 กรัม มีความเข้มข้นของกัวอีคอลที่ระดับต่างๆ ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ปริมาณของสารเหนี่ยวนำ (มิลลิกรัม)	กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml)		
	Ex 1	Ex 2	เฉลี่ย
1.0	36.71	35.90	36.31
2.0	40.9	39.15	40.03
3.0	41.94	41.14	41.54
4.0	37.69	36.72	37.23
5.0	37.95	36.98	37.47
6.0	36.78	36.04	36.41
7.0	36.44	37.02	36.73



ภาพที่ 11 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีปริมาณความเข้มข้นของขี้เลื่อย 11 กรัม มีความเข้มข้นของกัวอีคอลที่ระดับต่างๆ ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* MA4 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าโคโลนีเชื้อรามีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ โคโลนีมีสีเขียวเส้นใยมีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา MA 4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x เชื้อราสร้างเส้นใยที่มีผนังกั้นและสร้างสปอร์ที่เรียกว่า โคนิเดีย เมื่อนำเชื้อราไอโซเลท MA4 มาจัดจำแนกระดับสปีชีส์และเปรียบเทียบหาลำดับเบสที่เหมือนกันที่สุดในฐานข้อมูลของ EMBL database โดยใช้ BLAST search พบว่าลำดับเบสของเชื้อราไอโซเลท MA4 สอดคล้อง 100 เปอร์เซ็นต์กับลำดับเบสของ *A. flavus* isolate TDPEF52 ดังนั้นเชื้อราไอโซเลท MA4 คือ *A. flavus* MA4 มีรายงานวิจัยหลายฉบับกล่าวว่าเชื้อราหลายชนิดมีกิจกรรมฟอกสีเมลานินได้แก่ *A.fumigatus* ที่แยกจากดินกองปุ๋ยที่ประกอบด้วยกากเมล็ดกาแฟและเศษใบไม้ (Luther and Lipke, 1980) *Acrostaphylus* sp. a fungi imperfecti (Liu et al., 1995), *Phanerochaete chrysosporium* ซึ่งเป็น ligninolytic white rot fungus (Bulter and Day, 1998b), *Galactomyces geotrichum* VTT-D-84228 (Rättö et al. 2001), *Sporotrichum pruinosum* (Mohorčič et al., 2007), *Ceriporiopsis* sp. (Nagasaki et al., 2008)

กระบวนการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *A. flavus* MA4 คือ กระบวนการหมักแบบอาหารแข็งหรือ solid state fermentation โดยใช้ขี้เลื่อยเป็นซับสเตรต เชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 35.29 units/ml ภายในเวลา 7 วัน ส่วนกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว เชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 1.08 units/ml ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ทั้งนี้เพราะกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งเหมาะสำหรับการผลิตเอนไซม์โดยเชื้อราเนื่องจากมีปริมาณน้ำอิสระน้อยหรือมีปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ประโยชน์ (a_w, available water) ค่อนข้างต่ำ เชื้อราจะเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย จึงเป็นการลดปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีข้อดีคือ มีค่าใช้จ่ายด้านการให้อากาศต่ำและลดต้นทุนการกำจัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิต กากหรือของเหลือทิ้งจากกระบวนการหมักสามารถกำจัดได้ง่ายและสามารถนำไปปรับปรุงเป็นปุ๋ยได้ (ปราณี, 2556) กระบวนการหมักแบบอาหารเหลวไม่เหมาะสำหรับเชื้อราโดยเฉพาะอย่างยิ่งหากใช้ถังหมักหรือถังปฏิกรณ์แบบถังกวน (stirred tank) เพราะไมซีเลียมจะไปเกาะพันกับใบพัด (stirrer) ทำให้มีปัญหากับการกวนและการให้อากาศ แต่สามารถปรับปรุงได้โดยใช้เทคโนโลยีการตรึงเซลล์และเลือกใช้ถังปฏิกรณ์ที่เหมาะสมเช่น ถังปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบดและถังปฏิกรณ์แบบฟิกซ์เบด Sarnthima และคณะ (2009) และ Khammuang และ Sarnthima (2013) ทำการผลิตเอนไซม์แล็กเคสที่มีประสิทธิภาพในการฟอกสีเมลานินโดยใช้เชื้อเห็ด *Lentinus polychrous* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งที่ประกอบด้วยรำข้าวและฟางข้าวเป็นซับสเตรต โดยอาหารแข็งรำข้าว ให้กิจกรรมแล็กเคส 1,449 U/L หลังการเพาะเลี้ยง 21 วัน ส่วนอาหารแข็งฟางข้าว จะให้กิจกรรมแล็กเคส 1,425 U/L หลังการเพาะเลี้ยง 21 วัน อย่างไรก็ตาม Mohorcic และคณะ (2007) ทำการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยใช้เชื้อรา *Sporotrichum pruinosum* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลวหรือ submerged fermentationในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 140 Units/L ภายในเวลา 200 ชั่วโมงหรือ 8.33 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราเจริญเป็นแผ่นฟิล์มตามด้านข้าง ด้านล่างของถังปฏิกรณ์ รวมทั้งเจริญตามใบพัด

พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *A. flavus* MA 4 คือ พีเอช 6.0 โดยเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 36.88 units/ml เชื้อราส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงพีเอช 2-10 แต่พีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4-6 ซึ่งเป็นกรด ดังนั้นในสภาวะที่เป็น

กรดจะทำให้เชื้อราเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย และในสภาวะที่เหมาะสมเชื้อราจะสามารถสร้างสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Nakasaki และคณะ (2008) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Ceriporiopsis* sp. MD-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งมีส่วนประกอบของมอลต์สกัดและกลูโคส พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 6.0 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่มีประสิทธิภาพในการฟอกสีเมลานินจากผมของมนุษย์ได้ Rättö และคณะ (2001) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Galactomyces geotrichum* VTT-D-84228 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีพีเอชเท่ากับ 6.5 เพื่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน Mohorcic และคณะ (2007) ทำการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยใช้เชื้อรา *Sporotrichum pruinosum* โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5

อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *A. flavus* MA 4 คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 40.18 units/ml เชื้อรามีช่วงอุณหภูมิในการเจริญได้แคบกว่าแบคทีเรีย ส่วนมากเจริญที่อุณหภูมิ 0-35 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส บางชนิดเป็นพวก thermophilic fungi สามารเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Nakasaki และคณะ (2008) รายงานว่าเชื้อ *Ceriporiopsis* sp. MD-1 เป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่มีประสิทธิภาพในการฟอกสีเมลานินจากผมของมนุษย์ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส Mohorcic และคณะ (2007) ทำการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยใช้เชื้อรา *Sporotrichum pruinosum* โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *A. flavus* MA 4 คือ เมื่อทำการหมักเชื้อราเป็นเวลา 3 วัน ซึ่งเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 34.78 units/ml และช่วงเวลาที่มีการเจริญของเชื้อราที่ดีที่สุด คือเมื่อทำการหมักเชื้อราเป็นเวลา 3 วัน ตัวอย่างเซลล์มีน้ำหนักเท่ากับ 1.74 กรัม ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าเชื้อรา *Sporotrichum pruinosum* ซึ่งใช้เวลา 10 วันในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (Mohorcic et al., 2007)

ปริมาณขี้เลื่อยหรือซับสเตรตหรือแหล่งคาร์บอนที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน โดยเชื้อรา *A. flavus* MA 4 พบว่าปริมาณความเข้มข้นของขี้เลื่อยที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินคือ 11 กรัม เชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุดเท่ากับ 40.03 units/ml การใช้ขี้เลื่อยเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากขี้เลื่อยมีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบจำนวนมากโดยเฉพาะเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่มีหมู่โพลีฟีนอล แม้ว่าโครงสร้างของเมลานินยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัด Prota (2000) รายงานว่าเมลานินเป็นสารเฮตเทอโรจีนัสพอลิเมอร์ประกอบด้วยสารจำพวกอินโดลที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนซ์ Woo และคณะ (2004) รายงานว่าเมลานินมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบในเซลล์พืชและถ่านหิน เนื่องจากประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลและอินโดลมาต่อกันเป็นพอลิเมอร์เช่นเดียวกัน ดังนั้นการนำขี้เลื่อยซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการแปรรูปไม้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium เพื่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินจึงเป็นการนำวัตถุดิบธรรมชาติที่มีราคาถูกมาช่วยลดต้นทุนการผลิตเหมาะสำหรับการขยายขนาดในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ปริมาณความเข้มข้นของกัวอีคอล (guaiacol) ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium เพื่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *A. flavus* MA 4 โดยการหมักแบบ solid state fermentation คือ 3.0 กรัม ซึ่งเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุดเท่ากับ 41.54 units/ml กัวอีคอลเป็นสารต้นตอของสารให้กลิ่นรสหลายชนิดเช่นยูจีนอล (eugenol) และวานิลลิน (vanillin) (Esposito et al.,

