

บทที่ 3

โครงการที่ 2: การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยไลโปไลติกยีสต์

Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons by Lipolytic Yeast

โดย

รศ. ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล และ ดร. รุ่งทิวา เปี่ยมทองคำ

บทคัดย่อ

ปัญหาทางสิ่งแวดล้อมมีมากมายในปัจจุบันหนึ่งในปัญหาหลักทางด้านสิ่งแวดล้อม คือการปนเปื้อนของน้ำมัน ที่เกิดจากการรั่วไหลของน้ำมันจากการซ่อมเครื่องยนต์ การถ่ายน้ำมันเครื่อง การเดินเรือ การขุดร่อนน้ำ และการขุดเจาะก๊าซธรรมชาติ ทำให้มีการฟุ้งกระจาย และการปนเปื้อนของสารพิษต่างๆลงสู่น้ำทะเลการย่อยสลายของจุลินทรีย์คือกลไกทางธรรมชาติหนึ่งที่สำคัญที่ดีในการกำจัดมลพิษที่เกิดจากการรั่วไหลของน้ำมันจากสิ่งแวดล้อมได้ วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน โดยใช้แลคเคสที่ผลิตได้จากไลโปไลติกยีสต์สายพันธุ์ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* ที่คัดเลือกจากเกาะสีชัง โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *A. pullulans* และการผลิตเอนไซม์แลคเคส แลคเคสที่สามารถผลิตได้จาก *A. pullulans* โดยการชักนำของ 2 mM guaiacol ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโต และศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของ Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene โดยแลคเคส ผลการศึกษาพบว่าแลคเคสที่ผลิตโดย *A. pullulans* สามารถย่อยสลายสาร Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ได้ 24.35, 38.16, 25.38 และ 45.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับภายใน 48 ชั่วโมง การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินด้วยแลคเคส พบว่าปริมาณ Naphthalene ลดลง 51.34 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ Anthracene ลดลง 85.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับภายในเวลา 9 วัน

คำสำคัญ: ไลโปไลติกยีสต์ แลคเคส สารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนไฮโดรลิซิส

Abstract

One of the major environmental problems today is petroleum hydrocarbon contamination resulting from the activities related to oil spills as well as the petrochemical industry. Microbial degradation is the major and ultimate natural mechanism which one can clean up the petroleum hydrocarbon pollutants from the environment. The objective of this research was to study the polyaromatic hydrocarbons biodegradability by laccase produced by lipolytic yeast, *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*, screened from Sichang Island. The experiments were firstly performed by study the optimal condition for growing the *A. pullulans* and its laccase production. Laccase can be produced from *A. pullulans* by induction with 2 mM guaiacol in growth medium. Laccase was lyophilized and stored in capsule. Biodegradability of laccase on naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene was then determined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results revealed that the laccase activity of one capsule (0.16 g) lyophilized laccase was 711.11 U/ml and can degrade benzo[a]pyrene, anthracene, pyrene and naphthalene by 45.33, 38.16, 25.38 and 24.35 percent after 48 hours incubation respectively. The results of that laccase produced by *A. pullulans* can degrade naphthalene and anthracene in soil by 51.34 and 85.06 percent respectively, after incubation for 9 days.

Key words: lipolytic yeast, laccase, polyaromatic hydrocarbons

3.1. บทนำ

3.1.1. ความสำคัญและที่มาในการวิจัย

ปัญหาการปนเปื้อนน้ำมันในแหล่งน้ำทั้งของไทยและประเทศเพื่อนบ้านจากอุบัติเหตุที่เกิดจากการรั่วไหลของเรือขนน้ำมัน ทำให้เกิดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมและเป็นหนึ่งในปัญหาหลักของประเทศไทยที่กำลังประสบอยู่ในขณะนี้ ผลจากการรั่วไหลของน้ำมันชนิดต่างๆลงสู่ทะเลทำให้เกิดผลกระทบต่อองค์การชีวิตของสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย เช่น ปลาที่อาศัยในบริเวณนั้นๆ นกทะเล ที่ต้องจับปลาทะเลเป็นอาหาร คินทราขบริเวณชายฝั่งก็ได้รับการปนเปื้อนของคราบน้ำมัน

จุลินทรีย์กลุ่มไลโปโพลิดิกสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำมันและไขมันได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ไลเปส ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ประเภท Triacylglycerol acylhydrolase ทำหน้าที่ในการเร่งการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลน้ำมันและไขมัน (Triacylglycerol) ซึ่งปฏิกิริยาการย่อยสลายนี้สามารถผันกลับได้ในระบบของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) คือ ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification) และทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) (Rathi *et al.* 2001; Jaeger and Reetz., 1998) และด้วยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่หลากหลายจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลายอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหารในการปรับแต่งกลิ่นรส อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมกระดาษและเครื่องหนัง ตลอดจนการนำมาใช้ในระบบการกำจัดน้ำเสีย อย่างไรก็ตามพบว่ายีสต์นี้สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส (Laccase; EC 1.10.3.2) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductase) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมไฮโดรเจน ออกซิเจน หรืออิเล็กตรอน จากสารประกอบหนึ่งไปยังสารประกอบอื่น ในกระบวนการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนของเอนไซม์แลคเคส เอนไซม์แลคเคสจะเข้าไปเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาและมีความสามารถในการใช้สับสเตรทได้หลากหลายชนิด โดยข้อดีของการใช้เอนไซม์แลคเคสเป็นตัวเร่งที่เหนือกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาอนินทรีย์ ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) และอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง ไม่เป็นพิษ มีความสามารถในการละลายน้ำ สามารถทำซ้ำ (Repeatability) ได้ ปฏิกิริยาเกิดได้ภายใต้สภาวะการทดลอง เช่น พีเอชของสารละลาย อุณหภูมิ และความดันที่ไม่รุนแรง และสามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ

เกาะสีชังเป็นเกาะที่มีทำเลที่ตั้งอยู่บริเวณอ่าวไทยตอนใน มีสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างจากแผ่นดิน อีกทั้งพบการปนเปื้อนของน้ำมันและไขมันทั้งจากบ้านเรือนและเรือขนถ่ายสินค้ากลางทะเลตลอดทั้งปี จากงานวิจัยในโครงการ”การพัฒนาองค์ความรู้เพื่อการจัดการปัญหามลภาวะในทะเลและอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณหมู่เกาะสีชัง ปีที่ 1” ที่ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สามารถคัดเลือกไลโปโพลิดิกยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไลเปส งานวิจัยนี้จึงสนใจยีสต์ที่คัดเลือกได้มาใช้ประโยชน์ในการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน โดยเฉพาะสารกลุ่มโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAHs) ที่มีความเป็นพิษสูงที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำมัน

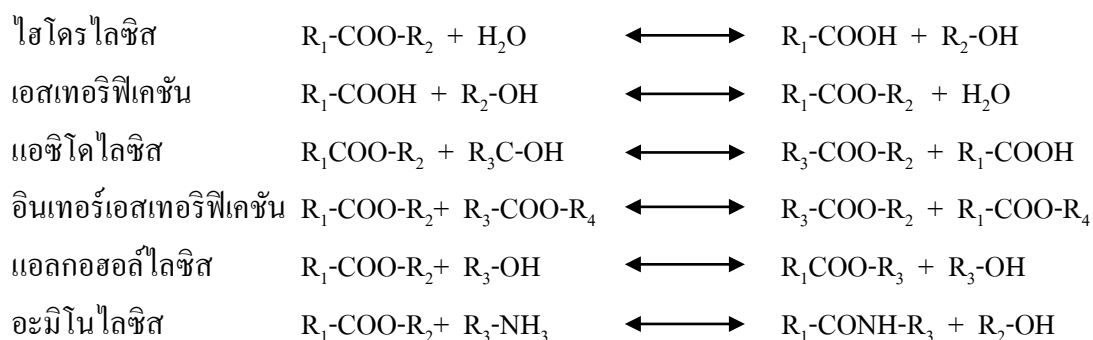
3.1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการเจริญของไลโปไลติกยีสต์เพื่อนำมาใช้ในการกระบวนการย่อยสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน
2. ทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของแลกเคสจากไลโปไลติกยีสต์ ในระดับห้องปฏิบัติการ
3. ทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนกับตัวอย่างดินที่ถูกปนเปื้อนด้วยโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

3.2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

3.2.1. ไลเปส

ไลเปส (Lipase; EC 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry ว่า กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอย่างอื่นอีก เช่น เอซิล-กลีเซอรอลไฮโดรเลส (Acyl glycerol hydrolase) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (Triacyl glycerol hydrolase) ไลเปสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) ซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ในพันธะเอสเทอร์ (Ester bond) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) เป็นไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) กรดไขมัน (Fatty acid) และกลีเซอรอล (Glycerol) ไลเปสจะทำการย่อยสารตั้งต้นได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในรูปอิมัลชัน (Oil-water interface) (Cihangir และ Sarikaya, 2004) เนื่องจากสารตั้งต้นอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (Insoluble water) อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (Initial rate) อาจขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับไว้ในพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสารตั้งต้น นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาที่เป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (Synthesis reaction) ได้แก่ เอสเทอริฟิเคชัน (Esterification) และทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาประเภทแอซิโดไลซิส (Acidolysis) อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน (Interesterification) แอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis) และ อะมิโนไลซิส (Aminolysis) ดังแสดงในปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเปสซึ่งสามารถเกิดได้ทั้งในภาวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (Aqueous solution) และไม่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยา (Non-aqueous solution) (Villeneuve et al., 2000) ดังนี้



ความจำเพาะของไลเปสต่อสารตั้งต้น

Macrae (1983) จำแนกไลเปสโดยแบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ได้เป็น 3 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

1. ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อทั้งตำแหน่งและชนิดของกรดไขมันตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่เข้าทำปฏิกิริยา (Non-specific lipase) ปฏิกิริยาจะดำเนินไปแบบสุ่ม มีการแลกเปลี่ยนหมู่เอซิลได้ทุกตำแหน่งบนไตรเอซิลกลีเซอรอล เอนไซม์กลุ่มนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้น จะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium macnes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*

2. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (1,3 specific lipase) ซึ่งจะไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) ไตรกลีเซอไรด์และได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมัน 1,2 ไดกลีเซอไรด์ หรือ 2,3 ไดกลีเซอไรด์ และ 2-มอนอกลิเซอไรด์แต่ (1,2),(2,3) – โมโนกลีเซอไรด์ เป็นสารประกอบชนิดไม่คงตัว ถ้าให้เกิดปฏิกิริยานานอาจจะมีการย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1-โมโนกลีเซอไรด์ หรือ 3-โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งหากปฏิกิริยาการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์ก็จะทำให้ได้กลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้จากจุลินทรีย์ ดังนี้ *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus* และไลเปสจากรำข้าว

3. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน (Fatty acid-specific lipase) บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ไลเปสในกลุ่มนี้จะย่อยสลายกรดไขมันที่มีพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 9 (Cis double bond) บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้ดี ส่วนกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (Saturated fatty acid) หรือชนิดไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) ที่ไม่มีพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 9 จะถูกไฮโดรไลซ์ได้ไม่คืบหน้า เอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางพวก ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไลเปส เช่น ไลเปสจากเชื้อรา *Penicillium cyclopium* และ *Geotrichum candidum* เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดเมื่อสารตั้งต้นเป็น โมโนเอซิลกลีเซอรอล

แหล่งของไลเปส

ไลเปสผลิตได้จากทั้งสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ในสัตว์ไลเปสสร้างขึ้นที่ตับอ่อน (Pancreatic lipase) และในน้ำนม (Milk lipase) ในพืชพบได้ในถั่ว ข้าวสาลี ฝ้าย และละหุ่ง ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถแยกได้จากทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ แต่เนื่องจากไลเปสจากจุลินทรีย์มีความเสถียรสูง (Stability) ความสามารถในการคัดเลือกสารตั้งต้นดี (Selectivity) และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด (Substrate specificity) จึงเป็นที่น่าสนใจและมีการนำไปประยุกต์ใช้สูงที่สุด (Cardenas et al., 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไลเปสจากยีสต์ เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตง่าย วิธีเก็บรักษาไม่ซับซ้อน มักผลิตไลเปสชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular lipase) ซึ่งง่ายและสะดวกต่อการแยกและนำไปใช้ (Kademi et al., 2003)

การผลิตเอนไซม์ไลเปส

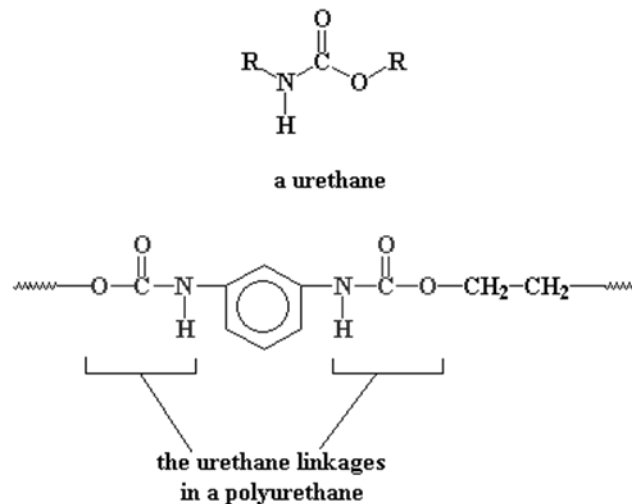
เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ทั้งในอาหารเหลว (submerge culture) และบนอาหารแข็ง (solid state) Pandey et al., (1999) เสนอว่าการผลิตไลเปสบนอาหารแข็งมีข้อดีว่าการผลิตในอาหารเหลวอยู่หลายประการ เช่น จุลินทรีย์สามารถเติบโตได้ง่าย เอนไซม์ที่ผลิตได้มีปริมาณมากกว่า นอกจากนี้ยังสามารถแยกเอนไซม์ออกมาได้ง่ายกว่า และ ทำให้เกิดของเสียน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันการผลิตไลเปสส่วนใหญ่เป็นการผลิตในอาหารเหลวไม่ว่าจะผลิตจากเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ทั้งนี้เป็นเพราะสามารถควบคุมสภาพการเลี้ยง สารอาหาร และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสในอาหารเหลวได้ง่ายกว่า ซึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และในโตรเจน สภาพความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ และการทำงานของเอนไซม์และความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิต (Elibol and Ozer, 2001)

บทบาทของไลเปสในการย่อยสลายทางชีวภาพ

จากกิจกรรมในทะเลที่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นการเดินเรือ การทำประมง และการเทียบเรือบริเวณชายฝั่งก่อให้เกิดการรั่วไหลของน้ำมันจากการซ่อมเครื่องยนต์ การถ่ายน้ำมันเครื่อง และจากกิจกรรมการเดินเรือต่างๆ เป็นจำนวนมาก อีกทั้งการขุดร่องน้ำ การขุดเจาะก๊าซธรรมชาติ ทำให้มีการฟุ้งกระจาย และการปนเปื้อนของสารพิษต่างๆลงสู่ทะเล

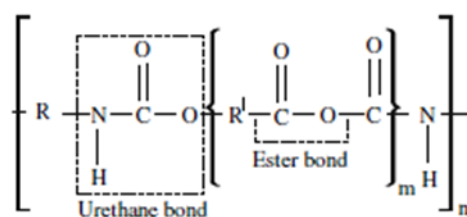
จากการปนเปื้อนของน้ำมันที่รั่วไหลนี้ คราบน้ำมันที่ติดค้างอยู่เป็นเวลานานโดยปราศจากการป้องกันและการบริหารจัดการจะส่งผลกระทบต่อทรัพยากรธรรมชาติ ระบบนิเวศทางทะเล และกระทบถึงปัญหาทางด้านเศรษฐกิจและสังคมตามมาในอนาคต โดยจากการสำรวจสภาพน้ำบริเวณเกาะสีชัง ซึ่งมีที่ตั้งอยู่บริเวณอ่าวไทยตอนในของประเทศไทยเรานั้น พบว่ามีการปนเปื้อนของน้ำมันและไขมันทั้งจากบ้านเรือนและเรือขนถ่ายสินค้ากลางทะเลตลอดทั้งปี

แนวทางการแก้ไขปัญหาล้างสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยสารชีวภาพที่ได้จากสิ่งแวดล้อมนั้นๆเป็นตัวบำบัด นับเป็นแนวทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาศึกษา ความเป็นไปได้ในการแก้ปัญหที่เกิดขึ้น และจากคุณสมบัติของไลเปสที่ได้กล่าวมาข้างต้น ไม่ว่าจะเป็นการนำไลเปสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง ตลอดจนอุตสาหกรรมเครื่องแก้ว อีกทั้งการนำไลเปสไปใช้ประโยชน์ในด้านการย่อยสลายขยะไขมัน (Masse et al., 2001) รวมถึงสารโพลียูรีเทน (Takamoto et al., 2001)



ภาพที่ 3.1 สารโพลียูรีเทน (โพลิเมอร์ที่นิยมนำมาทำเบาะโซฟา ที่นอน ฉนวนกันความร้อน กาวคุณภาพสูง และอื่นๆ เป็น Thermoset plastics ชนิดหนึ่งที่ย่อยสลายยากทางธรรมชาติ) (Urquhart et al., 1999)

จากการศึกษาการย่อยสลายสารโพลียูรีเทนของ Takamoto et al., (2001) อาศัยไลเปสที่ได้จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยากระบวนการไฮโดรไลซิส บริเวณพันธะเอสเทอร์สายโซ่หลักของโพลีเอสเตอร์ โพลียูรีเทน พบว่าเมื่อนำชิ้นส่วนพลาสติกโพลียูรีเทนซึ่งไม่ละลายน้ำใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *C. rugosa* ที่ถูกกระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่า ไลเปสที่ได้สามารถเร่งปฏิกิริยากระบวนการไฮโดรไลซิสของโพลียูรีเทน และวัดอัตราการย่อยสลายโพลียูรีเทน จากอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ร่วม ให้ค่า 0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร ไลเปสสามารถย่อยสลายโพลีเอสเตอร์ โพลียูรีเทน ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่ไม่สามารถละลายน้ำได้



ภาพที่ 3.2 ไลเปสเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสบริเวณพันธะเอสเทอร์ของโพลียูรีเทน (Gautam et al., 2007)

เอนไซม์ไลเปส จัดเป็นเอนไซม์ประเภท Triacylglycerol acylhydrolases ทำหน้าที่ในการเร่งการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (Ester bonds) ของโมเลกุลน้ำมันและไขมัน (Triacylglycerol) จากปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันในทะเล พบว่ามีสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; PAHs) มีความเป็นพิษสูง อีกทั้งยังย่อยสลายได้ยากเจือปนอยู่ด้วย มักเกิดจากกระบวนการเผา