1997) กัวอีคอลเป็นผลจากปฏิกิริยาไพโรไลซิสของลิกนิน จึงพบได้ในควันไม้และน้ำมันรักษาเนื้อไม้ (Dorfner, et al., 2003) Khammuang and Sarnthima (2013) ศึกษาการฟอกสีเมลานินสังเคราะห์โดยเอนไซม์หยาบของแลคเคส (crude laccase) ที่สังเคราะห์โดยเชื้อเห็ด *Lentinus polychrous* พบว่าการเติมสารวานิลลินที่ระดับความเข้มข้น 1.0 mmol/L ลงในปฏิกิริยาจะทำให้กิจกรรมฟอกสีเมลานินมีค่าเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่ากระบวนการหมักที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA 4 คือกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation และสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง คือ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร sawdust medium ที่มีปริมาณขี้เลื่อยและกัวอีคอลเท่ากับ 11 กรัมและ 3 มิลลิกรัม ตามลำดับ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุด ซึ่งการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมสีผมอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

บุญยิ่ง จันทร์เปี่ยม. 2546. เอกสารประกอบคำสอนเคมีประยุกต์ในงานสิ่งทอ. สาขาเคมีสิ่งทอ วิทยาลัยเทคนิคโพธาราม จังหวัดราชบุรี

Bulter, M.J. and A.W. Day. 1998a. Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*. 44: 1115-1136.

Bulter, M.J. and A.W. Day. 1998b. Destruction of fungal melanin by ligninases of *Phanerochaete chrysosporium* and other white rot fungi. *International Journal of Plant Science*. 159: 989-995.

Clancy, C.M.R. and J.D. Simom. 2001. Ultrastructural organization of eumelanin from *Sepia officinalis* measured by atomic force microscopy. *Biochemistry*. 40: 13353-13360. Doi:10.1021/bi010786t

De Sanjose S., Y. Benavente, A. Nieters, L. Foretova, M. Maynadië, P.L. Cocco, A. Staines, M. Vornanen, P. Boffetta, N. Becker, T. Alvaro, and P. Brennan. 2006. Asscociation between personal use of hair dyes and lymphoid neoplasms in Europe. *American Journal of Epidermology*. 164: 47-55.

Dorfner, R., T. Ferge, A. Kettrup, R. Zimmermann, and C. Yeretzian. 2003. Real-time monitoring of 4-vinylguaiacol, guaiacol, and phenol during coffee roasting by resonant laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 5768–5773.

Esposito, L. J., K. Formanek; G. Kientz, F. Mauger, V. Maureaux, G. Robert and F. Truchet 1997. Vanillin. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th edition. John Wiley & Sons. New York.

Franbourg, A., and F. Leroy. 2005. *Hair structure, function, and physiological propoties. In* Bouillon C. and J. Wilkinson (ed.), The science of hair care, 2 nd ed. CRC Press. Boca Raton.

Henson J.M. 2001. *Lignin, humic substances and coal*. Wiley-VCH, Weinheim. New York.

Khammuang, S. and R. Sarnthima. 2013. Decolorization of synthetic melanins by crude laccases of *Lentinus polychrous* Lév. *Folia Microbiology*. 58: 1-7.

Lin, W.P., H.L. Lai, Y.L. Liu, Y.M. Chiung, C.Y. Shiau, J.M. Han, C.M. Yang, and Y.T. Liu. 2005. Effect of melanin produced by a recombinant *Escherichia coli* on antibacterial activity of antibiotics. *Journal of Microbiology and Immunology Infection*. 38: 320-326.

Liu, Y.T., S.H. Lee, and Y.Y. Liao. 1995. Isolation of a melanolytic fungus and its hydrolytic activity on melanin. *Mycologia*. 87: 651-654.

Luther, J.P., and H. Lipke. 1980. Degradation of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 40: 145-155.

Manivasagan, P., J. Venkatesan, K. Senthilkumar, K. Sivakumar, S.-K. Kim. 2013. Isolation and characterization of biologically active melanin from*Actinoalloteichus* sp. MA-32. *International Journal of Biological Macromolecules*. 58: 263–274.

Mohorčič, M., J. Friedrich, I. Renimel, P. Andre, D. Mandin, J.P. Chaumont. 2007. Production of melanin bleaching enzyme of fungal origin and its application in cosmetics. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 12: 200-206.

Nagasaki, K., M. Kumazawa, S. Murakami, S. Takenaka, K. Koike, and K. Aoki. 2008. Purification, and gene cloning of *Ceriporiopsis* sp. strain MD-1 peroxidase that decolorize human hair melanin. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 5106-5112.

Prota, G. 2000. Melanins, melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint. *Pigment Cell Research*. 13: 283-293.

Rättö, M., M. Chatani, A.C. Ritschkoff, and L. Viikari. 2001. Screening of microorganisms for decolorization ofmelanins produced by bluestain fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 210-213.

Riley, P.A. 1997. Melanin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 29: 1235-1239.

Sarnthima, R., S. Khammuang, and J. Svasti. 2009. Extracellular ligninolytic enzymes by *Lentinus polychrous* Lév. Under solid-state fermentation of potential agro-industrial wastes and their effectiveness in decolorization of synthetic dyes. *Biotechnology Bioprocess Engineering*. 14: 513-522.

Woo, S.H., J.S. Cho, B.S. Lee, and E.K. Kim. 2004. Decolorization of melanin by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 9: 256-260.

เว็ปไซต์

http://www.rmutphysics.com/charud/naturemystery/sci2/hydrogen/hydrogen6.htm สืบค้นเมื่อวันที่ 21 ส.ค. 2559

http://narcotic.fda.moph. go.th สืบค้นเมื่อวันที่ 21 ส.ค. 2559

http://www.handbtoday. com / index.php สืบค้นเมื่อวันที่ 21 ส.ค. 2559

http://www.nsm.or.th/index.php สืบค้นเมื่อวันที่ 21 ส.ค. 2559
http://www.handbtoday.com/index.php สืบค้นเมื่อวันที่ 21 ส.ค. 2559
http://en.wikipedia.org/wiki/Melanin สืบค้นเมื่อวันที่ 21 ส.ค. 2559

ภาคผนวก

1. ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางปราณี พัฒนพิพิธไพศาล
   (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Pranee Pattanapipitpaisal
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงาน ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
   อำเภอ วารินชำราบ จังหวัด อุบลราชธานี รหัสไปรษณีย์ 34190
   โทรศัพท์: 045-288400 ต่อ 4030 โทรสาร: 045-288380
   scpranpa@gmail.com
5. ประวัติการศึกษา
   ปริญญาตรีสาขาชีววิทยา ปีที่สำเร็จการศึกษา : 2527
   สถาบันการศึกษา มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย
   ปริญญาโทสาขา จุลชีววิทยา ปีที่สำเร็จการศึกษา: 2531
   สถาบันการศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย
   ปริญญาเอกสาขา Biological Sciences ปีที่สำเร็จการศึกษา: 2544
   สถาบัน: The University of Birmingham ประเทศอังกฤษ
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   Enzyme Technology
   Environmental Microbiology
   Environmental Technology
   Bioremediation
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : จำนวน 1 แผนงานวิจัย

   1) แผนงานวิจัยเรื่อง "การแพร่กระจายของอาร์ซินิคในเขตชนบทลุ่มแม่น้ำโขงและการพัฒนากระบวนการบำบัดน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนอาร์ซินิค" เงินงบประมาณเพื่อการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2552-2554 (1 ต.ค. 51-30 ก.ย. 54)