ไหม้ของเชื้อเพลิง จากกระบวนการเคมีของโรงงานอุตสาหกรรม และการประกอบอาหารในครัวเรือน (Lijinsky, 1991) สามารถแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมได้หลายทาง ทั้งจากอากาศ จากการรั่วไหลของน้ำทิ้ง และการทิ้งสิ่งปฏิกูลของโรงงานอุตสาหกรรม การรั่วไหลที่เกิดจากอุบัติเหตุระหว่างการขนส่ง และการใช้ผลิตภัณฑ์น้ำมันปิโตรเลียม สารประกอบโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชนที่อาศัยอยู่ในเขตอุตสาหกรรมต่างๆค่อนข้างรุนแรง เนื่องจากเป็นสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic compounds) มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำทำให้คงทนอยู่ในระบบนิเวศได้เป็นระยะเวลานาน (Hites et al., 1977, 1980; Gschwend and Hites, 1981; Means et al., 1980) สารสามารถยึดเกาะกับอนุภาคของดินหรือดินตะกอนได้ดี จึงพบการปนเปื้อนในบริเวณดังกล่าวได้สูง การกระจายในดินชั้นต่างๆขึ้นกับขนาดของโมเลกุลและชั้นดิน สารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่มีวงเบนซีน 2-3 วง มีแนวโน้มการพบมากในชั้นของทรายบริเวณน้ำใต้ดิน ส่วนที่มีวงเบนซีน 5-6 วง มีแนวโน้มการพบในชั้นของดินที่มีสารอินทรีย์มาก สารเหล่านี้มีแนวโน้มถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียได้เช่นกัน (Potin et al., 2004)

การสลายตัวของสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่เกิดขึ้นได้แก่ การระเหย การเกิดโฟโตออกซิเดชัน (Photooxidation) การเกิดออกซิเดชันทางเคมี (Chemical oxidation) รวมถึงการถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน จากการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารนี้ด้วยสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ของ Kanaly and Harayam (2000) พบว่า ในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียจะย่อยสลายโดยเริ่มจากการออกซิไดส์ ให้เป็น dihydrodiol จากนั้นจึงแตกวงออกจนได้สารตัวกลางในวัฏจักรเครบส์ และนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ในที่สุด

	PAH	MW	Sol (mg/L)
Recalcitrance ↓	 Naphthalene	128.2	31.700
	 Acenaphthene	154.2	3.900
	 Anthracene	178.2	0.070
	 Phenanthrene	178.2	1.300
	 Fluoranthene	202.3	0.260
	 Pyrene	202.3	0.140
	 Benzo[a]anthracene	228.3	0.002
	 Benzo[a]pyrene	252.3	0.003

ภาพที่ 3.3 โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน พบว่ายิ่งมีวงโมเลกุลเพิ่มขึ้นความสามารถในการละลายน้ำยิ่งลดน้อยลง (Bamforth and Singleton, 2005)

เชื้อราบางกลุ่ม เช่น White rot fungi สามารถย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ได้โดยใช้เอนไซม์สำหรับย่อยสลายลิกนิน เช่น Lignin peroxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเนื้อไม้ แต่มีความจำเพาะต่ำจึงย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนินได้ด้วย (Baldrian et al., 2000)

3.2.2 แลคเคส

แลคเคส (Laccase; EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductase) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมไฮโดรเจน, ออกซิเจน หรืออิเล็กตรอน จากสารประกอบหนึ่งไปยังสารประกอบอื่น มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลักและมีโลหะคอปเปอร์ (Cu^{+2}) 4 อะตอมอยู่ในโครงสร้างโมเลกุลด้วย โลหะคอปเปอร์ในโครงสร้างแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ type-1 (T1) มีคอปเปอร์ 1 อะตอม, type-2 (T2) คอปเปอร์ 1 อะตอม และ type-3 (T3 และ T3') มีคอปเปอร์ 2 อะตอม (Zheng, et al., 2008; Solomon, et al., 1992) กระบวนการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนของเอนไซม์แลคเคส เริ่มขึ้นที่ตำแหน่ง T1 ซึ่งเป็นตำแหน่ง active site ที่มีการจับกับสารเป้าหมาย เกิดปฏิกิริยารีดักชันของคอปเปอร์ ที่ตำแหน่ง T1 และส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยัง ตำแหน่ง T2/T3 และออกซิเจนเกิดปฏิกิริยารีดักชันไปเป็นน้ำ (Solomon, et al., 1992) เอนไซม์แลคเคสจะเข้าไปเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาและมีความสามารถในการใช้สับสเตรทได้หลากหลายชนิด เช่น polyphenol, aromatic, benzinethiols, anthraquinone, syringalazine, 2,6 dimethoxyphenol, veratryl alcohol, 2,5 xylylene, ferulic acid และยังมีสับสเตรทที่เป็นพวก non-phenolic compounds เช่น HAA, HPI, VLA และ ABTS เป็นต้น (Bourbonnais et al., 1990) ข้อดีของการใช้เอนไซม์แลคเคสเป็นตัวเร่งที่เหนือกว่าตัวเร่งปฏิกิริยานินทรีย์ ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) และอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง ไม่เป็นพิษ มีความสามารถในการละลายน้ำ สามารถทำซ้ำ (Repeatability) ได้ ปฏิกิริยาเกิดได้ภายใต้สภาวะการทดลอง เช่น พีเอชของสารละลาย อุณหภูมิ และความดันที่ไม่รุนแรง และสามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ

บริเวณที่จับกับสับสเตรทของแลคเคส (Substrate binding sites of laccase)

โครงสร้างผลึกของแลคเคสไม่แสดงลักษณะเฉพาะของตำแหน่งที่เร่งปฏิกิริยา (Active site) แต่มีการวัดสับสเตรทและถ่ายโอนอิเล็กตรอนไปยังคอปเปอร์ T1 (Type-1-copper) อยู่ในโดเมนที่ 3 บริเวณที่จับกับสับสเตรทของแลคเคสเป็นบริเวณที่มีขนาดใหญ่อยู่ใกล้บริเวณคอปเปอร์ T1 (Type-1-copper) กรดอะมิโนส่วนใหญ่เป็น Histidine (His) และเป็นลิแกนด์ของคอปเปอร์ T1 (Type-1-copper) ล้อมรอบด้วยกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการจับของสับสเตรทต่างๆ จึงทำให้แลคเคสมีสมบัติความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรทได้หลากหลายชนิด ส่วนบริเวณที่ไม่ชอบน้ำก็เป็นกรดอะมิโนชนิด Phe อาจพบร่วมกับกรดอะมิโนที่ชอบน้ำ เช่น Asp, Lys, Tyr และ Prolines ตำแหน่งที่มี Pro ความหลากหลายของชนิดกรดอะมิโนนี้สามารถอธิบาย

ได้ถึงศักยภาพการรีดิวซ์ (Redox potential) ของโมเลกุลคอปเปอร์ T 1 (Type-1-copper) ($> 700 \text{ mV}$) ซึ่งเปรียบเทียบกับแลคเคสที่พบใน *Trametes versicolor*

บริเวณที่ใช้งานภายในโครงสร้างผลึกของแลคเคส (Active sites of laccase)

1. บริเวณที่ใช้งานของกลุ่มคอปเปอร์ T1 (Mononuclear site) บริเวณที่ใช้งานครั้งแรกพบว่าอยู่ใกล้กับผิวภายนอกโมเลกุลและเป็นบริเวณที่จับกับสับสเตรทที่เป็นสารอินทรีย์ ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มฟีนอล (Phenols) หรือกลุ่มอัลลาไมด์ (Arylamines) จะออกซิไดส์อิเล็กตรอนแล้วปล่อยอิเล็กตรอนไป โดยผ่านกลุ่มคอปเปอร์ T1 (Type-1-copper) ส่วนที่จับกับ His และ Cys ทั้งหมดเป็นส่วนของโดเมนที่ 3 และจะส่งเข้าไปยังบริเวณ Trinuclear (T2/T3) (Solomon et al., 2001)

2. บริเวณที่ใช้งานของกลุ่มคอปเปอร์ T2/T3 (Trinuclear site)

เมื่ออิเล็กตรอนถูกส่งเข้ามาบริเวณ Trinuclear (T2/T3) อิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนผ่านช่องทาง 2 ช่องทางภายในโครงสร้างโมเลกุลของแลคเคส (Intramolecular) (Morgunova et al., 2006) อิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนผ่านบริเวณที่มี Cys และ His 2 ตัวของคอปเปอร์ T1 (Type-1-copper) ไปยังบริเวณที่ใช้งานบริเวณที่ 2 คือ บริเวณ Trinuclear (T2/T3) บริเวณนี้จะจับและรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนได้น้ำเกิดขึ้น ซึ่งบริเวณ Trinuclear จะประกอบด้วย 1 โมเลกุลของกลุ่มคอปเปอร์ T2 (Type-2-copper) และ 2 โมเลกุลของกลุ่มคอปเปอร์ T3 (Type-3-copper) จัดอยู่ในลักษณะรูปสามเหลี่ยมอยู่ระหว่างโดเมนที่ 1 กับ โดเมนที่ 3 จับกับ His 8 ตัวและ 2 โมเลกุลของน้ำ ส่วนกลุ่มคอปเปอร์ T2 มีลักษณะเป็นไตรโคออดิเนต (Tricoordinated) จับกับ His 2 ตัวและ 1 โมเลกุลของน้ำ 2 โมเลกุลของกลุ่มคอปเปอร์ T3(a) เป็นบริเวณที่จับกับสาร His111, His399 และ His449 ส่วน T3(b) เป็นบริเวณที่จับกับสาร His66, His109 และ His451 นอกจากนี้ยังมีการจับกับโมเลกุลของน้ำแบบไม่สมมาตร (Asymmetrically) กับ 2 โมเลกุลของกลุ่มคอปเปอร์ T3 (T3 (a) ระยะทาง $2.98 \text{ \AA}$ และ T3 (b) มีระยะทางเท่ากับ $2.23 \text{ \AA}$) พื้นผิวของตัวทำละลายมี 2 ช่องทางในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนให้เข้าไปยังบริเวณ Trinuclear (T2/T3) ภายในโครงสร้างโมเลกุลของแลคเคส ซึ่งช่องทางแรกเป็น 2 โมเลกุลของกลุ่มคอปเปอร์ T3 (Type-3-copper) ด้านหนึ่งของกลุ่ม T2/T3 ช่องทางนี้จะยอมจับกับโมเลกุลของออกซิเจน ส่วนช่องทางที่ 2 เป็นโมเลกุลของกลุ่มคอปเปอร์ T2 (Type-2-copper) จะรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนได้น้ำเกิดขึ้นและน้ำก็เคลื่อนที่ไปผสมกับตัวทำละลายต่อไป

ปฏิกิริยาของแลคเคส (Reaction of laccase)

แลคเคสจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชันกับอิเล็กตรอนของสับสเตรทบริเวณ Mononuclear (Type-1-copper) แล้วอิเล็กตรอนก็ถูกถ่ายโอนผ่าน His-Cys-His ซึ่งเป็นบริเวณ Trinuclear (Type-2-copper/Type-3-copper) บริเวณนี้ทำหน้าที่รีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนได้น้ำเกิดขึ้นและส่งออกภายนอกต่อไป โดยอิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนผ่านช่องทางสำหรับการถ่ายโอนอิเล็กตรอนอยู่ 2 ช่องทาง ซึ่งเป็นบริเวณ Trinuclear (T2/T3) ช่องทางแรกเป็นโมเลกุลของคอปเปอร์ T3 (Type-3-copper) ช่องทางนี้จะจับกับ

โมเลกุลของออกซิเจน ส่วนช่องทางที่ 2 เป็นโมเลกุลของคอปเปอร์ T2 (Type-2-copper) ช่องนี้ จะทำการรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนได้น้ำเกิดขึ้น และน้ำก็เคลื่อนที่ไปผสมกับตัวทำละลายต่อไป

งานวิจัยของ Yucheng et al. (2007) ศึกษาการย่อยสลายของโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินด้วยเชื้อราที่ผลิตแลคเคส และ Wang et al., (2011) พบว่าเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* สามารถผลิตแลคเคสได้เมื่อมี guaiacol เป็นตัวชักนำ ดังนั้นจึงมีความสนใจในการศึกษาแลคเคสทางการค้า และแลคเคสที่ได้จากเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

3.2.3. *Aureobasidium pullulans*

A. pullulans เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น อะไมเลส โปรตีนเนส ไลเพส เซลลูเลส ไชแลเนส เป็นต้น (Chi et al., 2009) จึงเป็นยีสต์ที่มีความน่าสนใจในการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับไลเพสจาก *A. pullulans* ยังมีผู้น้อยมาก Liu et al., (2008) ได้ทำการศึกษาไลเพสจาก *A. pullulans* HN2.3 พบว่าภาวะที่เหมาะสมสามารถผลิตไลเพสได้ 8.02 ± 0.24 หน่วยต่อมิลลิลิตร ธนธร วิทิตสานต์ (2553) สามารถคัดแยกเชื้อ *A. pullulans* var. *melanogenum* ได้จากโคมที่ปนเปื้อนน้ำมัน บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี จากการศึกษาพบว่า เชื้อนี้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 2.304 ± 0.104 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันและทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเท่ากับ 17.84 ± 0.79 และ 25.27 ± 1.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสจากยีสต์ พบว่า มีค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสสูงสุดเท่ากับ 4.85 ± 0.15 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไลเพสมาประยุกต์ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซูการ์แฟคตีแอซิดเอสเทอร์พบว่า น้ำตาลฟรักโทสและกรดปาล์มมิกเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 5.95 ± 0.96 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 88.92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำมันปาล์มและเมทานอลเป็นสารตั้งต้น จะเห็นได้ว่าไลเพสที่ได้จากเชื้อนี้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและการสังเคราะห์ จึงน่าจะนำมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้ดี

3.3. ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต กิจกรรมของไลเพส และปริมาณโปรตีนจากเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

1. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

การเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารแข็ง (Yeast Malt Agar; YMA) ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนจานเพาะเชื้อ แล้วเจียโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน (Yeast Malt Broth; YMB) ในหลอดทดลองเพื่อทำเป็นหัวเชื้อ บ่มเลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเพิ่มจำนวนและนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ จากอาหารเหลว YMB ลงในอาหารเหลวสูตร (Lipase Production Medium; LPM) สำหรับการผลิตไลเปสปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมน้ำมันสนุด้า 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำให้ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.3 ทำการถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อโดยคำนวณให้มีค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมงนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักน้อยกว่า 10 กิโลดาลตันออกไป จะได้ไลเปสส่วนใสที่บริสุทธิ์ขึ้นอยู่ด้านบน และนำไปตรวจสอบกิจกรรมของไลเปสและปริมาณโปรตีน

2. การวัดอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

วัดค่าความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เก็บผลติดต่อกันเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง แล้วนำมาสร้างกราฟการเจริญเติบโตพร้อมทั้งเก็บตัวอย่างที่ได้มาแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสหรือเอนไซม์ที่ยีสต์ผลิตได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของไลเปสต่อไป

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein)

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ มาวัดปริมาณของโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford's method (Bradford, 1976) ด้วยวิธีการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA) ที่มีปริมาณโปรตีน 0-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส (Total activity)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาวัดค่ากิจกรรมของไลเปสทั้งหมดโดยใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Maia *et al.*, 2001) โดยใช้สารละลายตั้งต้น คือ พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท (*p*-nitrophenyl palmitate) ตรวจสอบโดยการวัดการดูดกลืนแสงของพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ซึ่งเป็นสารละลายผลิตภัณฑ์หลังทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยวัดที่ 410 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วเปรียบเทียบกับ

ปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจากกราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายพารา-ไนโตรฟีนอล ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit) ของแอกทิวิตีของเอนไซม์มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนพารา-ไนโตรฟีนอลปาล์มมิเตทแล้วให้พารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.3.2. ศึกษาความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของไลโปไลติกยีสต์ในระดับห้องปฏิบัติการ

1. ทดสอบความสามารถในย่อยสลาย Naphthalene ด้วยเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans*

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ยีสต์ในอาหารแข็ง (Yeast Malt Agar: YMA) ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนจานเพาะเชื้อ แล้วเชี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน (Yeast Malt Broth; YMB) ในหลอดทดลองเพื่อทำเป็นหัวเชื้อ บ่มเลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเพิ่มจำนวนและนำไปใช้เป็นก้ำเชื้อในการทดลองต่อไป หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ จากอาหารเหลว YMB ลงในอาหารเหลวสูตร (Lipase Production Medium; LPM) สำหรับการผลิตไลเปส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมน้ำมันสนับดำ 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำให้ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.3 ทำการถ่ายเชื้อจากก้ำเชื้อโดยคำนวณให้มีค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด จากนั้นจึงเติมแนฟทาลีน 1 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ส่วนใสเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแนฟทาลีนที่เหลืออยู่ ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

2. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตแลคเคส

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ยีสต์ในอาหารแข็ง (Yeast Malt Agar: YMA) ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนจานเพาะเชื้อ แล้วเชี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน (Yeast Malt Broth; YMB) ในหลอดทดลองเพื่อทำเป็นหัวเชื้อ บ่มเลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเพิ่มจำนวนและนำไปใช้เป็นก้ำเชื้อในการทดลองต่อไป หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ จากอาหารเหลว YMB ลงในอาหารเหลวสูตร (Laccase Production Medium) สำหรับการผลิตแลคเคส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

พร้อมทั้งเติม guaicol 2 mM และ CuSO_4 0.5 mM เพื่อชักนำให้ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้ จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยการแช่แข็ง (lyophilization)

3. ทดสอบความสามารถในย่อยสลาย Naphthalene ด้วยแลกเคสทางการค้า

นำแลกเคสทางการค้าความเข้มข้น 23.1 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร เติมลงใน Naphthalene และ Anthracene ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 5 เปอร์เซ็นต์ tween 80, 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 นำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

4. ทดสอบความสามารถในย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแลกเคสจากยีสต์

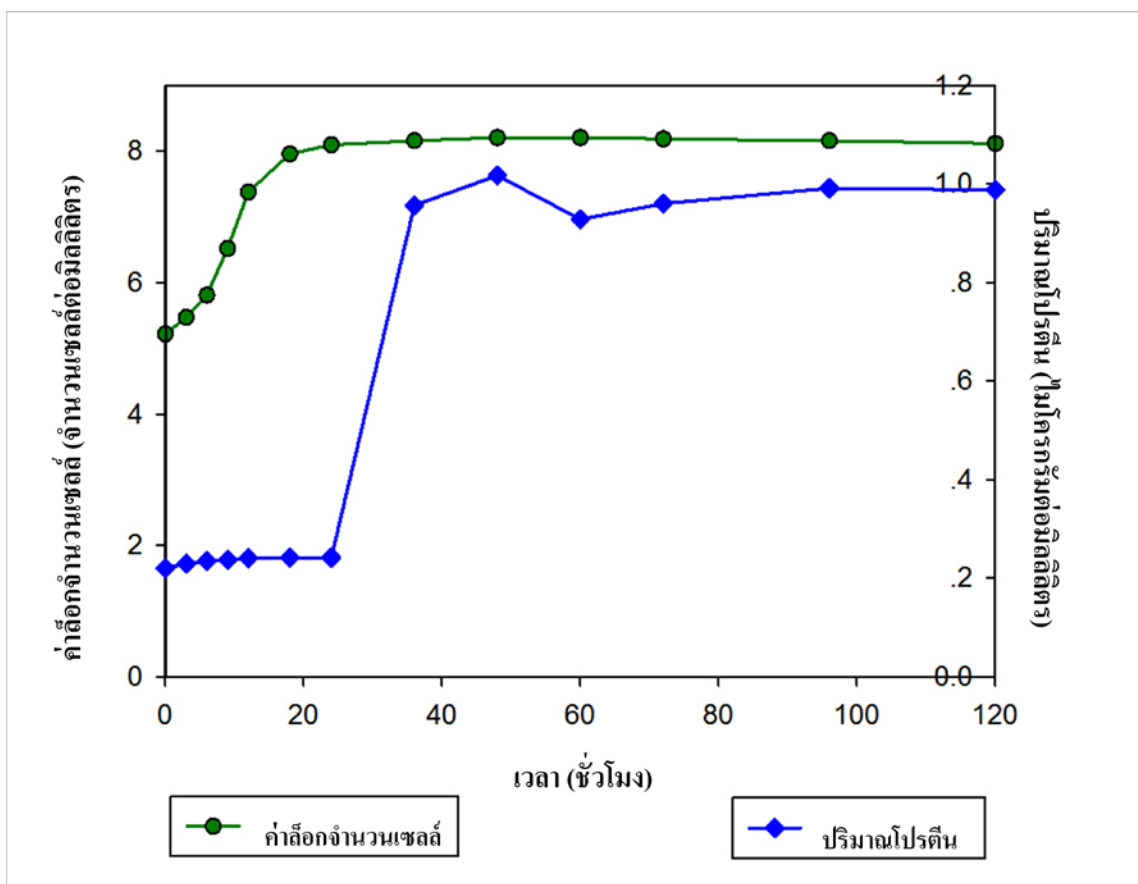
นำแลกเคสจากยีสต์ *A. pullulans* ความเข้มข้น 711 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร (0.16 กรัม) เติมลงสารละลายที่ประกอบด้วย Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ความเข้มข้นเริ่มต้น 10, 0.908, 0.135 และ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 5 เปอร์เซ็นต์ tween 80, 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ทำการสกัดสาร PAHs ออกจากสารละลายตัวอย่าง โดยเติมเฮกเซน 2 เท่าของปริมาณตัวอย่าง กับ ¼ เท่าของ 15% ไททันเอ็กซ์ 100 เข้าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

3.3.3. ศึกษาความสามารถและประสิทธิภาพของแลกเคสจากยีสต์ ในการย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในตัวอย่างดิน

นำแลกเคสจากยีสต์ *A. pullulans* ปริมาณ 5 กรัม เติมลงในตัวอย่างดินที่ประกอบด้วย Naphthalene หรือ Anthracene ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.45 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 5 เปอร์เซ็นต์ tween 80, 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 ในดิน 1 กรัม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันทำการสกัดสาร PAHs ออกจากสารละลายดินโดยเติมเฮกเซน 2 เท่าของปริมาณตัวอย่าง กับ ¼ เท่าของ 15% ไททันเอ็กซ์ 100 เข้าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

3.4. ผลการวิจัย

3.4.1. การทดลองวัดอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein)

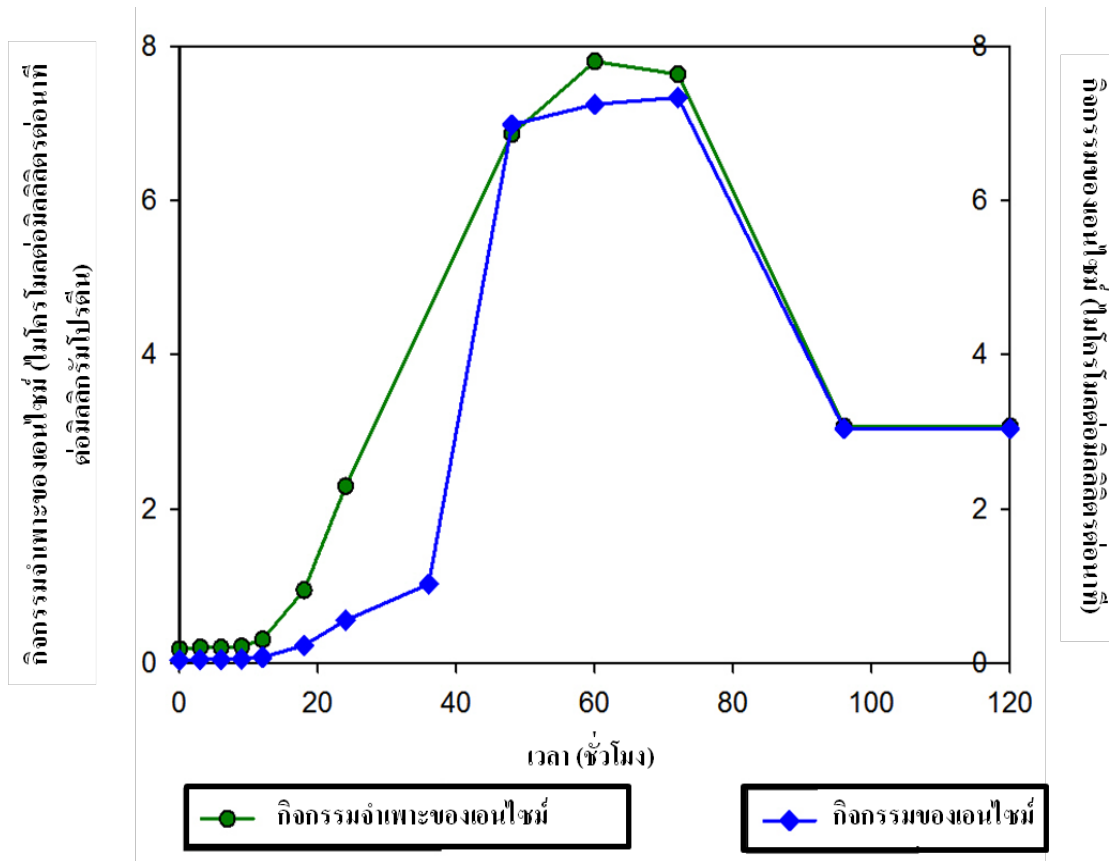


ภาพที่ 3.4 ค่าลือกจำนวนเซลล์และปริมาณ โปรตีนของเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans*

จากภาพที่ 3.4 กราฟการเจริญเติบโตของยีสต์ *Aureobasidium pullulans* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) ที่ช่วงเวลา 0-48 ชั่วโมงแรก และเข้าสู่ช่วงการเจริญเติบโตแบบคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 48-60 และจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน พบว่าเมื่อนำมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA จะเห็นได้ว่า *Aureobasidium pullulans* มีปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ 310.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในชั่วโมงที่ 48 โดยอยู่ในช่วงสุดท้ายของ log phase และเริ่มเข้าสู่ stationary phase

3.4.2 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส (Total activity)

ในการคำนวณค่ากิจกรรมของไลเปสของเชื้อจุลินทรีย์เชิงปริมาณ ต้องมีการเทียบกับกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล ในหน่วยไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาทีโดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ยูนิต หรือไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาทีของเอนไซม์ มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนพารา-ไนโตรฟีนอลปาล์มมิเตท ไปเป็นพารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่สภาวะที่กำหนด จากกราฟที่ชั่วโมงที่ 72 มีค่ากิจกรรมของไลเปสที่ 7.336 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง จึงมีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป



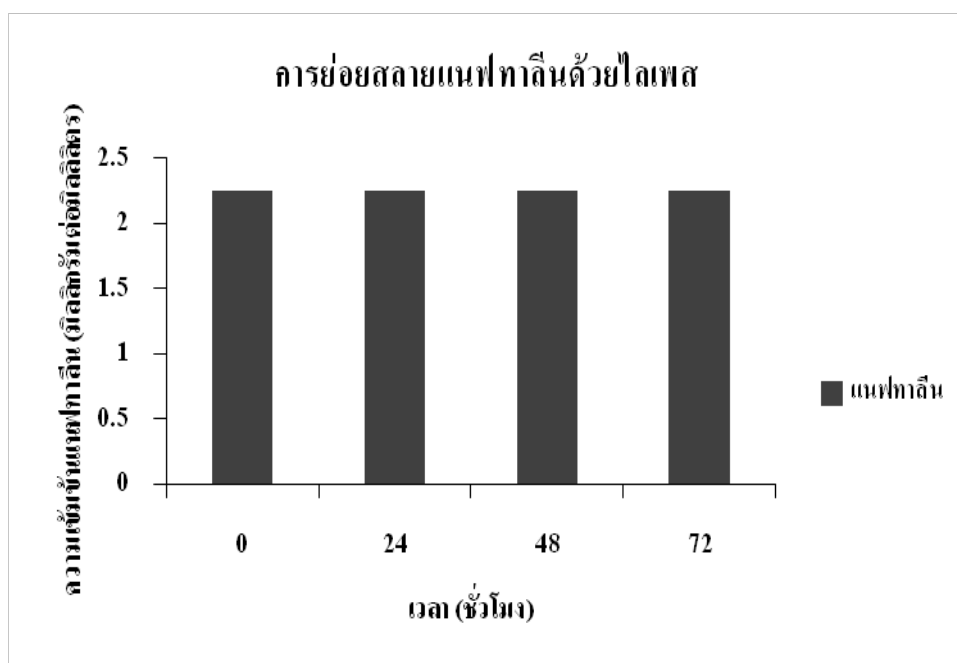
ภาพที่ 3.5 ปริมาณกิจกรรมของไลเปสและค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ของเชื้อยีสต์

Aureobasidium pullulans

จากการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสจากเชื้อยีสต์ในชั่วโมงที่ 60 พบว่าเชื้อ *Aureobasidium pullulans* มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 769.16 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.4.3 ความสามารถในการย่อยสลาย Naphthalene ของไลเพส

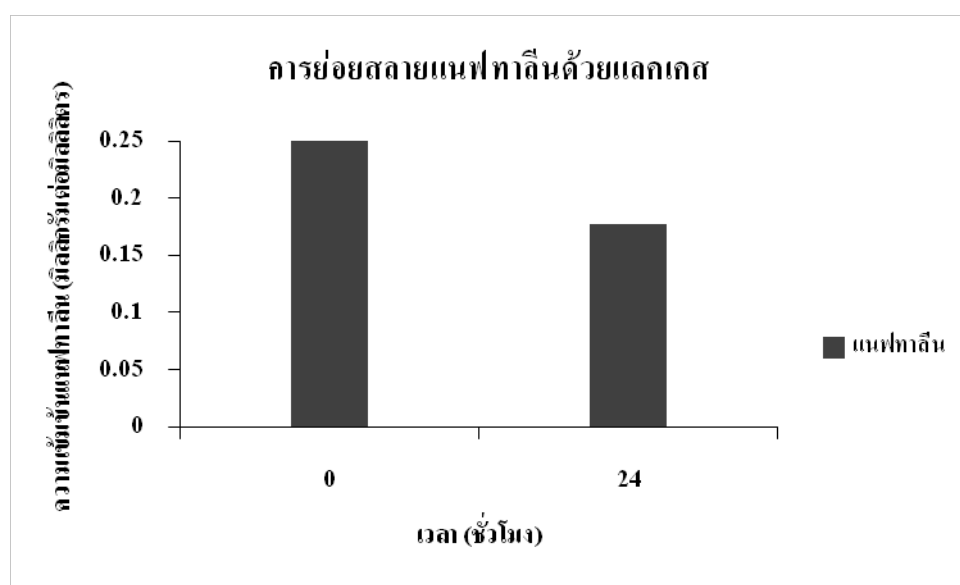
เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Aureobasidium pullulans* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด จากนั้นจึงเติม Naphthalene 1 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอน จะได้ส่วนใสเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จะเห็นได้ว่าไลเพสที่ได้จากการชักนำด้วยน้ำมันสนบูดำจากเชื้อยีสต์ *A. pullulans* ไม่สามารถย่อย Naphthalene ได้ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์หาปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง พบว่าปริมาณความเข้มข้นของ Naphthalene ที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้นซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 3.6) เนื่องจากไลเพสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) จึงไม่สามารถทำลายพันธะของวงเบนซีนให้แตกออกได้ จากงานวิจัยของ Yucheng et al., ในปี 2007 ได้ศึกษาการย่อยสลายของโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินด้วยเชื้อราที่ผลิตแลคเคส และ Wang et al. (2011) พบว่าเชื้อยีสต์ *A. pullulans* สามารถผลิตแลคเคสได้เมื่อมี guaiacol เป็นตัวชักนำ ดังนั้นจึงมีความสนใจในการศึกษาเปรียบเทียบแลคเคสทางการค้า และแลคเคสที่ได้จาก *A. pullulans* มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนต่อไป



ภาพที่ 3.6 ปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายด้วยไลเพส

3.4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย Naphthalene ของแลคเคสทางการค้า

เมื่อนำแลคเคสทางการค้าความเข้มข้น 23.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย Naphthalene ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงพบว่าแลคเคสมีความสามารถในการย่อยสลาย Naphthalene จะเห็นได้จากโครมาโทแกรมภาพที่ 3.7 ปริมาณ Naphthalene ลดลงจากความเข้มข้นเริ่มต้น 27.6 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแลคเคสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตส (Oxidoreductase) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยา โดยให้อิเล็กตรอนและมีโมเลกุลออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ออกซิเจนที่ได้รับอิเล็กตรอนจะรวมกับโปรตอนที่มีอยู่ในสารละลายกลายเป็นน้ำ ดังนั้นแลคเคสสามารถใช้สับสเตรทประเภทสารในกลุ่มโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เช่น Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene (Octavio et al., 2006)

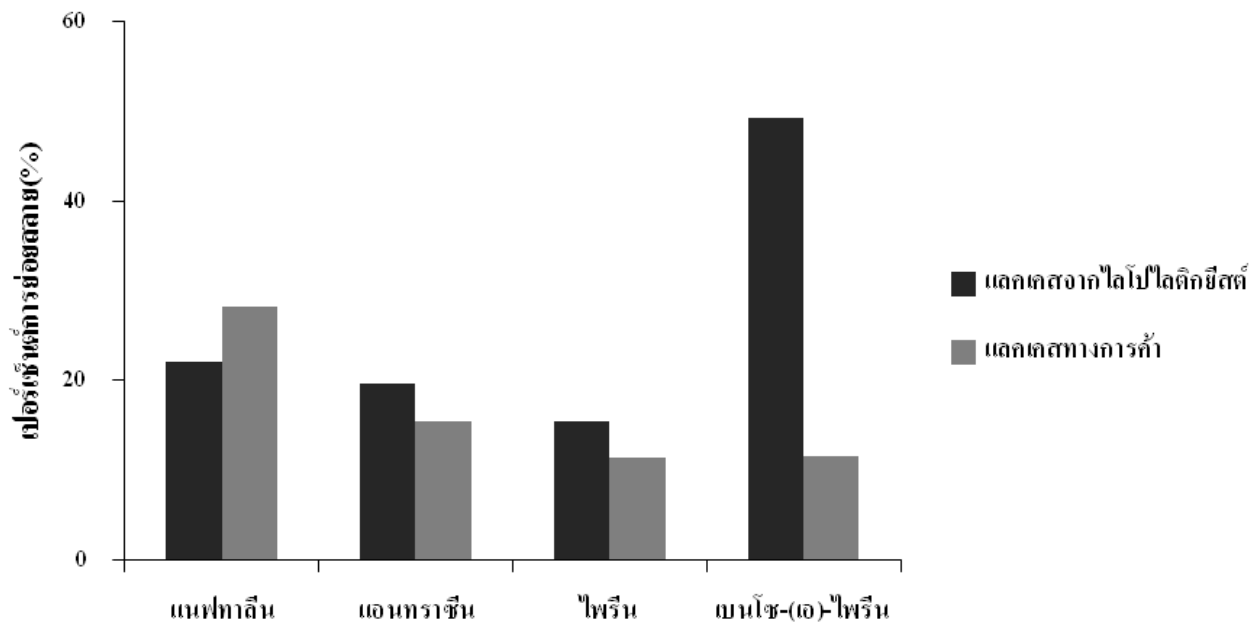


ภาพที่ 3.7 ปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายด้วยแลคเคสทางการค้า

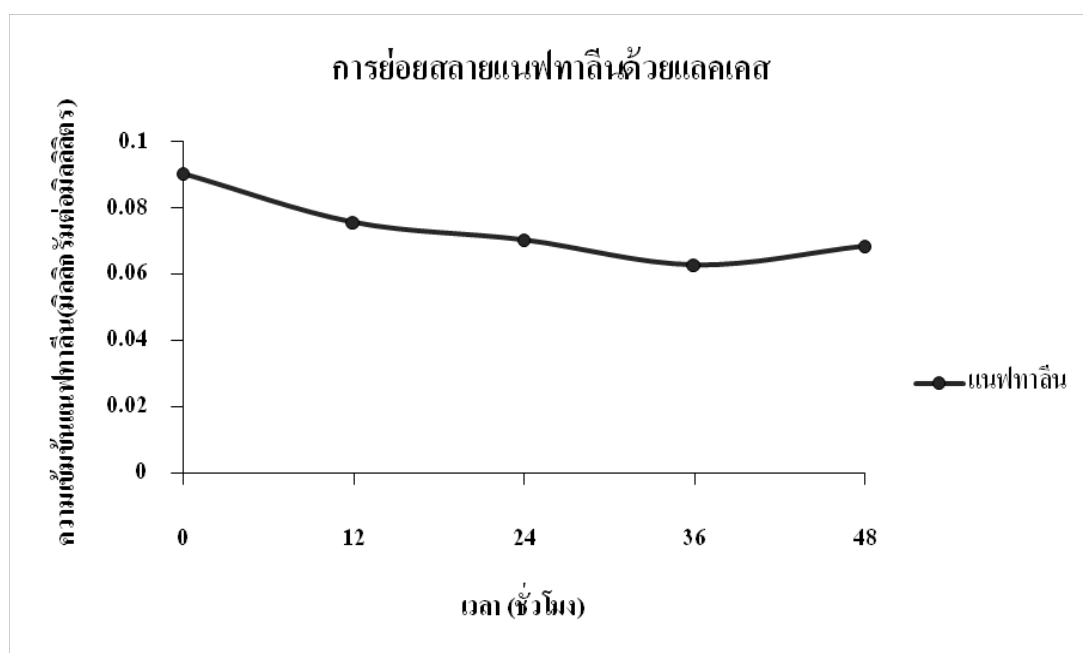
3.4.5 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแลคเคสจากยีสต์

นำแลคเคสจากยีสต์ *A. pullulans* ความเข้มข้น 711 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (0.16 กรัม) เติมลงในสารละลายที่ประกอบด้วย Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ความเข้มข้นเริ่มต้น 10, 0.908, 0.135 และ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 5 เปอร์เซ็นต์ tween 80, 100 มิลลิโมลาร์อะซิเตตบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมา วิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