   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : จำนวน 9 โครงการวิจัย

   1) โครงการวิจัยเรื่อง "การบำบัดน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนของอาร์ซินิคด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรีย" เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2553-2554 (1 ต.ค. 50-30 ก.ย. 52)
   2) โครงการวิจัยเรื่อง "การปนเปื้อนของอาร์ซินิคในน้ำใต้ดิน เขตชนบทลุ่มแม่น้ำโขง จังหวัดอุบลราชธานี" เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2552 (1 ต.ค. 51-30 ก.ย. 52)

3) โครงการวิจัยเรื่อง "การผลิตไลเปสโดยแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงและการประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน" เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2551-2552 (1 ต.ค. 50-30 ก.ย. 52)
4) โครงการวิจัยเรื่อง "การใช้กล้าเชื้อแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสาเหตุโรคเพื่อการผลิตพริกและแตงกวาอินทรีย์" ทุนสนับสนุนจากฝ่ายวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย ปีงบประมาณ 2549-2552 (28 ก.ค. 49-27 ก.ค. 52)
5) โครงการวิจัยเรื่อง "การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศด้วยกล้าเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท" เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2550-2551 (1 ต.ค. 49-30 ก.ย. 51)
6) โครงการวิจัยเรื่อง "การรีดิวส์โครเมตโดยเซลล์และเอนไซม์โครเมตรีดัสเตสที่ถูกตรึง" เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2548-2549 (1 ต.ค. 47-30 ก.ย. 49)
7) โครงการวิจัยเรื่อง "การตรวจวินิจฉัยและเก็บรวบรวมแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดินในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี" เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยโครงการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2547 (1 ต.ค. 46-30 ก.ย. 47)
8) โครงการวิจัยเรื่อง "การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง" เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2547 (1 ต.ค. 46-30 ก.ย. 47)
9) โครงการวิจัยเรื่อง "การคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างเอนไซม์ไลเปส" ทุนสนับสนุนการทำวิจัยเงินรายได้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2546 (1 ต.ค. 45-30 ก.ย. 46)

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้วและตีพิมพ์เผยแพร่ : (เฉพาะผลงานที่ได้รับทุนวิจัย)

1) **ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล**. 2545. การลดความเป็นพิษของโครเมียมโดยแบคทีเรีย. วารสารวิชาการ ม.อบ. 2: 30-35.
   - แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2547
2) **ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล**. 2547. การคัดแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวส์โครเมต. วารสารวิชาการ ม.อบ. 6 : 53-63.
   - แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2547
3) **ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล**. 2548. การคัดแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างไลเปส. วารสารวิชาการ ม.อบ. 7: 95-114.
   - แหล่งทุน: ทุนสนับสนุนการทำวิจัยเงินรายได้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2546
4) **ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล** . 2549. การลดปริมาณโครเมตที่มีความเป็นพิษโดยเซลล์และสารสกัดจากเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยโพลีไวนีลแอลกอฮอล์. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. 15: 1-11.
   - แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

(วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2548-2549

5) **ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล** . 2549. การลดความเป็นพิษของโครเมตโดยเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus fusiformis* NTR9 และเม็ดบีทตรึงเซลล์. การประชุมวิชาการ ม. อบ. ครั้งที่ 1. 28-29 กรกฎาคม 2549 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. จังหวัดอุบลราชธานี.
   - แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2548-2549
6) **ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล**. 2551. การปนเปื้อนสารหนูในน้ำใต้ดินเขตลุ่มแม่น้ำโขงตอนล่าง. วารสารวิชาการ ม.อบ. 10: 27-39.
   - แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2552
7) **ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล** เอมอร คำเพราะ และรัชฎาพร นวะพิฒ. 2552. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. วารสารวิชาการ ม.อบ. 11: 9-17.
   - แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2550-2551
8) **ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล** และพิยาดา สุรารักษ์. 2554. การปนเปื้อนอาร์ซินิคและคุณภาพน้ำใต้ดินในอำเภอเขมราฐ และอำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย อุบลราชธานี. 13: 50-58.
   - แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2552
9) อรอุษา รุ่งเรือง และ**ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล**. 2554. การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันด้วยเซลล์แบคทีเรียตรึงรูปและไลเปสตรึงรูป. การประชุมวิชาการ ม. อ. ภูเก็ตวิจัยครั้งที่ 4 (2554) 16-18 พฤศจิกายน 2554. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตภูเก็ต. จังหวัดภูเก็ต
   - แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2551-2552
10) **ปราณี พัฒนพพิธไพศาล** และ ชนิดาภา นวะพิฒ. 2555. การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อรา*Sclerotium rolfsii* ด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีท *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24 ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนส. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 14: 10-22.
   - แหล่งทุน: ทุนสนับสนุนจากฝ่ายวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย ปีงบประมาณ 2549-2552
11) จิราวรรณ มลาไวย์ สายน้ำผึ้ง ฉายาพัฒน์ และ**ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล**. 2555. การคัดเลือกไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 14(2): 71-77.
   - แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2551-2552