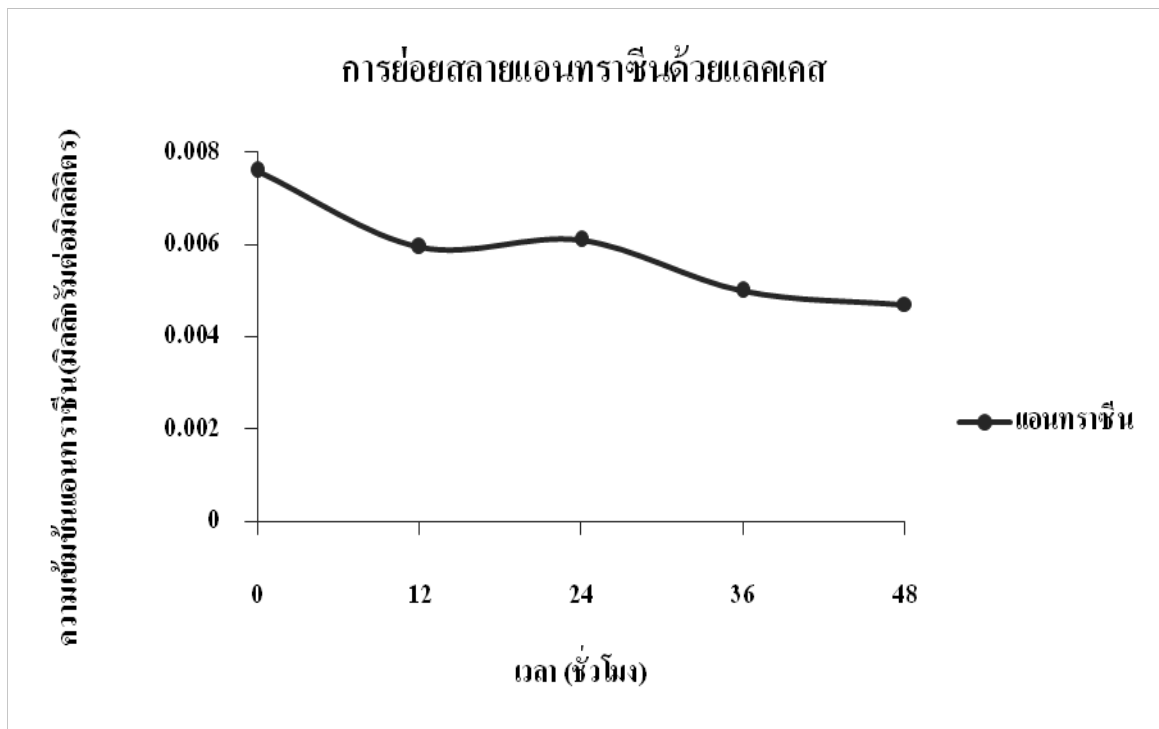
ของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) พบว่าแลกเคสจากไลโปไลติกยีสต์จากเกาสีซึ่งสามารถย่อยสลาย Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ได้ 24.35, 38.16, 25.38 และ 45.33% ตามลำดับภายในเวลา 48 ชั่วโมง



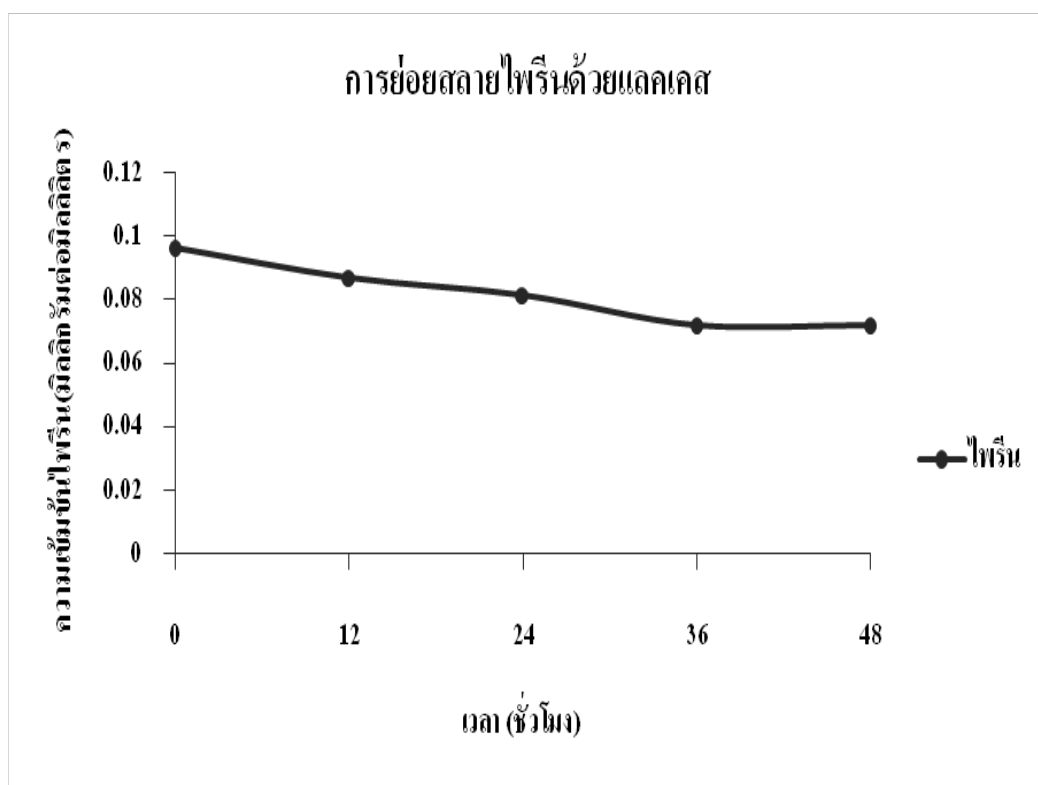
ภาพที่ 3.8 ปริมาณสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่จากการย่อยด้วยแลกเคส



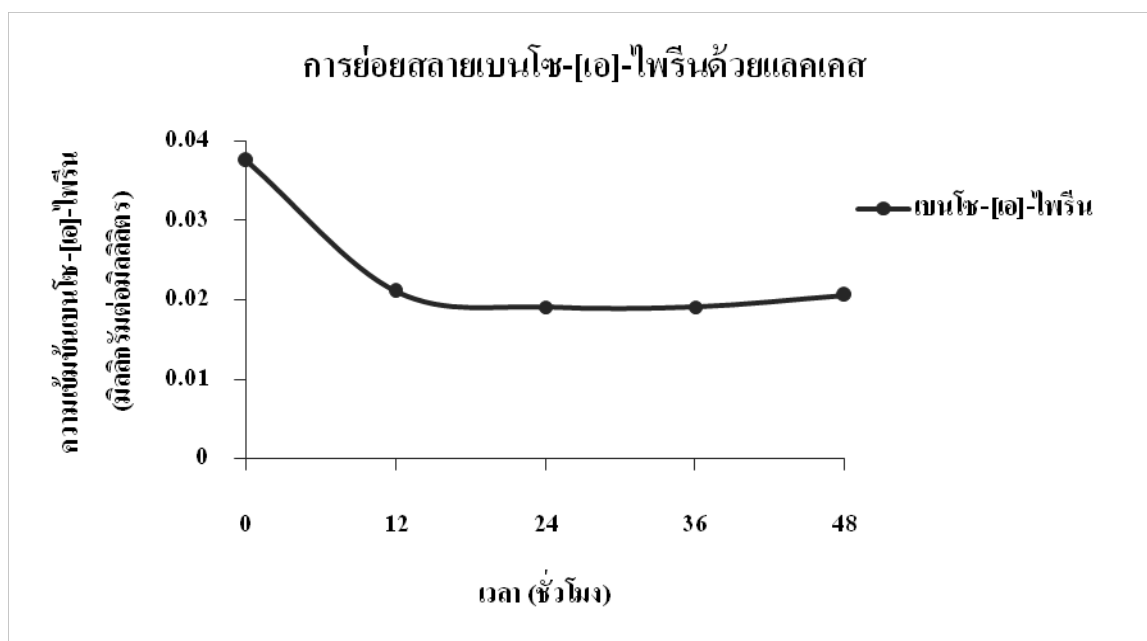
ภาพที่ 3.9 ปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่จากการย่อยด้วยแลกเคสจากยีสต์ *A. pullulans*



ภาพที่ 3.10 ปริมาณ Anthracene ที่เหลืออยู่จากการย่อยด้วยแลกเคสจากยีสต์ *A. pullulans*



ภาพที่ 3.11 ปริมาณ Pyrene ที่เหลืออยู่จากการย่อยด้วยแลกเคสจากยีสต์ *A. pullulans*

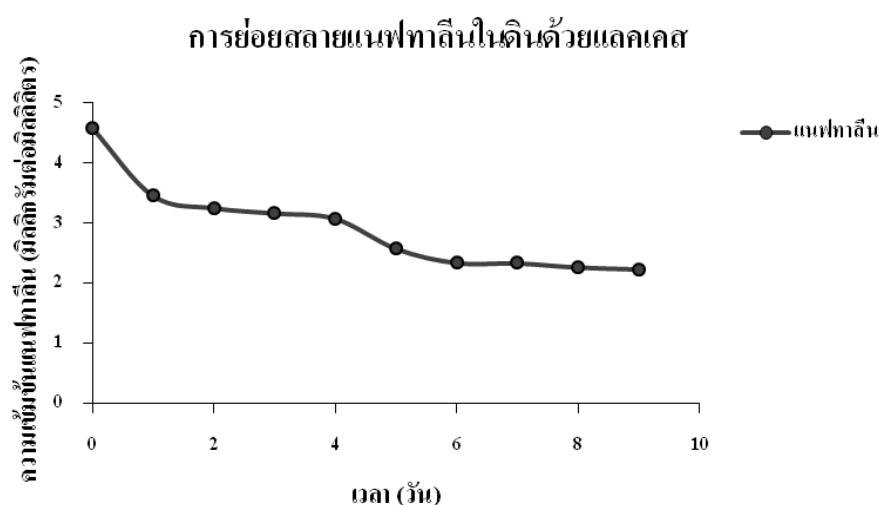


ภาพที่ 3.12 ปริมาณ Benzo[a]pyrene ที่เหลืออยู่จากการย่อยด้วยแลกเคลสจากยีสต์ *A. pullulans*

3.4.6 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ในดินด้วยแลกเคลส

3.4.6.1 ความสามารถในการย่อยสลาย Naphthalene ของแลกเคลสจากยีสต์ *A. pullulans*

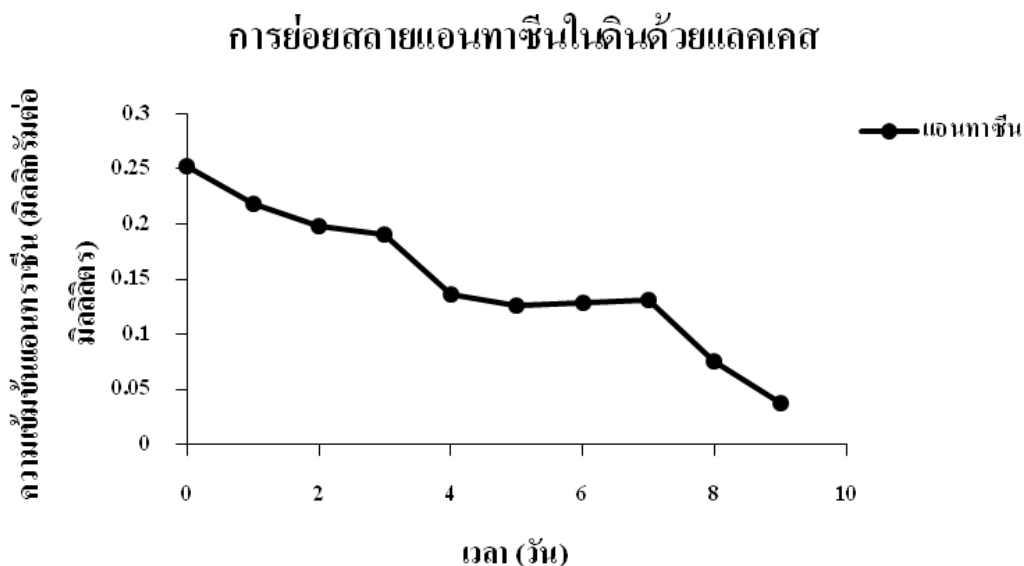
เมื่อนำแลกเคลสปริมาณ 5 กรัม เติมลงในตัวอย่างดินที่มี Naphthalene ความเข้มข้นเริ่มต้น 4.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง พบว่าแลกเคลสมีความสามารถในการย่อยสลาย Naphthalene โดยทำให้ปริมาณ Naphthalene ลดลง 51.34 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 9 วัน (ภาพที่ 3.13) (ค่าเฉลี่ย 5.8 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)



ภาพที่ 3.13 ปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ในดินหลังจากการย่อยด้วยแลกเคลส

3.4.6.2. ความสามารถในการย่อยสลาย Anthracene ของแอสคัสจากยีสต์ *A. pullulans*

เมื่อนำแอสคัสปริมาณ 5 กรัม เติมลงในตัวอย่างดินที่มี Anthracene ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันและนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Anthracene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จากโครมาโทแกรมภาพที่ 3.14 พบว่าแอสคัสมีความสามารถในการย่อยสลาย Anthracene ในดินลดลง 85.06 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 9 วัน (เฉลี่ย 9.49 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)



ภาพที่ 3.14 ปริมาณ Anthracene ที่เหลืออยู่ในดินหลังจากการย่อยด้วยแอสคัส

3.5. อภิปรายและวิจารณ์ผล

การเจริญเติบโตของยีสต์ *A. pullulans* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) ที่ช่วงเวลา 0-48 ชั่วโมงแรก และเข้าสู่ช่วงการเจริญเติบโตแบบคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 48-60 โดยมีปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ 310.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 48 โดยอยู่ในช่วงสุดท้ายของ Log phase และเริ่มคงที่ตามอัตราการเจริญที่คงที่ ชั่วโมงที่ 72 มีค่ากิจกรรมของไลเปสที่ 7.336 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงเมื่อวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสจากเชื้อยีสต์ *A. pullulans* พบว่าในชั่วโมงที่ 60 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 769.16 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีนดังนั้นที่ชั่วโมงที่ 60 จึงเหมาะสมที่สุดที่จะนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเนฟทาลินของไลเปส แล้ววิเคราะห์หาปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จะเห็นได้ว่าไลเปสที่ได้จากยีสต์ *A. pullulans* เนื่องจากไลเปสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) จึงไม่สามารถทำลาย

พันธะของวงเบนซีนให้แตกออกได้ จากงานวิจัยของ Yucheng et al., ในปี 2007 ได้ศึกษาการย่อยสลายของ โพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่ปนเปื้อนในดินด้วยเชื้อราที่ผลิตแลกเคส และในปี 2011 Wang et al., พบว่าเชื้อยีสต์ *A. pullulans* สามารถผลิตแลกเคสได้เมื่อมี guaiacol เป็นตัวชักนำ ดังนั้นจึงมีความสนใจในการศึกษาแลกเคสที่ได้จาก *A. pullulans* มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนต่อไป เมื่อนำแลกเคสจากไลโปไลติกยีสต์ความเข้มข้น 711 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร (0.16 กรัม) มาทดสอบการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในระดับห้องปฏิบัติการ แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบ สมรรถนะสูง พบว่าแลกเคสจากไลโปไลติกยีสต์จากเกาะสีชัง สามารถย่อยสลาย Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ได้ 24.35, 38.16, 25.38 และ 45.33 % ตามลำดับ ภายใน 48 ชั่วโมง เนื่องจากแลกเคสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductase) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยา โดยให้อิเล็กตรอน และมีโมเลกุลออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ออกซิเจนที่ได้รับอิเล็กตรอนจะรวมกับโปรตอนที่อยู่ใน สารละลายกลายเป็นน้ำ ดังนั้นแลกเคสสามารถใช้สับสเตรทประเภทสารในกลุ่มโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ (Octavio et al., 2006) สำหรับการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างดินด้วยแลกเคสจากยีสต์ พบว่าปริมาณ Naphthalene ลดลง 51.34 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ Anthracene ลดลง 85.06 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 9 วัน เนื่องจากสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนสามารถยึดเกาะกับอนุภาคของดินได้ดีจึงย่อยสลายได้ยากขึ้นกว่าในสถานะที่อยู่ใน สารละลาย โดย Naphthalene ลดลงเฉลี่ย 5.8 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ Anthracene ลดลงเฉลี่ย 9.49 เปอร์เซ็นต์ต่อวันตามลำดับ

สรุปได้ว่าเอนไซม์แลกเคสจากไลโปไลติกยีสต์จากเกาะสีชัง ได้แสดงถึงความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ทั้ง 4 ชนิด แต่มีความจำเพาะการย่อยสลายตามโครงสร้างที่แตกต่างกันไป สังเกตได้ว่านิยมนิยมนโครงสร้างอะโรมาติกที่เป็นวงแหวนแต่ไม่ขึ้นกับขนาดของโครงสร้าง การทดลองนี้ได้มีการดำเนินการในห้องปฏิบัติการภายใต้การควบคุมปัจจัยต่างๆซึ่งได้แสดงถึงศักยภาพของแลกเคสที่จะใช้ในการบำบัดสารพิษกลุ่มนี้ได้

3.6. ข้อเสนอแนะ

การศึกษาต่อไปที่ควรปฏิบัติและดำเนินการคือการนำผลการศึกษาวิจัยไปทดลองทดสอบการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในพื้นที่จริงด้วยการใช้เอนไซม์แลกเคส หรือจุลินทรีย์ *A. pullulans* ทั้งเซลล์ โดยศึกษาถึงปัจจัยทั้งด้านกายภาพและชีวภาพของพื้นที่ต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายสาร เพื่อให้ทราบถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้กระบวนการทดสอบดังกล่าวในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ หรือสภาพแวดล้อมที่สามารถควบคุมปัจจัยที่เป็นตัวแปรต่างๆ

3.7. บรรณานุกรม

- ธนธร วิทิตสานต์. 2553. การสังเคราะห์ซูการ์แฟตตีแอซิดเอสเทอร์และเมทิลเอสเทอร์ด้วยไลเปสจากยีสต์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Baldrian, P., In der Wiesche, C., Gabriel, J., Nerud, F., and Zadrazil, F. 2000. Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2471–2478.
- Benjamin, S., and Pandey, A. 2001. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation, *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 44: 213-221
- Bourbonnais, R., and Paice, M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation, *FEBS Letters*, 267: 99–102.
- Cardenas, F., De Castro, M.S., Sanchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., Valmaseda, M., Elsona, S.W., and Alvarez, E. 2001. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media, *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 145–154.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analysis Biochemistry*, 72: 248–254.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., and Zhang, T. 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 793–804.
- Cihangir, N., and Sarikaya, E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 193-197.
- Elibol, M., and Ozer, D. 2001. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*, *Process Biochemistry*, 36, 4: 325-329
- Fernández-Sánchez, C., Tzanov T., Gübitz, G. M., and Paulo, A. C. 2002. Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions, *Bioelectrochemistry*, 58, 149-156.
- Gautam, R., Bassi, A.S. and Yanful, E. K. 2007. *Candida rugosa* lipase-catalyzed polyurethane degradation in aqueous medium, *Biotechnology Letters*, 29: 1081–1086.
- Gschwend, P.M., and Hites, R.A., 1981. Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine and lacustrine sediments in the Northeastern United States, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45: 2359-2367.

- Hites, R.A., Laflamme, R.E., and Farrington, J.W., 1977. Sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons: the historical record, *Science*, 198: 829-831.
- Jaeger, K-E., Reetz, M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 16: 396–403.
- Kademi, A., Lee, B., and Houde, A. 2003. A production of heterologous microbial lipases by yeasts, *Indian Journal of Biotechnology*, 2: 346-355.
- Kakugawa, K., Masahiro, T., Kunihiro, I., Keiko, M., Shozo, M., Yuki, M., Osamu, S., and Tokichi, M. 2002. Isolation of Yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11, Novel Producer of Mannosylerythritol Lipid, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 66: 188- 191
- Kanally, R.A., and Harayama, S., 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria, *Journal of Bacteriology*, 182 (8): 2059-2067.
- Kazlauskas, R. J., and Bornscheuer, U. T. 1998. Biotransformations with lipases, In: Rehm, H. J., Pihler, G., Stadler, A., Kelly, P. J. W. (ed), *Biotechnology*, Vol. 8. 37-192, New York: VCH.
- Lijinsky, W., 1991. The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food, *Mutation Research*, 259: 251-261.
- Liu, Z. Q., Chi, Z. M., Wang, L., and Li, J. 2008. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils, *Biochemical Engineering Journal*, 40: 445–451.
- Macrae, A. R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification oils and fats, *Journal of American oil Chemists' Society*, 60: 291-294.
- Maia, M.M.D., Heasley, A., Camargo de Moraes, M.M., Melo, E.H.M., Moraes J.R., M.A., Ledingham, W.M., and Lima Filho, J.L. 2001. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation, *Bioresource Technology*, 76: 23-27.
- Masse, L., Kennedy, K. J., and Chou, S. P. 2001. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79: 629-635.
- Means, R. C. 1980. Underdevelopment and the Development of Law. Chapel Hill: University of North Carolina Press.
- Morgunova, E., Illarionov, B., Sambaiah, T., Haase, I., Bacher, A., Cushman, M., Fischer, M., and Ladenstein, R. 2006. Structural and thermodynamic insights into the binding mode of five novel inhibitors of lumazine synthase from *Mycobacterium tuberculosis*, *FEBS Journal*, 273: 4790-4804.

- Octavio, L. C., Cristina Irma, M. P. P., Ricardo, J. R. B., and Francisco, V. O. 2006. Laccases, *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 2: 323-340.
- Oishi, H., Morimoto, T., Watanabe, Y., and Tamai, Y. 1999. Purification and Characterization of Phospholipase B from *Kluyveromyceslactis*, and Cloning of Phospholipase B gene, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63: 68-76
- Ota, Y., Gomi, K., Kato, S., Sugiura, T., and Minoda, Y. 1982. Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*, *Agricultural Biology and Chemistry*, 46: 2885-2893
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., and Soccol, V. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29: 119-131.
- Potin, O., Rafin, C., and Veignie, E. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) – contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54: 45-52.
- Rathi, P., Goswami, V.K., Sahai, V., Gupta, R. 2002. Response surface methodology for improving production of hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia*, *Journal of Applied Microbiology*, 93: 930–936
- Schmidt, R. D., and Verger, R. 1998. Lipase: Interfacial enzymes with attractive applications, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 37: 1608-1633.
- Solomon, E.I., Baldwin, M.J., and Lowery, M.D. 1992. Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity, *Chemical Reviews*, 92: 521-542.
- Takamoto, T., Shirasaka, H., Uyama, H., and Kobayashi, S. 2001. Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent, *Chemistry Letter* 6: 492-493.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J., and Haas, M. J. 2000. Review: Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9: 113-148.
- Wang, H., Kong, W., Jin, J., Zhang, N., and Li, B. 2011. Extracellular Acidic Laccase by *Aureobasidium pullulans*, *Journal of Microbiology*, 2011-02.
- Yucheng, W., Ying, T., Zhengao, L., Xuewei, L., and Yongming L. 2007. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil, *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 789–796.

Zheng, W., Zhou, H.M., Zheng, Y.F., and Wang, N. 2008. A comparative study on electrochemistry of laccase at two kinds of carbon nanotubes and its application for biofuel cell, *Chemical Physics Letters*, 457, 381-385.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast Malt Medium (YM)

ประกอบด้วย

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับพีเอชเป็น 5.5 กรณิอาหารแข็งเติมวุ้น 20 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Lipase production medium

ประกอบด้วย

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Meat extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
KH ₂ PO ₄	7	กรัม
Palm oil	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Laccase Production Medium

ประกอบด้วย

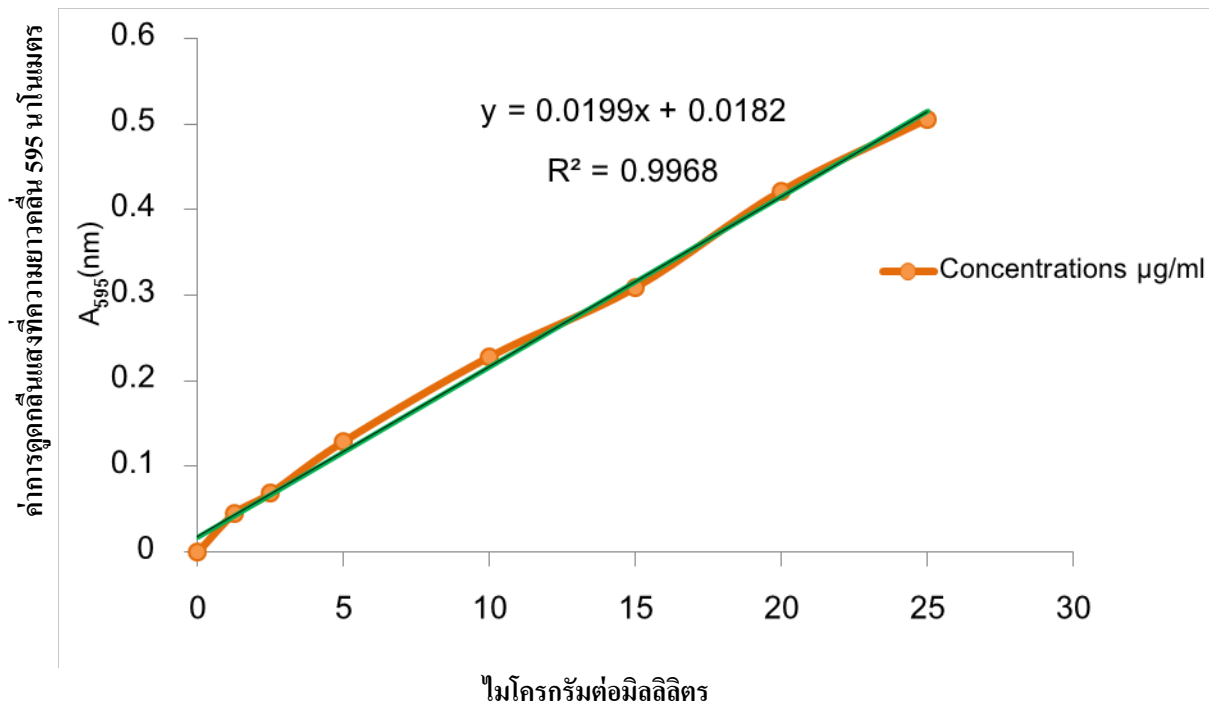
Yeast extract	0.05	กรัม
K ₂ HPO ₄	3.4	กรัม
KH ₂ PO ₄	4.3	กรัม

MgCl ₂ .2H ₂ O	0.3	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	กรัม
Glucose	15	กรัม
Trace salt	5	มิลลิลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
Trace salt ประกอบด้วย		
MnCl ₂ .4H ₂ O	1	มิลลิกรัม
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.6	มิลลิกรัม
CaCl ₂ .H ₂ O	2.6	มิลลิกรัม
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6	มิลลิกรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

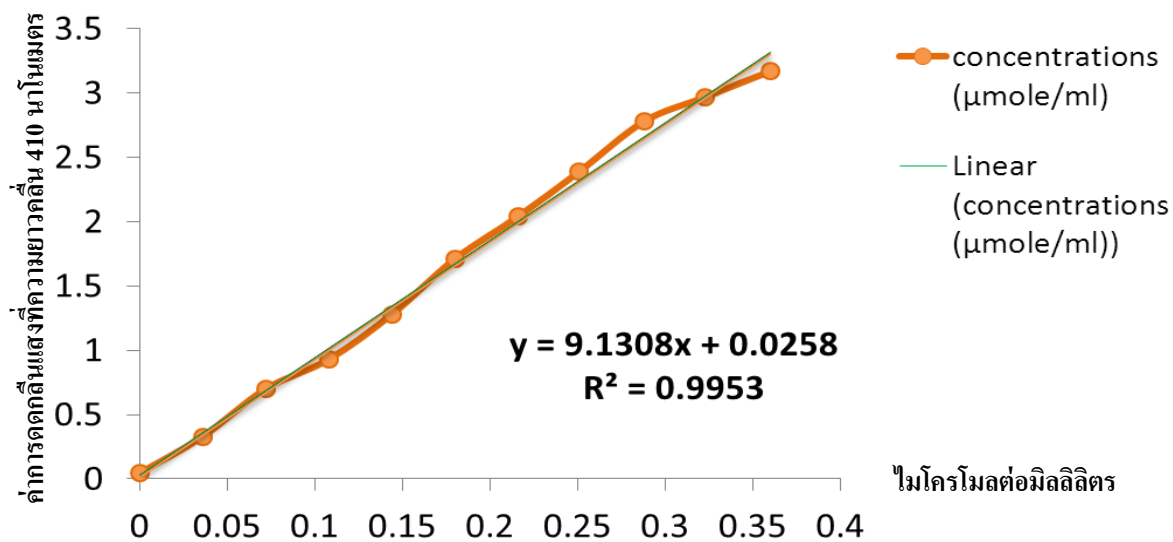
ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม Guaicol 2 mM และ CuSO₄ 0.5 mM

ภาคผนวก ข

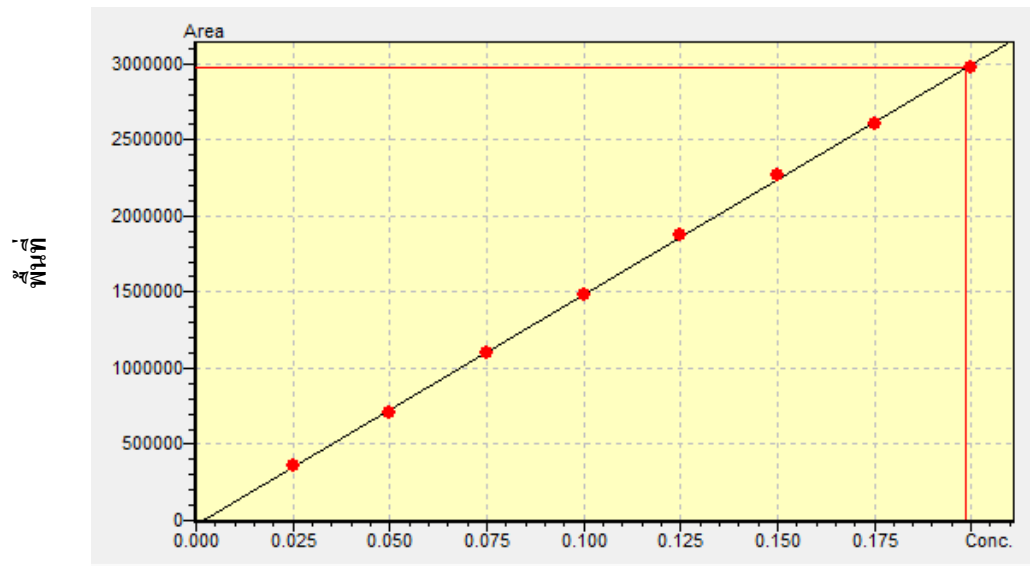
โครมาโตแกรมและกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ 3.15 กราฟมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณ โปรตีน 2.5-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

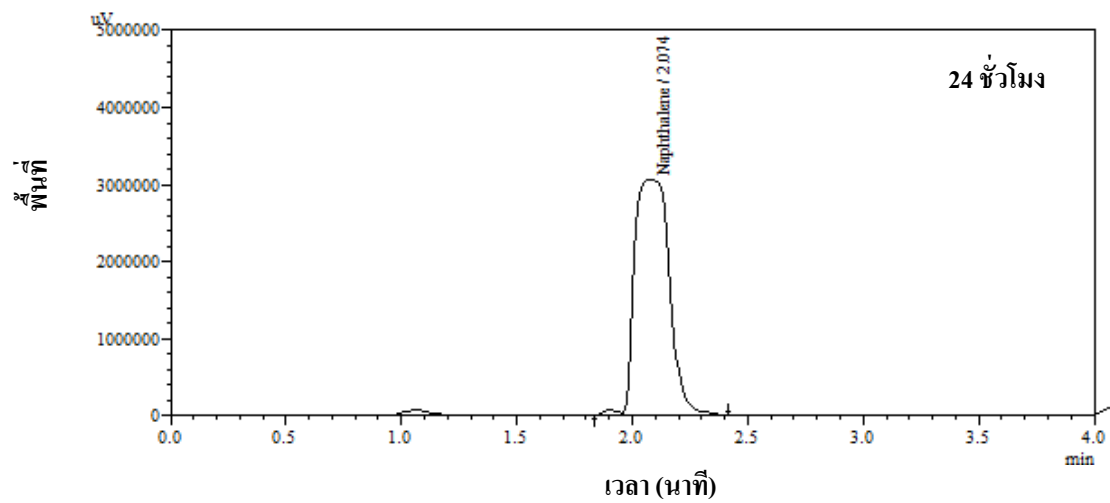
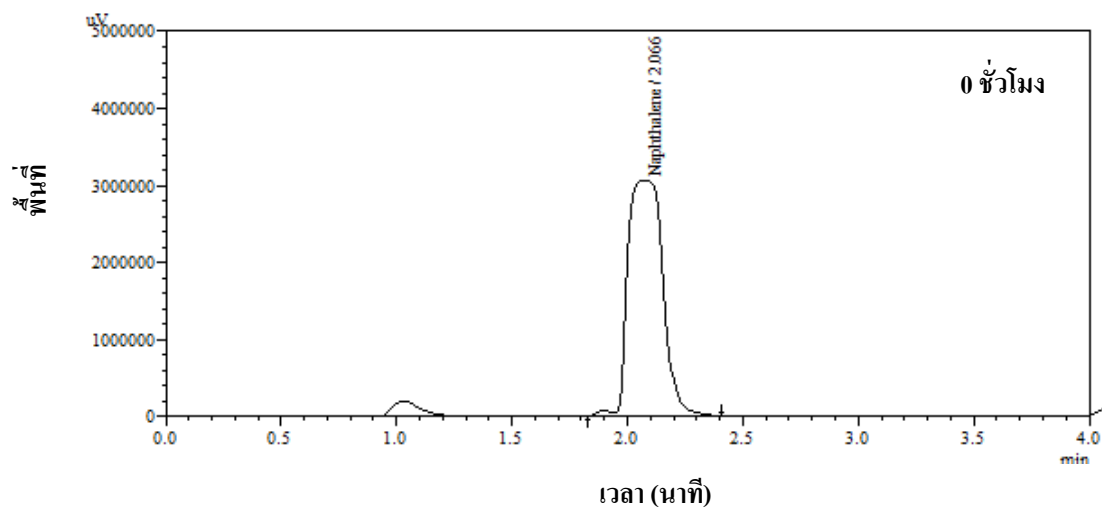


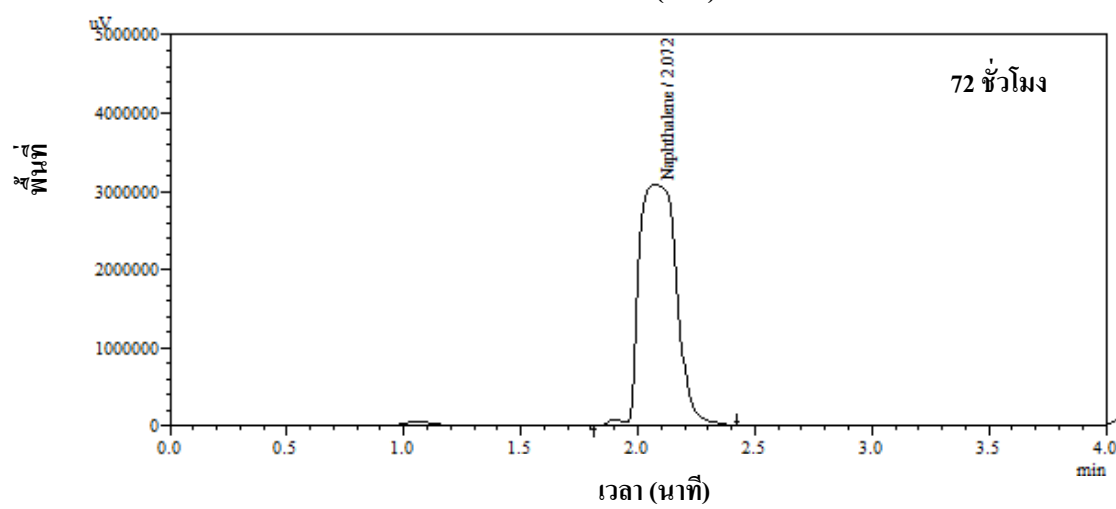
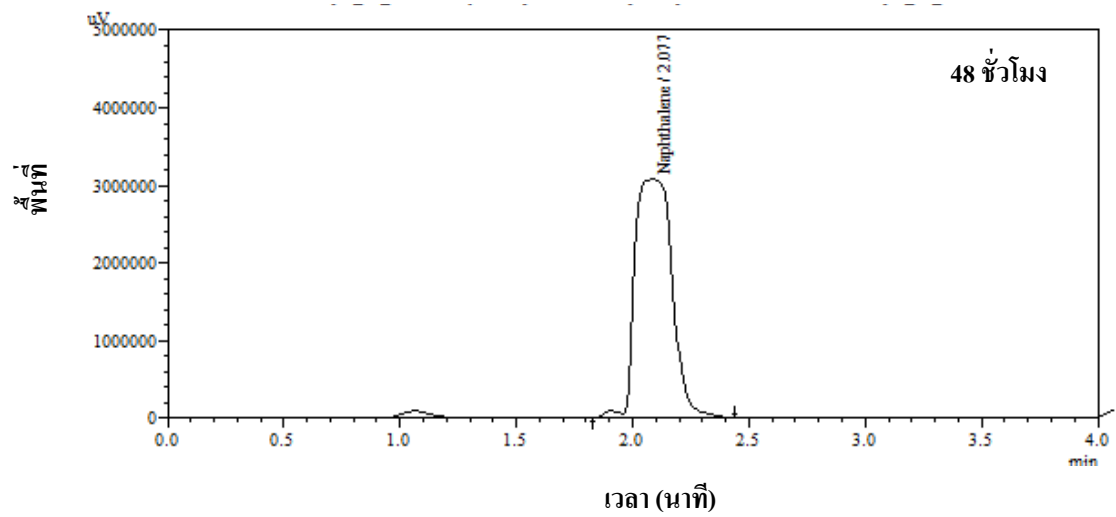
ภาพที่ 3.16 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรเฟนอลปริมาณ 0-0.4 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร



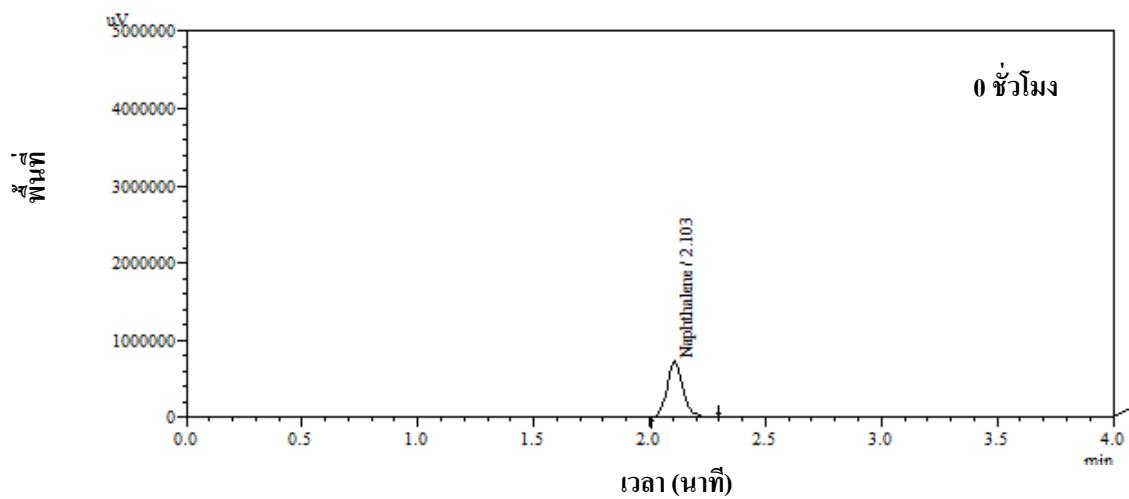
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)

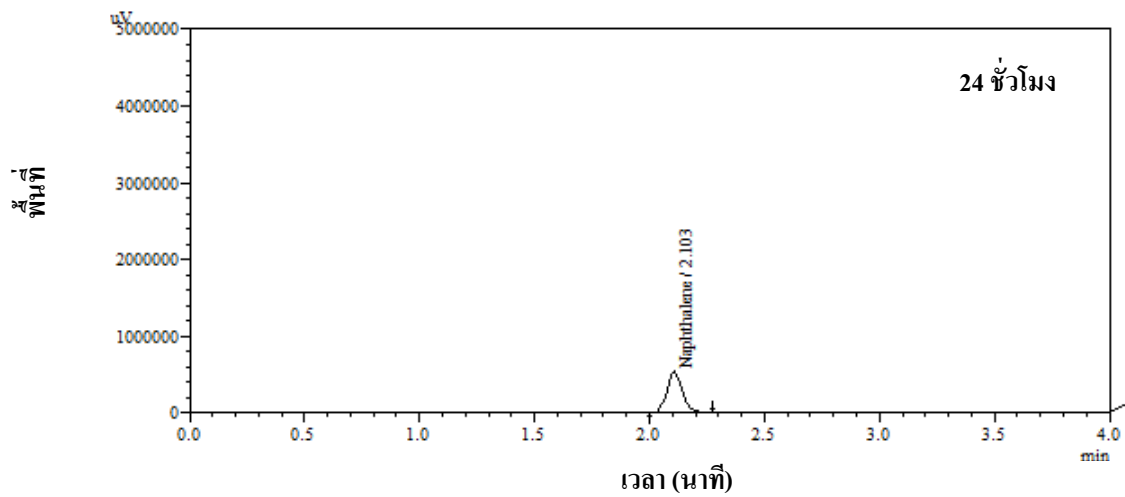
ภาพที่ 3.17 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแนฟทาไลน์



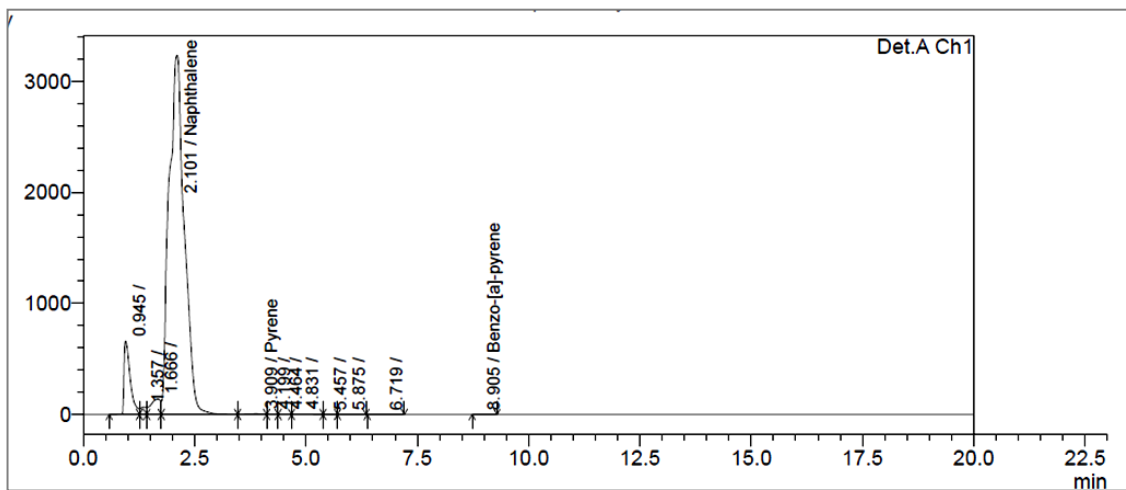


ภาพที่ 3.18 ปริมาณแนฟทาลินที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายด้วยไลเพส

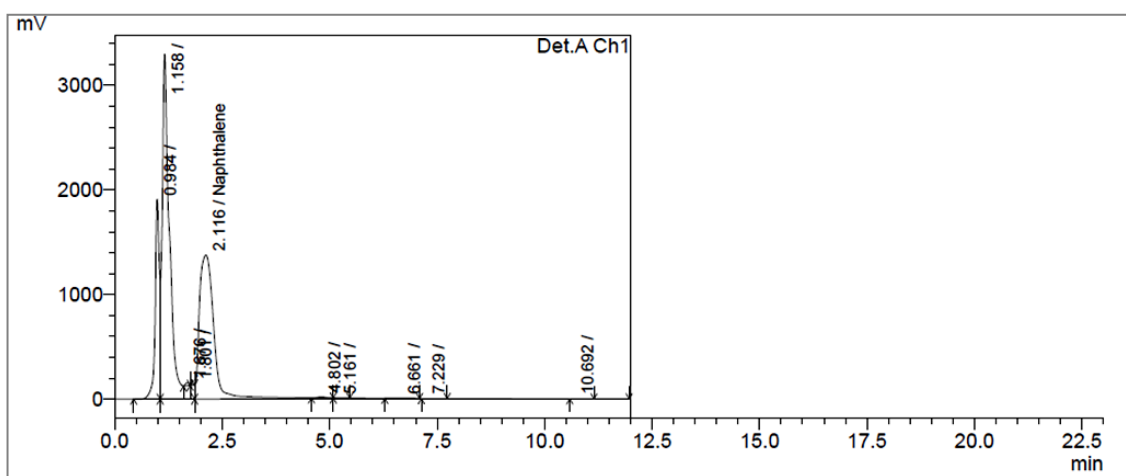




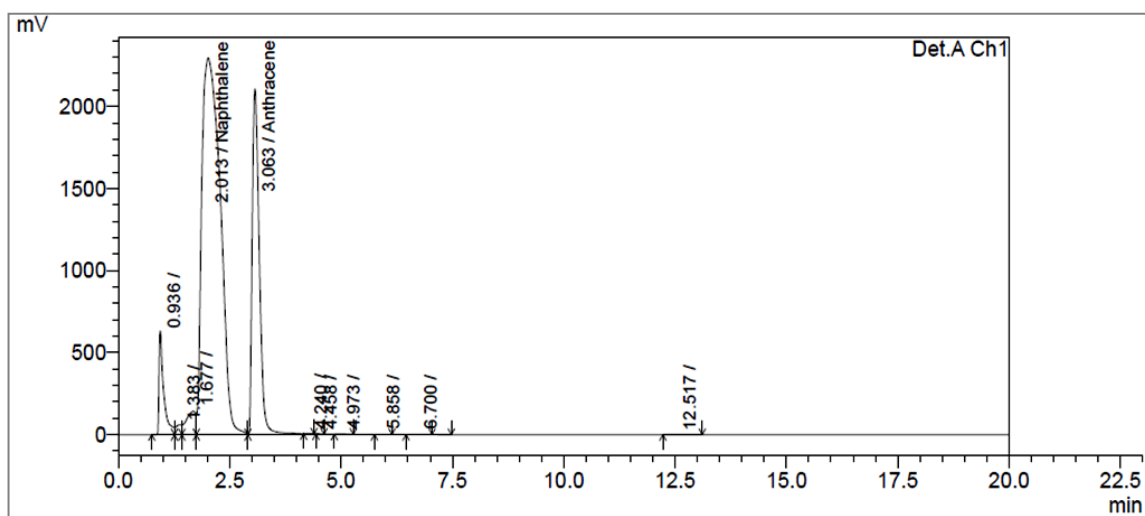
ภาพที่ 3.19 ปริมาณแนฟทาไลน์ที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายด้วยแลคเคสทางการค้า



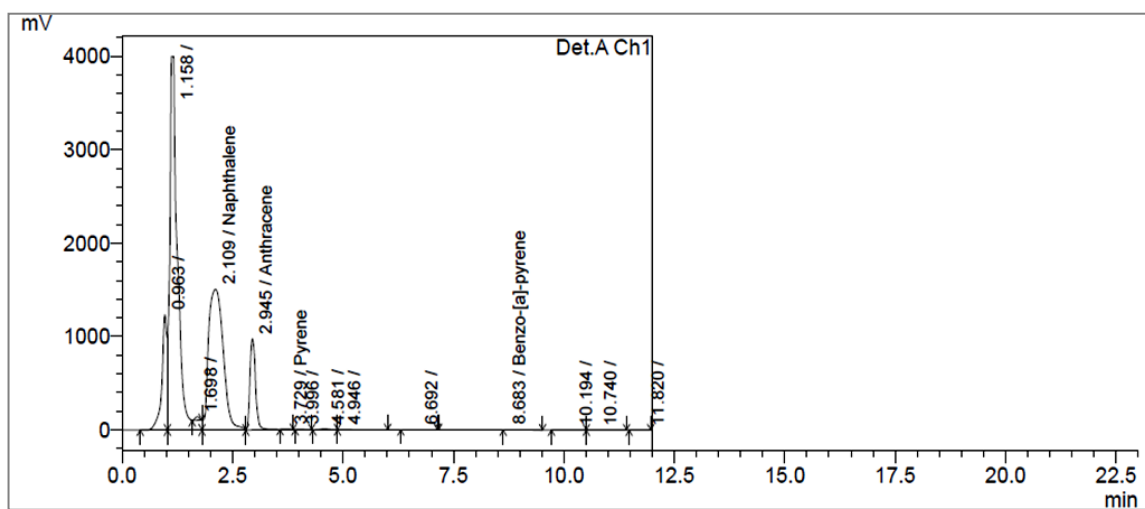
ภาพที่ 3.20 ปริมาณแนฟทาไลน์จากการย่อยด้วยแลคเคสในดินเมื่อเวลาผ่าน 0 วัน



ภาพที่ 3.21 ปริมาณแนฟทาไลน์จากการย่อยด้วยแลคเคสในดินเมื่อเวลาผ่าน 9 วัน



ภาพที่ 3.22 ปริมาณแอนทราซีนจากการย่อยด้วยแลคเคสในดินเมื่อเวลาผ่าน 0 วัน



ภาพที่ 3.23 ปริมาณแอนทราซีนจากการย่อยด้วยแลคเคสในดินเมื่อเวลาผ่าน 9 วัน

ภาคผนวก ค

แลกเคลส



ภาพที่ 3.24 แลกเคลสที่ผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* ใน Laccase production medium

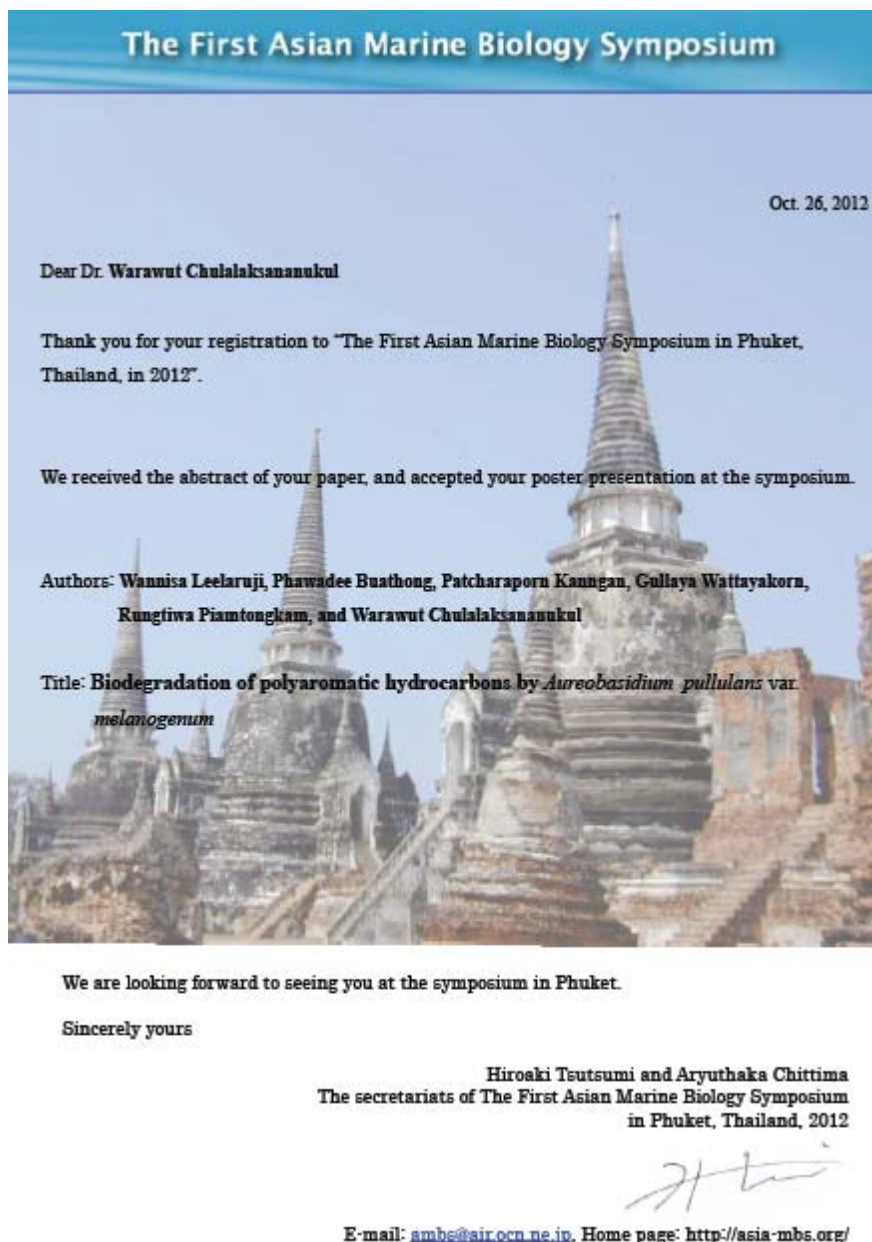


ภาพที่ 3.25 การย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแลกเคลส

ภาคผนวก ง

ผลงานทางวิชาการของโครงการที่เผยแพร่แล้ว

1. เสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง **Biodegradation of Poly-aromatic Hydrocarbons by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*** ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The First Asian Marine Biology Symposium in Phuket, Thailand, December 13 -17, 2012





Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*

Wannisa Leelaruji¹, Phawadee Buathong¹, Patcharaporn Kannan¹, Rungtiwa Piamtongkam², Gullaya Wattayakorn³ and Warawut Chulalaknanukul^{4, 5*}



¹Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand
²Inter-Department of Biotechnology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
³Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand
⁴Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand
⁵Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand
*Corresponding author, e-mail: warawut.c@chula.ac.th



Abstract

One of the major environmental problems today is petroleum hydrocarbon contamination resulting from the activities related to oil spills as well as the petrochemical industry. Microbial degradation is the major and ultimate natural mechanism which one can clean up the petroleum hydrocarbon pollutants from the environment. The objective of this research was to study the polyaromatic hydrocarbons biodegradability by laccase produced by lipolytic yeast, *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*, screened from Sichang Island. The experiments were firstly performed by study the optimal condition for growing the *A. pullulans* and its laccase production. Laccase can be produced from *A. pullulans* by induction with 2 mM guaiacol in growth medium. Biodegradability of naphthalene, anthracene, pyrene and benzo-[a]-pyrene by laccase was then determined. The results revealed that laccase produced by *A. pullulans* can degrade benzo-[a]-pyrene, anthracene, pyrene and naphthalene by 45.33, 38.16, 25.38 and 24.35 percent respectively.

Keywords: lipolytic yeast, laccase, naphthalene, biodegradation

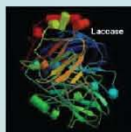
Introduction and Objectives

Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) are a class of persistent organic pollutants which mainly come from incomplete combustion or pyrolysis of fossil fuels or other organic matter (Gao D. et al., 2010). This study focused on four type of PAHs as



Laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) is enzyme that has a potential in toxic material degradation. Laccase can be produced by *A. pullulans* yeast strain (Rich O. J., et al., 2011). In this study, *A. pullulans* was screened from Sichang Island.

Objectives of this study is to test PAHs degradation ability and efficiency of laccase from lipolytic yeast in Laboratory environment and in Sichang island's soil



Results

Figure 1.

PAH Degradation by Laccase at 24 hour

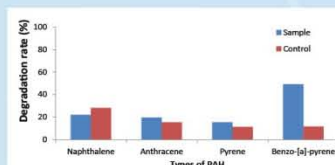


Figure 2.

Remaining naphthalene concentration at different time

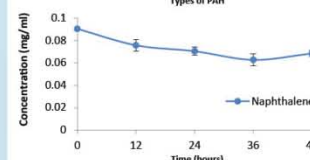


Figure 3.

Remaining anthracene concentration at different time

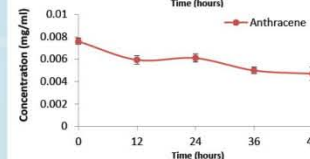


Figure 4.

Remaining pyrene concentration at different time

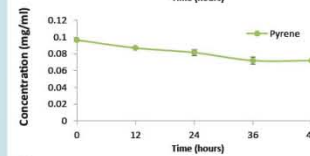
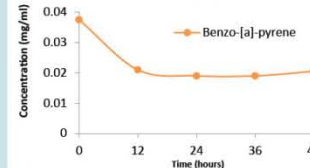
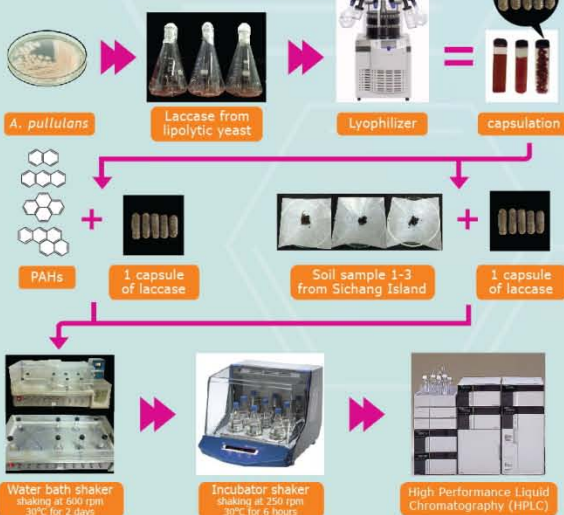


Figure 5.

Remaining benzo-[a]-pyrene concentration at different time



Materials and Methods



Conclusions

One capsule of laccase (0.16 g) has enzyme activity equal to 711 U/ml and PAHs degradation ability as below:

1. Naphthalene (10 mg/ml) was decreased by 24.35%
2. Anthracene (0.908 mg/ml) was decreased by 38.16%
3. Pyrene (0.000135 mg/ml) was decreased by 25.38%
4. Benzo-[a]-pyrene (0.00019 mg/ml) was decreased by 45.33%

However, when testing PAHs degradation ability of laccase from lipolytic yeast by using soil from Sichang island. The result was showed that the laccase from lipolytic yeast can not degraded PAHs in the soil from sichang island.

References:

1. Gao D, Liang H, Du L, Chen J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by white rot-fungus *Pseudotrametes gibosa* isolated from the boreal forest in Notheast China. *African Journal of Biotechnology*. 2010, 9: 6888-6893.
2. Rich O J, Manitchotpitit P, Peterson W S, Leathers D T. Laccase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *RJAS*, 2011, 1: 41-47.

Acknowledgments

This research is part of the project entitled "Knowledge Management for Marine Pollution Abatement and Biodiversity Conservation of Sichang and Sriracha, Chonburi Province on Thailand Coastal Areas" funded by The National Research Council of Thailand (NRCT). Soil samples were gifted from the Aquatic Resources Research Institute (ARRI), Sichang island, Chulalongkorn University.

PROGRAM AND ABSTRACTS

The 1st Asian Marine Biology Symposium

13th-17th December 2012

Cape Panwa Hotel
Phuket, Thailand

Organized by:
Department of Marine Science
Faculty of Fisheries, Kasetsart University

The Japanese Association of Benthology
The Japanese Plankton Society

K-Benthos



**P6-9 Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by
Aureobasidium pullulans var. *melanogenum***

**Wannisa Leelaruji¹⁾, Phawadee Buathong¹⁾, Patcharaporn
Kanngan¹⁾, Gullaya Wattayakorn²⁾, Rungtiwa Piamtongkam³⁾, and
*Warawut Chulalaksananukul^{4, 5)}**

1) Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

2) Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok,
10330, Thailand

3) Inter-Department of Biotechnology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330,
Thailand

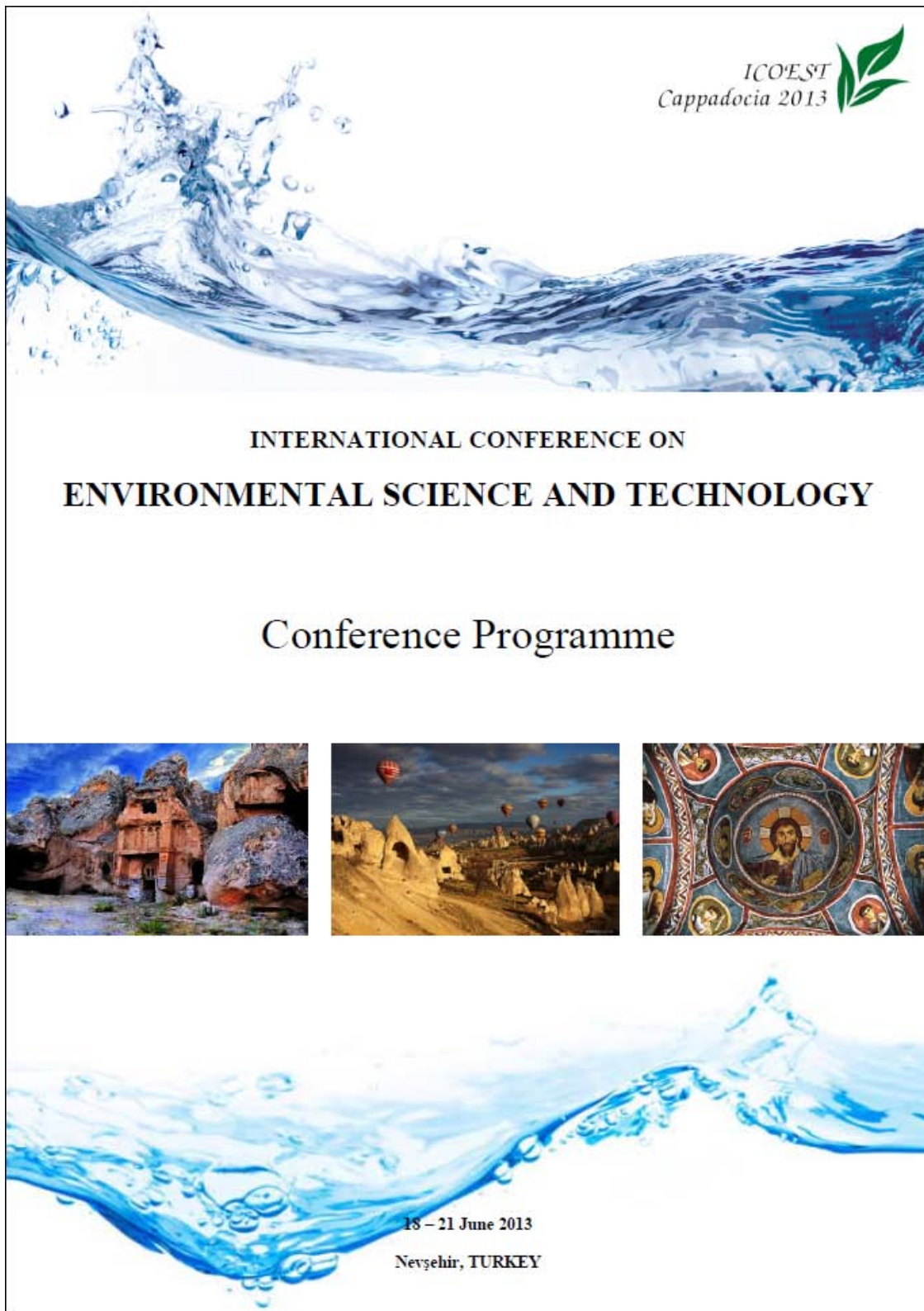
4) Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

5) Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

Abstract: One of the major environmental problems today is petroleum hydrocarbon contamination resulting from the activities related to oil spills as well as the petrochemical industry. Microbial degradation is the major and ultimate natural mechanism which one can clean up the petroleum hydrocarbon pollutants from the environment. The objective of this research was to study the polyaromatic hydrocarbons biodegradability by laccase produced by lipolytic yeast, *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*, screened from Sichang Island. The experiments were firstly performed by study the optimal condition for growing the *A. pullulans* and its laccase production. Laccase can be produced from *A. pullulans* by induction with 2 mM guaiacol in growth medium. Biodegradability of naphthalene by laccase from *A. pullulans* was then determined. The results revealed that laccase from *A. pullulans* can degrade naphthalene about 30 percent in 24 h.

Keywords: biodegradation, laccase, lipolytic yeast, naphthalene,

2. เสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง **Biodegradation of Poly-aromatic Hydrocarbons by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*** ในการประชุม International Conference on Environmental Science and Technology, ICOEST'2013 – CAPPADOCIA Urgup, Turkey, June 18-21, 2013



Biodegradation of poly-aromatic hydrocarbons by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*

Wannisa Leelarujit¹, Phawadee Buathong¹, Patcharaporn Kanngan¹, Rungtiwa Piamtongkam²,
Suphang Chulalaksananukul³, Gullaya Wattayakorn⁴ and Warawut Chulalaksananukul^{5,6*}

¹ Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

² Inter-Department of Biotechnology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

³ Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Mahidol University, Nakornpathom, 73170, Thailand.

⁴ Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

⁵ Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

⁶ Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

(* Corresponding author E-mail: warawut.c@chula.ac.th)



Introduction

Poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) are environmental pollutants in the soil, water and air. They and their derivatives are widespread products of incomplete combustion of organic materials; both from natural combustion, such as forest fires and volcanic eruptions, and also from anthropogenic activities. These compounds are a class of hazardous organic chemicals consisting of two or more fused benzene rings in linear, angular and cluster arrangements.

Biodegradation of PAHs has been performed by fungi, various enzymes from fungi and white rot basidiomycetes. This study was performed in order to investigate the degradation of PAHs using laccase from *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* (Figure 1).

This isolate was obtained from oil-contaminated soil and so was expected to have PAH degradative ability. Laccase enzyme production from *A. pullulans* was induced and applied for degradation the mixture of benzo[a]pyrene, pyrene, anthracene, and naphthalene as model PAHs on varying size and complexity (Figure 2).



Figure 1. PAHs structure

The residual levels of PAHs were followed by HPLC analysis.

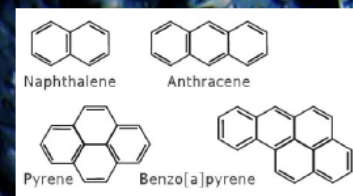


Figure 2. PAHs structure

Results & Discussion

Biodegradation of PAHs by laccase was performed with 1 capsule of lyophilized laccase (0.16 g) with an activity of 711 U/mL. This laccase was added to a mixed solution of naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene at initial concentrations of 90, 7.5, 99 and 37 µg/mL, respectively, and incubated at 30°C with shaking at 150 rpm for 48 h. The degradation curves are shown for each respective PAH in Figure 3 - 6.

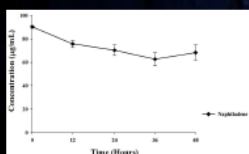


Figure 3. Biodegradation of Naphthalene by laccase

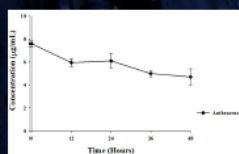


Figure 4. Biodegradation of Anthracene by laccase

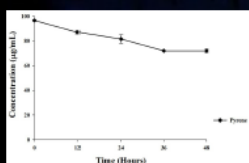


Figure 5. Biodegradation of Pyrene by laccase

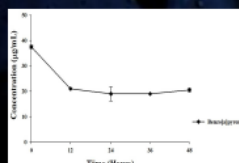


Figure 6. Biodegradation of Benzo[a]pyrene by laccase

After incubation with the laccase for 48 h, the concentration of naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene were all decreased as the incubation time increased to a minimum from 24 h (benzo[a]pyrene) or 36 h (pyrene and naphthalene) onwards, except for anthracene which may not reach completion by the end of the 48 h assay period. At 48 h, the remaining concentrations of the four PAHs were 68, 4.7, 72 and 20 µg/mL for naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene, respectively. Thus, benzo[a]pyrene was the most degradable PAHs, followed by anthracene, pyrene and naphthalene with degradation efficiencies (relative to the initial concentration) of 45.9%, 37.3%, 27.3% and 24.4%, respectively (Figure 7).

In comparison to the commercial laccase preparation, the degradation efficiency of PAHs obtained with the crude laccase preparation from *A. pullulans* var. *melanogenum* was mostly higher, especially for benzo[a]pyrene degradation.

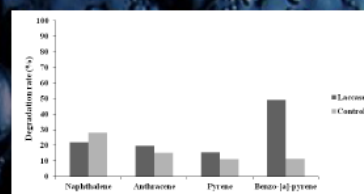


Figure 7. Percentage biodegradation of four poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) using the crude laccase preparation from *A. pullulans* (Laccase) compared to control using commercial laccase (Control).

Conclusions

Laccase was induced by 2 mM of guaiacol and 0.5 mM CuSO₄ in YM media from *A. pullulans* var. *melanogenum*. Its activity of 1 capsule (0.16 g) of lyophilized laccase was 711 U/mL. The biodegradation of a mixture of four different PAHs (90 µg/mL naphthalene, 7.5 µg/mL anthracene, 99 µg/mL pyrene and 37 µg/mL benzo[a]pyrene) by laccase in liquid media occurred within 48 h of incubation without ABTS or HBT with a degradation efficiency for benzo[a]pyrene, pyrene, anthracene and naphthalene of 45.9, 27.3, 37.3 and 24.4%, respectively. Even though the crude laccase preparation from *A. pullulans* could not completely degrade the four tested PAHs under these conditions with a single dose over 48 h, it may potentially be a suitable and promising green method, which may have the potential for environmental performance.

This research was supported by the National Research Council of Thailand (NRCT), the Aquatic Resources Research Institute (ARRI), Sichang island, Chonburi Province, and Biofuel Production by Biocatalyst Research unit, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, THAILAND.

The ICOEST 2013 - Cappadocia

Biodegradation of poly-aromatic hydrocarbons by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*

Wannisa Leelarujij¹, Phawadee Buathong¹, Patcharaporn Kanngan¹, Rungtiwa Piamtongkam², Suphang Chulalaksananukul³, Gullaya Wattayakorn⁴ and Warawut Chulalaksananukul^{5,6*}

¹Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

(E-mail: w.leelarujij@gmail.com, phawadee0210@gmail.com, k.pickpatcha@hotmail.com)

² Inter-Department of Biotechnology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

(E-mail: prungtiwa@gmail.com)

³Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Mahidol University, Nakornpathom, 73170, Thailand.

(E-mail: suphang.chu@mahidol.ac.th)

⁴Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

(E-mail: gullaya@gmail.com)

⁵ Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

⁶Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

(* Corresponding author E-mail: warawut.c@chula.ac.th)

ABSTRACT

Poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of persistent organic pollutants that are resistant to degradation and can remain in the environment for a long time. PAHs contain two or more fused benzene rings and are mainly produced as byproducts of incomplete combustion, such as from fossil fuel burning, forest fires, coal fires or vehicle emissions. Currently, PAHs increasingly cause major environmental problems because of continuing industrial development. Biodegradation by microbes is the major natural mechanism for PAH removal from the environment. The main objective of this research was to study the biodegradation of four types of PAHs (naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene) by laccase produced from the lipolytic yeast, *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*, screened from Sichang Island (Thailand). The optimal condition for growing *A. pullulans* var. *melanogenum* and its laccase production was first evaluated, and revealed that laccase production was induced with 2 mM guaiacol and 0.5 M CuSO₄ in the yeast malt (YM) growth medium. Laccase was then lyophilized and stored in capsule form. The subsequent ability to degrade naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene was determined using high performance liquid chromatography. The results revealed that the laccase activity of one capsule (0.16 g) of lyophilized laccase was 711 U/mL (4.4 U/mg) and could degrade a mixture of benzo[a]pyrene (37 µg/mL), anthracene (7.5 µg/mL), pyrene (99 µg/mL) and naphthalene (90 µg/mL) by 45.9, 37.3, 27.3 and 24.4% respectively.

Keywords: Biodegradation; Laccase; Lipolytic yeast; Poly-aromatic hydrocarbons

1. INTRODUCTION

Poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) are environmental pollutants in the soil, water and air. They and their derivatives are widespread products of incomplete combustion of organic materials; both from natural combustion, such as forest fires and volcanic eruptions, and also from anthropogenic activities [1,2]. These compounds are a class of hazardous organic chemicals consisting of two or more fused benzene rings in linear, angular and cluster arrangements [3,4]. For example, naphthalene is the simplest with two rings and is the most soluble of the PAHs [1]. On the other hand, benzo[a]pyrene, a typical high molecular weight PAHs with five rings, is one of the most recalcitrant and toxic PAHs [5,6]. Recently, benzo[a]pyrene was included as one of 12 target compounds or groups in a new strategy for controlling persistent, bio-accumulative and toxic pollutants [3].

Biodegradation of PAHs has been performed by fungi, various enzymes from fungi and white rot basidiomycetes [7]. *Fusarium* sp. E033, one species of fungi, was shown to be able to degrade 0.4 mM (100 mg/L) benzo[a]pyrene directly [8], whilst fungal laccases from *Trametes versicolor* and *Myceliophthora thermophila* have been shown to be able to oxidize the 12 target aromatic hydrocarbons [3]. Laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2), in the family of blue multi-copper oxidases [9], is a polyphenol oxidase containing four copper atoms in its active site [10] and is capable of oxidizing a wide range of aromatic compounds, with the concomitant reduction of molecular oxygen to water [9]. In addition, laccases can be used in a great variety of process, mainly related to bioremediation, such as pulp delignification, de-colorization and detoxification of textile dyes, as well as for bioremediation of xenobiotic compounds and treatment of wastewater [11].

Aureobasidium pullulans is a ubiquitous, polymorphic and oligotrophic black yeast-like microfungus [12]. It is particularly well known for its biotechnological significance as a producer of the biodegradable extracellular polysaccharide (EPS) pullulan (poly- α -1,6-maltotriose) [13]. This yeast also produces numerous degradative enzymes; including fructofuranosidase, glucoamylase and xylanase. However, laccase production by *A. pullulans* is poorly known [9]. This study was performed in order to investigate the degradation of PAHs using laccase from *A. pullulans* var. *melanogenum* since this isolate was obtained from oil-contaminated soil and so was expected to have PAH degradative ability. Laccase enzyme production from *A. pullulans* was induced and applied for degradation of the mixture of benzo[a]pyrene, pyrene, anthracene, and naphthalene as model PAHs on varying size and complexity. The residual levels of PAHs were followed by HPLC analysis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Microorganism and chemicals

Aureobasidium pullulans was obtained from the Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Chulalongkorn University, Thailand. Benzo[a]pyrene, naphthalene, guaiacol and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) were purchased from Fluka. Anthracene and pyrene were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Culture conditions and enzyme production

The inoculum was grown in yeast malt (YM) broth (3% (w/w) yeast extract, 3% (w/v) malt extract, 5% (w/v) peptone, 10% (w/v) glucose) at 30 °C for 48 h with shaking at 200 rpm. This culture was then inoculated at 1% (v/v) into laccase production medium (2 mM of guaiacol and 0.5 mM CuSO₄ in YM) as described previously [14]. Growth of *A. pullulans* was measured over 120 h of culture in terms of the culture turbidity using the absorption at a wavelength of 600 nm and Colony forming units (CFUs/mL) was determined by spread plate technique and diluted it to count the number of cell between 30-300 colonies. The culture was centrifuged at

10,000 rpm, 4 °C for 15 min, and the supernatant harvested as a crude laccase preparation, lyophilized and stored in capsules.

2.3. Biodegradation of PAHs

One capsule of laccase (1.6g), found to contain 711unit (U)/mL of enzyme activity, enzyme activity was determined by enzyme activity assays[15]. Capsule of laccase was added to a mixture of benzo[a]pyrene, pyrene, anthracene, and naphthalene at an initial concentration of 37, 99, 7.5 and 90 µg/mL, respectively. Then, 5% (v/v) of Tween 80 and 100 mM acetate buffer (pH 4.5) were added and the mixture was incubated at 30 °C for 48 h with shaking at 150 rpm. Samples were collected every 12 h and extracted with 2 volumes of hexane. After that, 0.75 volumes of 15% (v/v) triton X 100 was added to the solution and shaken for 6 h at 200 rpm before analysis as previously described [6].

2.4. Analysis of PAHs

Residual PAH levels in the extracts were analyzed by HPLC using a model Shimadzu LC-20A series connected to an Inertsil ODS-P HP column (0.46 mm in diameter and 250 mm in length) and equipped with UV detector. The mobile phase was an 80:20 (v/v) ratio acetonitrile:water mixture, run at a flow rate of 1.5 mL/min.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Growth of *A. pullulans* var. *melanogenum*

Growth of *A. pullulans* var. *melanogenum* was measured over 120 h when incubated in YM medium at 30 °C with shaking at 200 rpm. Under these conditions, the growth of *A. pullulans* rapidly increased after 10 h of incubation and reached stationary phase within 48–72 h of incubation. The maximum cell density was obtained at 48 h and so this culture cell time was selected for further cultivation in YM medium supplemented with 2 mM guaiacol and 0.5 mM CuSO₄ to induce laccase production. After that, the crude extracellular enzyme preparation was evaluated for the ability to degrade a mixture of four different PAHs.

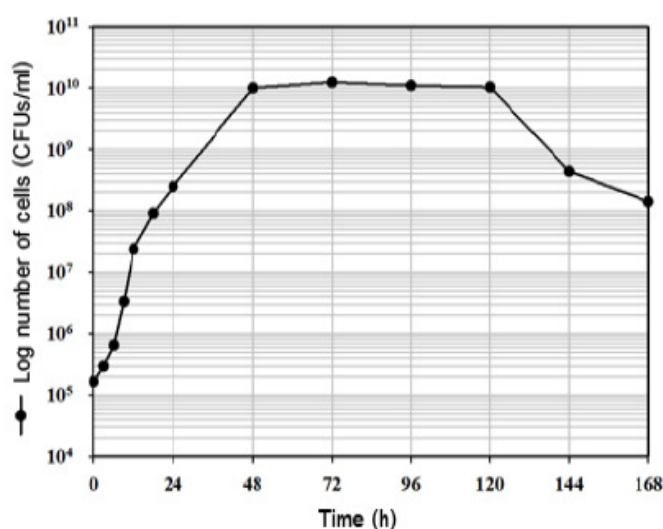
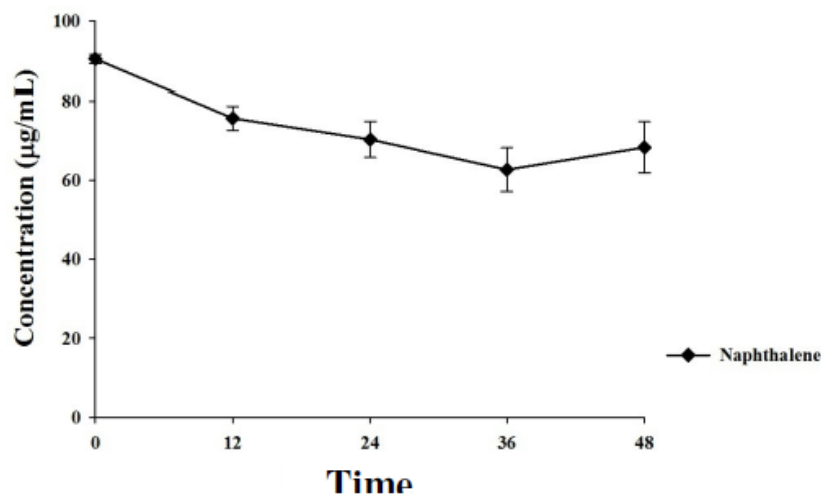


Figure 1. Growth (as colony forming units (CFU)/mL) of *A. pullulans* in YM medium, incubated at 30 °C, 200 rpm for 120 h. Data are shown as the mean $\pm$ 1 SD, derived from 3 independent trials.

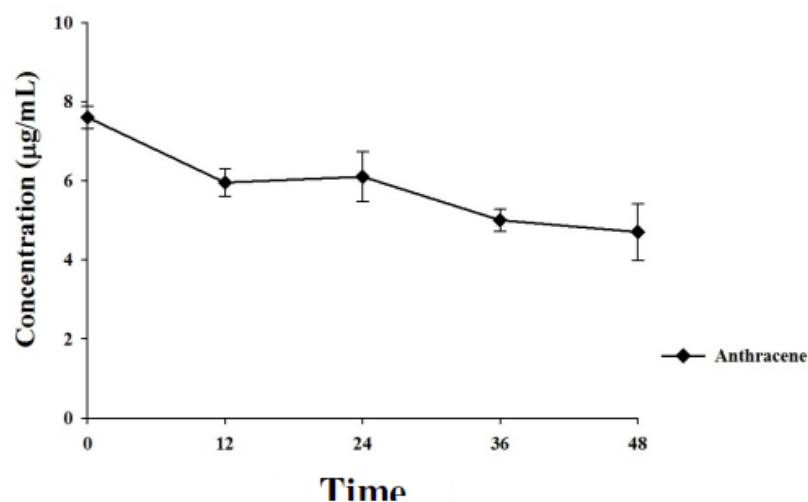
3.2. Biodegradation of PAHs using the crude laccase preparation from *A. pullulans*

Biodegradation of PAHs by laccase was performed with 1 capsule of lyophilized laccase (0.16 g) with an activity of 711 U/mL. This laccase was added to a mixed solution of naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene at initial concentrations of 90, 7.5, 99 and 37 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and incubated at 30 °C with shaking at 150 rpm for 48 h. The degradation curves are shown for each respective PAH in Figure 2.

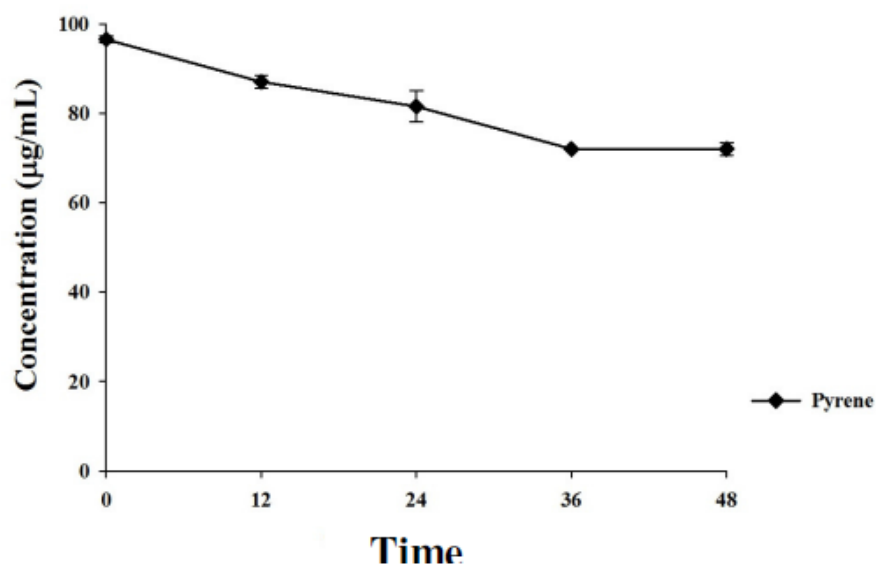
After incubation with the laccase for 48 h, the concentration of naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene were all decreased as the incubation time increased to a minimum from 24 h (benzo[a]pyrene) or 36 h (pyrene and naphthalene) onwards, except for anthracene which may not have reached completion by the end of the 48 h assay period. At 48 h, the remaining concentrations of the four PAHs were 68, 4.7, 72 and 20 $\mu\text{g/mL}$ for naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene, respectively. Thus, benzo[a]pyrene was the most degradable PAHs, followed by anthracene, pyrene and naphthalene with degradation efficiencies (relative to the initial concentration) of 45.9%, 37.3%, 27.3% and 24.4%, respectively.



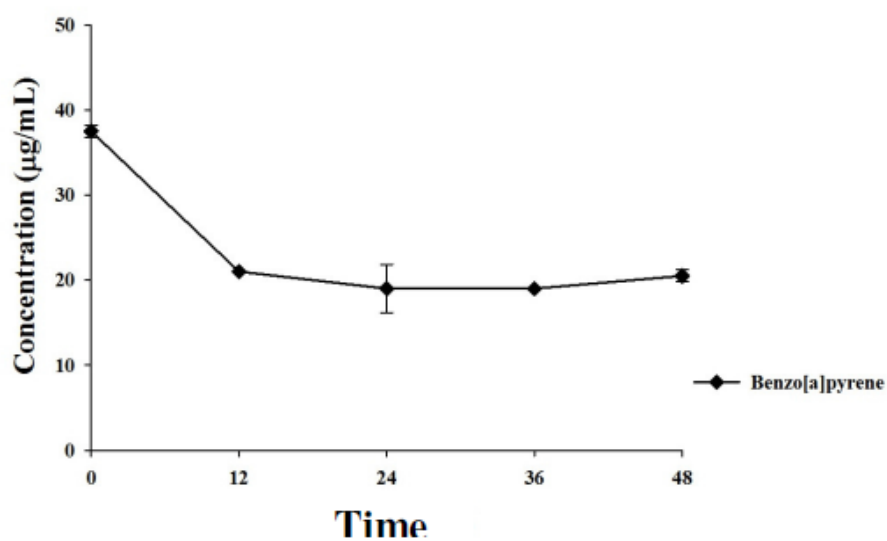
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 2. Biodegradation of poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) by laccase showing the residual concentration over time of: (a) naphthalene, (b) anthracene, (c) pyrene, and (d) benzo[a]pyrene. Data are shown as the mean $\pm$ 1 SD, derived from 3 independent trials.

In comparison to the commercial laccase preparation, the degradation efficiency of PAHs obtained with the crude laccase preparation from *A. pullulans* var. *melanogenum* was mostly higher, especially for benzo[a]pyrene degradation.

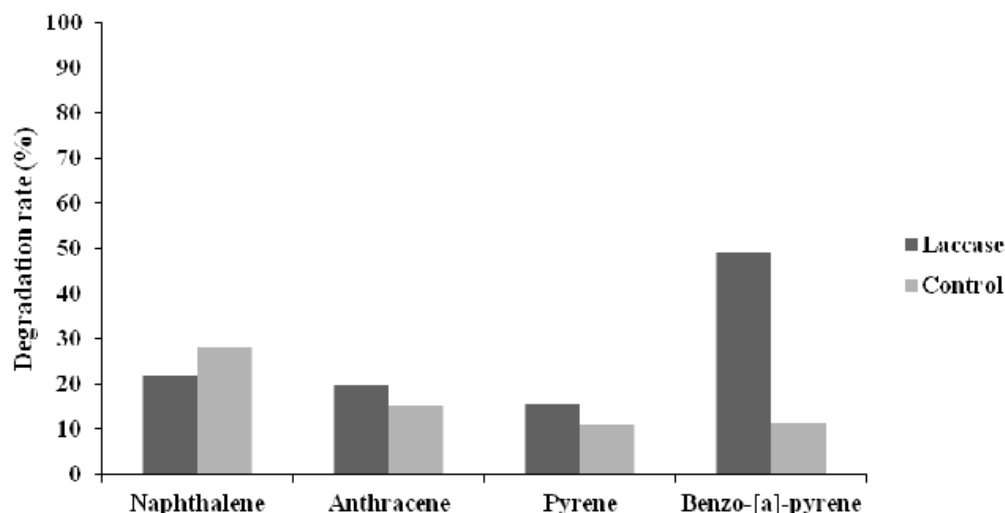


Figure 3. Percentage biodegradation of four poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) using the crude laccase preparation from *A. pullulans* (Laccase) compared to control using commercial laccase (Control). Data are shown as the mean $\pm$ 1 SD, derived from 3 independent trials. Means within each pair with a different lowercase letter are significantly different ($P < 0.05$; Mann-Whitney U test)

This result was similar to that previously reported [5], where laccase was shown to efficiently remove (degrade) aged anthracene, benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene from contaminated soil. The specificity of laccase catalysis was proposed to be related to the ionization potentials (IPs) of the substrates [5]. Moreover, the laccase-catalysed oxidation process was enhanced when adding certain low molecular weight compounds as mediators, such as ABTS. A suitable mediator would form an intermediate with high activity that could transfer electrons from oxygen molecules to the substrate and so enhance the substrate degradation [16]. Previously, it was reported that degradation of phenanthrene with purified laccase from *T. versicolor* 951022 did not occur, but did when ABTS or HBT was added into the reaction mixture [17]. In the presence of 5 mM ABTS or HBT, laccase at 5 U/mL could oxidize 40% and 30% of a 20 mg/L phenanthrene solution in 2 h, respectively. In contrast, other PAHs, such as anthracene, fluorene, benzo[a]pyrene and perylene, were almost completely removed by the laccase from *T. versicolor* after the addition of HBT [17].

4. CONCLUSION

Laccase was induced by 2 mM of guaiacol and 0.5 mM CuSO_4 in YM media from *A. pullulans* var. *melanogenum*. Its activity of 1 capsule (0.16 g) of lyophilized laccase was 711 U/mL. The biodegradation of a mixture of four different PAHs (90 $\mu\text{g/mL}$ naphthalene, 7.5 $\mu\text{g/mL}$ anthracene, 99 $\mu\text{g/mL}$ pyrene and 37 $\mu\text{g/mL}$ benzo[a]pyrene) by laccase in liquid media occurred within 48 h of incubation without ABTS or HBT with a degradation efficiency for benzo[a]pyrene, pyrene, anthracene and naphthalene of 45.9, 27.3, 37.3 and 24.4%, respectively.

Even though the crude laccase preparation from *A. pullulans* could not completely degrade the four tested PAHs under these conditions with a single dose over 48 h, it may potentially be a suitable and promising green method, which may have the potential for environmental performance.

ACKNOWLEDGMENTS

This research is part of the project entitled “Knowledge Management for Marine Pollution

Abatement and Biodiversity Conservation of Sichang and Sriracha, Chonburi Province on Thailand Coastal Areas” funded by The National Research Council of Thailand (NRCT). Soil samples were gifted from the Aquatic Resources Research Institute (ARRI), Sichang Island, Chulalongkorn University.

REFERENCES

- [1] A.Mrozik, Z. Piotrowska-Seget and S. Labuzek, 2003. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*. 12 (1) 15 – 25.
- [2] S. Lundstedt, 2003. *Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes*, PhD Thesis, Department of environmental and toxicological chemistry, University of Amsterdam, The Netherlands.
- [3] M. Alcalde, T. Bulter and F.H. Arnold, 2002. Colorimetric assay for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *Journal of Biomolecular Screening*. 7 547 – 553.
- [4] K. Juckpech, O. Pinyakong and P. Rerngsamran, 2012. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by newly isolated *Curvularia* sp. S5, and *Phanerochaete* sp. T20. *ScienceAsia*. 38 147 – 156.
- [5] X. Li, X. Lin, R. Yin, Y. Wu, H. Chu, J. Zeng and T. Yang, 2010. Optimization of laccase-mediated benzo[a]pyrene oxidation and the bioremediation application in aged polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soil. *Journal of Health Science*. 56 (5) 534 – 540.
- [6] E. Luepromchai, W. Lertthamrongsak, P. Pinphanichakarn, S. Thaniyavarn, K. Pattaragulwanit and K. Juntongjin, 2007. Biodegradation of PAHs in petroleum-contaminated soil using tamarind leaves as microbial inoculums. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 29 (2) 515 – 527.
- [7] A.I. Canas, M. Alcalde, F. Plou, M.J. Martinez, A.T. Martinez and S. Camarero, 2007. Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environmental Science and Technology*. 41 (8) 2964 – 2971.
- [8] S. Chulalaksananukul, G.M. Gadd, P. Sangvanich, P. Sihanonth, J. Piapukiew and A.S. Vangnai, 2006. Biodegradation of benzo[a]pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 262 99 – 106.
- [9] Y.Z. Xiao, Y.Z. Hong, J.F. Li, J. Hang, P.G. Tong, W. Fang and C.Z. Zhou, 2006. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 71 493 – 501.
- [10] J.O. Rich, P. Manitchotpisit, S.W. Peterson and T.D. Leathers, 2011. Laccase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Rangsit Journal of Arts and Sciences*. 1 (1) 41 – 47.
- [11] L.C. Octavio, P.P.M.C. Irma, B.R.J. Ricardo and V.O. Francisco, 2006. Laccases. In: *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. R.G. Guevara-Gonzalez, and I. Torres-Pacheco (Eds.). Departamento de Ingenieria Bioquimica, Instituto Tecnológico de Celaya, Kerala, India, ISBN: 81-7736-269-0. pp: 323-340.

- [12] R. Gaur, R. Singh, M. Gupta and M. K. Gaur, 2010. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *African Journal of Biotechnology*. 9 (47) 7989 – 7997.
- [13] P. Zalar, C. Gostinčar, G.S. de Hoog, V. Uršič, M. Sudhadham and N. Gunde-Cimerman, 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*. 61 21–38.
- [14] M. Theerachat, S. Morel, D. Guieysse, M. Remaud-Simeon and W. Chulalaksananukul, 2012. Comparison of synthetic dye decolorization by whole cells and a laccase enriched extract from *Trametes versicolor* DSM11269. *African Journal of Biotechnology*. 11 (8) 1964 – 1969.
- [15] A. Li, Y. Zhu, L. Xu, W. Zhu, and X. Tian, 2008. Comparative study on the determination of assay for laccase of *Trametes* sp. *African Journal Biochemistry Research*. 2 181-183.
- [16] D. Gao, H. Liang, L. Du and J. Chen, 2010. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by white rot-fungus *Pseudotrametes gibbosus* isolated from the boreal forest in Northeast China. *African Journal of Biotechnology*. 9 (41) 6888 – 6893.
- [17] M.-J. Han, H.-T. Choi and H.-G. Song, 2004. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *The Journal of Microbiology*. 42 (2) 94 – 98.