12) ทิพย์มณฑา ฤกษ์ใหญ่ และ**ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล**. 2556. ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสโดยสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus fusiformis* NTR9. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 18(1): 56-66.

- แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2548-2549

13) กรรณิการ์ บุตรสระคู และ**ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล**. 2556. การบำบัดไขมันและลดค่าบีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนไขมันด้วยเซลล์ตรึงรูปด้วยอัลจิเนต. The 7th UBU research Conference. Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani. p. 64-73.

- แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2551-2552

14) Nuratsa, I and **P. Pattanapipitpaisal**. 2004. Chromate removal by polyvinyl alcohol- immobilized bacterium. 30th Congress on Science and Technology of Thailand 19-21 October 2004. Impact Exhibition and Convention Center, Muang Thong Thani, Bangkok.

- แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2548-2549

15) **Pattanapipitpaisal, P.** 2007. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of chili damping- off disease. Proceeding of the 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. Nongkhai Campus, Thailand, November 1-3, 2007 at Nongkhai Province, Thailand.

- แหล่งทุน: ทุนสนับสนุนจากฝ่ายวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย ปีงบประมาณ 2549-2552

16) **Pattanapipitpaisal, P.** and P. Suraruk. 2011. Groundwater Quality and Arsenic Contamination in Amphoe Khemmarat, Ubon Ratchathani, Thailand. Proceeding of the 1st Environmental Asia International Conference on "Environmental Supporting in Food and Energy Security: Crisis and Opportunity" 22-25 March 2011. Rama Garden Hotel. Bangkok. Thailand.

- แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2552

17) **P. Pattanapipitpaisal,** P. Suraruk. 2012. Groundwater Quality and Arsenic Contamination in amphoe Khemmarat, Ubon Ratthathani, Thailand. *J. Env. Sci and Engineer.* 1: 133-141.

- แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2552

18) **Pattanapipitpaisal, P.** and R. Kamlandharn. 2012. Screening of chitinolytic actinomycetes for biological control of *Sclerotium rolfsii stem* rot disease of chilli. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 34(4): 387-389.

- แหล่งทุน: ทุนสนับสนุนจากฝ่ายวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย ปีงบประมาณ 2549-2552

19) **Pattanapipitpaisal, P.** and T. Reakyai. 2013. Cr(VI) reduction by cell-free extract of thermophillic *Bacillus fusiformis*NTR9. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 35(4): 407-414.

- แหล่งทุน: เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2548-2549

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : -ไม่มี ดำเนินการแล้วเสร็จทุกโครงการ

2. กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

ได้ส่งผลงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (submitted)

3. ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการและผลที่ได้รับ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	กิจกรรมที่วางแผนและได้ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1. เพื่อคัดแยกและคัดเลือกเชื้อราจากแหล่งธรรมชาติที่มีความสามารถในการฟอกสีเมลานิน 2. เพื่อจัดจำแนกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการฟอกสีเมลานิน	1. การเก็บตัวอย่าง 2. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถฟอกสีเมลานิน 3. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์เอนไซม์ฟอกสีเมลานิน 4. การจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล	- ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการฟอกสีเมลานินที่คัดแยกได้จากแหล่งพื้นที่ในประเทศไทย - สามารถจัดจำแนกและทราบถึงชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการฟอกสีเมลานิน - ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน
3. เพื่อศึกษากระบวนการหมักและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน	5. การศึกษากระบวนการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน	- ทราบถึงกระบวนการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ - ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป