



วิทยานิพนธ์

การโคลนยีนย่อยลิग्นินจาก White-rot Fungi เพื่อการปรับปรุง
สายพันธุ์

**MOLECULAR CLONING OF LIGNINASE GENE FROM
WHITE-ROT FUNGI FOR STRAIN IMPROVEMENT**

นางสาวศลยา สุขสะอาด

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลนยีนย่อยลิग्นินจาก White-rot Fungi เพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์

Molecular Cloning of Ligninase Gene from White-rot Fungi for Strain Improvement

นามผู้วิจัย นางสาวศลยา สุขสอาด

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(อาจารย์ชวลิต สงประยูร, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์มาลี ศรีสวดสุข, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิชัย โมลีรัตน์, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจฉกหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนยีนย่อยลิิกนินจาก White-rot Fungi เพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์

Molecular Cloning of Ligninase Gene from White-rot Fungi for Strain Improvement

โดย

นางสาวศลยา สุขสอาด

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2550

ศลยา สุขสอาด 2550: การโคลนยีนย่อยลิกนินจาก White-rot Fungi เพื่อการปรับปรุง
สายพันธุ์ ปรินญาปรัชญาคุณฐิบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ปรธานกรรมการที่
ปรึกษา: อาจารย์ชวลิต สงประยูร, Ph.D. 93 หน้า

เอ็นไซม์ย่อยลิกนินจากจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษรวมทั้ง
การกำจัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม การศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยลิกนินสามารถนำมาใช้
ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้ งานวิจัยนี้ได้คัดเลือก
กลุ่ม white-rot ที่ผลิตเอ็นไซม์ย่อยลิกนินได้สูง 1 เชื้อ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์
ส่วน ITS ใน ribosomal DNA กับฐานข้อมูลใน Gene Bank พบว่าเป็นเชื้อในจีนัส *Ganoderma* sp.
เมื่อทดลองแยก cDNA ของเอ็นไซม์ย่อยลิกนินของเชื้อที่ได้จาก mRNA โดยใช้ยีนที่ปลาย 5' ของ
เอ็นไซม์ manganese peroxidase จาก *Ganoderma formosanum* และ *Ganoderma australe* พบ
โคลนที่มีชิ้นส่วนของยีนในกลุ่ม peroxidase จำนวน 4 โคลน โดยโคลน E1-2 พบ promoter
ทางด้าน 5' ประกอบด้วย TATA box ที่ตำแหน่ง 144-149 CAT box ที่ตำแหน่ง 306-311 และ
326-330 พบ start codon (ATG) ที่ตำแหน่ง 599-601 และพบว่ามี metal response element (MRE)
อยู่ระหว่าง TATA box และ CAT box ในตำแหน่งที่ 162-167 จากการเปรียบเทียบลำดับกรด
อะมิโนกับฐานข้อมูลเอ็นไซม์ย่อยลิกนินในรากลุ่ม white-rot ชนิดอื่น พบว่าโคลน E5-2 เป็นส่วน
ของเอ็นไซม์ manganese peroxidase เนื่องจากพบกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ manganese binding site
โดยคาดว่ากรดอะมิโน Glu62, Val65 และ Asp142 เป็นกรดอะมิโนที่จับกับ Mn^{2+} และมี Arg70,
Arg72 และ Arg136 อยู่บริเวณ heme group

Solaya Suksa-ard 2007: Molecular Cloning of Ligninase Gene from White-rot Fungi for Strain Improvement. Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Mr. Chawalit Hongprayoon, Ph.D. 93 pages.

Lignolytic enzymes play important roles in pulp and paper industry and xenobiotic compounds degradation. Molecular genetics studies of lignolytic enzymes can lead to strain improvement for desired property. In this research, lignolytic fungi were screened and selected for the highest enzyme activity strain. Based on ITS ribosomal DNA sequences comparison, the selected fungus was found to be *Ganoderma* sp. The cDNA encoding manganese peroxidase was isolated from mRNA pool of the fungus by using nucleotide sequences at 5' end of manganese peroxidase from *Ganoderma formosanum* and *Ganoderma australe* as a primer. Four clones were found to have peroxidase gene. Clone E1-2 contained promoter sequence at 5' terminal with TATA box, CAT box and start codon at 144-149, 306-311 and 326-330 and 599-601 nucleotide positions, respectively. The metal response element was found at nucleotide position 162-167 between TATA box and CAT box. Based on amino acid comparison of lignolytic enzymes from white-rot fungi, the clone E5-2 was found to be a fragment of manganese peroxidase with Glu62, Val65 and Asp142 interacted with Mn^{2+} at manganese binding site while Arg70, Arg72 and Arg136 were the residues near heme group.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ชวลิต สงประยูร ประธานกรรมการที่ปรึกษา และ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิชัย โหมสิทธิ์ตน กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ให้
คำปรึกษา แนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์มาลี ศรีสดสุข กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ที่ได้กรุณาให้ความ
อนุเคราะห์ในทุกๆ ด้าน ให้คำปรึกษาและแนะนำทั้งในเรื่องการศึกษา การทำวิทยานิพนธ์ และการ
ใช้ชีวิต ทั้งยังเป็นกัลยาณมิตรที่ชักนำให้ข้าพเจ้าได้พบทางสงบแห่งจิต ที่ข้าพเจ้าจักได้ใช้เป็นที่ยึด
เหนี่ยวและพึ่งพิงในยามปัจจุบันที่โลกเรามีแต่ความแก่งแย่งและวุ่นวาย

ขอขอบพระคุณอาจารย์แสงสุรีย์ สิ้นธุณิก คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ และศูนย์
เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านการเงิน ในการเรียน
และการทำวิจัย

ขอขอบคุณผองเพื่อนและพี่ๆ น้องๆ โดยเฉพาะอาจารย์เบญจมาศ แก้วนุช รวมทั้งบุคลากร
ทุกคนในคณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ ที่ได้ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือต่างๆ เมื่อ
ข้าพเจ้าร้องขอ

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณมารดาและบิดาที่ให้ข้าพเจ้าได้เกิดมาใช้ชีวิตบนโลก
ใบนี้อย่างมีความสุข ให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกๆ ด้าน ให้ทั้งความรักและความเข้าใจ รวมทั้ง
เป็นกำลังใจให้แก่ข้าพเจ้าทุกๆ วินาทีแม้ในเวลาที่ข้าพเจ้ารู้สึกทุกข์ที่สุดก็ตาม

ศลยา สุขสอาด

กันยายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	33
สรุป	71
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	73
ภาคผนวก	83
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	93

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของเอนไซม์ laccase จากเชื้อรา	13
2	ข้อมูลเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินและไม้ผุจากธรรมชาติ	35
3	จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากจากธรรมชาติแบ่งตามความสามารถในการ เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น	49
4	จำนวนโคลนที่ได้จากการเชื่อมต่อแถบดีเอ็นเอที่สกัดจาก agarose gel เข้ากับ เวกเตอร์ pDrive แล้ว transform สู่ <i>E.coli</i> DH 5 α	57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างสารโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิดซึ่งใช้ในการสังเคราะห์ลิกนิน	4
2	โครงสร้างลิกนินจากต้นสน	5
3	โครงสร้างของลิกนินซึ่งทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส	6
4	สถานะออกซิเดชันของ lignin peroxidase	10
5	โครงสร้าง 3 มิติของเอ็นไซม์ yeast cytochrome c peroxidase	10
6	โครงสร้าง 3 มิติ ของเอ็นไซม์ laccase ใน <i>Trametes versicolor</i>	15
7	ระบบการย่อยสลายลิกนินของ <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	16
8	บทบาทของ veratryl alcohol ในการเป็นตัวกลางการส่งต่อประจุในขบวนการย่อยลิกนิน	16
9	การผลิตเอ็นไซม์ manganese peroxidase , laccase และ polyphenol peroxidase	50
10	กิจกรรมของเอ็นไซม์ย่อยลิกนิน 3 ชนิด	51
11	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของเชื้อ GF กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อชนิดต่างๆจากฐานข้อมูลใน Gene Bank โดยใช้โปรแกรม BlastN	53
12	cDNA ของเชื้อ GF ที่สังเคราะห์จาก totalRNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Mn-P 5' และ Oligo(dT) ₂₀	54
13	ขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดจาก agarose gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน	55
14	แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดเวกเตอร์ pDrive	56
15	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอในโคลนที่แยกได้เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน	58
16	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอจากโคลน E 1-1 จำนวน 880 นิวคลีโอไทด์	60
17	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอจากโคลน E 1-2 จำนวน 1156 นิวคลีโอไทด์	61
18	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอจากโคลน E 5-2 จำนวน 880 นิวคลีโอไทด์	62
19	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอจากโคลน E 6-2 จำนวน 867 นิวคลีโอไทด์	63
20	โครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์ manganese peroxidase และกลุ่มกรดอะมิโนที่จับกับ Mn ²⁺ (manganese binding site)	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	การเปรียบเทียบลำดับกรดมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน E5-2 กับเห็ดชนิดต่างๆ	67
22	การเปรียบเทียบลำดับกรดมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน E1-2 กับเห็ดชนิดต่างๆ	68
23	การเปรียบเทียบลำดับกรดมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน E6-2 กับเห็ดชนิดต่างๆ	69
24	การเปรียบเทียบลำดับกรดมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน E1-1 กับเห็ดชนิดต่างๆ	70

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ABTS	=	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-triazoline-6-Sulphonic acid)
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EDTA	=	Ethylene-diamine tetraacetic acid
EtOH	=	Ethyl alcoho
IPTG	=	Isopropyl thio- β -D-galactoside
LA	=	Luria-Betani agar
LB	=	Luria-Betani broth
MEA	=	Malt extract agar
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PDA	=	Potato dextrose agar
PDB	=	Potato dextrose agar
RNA	=	Ribonuclic acid
TBE	=	Tris-borate EDTA eletrophoresis buffer
TE	=	Tris-EDTA buffer
w/v	=	น้ำหนักต่อปริมาตร
X-gal	=	5-Bromo-4-chloro-3-indotyl- β -D-galactoside

การโคลนยีนย่อยลิกนินจาก White-rot Fungi เพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์

Molecular Cloning of Ligninase Gene from White-rot Fungi for Strain Improvement

คำนำ

อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่มีความสำคัญในประเทศไทย กระบวนการผลิตเยื่อมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเส้นใยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสออกจากเนื้อไม้เพื่อผลิตเป็นเยื่อกระดาษ เนื้อไม้ประกอบด้วยเส้นใยเซลลูโลสร้อยละ 45 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 25 และ ลิกนินร้อยละ 30 ลิกนินที่อยู่ในเนื้อไม้จะถูกกำจัดออกจากกระบวนการผลิตเยื่อเพราะเป็นสาเหตุที่ทำให้เยื่อมีคุณภาพต่ำและมีสีดำนวล ลิกนินในกระบวนการผลิตและฟอกเยื่อจะถูกแยกและทำปฏิกิริยากับออกซิเจนละลายอยู่ในน้ำทิ้ง ซึ่งจะถูกส่งไปยังระบบบำบัดน้ำแบบชีวภาพที่มีการเติมอากาศและให้ทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ แล้วถูกตกตะกอนออกด้วยสารส้ม (alum) เกิดเป็นสารประกอบที่ย่อยสลายได้ยากในสภาพธรรมชาติ เนื่องจากลิกนินมีโครงสร้างที่สลับซับซ้อนเป็น branched polymer ของ phenol propane units ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ C-C และพันธะ C-O-C

ปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถในการย่อยสลายและฟอกจางสีของลิกนินและสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนิน (lignin-like compound) ทั้งราและแบคทีเรียต่างก็มีเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินและสารที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนิน แต่ราจะมีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินได้สูงกว่าในแบคทีเรีย พบว่าเชื้อราในกลุ่ม white-rot fungi จะมีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินได้ดีที่สุด ราในกลุ่มนี้จะมีระบบย่อยลิกนินเป็นแบบ extracellular system เกิดปฏิกิริยาแบบ oxidative mechanism ประกอบด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิด คือ lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) และ laccase

นอกจากสารประกอบลิกนินจะมีโครงสร้างที่สลับซับซ้อนยากต่อการย่อยสลายแล้ว ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตเยื่อของโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษก็ยังไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในระบบบำบัดน้ำแบบชีวภาพ ทำให้ผลิตเอนไซม์ได้น้อยไม่เพียงพอต่อการย่อยสลายลิกนิน เป็นผลให้ต้องใช้สารเคมีจำนวนมากในการตกตะกอน

ลิกนินที่ยังคงตกค้างอยู่ในน้ำทิ้ง ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเพราะต้องเพิ่มต้นทุนค่า
สารเคมี ทั้งยังเพิ่มปริมาณตะกอนของสารประกอบลิกนินที่ย่อยสลายได้ยากออกสู่สิ่งแวดล้อม

การแยกและศึกษาชิ้นของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน ได้มีผู้ศึกษาแล้วจากจุลินทรีย์หลายชนิด
การเพิ่มประสิทธิภาพของยีนในเราสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนโปรโมเตอร์ หรือเพิ่มจำนวนชุด
ของยีน โดยไม่ก่อให้เกิดลักษณะ gene silencing เหมือนที่พบในแบคทีเรีย

จากเหตุผลที่กล่าวมาแล้วการใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพในการปรับปรุงลักษณะพันธุกรรม
ของ white-rot fungi เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน จึงสามารถทำได้
และเป็นหนทางที่สามารถช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีในการกำจัดลิกนินจากกระบวนการผลิตเยื่อ
ช่วยลดปริมาณสารเคมีปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และช่วยลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอัน
เนื่องมาจากการใช้สารเคมีปริมาณมากในการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษได้

วัตถุประสงค์

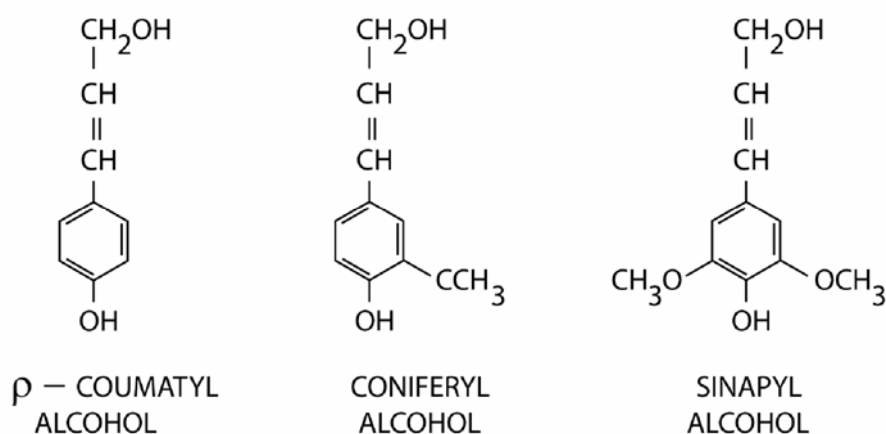
1. คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยลิกนิน
2. แยกและศึกษาอินพลิเดนไทม์ย่อยสลายลิกนินจากเชื้อราที่คัดเลือก

การตรวจเอกสาร

1. ลิกนิน

ลิกนินเป็นสารโมเลกุลใหญ่ พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส พบในกลุ่มของพืชที่มีท่อลำเลียง ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงแก่พืช ทำให้พืชต้านทานต่อแรงกดดัน และการบุกรุกของจุลินทรีย์ได้ (Brown, 1985) สามารถพบลิกนินได้ใน ferns และ club mosses แต่ไม่พบใน Bryophyta (true mosses) รวมทั้งพืชชั้นต่ำ สำหรับพืชชั้นสูงที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบได้แก่ angiosperms, gymnosperms และ monocotyledons ซึ่งเป็นกลุ่มพืชที่สำคัญและมีจำนวนมากที่สุดบนพื้นโลก ลำต้นของเนื้อไม้ angiosperms ประกอบด้วยลิกนิน 18-25 % ของเนื้อเยื่อแห้ง ส่วนใน gymnosperms และ monocotyledons ประกอบด้วยลิกนิน 25-35 % และ 10-15 % ของเนื้อเยื่อแห้งตามลำดับ (Cowling and Kirk, 1976) ดังนั้นลิกนินจึงเป็นองค์ประกอบสำคัญของพืชที่สามารถปรับตัวเพื่อการดำรงอยู่ได้

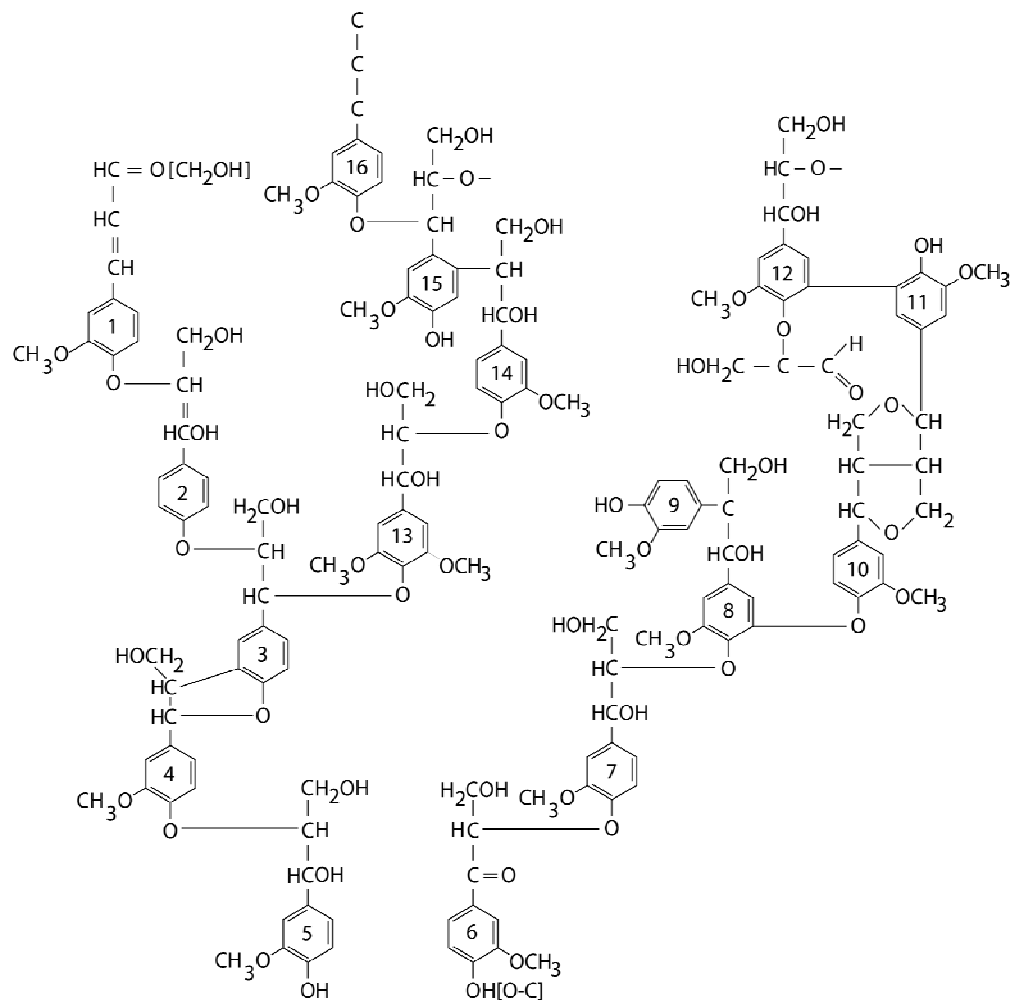
โครงสร้างของลิกนินมีหลายรูปแบบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันตั้งแต่ 10 ถึง 1,000 kDa หรือมากกว่า (Eggeling, 1983) ลิกนินเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่สังเคราะห์ขึ้นจากหน่วยย่อย phenylpropanoid ซึ่งได้แก่ p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครงสร้างสารโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิดซึ่งใช้ในการสังเคราะห์ลิกนิน

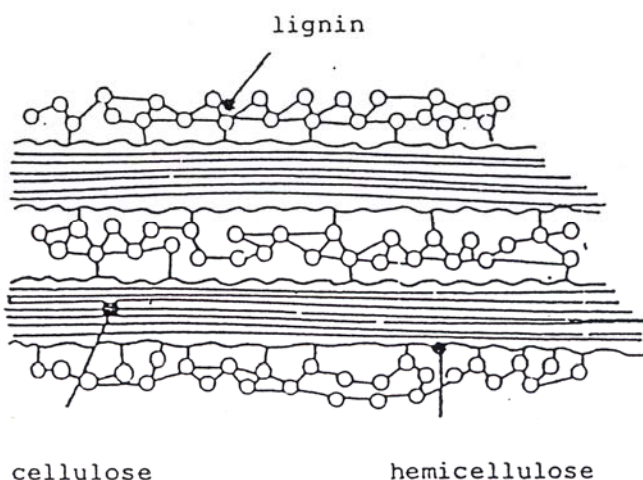
ที่มา: Crawford R.L. (1981)

หน่วยย่อยทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Bisaria and Chose, 1981) หน่วยย่อยเหล่านี้จะจับตัวกันเป็นโครงสร้างสามมิติ โดยเกิดการสร้างพันธะอีเธอร์ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่สี่ของวงแหวนฟีนอล กับคาร์บอนที่ตำแหน่ง β ของ side chain โดย side chain ของลิกนินจะประกอบด้วย cinnamyl alcohol, aldehyde และ hydroxylated การจับกันด้วยพันธะอีเธอร์และการสร้างเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ทำให้โมเลกุลของลิกนินมีความแข็งแรงและทนต่อการย่อยสลาย (Evans, 1987) (ภาพที่ 2) สามารถพบลิกนินได้ในชั้น middle lamella ของพืช (Norkrans, 1967; Cowling and Kirk, 1976) โดยทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลล์ลูโลสและเฮมิเซลล์ลูโลสดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 2 โครงสร้างลิกนินจากต้นสน

ที่มา: Evans (1987)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของลิกนินซึ่งทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: Norkrans (1967); Cowling and Kirk (1976)

2. การย่อยสลายลิกนิน

ลิกนินสามารถย่อยสลายทางเคมีโดยใช้สารละลายต่างที่มีความเข้มข้น 5 % และที่อุณหภูมิสูง 130-280 องศาเซลเซียส (Avgerinos and Wang, 1983) หรืออาจใช้สารทำให้เกิดการออกซิไดส์ได้ เช่น H_2O_2 , $NaClO_2$ ฯลฯ ก็มีผลให้ลิกนินเกิดการย่อยสลายได้เช่นกัน (Sullivan and Hershberger, 1959; Gould, 1984) แต่การย่อยสลายทางเคมีนี้ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงและใช้อุณหภูมิสูง รวมทั้งมีการตกค้างของสารเคมีอันตรายด้วย จึงได้ศึกษาการย่อยสลายลิกนินโดยใช้ปฏิกิริยาทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์ซึ่งได้จากจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มๆ ได้ดังนี้

2.1 การย่อยสลายลิกนินโดยเชื้อรา สามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อราที่ย่อยสลายลิกนินได้เป็น 3 กลุ่มคือ soft-rot fungi, brown-rot fungi และ white-rot fungi โดย soft-rot fungi สามารถแทรกเข้าไปที่ secondary walls ของเซลล์เนื้อไม้แล้วทำการย่อยสลายได้ เชื้อราพวกนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes และ Fungi Imperfecti จะพบมากในสภาพธรรมชาติที่ชื้น soft-rot fungi สามารถย่อยสลาย polysaccharides ได้ดี แต่ย่อยสลายลิกนินได้แบบช้าๆ (Kirk, 1984) ส่วน brown-rot fungi สามารถย่อยสลาย polysaccharides และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลิกนินโดยแทรกเข้าไปที่ lumen ของเนื้อไม้ เชื้อราพวกนี้ทำการย่อยสลายได้คล้ายกับ Basidiomycetes ซึ่งเป็นกลุ่มหนึ่งใน white-rot

fungi (Buswell and Odier, 1987) แต่อย่างไรก็ดี ทั้ง soft-rot fungi และ brown-rot fungi สามารถย่อยลิกนินได้อย่างช้าๆ มีศักยภาพต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ white-rot fungi ซึ่งมีความสามารถสูงในการย่อยสลายลิกนิน และเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการศึกษากันมาก โดย white-rot fungi สามารถบุกรุกเข้าที่ lumen ของเซลล์เนื้อไม้เหมือนกับ brown-rot fungi แต่ white-rot fungi มีคุณสมบัติพิเศษว่าตรงที่มีผนังเซลล์บางมากจนสามารถเข้าถึง middle lamella ของพืช และยังมีผลให้ extracellular enzyme สามารถหลั่งออกมานอกเซลล์ได้ง่ายกว่า จนสามารถย่อยสลายทั้ง polysaccharide และลิกนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Hatakka, 1986) white-rot fungi ส่วนมากได้แก่กลุ่มของ Basidiomycetes และ Ascomycetes บางสายพันธุ์ white-rot fungi ที่มีการศึกษากันได้แก่ *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Fomes*, *Ischnoderma*, *Pleurotus*, *Phlebia*, *Phellinus*, *Ganoderma*, *Cerrena*, *Meruleus*, *Poria*, *Xylolobus*, *Hirschioporus*, *Lentinula*, *Bjerkandera* และ *Sporotrichum* (Hatakka, 1986) ซึ่งสายพันธุ์ที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium*

white-rot fungi ไม่ใช้ลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอนอันดับแรก โดย Kirk *et al.* (1976) ได้ทดลองย่อยสลายลิกนิน โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสหรือเซลลูโลส ซึ่งพบว่าระหว่างการเจริญนี้ จะไม่มีการย่อยสลายลิกนินเลย แต่เมื่อกลูโคสหรือเซลลูโลสหมดไปจะมีผลกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายลิกนินให้กลายเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไปได้ (Keyser *et al.*, 1987) ในการย่อยสลายตามธรรมชาตินั้นเชื่อว่าจะใช้แหล่งคาร์บอนคือ polysaccharides จากพืชก่อนจะมีการใช้ลิกนิน

ในสภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน *Phanerochaete chrysosporium* จะสามารถย่อยสลายลิกนินได้ดีมาก (Kirk *et al.*, 1976; Fenn and Kirk, 1981) สารประกอบไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโนต่างๆ ได้แก่ glutamate, glutamine และ histidine มีผลยับยั้งการย่อยสลายลิกนิน โดยควบคุมที่ระดับ cyclic AMP (cAMP) โดยจากการทดลองพบว่าระดับของ cAMP ใน *Phanerochaete* จะลดพร้อมทั้งลดกิจกรรมการย่อยสลายของลิกนินลงด้วย (MacDonald *et al.*, 1984)

การย่อยสลายลิกนินใน *Phanerochaete chrysosporium* ยังถูกควบคุมโดยสภาวะการขาดแคลนแหล่งคาร์บอน โดยเมื่อมีการเติมคาร์โบไฮเดรตจะมีผลลดการย่อยสลายลิกนิน และเมื่อมีการเติม glutamate จะลดการย่อยสลายลิกนินอย่างสมบูรณ์ (Jeffries *et al.*, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่า การขาดแคลนซัลเฟตมีผลต่อการลดการย่อยลิกนินด้วย ในขณะที่การขาดแคลนฟอสฟอรัสไม่มีผลต่อการย่อยสลายลิกนิน

Phanerochaete chrysosporium ต้องการออกซิเจนในการย่อยสลายลิกนิน ทดลองโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีการเขย่า มีผลให้เส้นใยของเชื้อราวมกันเป็นกลุ่มมีลักษณะเป็น pellet ซึ่งมีความสามารถในการรับออกซิเจนและการย่อยสลายลิกนิน (Kirk and Farrell., 1987)

2.2 การย่อยสลายลิกนินโดยแบคทีเรีย แบคทีเรียจำนวนมากทั้งแกรมบวกและแกรมลบมีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินได้ แต่ถึงอย่างไรก็ตามกระบวนการย่อยสลายโดยแบคทีเรียเกิดขึ้นช้า และไม่สมบูรณ์เมื่อเทียบกับเชื้อรา การย่อยสลายลิกนินของแบคทีเรียในสภาวะที่มีอากาศทั่วถึงจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าสภาวะไม่มีอากาศ

แบคทีเรียแกรมลบที่มีความสำคัญในการย่อยสลายลิกนินคือ *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Beijerinckia* และ *Erwinia* ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการศึกษาถึงการย่อยสลายลิกนินจะอยู่ในกลุ่ม Actinomycete ได้แก่ *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* และ *Thermomonospora* (Zimmermann, 1990)

การย่อยสลายลิกนินของแบคทีเรียไม่ต้องการสารตั้งต้น Odier และ Monties (1978) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Xanthomonas* ในอาหาร minimal medium ที่มี dioxane-lignin เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 15 วัน พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายลิกนินได้ 77 % และเมื่อมีการเติมกลูโคส พบว่าอัตราการย่อยสลายลิกนินเหลือเพียง 23 % นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการสลาย methoxyl groups, aromatic ring และ side chain ได้ แต่มีประสิทธิภาพด้อยกว่าเชื้อรา

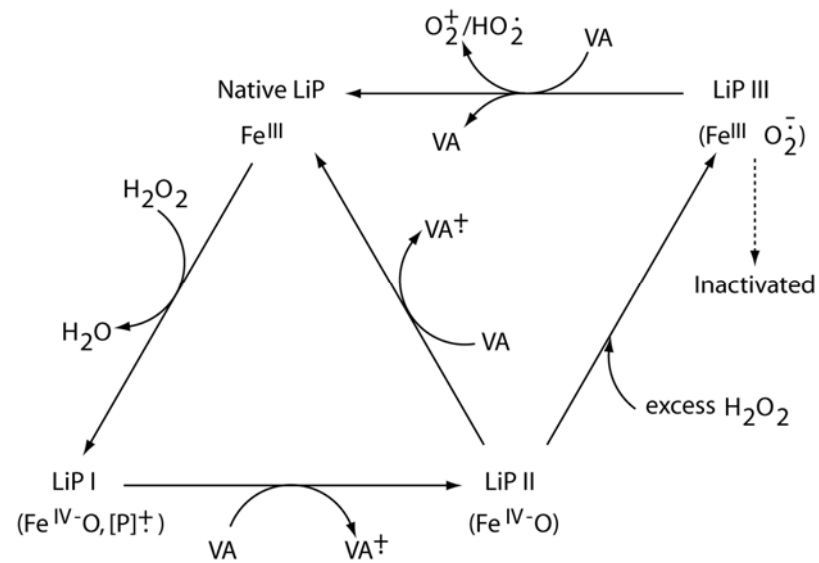
2.3 การย่อยลิกนินโดยใช้เชื้อราพร้อมกับแบคทีเรีย ได้มีการใช้เชื้อราพร้อมกับแบคทีเรียในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนิน Blanchette และ Shaw (1978a) ได้ทดลองใช้แบคทีเรีย (*Enterobacter* sp.) หรือยีสต์ (*Saccharomyces bailii* และ *Pichia pinus*) ร่วมกับ Basidiomycetes เช่น *Coriolus versicolor*, *Hirschioporus abietinus* และ *Poria placenta* ย่อยเนื้อไม้เป็นเวลา 5 เดือน พบว่าการย่อยมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นโดยแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของเชื้อราโดยให้สารพวกวิตามินแก่เชื้อรา และพบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายไม้ได้หลังจากเชื้อราได้ทำลายผนังเซลล์แล้ว การร่วมกันของแบคทีเรียและเชื้อรานี้ เป็นวิธีหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนิน (Blanchette and Shaw, 1978b)

3. เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากเชื้อรา

3.1 lignin peroxidases เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่มีการค้นพบว่าสามารถย่อยสลายลิกนินได้ โดยการย่อยลิกนินจะอาศัยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวทำให้เกิดการตัดพันธะ $C_{\alpha}-C_{\beta}$ ของลิกนิน และ methylated lignin แยกครั้งแรกจาก *Phanerochaete chrysosporium* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 42 kDa มี protoheme IX เป็น prosthetic group โดยมี 1 โมลของ protoheme IX เท่ากับ โมลของ lignin peroxidase

โดยปกติ lignin peroxidase สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน แต่ต้องมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสื่อกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา (Renganathan and Gold., 1986) กลไกการทำงานของ lignin peroxidase เหมือนกับ yeast cytochrome c peroxidase (Poulos and Kraut, 1980) และ horseradish peroxidase (Dawson, 1988) โดยเกิดปฏิกิริยาที่ active site (Kuila *et al.*, 1985; Andersson *et al.*, 1985) lignin peroxidase ในธรรมชาติมีองค์ประกอบเป็น heme iron atom (Fe III) โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเมื่อมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน 2 อนุภาคแก่ oxo-iron cation radical (Fe IV=O) กลายเป็น compound I (LiP I) ซึ่งสามารถย่อยสลายลิกนินได้จากนั้นจะเกิด oxidize อีก 1 ครั้ง กลายเป็น compound II (LiP II) และกลับเข้าสู่สภาวะเดิม ถ้าในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากจะ oxidize ต่อเป็น compound III (LiP III) (ภาพที่ 4) โดยมี veratryl alcohol เป็นสารตัวกลาง (mediator) ที่ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนแก่ compound II และ compound III เพื่อกลับมาเป็น lignin peroxidase ในสภาวะปกติ (Wariishi and Gold, 1989; Tien and Kirk, 1984; Andrawis *et al.*, 1988; Wariishi *et al.*, 1990)

3.2 manganese peroxidase เป็นเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยา peroxidase โดยอาศัย manganese (MnII) และถูกกระตุ้นโดย lactate พบในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยง *Phanerochaete* (Kuwahara *et al.*, 1984; Huynh and Crawford, 1985) เอนไซม์ manganese peroxidase มีน้ำหนักประมาณ 46 kDa ประกอบด้วย glycoprotein และมี protoporphyrin IX เป็น prosthetic group มี glycan 17% มีคุณสมบัติเหมือน lignin peroxidase (Glenn and Gold, 1985; Paszczynski *et al.*, 1986) และมี coordination site เป็น heme iron ที่มีรูปแบบเช่นเดียวกันกับที่พบใน lignin peroxidase , horseradish peroxidase และ yeast cytochrome c peroxidase โดย heme iron นี้มีกรดอะมิโน histidine เป็น ligand (ภาพที่ 5) (Mino *et al.*, 1989)

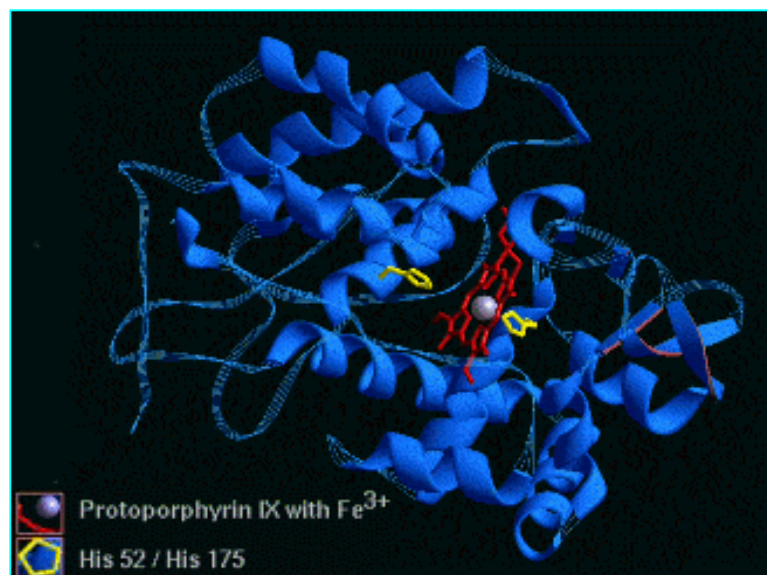


ภาพที่ 4 สภาวะออกซิเดชันของ lignin peroxidase LiP = Lignin peroxidase;

LiP I = compound I; LiP II = compound II; LiP III = compound

III; VA = veratryl alcohol

ที่มา: Wariishi and Gold (1989)



ภาพที่ 5 โครงสร้าง 3 มิติของเอ็นไซม์ yeast cytochrome c peroxidase

ที่มา: Anonymous (2006)

manganese peroxidase ที่ผลิตได้จาก *Phanerochate chrysosporium* เป็น isoenzyme มีหลายรูปแบบแต่ทำหน้าที่เดียวกัน (Leisola *et al.*, 1987; Farrell *et al.*, 1989) กลไกการทำงานของ manganese peroxidase เหมือนกับ peroxidase ทั่วไป คือมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น โดย Mn(II) ให้ 2 อิเล็กตรอนแก่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้ได้ compound I ซึ่ง Mn(II) เกิด oxidize เป็น Mn(III) โดย compound I จะถูกออกซิไดส์ต่อเป็น compound II และเข้าสู่สถานะเดิมคือ manganese peroxidase และถ้ามีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากเกินไปจะทำให้เกิด compound III ได้อีกซึ่งจะสามารถย่อยสลาย phenolic lignin model compounds รวมทั้งสามารถย่อยลิกนินได้ด้วยเช่นกัน (Wariishi *et al.*, 1988, Wariishi and Gold 1989; Forrestes *et al.*, 1988) manganese peroxidase สามารถ oxidize สาร glutathione, dithiothreitol และ NADPH ได้และพร้อมกันนี้ยังผลิตน้ำได้จากออกซิเจนซึ่งเกิดในปฏิกิริยา Mn(II)-dependent reaction และผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อปฏิกิริยา peroxidation สำหรับการย่อยสลายลิกนิน (Paszczynski *et al.*, 1985; Paszczynski *et al.*, 1986)

3.3 laccase จากเชื้อราเป็นเอนไซม์จัดอยู่ในกลุ่ม extracellular glycoprotein (ตารางที่ 1) สามารถย่อยสลายสารทั้งพวก phenolic และ non-phenolic compounds เช่น guaiacol, 2,6-dimethoxyphenol, p-phenylene diamine, syringaldazine (N,N'-bis(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzylidenehydrazine)) และ ABTS (2,2'-azinbis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) จากการทดลองสกัดแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่า เป็น isoenzyme เนื่องจากการตัดแปลงโมเลกุลเพื่อความสะดวกเหมาะสมต่อ extracellular location ที่แตกต่างกัน โดยมีการตัดสายของ polypeptide หรือเติมหมู่คาร์โบไฮเดรต เอนไซม์นี้มีขนาด 60-80 kDa ประกอบด้วย 520 -550 กรดอะมิโนมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ 15-20 % และมี copper 2-4 อะตอมต่อโมเลกุลของเอนไซม์ (ภาพที่ 6) จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน laccase ในราชนิดต่างๆ ได้แก่ *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* (Ascomycete), *Coriolus birsutus*, *Plebia radiata* และ *Agaricus bisporus* (Basidiomycetes) พบว่าบริเวณอนุรักษ์ของยีน laccase คือบริเวณ copper binding site ซึ่งประกอบด้วย cysteine 1 residue และ histidine 10 residue จับกับคอปเปอร์ 4 อะตอม ซึ่งลักษณะนี้สามารถพบได้ในเอนไซม์ ascorbate oxidase และ mamalian plasma protein ceruloplasmin โครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ laccase ที่ได้จาก *Neurospora crassa* และ *Phlebia radiata* มีลักษณะเป็น β -barrel เหมือนกับที่พบในเอนไซม์ ascorbate oxidase ซึ่งจากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงของสาย polypeptide ของเอนไซม์ laccase 5 สาย และเอนไซม์ ascorbate oxidase 2 สาย พบว่ามีค่าความคล้ายคลึง 83 เปอร์เซ็นต์

white-rot fungi ส่วนมากสามารถผลิต laccase และหลั่งออกมานอกเซลล์ เอ็นไซม์ laccase สามารถย่อยสลาย lignin model compounds และ phenolic hydroxyl ได้เป็น phenoxy radicals โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน กลุ่มราที่สามารถผลิต laccase ได้ดีคือ *Trametes (Polyporus, Coriolus) versicolor* (Bollag and Leonowicz, 1984) *Pleurotus ostreatus* (Sannia et al., 1986) ส่วน *Phanerochaete chrysosporium* เป็นกลุ่มของ white-rot fungi ที่ไม่สามารถผลิต laccase ได้

4. การย่อยสลายลิกนินโดย White-rot fungi

ราที่ใช้ศึกษากลไกในการย่อยลิกนินคือ *Phanerochaete chrysosporium* โดยในการย่อยสลายลิกนิน *Phanerochaete chrysosporium* ผลิตเอ็นไซม์ 3 ชนิดคือ LiP MnP และ glyoxal oxidase (GLOX) (Kirk and Hammol., 1992) โดยเอ็นไซม์ทั้งสามมีการทำงานร่วมกันดังภาพที่ 7 โดยเริ่มจากเอ็นไซม์ GLOX ทำหน้าที่ในการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สำหรับการทำงานของเอ็นไซม์ peroxidase ซึ่งมีเอ็นไซม์ LiP เป็นเอ็นไซม์หลักในการย่อยโครงสร้างที่เป็น non-phenolic ของ ลิกนินส่วนที่เป็น aromatic nuclei จะถูก oxidized ไปเป็น aryl cation radical ซึ่งจะถูกลดในขบวนการ fragmentation ในขณะผลิต veratryl alcohol ซึ่งเป็น secondary metabolite ทำหน้าที่กระตุ้นการสร้าง LiP และเป็นตัวกลางในการส่งถ่ายประจุ (charge-transfer mediator) (ภาพที่ 8) เอ็นไซม์ MnP จะผลิต Mn^{3+} ซึ่งเมื่อถูก chelate จะทำหน้าที่ oxidize สารพวก phenolic สารระหว่างปฏิกิริยาทั้งที่เป็น aliphatic และ aromatic ก็จะถูก metabolize ต่อโดยราจนกลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ

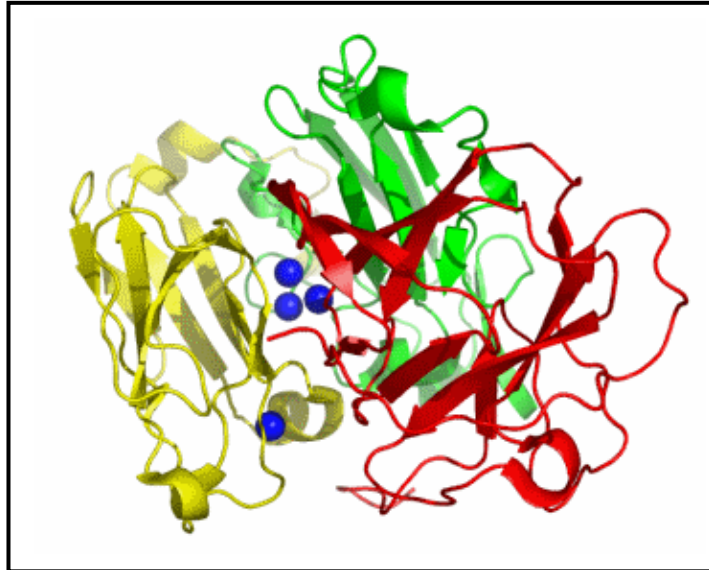
ตารางที่ 1 คุณสมบัติของเอนไซม์ laccase จากเชื้อรา

Organism	No. of enzymes	Mol. Mass (kDa)	Carbohydrate content (%)	Copper content (atom per molecule)
<i>Agaricus bisporus</i>	1(2)	100 65	15	2
<i>Armillaria mellea</i>	2	59 ?	-	-
<i>Aspergillus nidulans</i> (conidial)	1	110	12	-
<i>Botrytis cinerea</i>	2	80 72	80	-
<i>Lentinus edodes</i>	1	66	-	-
<i>Monocillium incicum</i>	1	100 72	-	-
<i>Neurospora crassa</i>	1	65	11	3
<i>Phlebia radiata</i>	1	64	-	2
<i>Podosporra anserina</i>	3	70 80 390	25 23 22	3.3

ตารางที่ 1 (ต่อ)

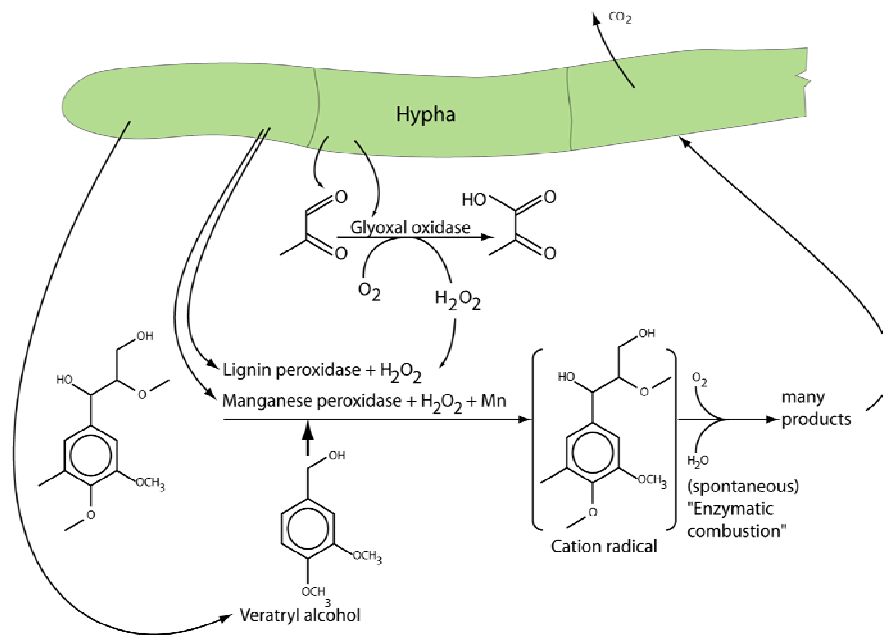
Organism	No. of enzymes	Mol. Mass (kDa)	Carbohydrate content (%)	Copper content (atom per molecule)
<i>Polyporus (Coriolus) versicolor</i>	2	60 ~65	14	4
<i>Pycnoporus coccineus</i>	1	70	-	-
<i>Schizophyllum commune</i>	1	62-64	-	-

ที่มา: Christopher (1994)



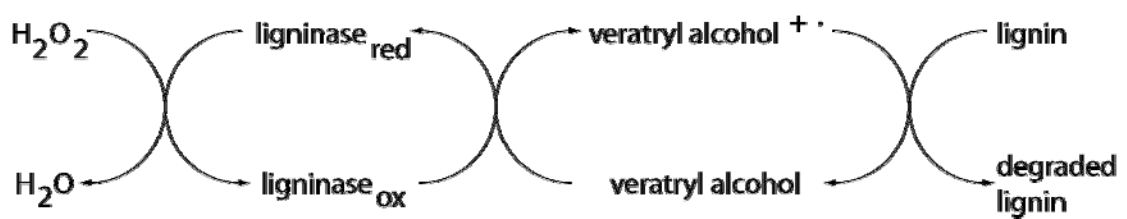
ภาพที่ 6 โครงสร้าง 3 มิติ ของเอ็นไซม์ laccase ใน *Trametes versicolor* ;
สีน้ำเงินแสดงอะตอมของ copper ion

ที่มา: Joachim, (2007)



ภาพที่ 7 ระบบการย่อยสลายลิกนินของ *Phanerochaete chrysosporium*

ที่มา: Kirk and Hammol. (1992)



ภาพที่ 8 บทบาทของ veratryl alcohol ในการเป็นตัวกลางการส่งต่อประจุในขบวนการย่อยลิกนิน

ที่มา: Harvey *et al.* (1986)

5. ประโยชน์ของเอ็นไซม์ย่อยลิกนิน

เอ็นไซม์ย่อยลิกนินจาก white rot fungi นอกจากจะย่อยและฟอกจางสีเนื้อไม้แล้วยังสามารถย่อยสลาย hydroxy stilbenes ซึ่งเป็นสารที่ใช้เป็นสีย้อมผม (Onuki *et al.*, 2000; Pruche *et al.*, 2000) เอ็นไซม์ laccase ที่อยู่บนผิวหน้าพื้นดินมีประโยชน์ในการวิเคราะห์และตรวจวัดสารพวก azide (Leech and Daigle, 1998) โดยตัวตรวจจับจะตรวจวัดดัชนีของออกซิเจนในกระบวนการย่อยสลายที่เกิดขึ้น ประโยชน์ของ ligninolytic enzyme สามารถสรุปได้ดังนี้

5.1 Delignification เป็นการย่อยสลายลิกนินในเนื้อเยื่อไม้ซึ่งมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรม การผลิตเยื่อกระดาษ ได้มีการศึกษาระบบการย่อยลิกนินโดยเอ็นไซม์ laccase, MnP และ LiP ใน white-rot fungi ชนิดต่างๆ พบว่าเอ็นไซม์ที่ได้มีความสามารถในการย่อยลิกโนเซลลูโลสได้เหมือนกัน แต่มีความแตกต่างด้าน molecular weight, optimum pH และคุณสมบัติอื่นๆ โดย เอ็นไซม์ laccase จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสได้สูงเมื่อมีสารพวก phenolic เป็นตัวกระตุ้น (Mai *et al.*, 2000) สาร phenolic นี้เป็นพิษต่อราแต่ไม่เป็นอันตรายต่อยีสต์ Larsson *et al.* (2001) ได้ทำการตัดต่อยีน laccase จาก *Trametes* เข้าสู่ระบบของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอ็นไซม์ให้สูงขึ้น พบว่าสามารถเกิดการย่อยสลายเนื้อไม้ได้ดีและทนต่อสารพวก phenolic ได้

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

5.3 Bioremediation เอ็นไซม์จากราสามารถย่อยสลายสารที่ย่อยยากที่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้ เช่น Trichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenols สามารถย่อยสลายโดยรา *Panus tigrinus* และ *Coriolus versicolor* ได้เป็น 2,6 dichloro-1,4-hydroquinol และ 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone โดย *P. tigrinus* ผลิตเอ็นไซม์ MnP ส่วน *C. versicolor* ใช้เอ็นไซม์ laccase ในการย่อยสลาย (Leontievsky *et al.*, 2000) สีย้อมสังเคราะห์จำพวก azure B, brilliant green, congo red, crystal violet และ remazo' brilliant blue R สามารถย่อยสลายได้โดย *Flavodon flavus* ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่ำ (Raghukumar, 2000) *T. versicolor* สามารถกำจัดสี Poly R-478 ได้ 90 % โดยมี

veratryl alcohol เป็นตัวกระตุ้น และสามารถย่อยสลายสาร humic acid โดยสลาย 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid ได้เป็น 2-amino-4,6-dimethyl-3-phenoxazinone-1,9- carboxylic acid (Osiadacz *et al.*, 1999; Fakoussa and Frost, 1999) สารกำจัดแมลงศัตรูพืชพวก Isoxaflutole ซึ่งตกค้างในดินและพืชในรูปแบบของ diketonitrile สามารถถูกย่อยสลายโดย *Phanerochaete chrysosporium* และ *T. versicolor* ได้เป็น benzoic acid มีการแยกเอนไซม์ laccase บริสุทธิ์จาก *Coriolopsis gallica* เพื่อใช้ในการย่อยสลายสาร carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene และ dibenzothiophene (Bressler *et al.*, 2000) ในปี ค.ศ. 2000 Hublik และ Schinner ได้ตรึงเอนไซม์ laccase ที่แยกมาจาก *Pleurotus* เพื่อใช้ในการกำจัดสารพวก phenolic จากมลภาวะ และได้มีการปรับปรุงให้มีการย่อยสลายสาร 2,6-dimethoxyphenol ในระบบถังหมัก

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอเป็นสิ่งสำคัญสำหรับงานวิจัยทางอนุชีววิทยาโดยเฉพาะกับดีเอ็นเอสายใหม่ที่เพิ่งทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอจะทำให้ทราบถึงบริเวณที่มีรหัสในการสร้างโปรตีน บริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอใหม่โดยทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเออื่นๆ เพื่อทราบบริเวณที่คล้ายคลึงกัน

ในการหาบริเวณที่มีรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนนั้นสามารถทำได้โดยการหา open reading frame (ORF) แล้วจึงตรวจสอบว่า ORF ที่หาได้นั้นเป็นบริเวณที่มีรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนจริงหรือไม่ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ 2 วิธี คือ หาคุณสมบัติทางสถิติของลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นรหัสการสร้างโปรตีน และหาบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน เช่น promoter, ribosome binding site, terminator และบริเวณที่มีการเติม poly-A หรือบริเวณที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอน RNA splicing

ลักษณะของ coding region คือส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่มีรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนจะมีองค์ประกอบที่มีลักษณะเฉพาะซึ่งแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณที่ไม่มีรหัสสำหรับการสร้างโปรตีน เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์จะต้องมีรหัสสำหรับกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นสาย polypeptide สำหรับโปรตีนนั้น หน้าที่การทำงานของโปรตีนจึงมีส่วน

อย่างมากในการกำหนดลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ นอกจากนั้นมีการศึกษาที่แสดงว่าดีเอ็นเอในบริเวณที่มีรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนมีคุณสมบัติของ periodicity คุณสมบัตินี้สามารถวิเคราะห์ได้ 2 วิธี คือ 1) base composition bias โดยคาดว่าในส่วน non-coding region นั้นมีการกระจายตัวอย่างอิสระ ดังนั้นองค์ประกอบของเบสแต่ละชนิดมีปริมาณไม่แตกต่างกัน ส่วนในบริเวณ coding region จะมีการกำหนดเบสขึ้นอยู่กับการคอมมิโนที่มาประกอบกันเป็นสายโปรตีน โดยทั่วไปแล้วพบว่าเบสในตำแหน่งที่ 1 และที่ 2 ของโคดอนทั้งหมดใน coding region จะเป็นเบสกวีนินและไซโตซีนเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์สำหรับการวิเคราะห์หา coding region โดยวิธีนี้ เช่น โปรแกรม Testcode อยู่ในซอฟต์แวร์ GCG package โดยคำนวณหาปริมาณเบสที่เป็นองค์ประกอบเป็นส่วนๆ ซึ่งมีความยาวตามที่กำหนด แล้วจะเลื่อนไปคำนวณในส่วนถัดไป การวิเคราะห์ coding region นี้ไม่ต้องการข้อมูลอื่นใดมาประกอบแต่มีข้อบกพร่องที่ว่าไม่สามารถหาจุดเริ่มต้นและสิ้นสุด รวมทั้งไม่สามารถบอก reading frame ได้ และ 2) codon usage patterns คือรูปแบบของการใช้โคดอนเพื่อประกอบเป็นยีนเป็นลักษณะที่เรียกว่า codon preference โดยคำนี้มีความหมายต่างจาก codon usage ซึ่งหมายถึงความถี่ที่โคดอนแต่ละตัวถูกใช้เพื่อเป็นองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน การวิเคราะห์หา coding region นั้นได้จากการคำนวณหา codon usage ของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการวิเคราะห์ถ้า codon usage ที่คำนวณได้สอดคล้องกับ codon preference สำหรับสิ่งมีชีวิตนั้น ก็น่าจะเป็นไปได้ว่าดีเอ็นเอบริเวณที่ทำการวิเคราะห์เป็น coding region การวิเคราะห์โดยวิธีนี้เหมาะสมสำหรับยีนที่มีการแสดงออกในระดับสูง

ลักษณะของส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน (regulatory element) คือบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนและมักจะเป็นดีเอ็นเอส่วนสั้นๆ การวิเคราะห์หาดีเอ็นเอบริเวณนี้สามารถทำได้โดยการหาส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะตรงกับ regulatory element ที่ต้องการ เนื่องจาก regulatory element มีขนาดสั้นและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันได้บ้าง ประสิทธิภาพของวิธีการหาบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนจึงขึ้นอยู่กับว่าจะสามารถกำหนดลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ regulatory element ให้ชัดเจนได้เพียงใด การให้ความหมายและกำหนดลักษณะของ regulatory element สามารถทำได้โดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดที่เป็น consensus เป็นตัวกำหนด ตัวอย่างเช่น บริเวณโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่ง -10 ของยีนในแบคทีเรีย *E. coli* มี consensus คือ TATAAT ดังนั้นในการหาโปรโมเตอร์ของยีนในแบคทีเรียจะหาบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TATAAT หรือที่ใกล้เคียงนี้มากที่สุด วิธี frequency matrix เป็นการหาความถี่ของเบสแต่ละชนิด ที่แต่ละตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอ-

ไทด์ในบริเวณควบคุมโดยแสดงเป็นตารางการกระจายความถี่ และอีกวิธีคือวิธี weight matrix เป็นตารางที่แสดงนัยสำคัญของการพบเบสชนิดหนึ่งในตำแหน่งหนึ่งๆ สร้างจาก frequency matrix โดยนำค่าความถี่นี้ไปหาค่าเฉลี่ยของการพบเบส ตัวเลขที่ได้นี้แสดงค่าโอกาสพบเบสหนึ่งๆ มากน้อยกว่าปกติเป็นกี่เท่าในแต่ละตำแหน่ง จากนั้นหาค่า logarithm ของตัวเลขนั้น

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) เป็นกลุ่มของโปรแกรมคอมพิวเตอร์ สำหรับเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอ หรือ โปรตีน ถูกพัฒนาโดย National Center for Biotechnology Information สหรัฐอเมริกา สามารถทำงานและแสดงผลได้รวดเร็ว ประกอบด้วย 5 โปรแกรม คือ

1. BlastN เป็นโปรแกรมสำหรับเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่อยู่ในฐานข้อมูล
2. BlastP เป็นโปรแกรมสำหรับเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ polypeptide กับลำดับกรดอะมิโนของ polypeptide ที่อยู่ในฐานข้อมูล
3. BlastX เป็นโปรแกรมสำหรับเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทั้ง 6 reading frame ที่ได้จากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่สนใจ โดยเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ polypeptide ที่อยู่ในฐานข้อมูล
4. TblastN เป็นโปรแกรมสำหรับเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ polypeptide กับลำดับกรดอะมิโนทั้ง 6 reading frame ที่ได้จากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่อยู่ในฐานข้อมูล
5. TblastX เป็นโปรแกรมสำหรับเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทั้ง 6 reading frame ที่ได้จากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่สนใจ โดยเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนทั้ง 6 reading frame ที่ได้จากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่อยู่ในฐานข้อมูล

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้แสดงถึงที่น่าจะเป็นโดยคำนวณจากคะแนน และความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน โดยโปรแกรม BLAST จะบอกค่าความน่าจะเป็นของผลการเปรียบเทียบ ค่านี้สามารถใช้ประเมินความน่าเชื่อถือได้ เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอ-

ไพล์ที่เพิ่มมากขึ้นในฐานข้อมูล จึงมีความต้องการที่จะเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในหลายสายคร่าวเดียวกัน ดังนั้นนักวิจัยจาก European Molecular Biology Laboratory ประเทศเยอรมัน ได้วิจัยโปรแกรมชุด Clustal ขึ้นมาเพื่อช่วยในการวิเคราะห์ multiple sequence alignment

7. การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบนสายนิวคลีโอไทด์

รูปแบบและตำแหน่งการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถบอกได้ถึงคุณสมบัติของบริเวณจำเพาะต่างๆ ที่พบในโปรตีนชนิดนั้นๆ การวิเคราะห์หาบริเวณจำเพาะเหล่านี้มีความสำคัญในการทำนายชนิดของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นจากลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าบริเวณนั้นๆ จะเป็นบริเวณที่มีความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยาใด พบว่ารูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนที่ให้ลักษณะเฉพาะนี้ในเอ็นไซม์ชนิดเดียวกันหรือกลุ่มเดียวกันจะมีความคล้ายคลึงกัน

รูปแบบของกรดอะมิโนบริเวณจำเพาะในเอ็นไซม์ lignin peroxidase และ manganese peroxidase จะมีความคล้ายคลึงกัน ได้แก่ บริเวณ glycosylation site ที่กำหนดด้วยกรดอะมิโน Asn 257 (หมายถึงกรดอะมิโน Asparagine ในตำแหน่งที่ 257) และ/หรือ Ser 334 (Thomas, *et al.* 1993), บริเวณ glycosylation site ที่กำหนดด้วยกรดอะมิโน Asn 103-Asn 131-Asn 135-Asn 160 (Pekk, *et al.* 2003), บริเวณ C-terminal site กำหนดด้วยบริเวณที่เป็น proline rich ซึ่งมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็น Ile-Pro-Pro-Pro-Pro-Gly-Ala หรือ Ile-Pro-Pro-His-Lys-Ala หรือ Ile-Pro-Pro-Pro-Pro-Ser-Pro-Asn, บริเวณ conserved distal histidine กำหนดด้วย His 47 (Thomas, *et al.* 1999), บริเวณ conserved proximal histidine กำหนดด้วย His 176 (Thomas, *et al.* 1999), บริเวณ manganese binding site กำหนดด้วย Glu 56-Glu-60-D 200 หรือ Glu-35-Glu 39-Asp 179 (Yasuhiko, *et al.* 1995 และ Heather, *et al.* 2001), บริเวณ CRE (cAMP response element) กำหนดด้วยลำดับของนิวคลีโอไทด์ TGACGTC (Mario, *et al.* 2000), บริเวณ MRE (Metal response element) กำหนดด้วยลำดับของนิวคลีโอไทด์ ACCCCG (Mario, *et al.* 2000), บริเวณ XRE (Xenobiotic response element) กำหนดด้วยลำดับของนิวคลีโอไทด์ CACGCT (Mario, *et al.* 2000)

รูปแบบของกรดอะมิโนบริเวณจำเพาะของเอ็นไซม์ laccase คือ บริเวณ copper-binding site กำหนดด้วยกรดอะมิโน histidine ที่มีการเรียงตัวเป็น His _ His หรือ His _ _ His _ His (Kazutomo, *et al.* 2002)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ประกอบด้วยเชื้อรา YK505 (*Trametes hirsuta*) เป็นเชื้อใช้เปรียบเทียบ ได้รับจาก Dr. Kondo, Kyushu University ผ่านทางสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์เกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เชื้อรา GF เป็นเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์คัดแยกได้จากการวิจัยครั้งนี้และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α (F⁺ supE44 endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) gln44 thi1 recA1 gyrA(Nal^r) deoR lambda⁻)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารแข็ง ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Luria-Bertani Agar (LA) และ Nutrient Agar (NA) ส่วนอาหารเหลว ได้แก่ Potato Dextrose Broth (PDB), Luria-Bertani Broth (LB) และ Basal Medium (ภาคผนวก)

3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์เอ็นไซม์ย่อยลิกนิน

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์เบื้องต้น ได้แก่ งานเพาะเลี้ยง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารแข็งสูตร NA ซึ่งเติม 2 มิลลิโมลาร์ ABTS, 0.01% Phenol Red และ 0.8 กรัมต่อลิตร Tannic acid

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอ็นไซม์ย่อยลิกนิน ได้แก่ เครื่อง spectrophotometer หลอดทดลอง สารตั้งต้นในการรีดิวซ์ของเอ็นไซม์ laccase, manganese peroxidase และ lignin peroxidase

4. อุปกรณ์และสารเคมีในการสกัดแยก DNA และ RNA

4.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเส้นใย ได้แก่ ฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหาร PDB

4.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยก DNA และ RNA ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร และ 1.5 มิลลิลิตร ไมโครปิเปต เครื่องแก้ว สารเคมีต่างๆ

5. อุปกรณ์และสารเคมีในการแยกพลาสมิดจากแบคทีเรีย

5.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ ฟลasks เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร LB

5.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการแยกพลาสมิด ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ไมโครปิเปต เครื่องแก้ว สารเคมีต่างๆ

6. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ DNA

6.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ได้แก่ เครื่อง spectrophotometer

6.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกขนาดดีเอ็นเอ ได้แก่ ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสและอุปกรณ์ถ่ายรูป

7. อุปกรณ์และสารเคมีในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

7.1 อุปกรณ์ในการทำ PCR ได้แก่ เครื่อง Thermal cycler ไมโครปิเปต หลอดทำปฏิกิริยา PCR แบบผนังบางขนาด 500 มิลลิลิตร

7.2 สารเคมีในการทำ PCR ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ เอ็นไซม์ Taq DNA polymerase และ dNTP

8. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่แบคทีเรีย

8.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเหลวสูตร LB

8.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการนำดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ ได้แก่ อ่างปรับอุณหภูมิให้ร้อนและอ่างน้ำแข็ง

9. ชุดสำเร็จรูป

9.1 ชุดสกัดแยก total RNA จากเส้นใย Rneasy Plant Mini kit ของบริษัท Qiagen

9.2 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเออย่างรวดเร็ว Colony Fast Screen (Size Screen) ของบริษัท Epicenter

9.3 ชุดสกัดแยกแถบดีเอ็นเอจากชิ้น ژีน Gene clean II Kit ของบริษัท BIO 101

9.4 ชุดการทำโคลน QIAGEN PCR Cloning Kit ของบริษัท Qiagen

9.5 ชุดสกัดแยก QIAquick spin สำหรับทำ PCR product ให้บริษัท Qiagen

10. คอมพิวเตอร์และโปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส

ได้แก่ โปรแกรม DNASIS version 2, ClustalW และ BLAST (จากฐานข้อมูลผ่านเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

วิธีการ

1. การคัดเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินจากธรรมชาติ

1.1 การเก็บตัวอย่างจากธรรมชาติ เก็บตัวอย่างชิ้นไม้ผุและดินใต้ไม้ผุจากอุทยานแห่งชาติเขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี อุทยานแห่งชาติห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี

1.2 การคัดเลือกเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนิน วางตัวอย่างที่เก็บได้จากข้อ 1.1 บนอาหารสูตร NA (Nutrient Agar) ที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะ streptomycin ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 วัน ตัดเฉพาะปลายเส้นใยที่เจริญออกมาเลี้ยงบนอาหารจานใหม่ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง แล้วปล่อยให้เชื้อราเจริญเติบโตนาน 1 วันและ 2 วัน บันทึกลักษณะเส้นใยและสปอร์ที่ได้

เมื่อเชื้อเจริญได้ 3 วัน ใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะอาหารวุ้นที่มีเส้นใยอยู่น้อยอยู่มาวางบนอาหาร NA ที่เสริมด้วย tannic acid ปริมาณ 0.8 กรัมต่อลิตร ที่จะให้บริเวณสีเหลืองกับเอนไซม์ polyphenol oxidase, ABTS ปริมาณ 2 มิลลิโมลาร์ ที่ให้สีเขียวกับเอนไซม์ laccase และ 0.01% phenol red ที่ให้บริเวณสีเหลืองมะนาวกับเอนไซม์ manganese peroxidase เลี้ยงเส้นใยที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี

2. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนิน

2.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนิน เอนไซม์ย่อยลิกนินซึ่งนำมาศึกษานี้แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ เอนไซม์ lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) และ laccase โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

เอนไซม์ LiP วัดกิจกรรมตามวิธีของ Tien and Kirk (1988) โดยส่วนผสมสารตั้งต้นประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ veratryl alcohol จำนวน 160 ไมโครลิตร 5 มิลลิโมลาร์ H_2O_2 จำนวน 64 ไมโครลิตร 0.25 โมลาร์ d-tartaric acid pH 2.5 จำนวน 160 ไมโครลิตร และตัวอย่างเอนไซม์โดยปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 800 ไมโครลิตร วัดผลผลิตที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ($E = 9300 M^{-1} cm^{-1}$)

เอ็นไซม์ MnP วัดกิจกรรมตามวิธีของ Pasczynski *et al.* (1988) โดยส่วนผสมสารตั้งต้น ประกอบด้วย 0.5 โมลาร์ sodium tartrate buffer pH 5.0 จำนวน 160 ไมโครลิตร 1 มิลลิโมลาร์ guaiacol pH 4.5 จำนวน 80 ไมโครลิตร 1 มิลลิโมลาร์ MnSO_4 จำนวน 80 ไมโครลิตร 5 มิลลิโมลาร์ H_2O_2 จำนวน 16 ไมโครลิตร และตัวอย่างเอ็นไซม์ โดยปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 800 ไมโครลิตร วัดผลผลิตที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร ($\epsilon = 12100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

เอ็นไซม์ laccase วัดกิจกรรมตามวิธีของ Niku-Paavola *et al.* (1988) โดยส่วนผสมสารตั้งต้นจำนวน 800 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1 โมลาร์ glycine-HCl pH 3.0 จำนวน 40 ไมโครลิตร 28 มิลลิโมลาร์ ABTS จำนวน 500 ไมโครลิตร และตัวอย่างเอ็นไซม์ โดยปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 800 ไมโครลิตร วัดผลผลิตที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร ($\epsilon = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

2.2 การเตรียมตัวอย่างเอ็นไซม์จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง ดัดแปลงวิธีจาก Pal M. *et al.* (1995) โดยเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่ไม้อยูคาลิปตัสจำนวน 5 กรัม น้ำจำนวน 20 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปลุกเชื้อทุกสัปดาห์เป็นเวลา 9 สัปดาห์ โดยตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้ออายุน้อยเจริญอยู่ด้วย cock borrrer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลงไป 3 ชิ้น บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นำมาสกัดเอ็นไซม์ทุกสัปดาห์ โดยเติม 50 มิลลิโมลาร์ sodium acetate pH 4.5 ที่แช่ในถังน้ำแข็งปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปหากิจกรรมของเอ็นไซม์

3. การตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อราผลิตเอ็นไซม์ย่อยลิกนิน

ทำโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacers) ของ ribosomal DNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 10 x buffer จำนวน 5 ไมโครลิตร 2 มิลลิโมลาร์ dNTP จำนวน 5 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ ITS1 (TTC GTC GGT GAA CCT GCG G) (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) จำนวน 1 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) จำนวน 1 ไมโครลิตร, recombinant plasmid จำนวน 10 นาโนกรัม Taq DNA Polymerase จำนวน 2.5 ไมโครลิตร DNA template จำนวน 10 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณสาย DNA ด้วยเครื่อง PCR ที่สภาวะ denaturation 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที amplification 30 รอบ โดยกำหนด denaturing ที่ 94

องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที annealing ที่ 47 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที เมื่อสิ้นสุดรอบสุดท้ายทำ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วทำ BlastN เข้ากับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ใน Gen Bank ของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

4. การสังเคราะห์ cDNA

4.1 การเลี้ยงและเก็บเส้นใยคัดแปลงจาก Declan and Dobson (2001) โดยเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว Basal medium สูตรที่มีแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่ำ บ่มเส้นใยในเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน แล้วเติมกลูโคสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิโมลาร์ และเติมสารกระตุ้นเอ็นไซม์ veratryl alcohol ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ และ CuSO_4 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 400 ไมโครโมลาร์ บ่มในเครื่องเขย่า 25 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงแล้วเติมสารกระตุ้นเอ็นไซม์อีกครั้งหนึ่ง บ่มในสภาพเดิมนาน 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเส้นใยแบบเทคนิคปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Glass filter whatman #4 ล้างเส้นใยด้วยน้ำที่นิ่งมาเชื้อแล้วแช่เย็นไว้ 2 ครั้ง ใช้ปั๊มดูดอากาศดูดน้ำออกจากเส้นใยผ่านกระดาษกรองให้ได้มากที่สุด บดเส้นใยในไนโตรเจนเหลวจนได้ผงละเอียด แบ่งผงเส้นใยลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่แช่เย็นหลอดละประมาณ 200 มิลลิกรัม รับประทานหลอดที่มีเส้นใยเก็บใน -70 องศาเซลเซียสโดยเร็วก่อนที่เส้นใยจะละลาย

4.2 การสกัด total RNA จากเส้นใยที่เก็บ -70 องศาเซลเซียส โดยใช้ Rneasy Plant Mini Kit ของบริษัท QIAGEN ทำโดยนำเส้นใยที่บดให้เป็นผงละเอียดในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ มาเติมสารละลาย RLC จำนวน 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน อุ่นที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 1-3 นาที จากนั้นถ่ายใส่หลอด QIAshredder spin column (lilac) ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ส่วนน้ำที่ได้เติมเอธานอล 96-100 % ปริมาตร 0.5 เท่า ผสมให้เข้ากันแล้วถ่ายลงในหลอด Rneasy mini column (pink) ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่สารละลายที่ผ่านคอลัมน์แล้วล้างคอลัมน์โดยเติมสารละลาย RW1 จำนวน 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที นำคอลัมน์ใส่หลอดเซนทริฟิวจ์ใหม่และล้างต่อด้วยสารละลาย RPE buffer จำนวน 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที 2 ครั้ง จากนั้น

ทำให้ Rneasy silica-gel membrane แห้งโดยการนำคอลัมน์ใส่หลอดเซนตริฟิวก์ใหม่ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ละลาย RNA ซึ่งติดอยู่ที่ Rneasy silica-gel membrane ด้วยน้ำปลอดเชื้อและไม่ปนเปื้อนด้วย RNase ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ RNA

4.3 การสังเคราะห์ cDNA ด้วย Superscript III One-step RT-PCR ของบริษัท Invitrogen สารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วย 2 x Reaction Mix จำนวน 25 ไมโครลิตร, total RNA ปริมาณ 10 พิโคกรัม - 1 ไมโครกรัม, ไพรเมอร์ตัวที่ 1 (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) จำนวน 1 - 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ตัวที่ 2 (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) จำนวน 1 - 2 ไมโครลิตร, Superscript III enzyme Mix จำนวน 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนได้ 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาโดยเครื่อง Thermal cycler ในสภาวะดังนี้ สร้าง cDNA เส้นที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วสร้าง cDNA เส้นที่ 2 ด้วยการให้ความร้อน 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ตามด้วย amplification 40 รอบ โดยกำหนด denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ อุณหภูมิต่ำกว่าค่า Tm ของไพรเมอร์จำนวน 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension ที่ 68 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที เมื่อสิ้นสุดรอบสุดท้ายทำ final extension ที่ 68 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสหรือนำไปทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ด้วย QIA quick Spin Kit ของบริษัท QIAGEN

5. การสร้าง recombinant plasmid จาก cDNA

ทำโดยนำ cDNA จากข้อ 4.3 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pDrive ในสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลาย pDrive (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) จำนวน 1 ไมโครลิตร, cDNA จำนวน 2 ไมโครลิตร, น้ำจำนวน 2 ไมโครลิตร และ ligation master mix จำนวน 5 ไมโครลิตร จะมีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 8-10 องศาเซลเซียส 30 นาทีถึง 2 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. การนำ recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์ *E.coli* DH 5 α

6.1 การเตรียม competent cell ทำโดยเลี้ยง *E.coli* สายพันธุ์ DH 5 α ในอาหาร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน นำเชื้อที่

เจริญแล้ว 200 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหาร SOB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงหรือจนเซลล์มีความขุ่นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 - 0.6 ถ่ายเชื้อที่เจริญแล้วลงในหลอดเซนตริฟิวจ์แช่ในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ที่ 3,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ล้างตะกอนที่ได้ในสารละลาย RF1 ที่แช่เย็น ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ แล้วละลายตะกอนในสารละลาย RF2 ที่แช่เย็น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็งแล้วแบ่งใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่แช่เย็นไว้หลอดละ 100 - 400 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C

6.2 การนำ recombinant plasmid เข้าสู่ competent cell ทำโดยนำ DNA ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.3 จำนวน 2 - 5 ไมโครลิตรมาผสมกับ competent cell ที่ได้จากข้อ 6.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยเขย่าเบาๆ แล้วแช่น้ำแข็งทันที นาน 30 นาที ทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที แล้วรีบแช่น้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เติมน้ำอาหาร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มเชื้อไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารแข็ง LA ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-gal ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน โคโลนีที่ได้รับ recombinant DNA จะปรากฏสีขาว ส่วนโคโลนีที่ไม่ได้รับจะปรากฏสีฟ้า ย้ายโคโลนีสีขาวใส่จานอาหารใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 คืนแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ย้ายใส่อาหารใหม่ทุก 1 - 2 เดือน

7. การตรวจสอบโคลนโดยการสกัด DNA

7.1 การสกัด DNA ไปตรวจสอบขนาดอย่างรวดเร็ว ทำโดยใช้ชุด Colony Fast Screen (Size Screen) ของบริษัท Epicenter ทำโดยนำ colony จากข้อ 6.2 ปริมาณเล็กน้อยมาใส่ในสารละลาย EpiBlue ปริมาตร 10 ไมโครลิตร กระจายเซลล์ให้ทั่วด้วยเครื่อง vortex mixer แรงๆ นาน 10 วินาที ใส่สารละลาย Epilysse ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ผสมด้วยเครื่อง vortex mixer แรงๆ นาน 10 วินาที ตรวจสอบ DNA ใน 0.7 % agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

7.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี alkaline lysis ทำโดยเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 6.2 ในอาหาร LB ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะ ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที กระจายตะกอนใน Solution I ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที เติม Solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดเบาๆ จนได้สารละลายใส (ห้ามเกิน 5 นาที) แล้วใส่ Solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร กลับหลอดเบาๆ จนได้ตะกอนสมบูรณ์ แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที ปั่นทิ้งตะกอนที่ 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใสมาใส่สารละลาย phenol และ chloroform อย่างละ 400 ไมโครลิตร เขย่าแรงๆ ปั่นเหวี่ยงเก็บสารละลายส่วนบนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำสารละลายชั้นบนมาใส่หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแรงๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บสารละลายส่วนบนมาใส่สารละลาย 3 โมลาร์ sodium acetate ปริมาตร 1 ใน 10 เท่า ของปริมาตรสารละลาย เติม absolute EtOH ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน ปั่นเก็บตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 70 % EtOH ที่เย็น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเก็บตะกอนโดยเทส่วนน้ำทิ้ง แล้วปล่อยให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนในสารละลาย TE ที่เติม RNaseA จำนวน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20°C

7.3 การยืนยันขนาดของ cDNA ใน recombinant plasmid โดยวิธี PCR ด้วย Taq DNA Polymerase ของบริษัท Sigma ประกอบด้วยสารละลาย 10 x buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร dNTP (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ SP6 (CAT TTA GGT GAC ACT ATA G) (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ T7 (GTA ATA CGA CTC ACT ATA G) (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร recombinant plasmid จำนวน 10 นาโนกรัม Taq DNA Polymerase ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ จนได้ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร นำไปใส่เครื่อง Thermal cycler โดยใช้สภาวะดังนี้ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที amplification จำนวน 30 รอบ โดยใช้ denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing ที่ 47 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วทำ final extension ต่ออีกที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ใน 1.3 % agarose gel electrophoresis

8. การแยกดีเอ็นเอจากแถบใน agarose gel

สกัดดีเอ็นเอจาก agarose gel ด้วยชุดสกัด Gene Clean II Kit ของบริษัท BIO 101 ทำโดยตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการจาก agarose gel ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ซึ่งน้ำหนักชิ้นวุ้นให้ 100 มิลลิกรัมมีปริมาตรเท่ากับ 100 ไมโครลิตร) เติมน้ำละลาย TBE Modifier ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรชิ้นวุ้น เติมน้ำละลาย NaI ปริมาตร 4.5 เท่าของปริมาตรชิ้นวุ้น ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 5 นาที เติมน้ำละลาย Glass Milk จำนวน 1 ไมโครลิตรต่อ 100 ไมโครลิตร ของปริมาตรสารละลายในหลอดทั้งหมด บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส 15 นาที (เขย่าหลอดทุก 1 นาที) ปั่นเหวี่ยงตกตะกอน Glass Milk ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที เทส่วนน้ำทิ้ง เติมน้ำละลาย New Wash แล้วปั่น-ลง ให้ตะกอนกระจายตัว ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที (ล้างด้วยสารละลาย New Wash 2 ครั้ง) ทิ้งส่วนน้ำให้หมด ปล่อยให้ตะกอนแห้ง เติมน้ำหรือ TE ปริมาตรเท่ากับปริมาตร Glass Milk กระจายตะกอนให้ทั่วด้วยการปั่น-ลงซ้ำๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที คุณเฉพาะส่วนน้ำที่มีสารละลายดีเอ็นเออยู่ใส่หลอดใหม่เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

9. การสังเคราะห์ Oligonucleotide

Oligonucleotide ที่ใช้ในงานวิจัยสังเคราะห์โดย Bioservice Unit ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC), สวทช. และห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

10. การวิเคราะห์ลำดับเบส

วิเคราะห์ลำดับเบสโดยวิธี primer extension dideoxy chain termination (PCR) (Sanger *et al.*, 1977; Zimmermann *et al.*, 1988 and Gibson *et al.*, 1990) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส ABI PRISM™ model 377 version 3.4.1 ดำเนินการโดย BioService Unit (BSU) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC), สวทช. และห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

11. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณนิวคลีโอไทด์

การตรวจสอบโดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต โดยเจือจางสารละลายนิวคลีโอไทด์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในน้ำปริมาตร 495 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณนิวคลีโอไทด์จากค่า $A_{260} = 1.0 = 50$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (กรณีดีเอ็นเอเกลียวคู่) และค่า $A_{260} = 1.0 = 40$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (กรณีอาร์เอ็นเอ)

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการหาอัตราส่วนของค่า A_{260} / A_{280} ซึ่งควรอยู่ในช่วง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอเกลียวคู่บริสุทธิ์เหมาะสำหรับการทดลองขั้นต่อไป ส่วนอาร์เอ็นเอที่เจือจางในสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 7.5 RNA ที่บริสุทธิ์จะให้ค่า A_{260} / A_{280} อยู่ในช่วง 1.9-2.1

การตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสทำใน 0.7-1.3 % agarose gel electrophoresis ในสารละลาย 1X TBE buffer เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินจากธรรมชาติ

สามารถแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินและไม้ผุ ที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติเขื่อนแก่งกระจานได้ 46 ชนิด จากวนอุทยานแห่งชาติห้วยขาแข้งได้ 7 ชนิด โดยแยกชนิดจากลักษณะเส้นใย และการทำปฏิกิริยาเกิดสีของเอนไซม์ polyphenol oxidase, manganese peroxidase และ laccase กับสารตั้งต้น tannic acid, phenol red และ ABTS ตามลำดับ (ตารางที่ 2) พบว่ามีเชื้อ 15 ชนิดที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ แบ่งเป็น ผลิตเฉพาะเอนไซม์ polyphenol oxidase 1 เชื้อ ผลิตเอนไซม์ manganese peroxidase 12 เชื้อ และผลิตเฉพาะเอนไซม์ laccase 2 เชื้อ เชื้อราที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 2 ชนิดเอนไซม์มี 7 เชื้อ แบ่งเป็นผลิตเอนไซม์ polyphenol oxidase กับ manganese peroxidase 4 เชื้อ ผลิตเอนไซม์ polyphenol oxidase กับ laccase 2 เชื้อ และผลิตเอนไซม์ manganese peroxidase กับ laccase 1 เชื้อ พบเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 3 ชนิดเอนไซม์เพียง 1 ชนิด อีก 30 ชนิดไม่สามารถผลิตเอนไซม์ได้เลย (ตารางที่ 3) จึงเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 3 ชนิดเอนไซม์ ไปใช้ในการศึกษา กิจกรรมของเอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้องต่อไป โดยให้ชื่อเชื้อว่า GF

2. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินจากเชื้อที่แยกได้

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยลิกนิน 3 ชนิด คือ manganese peroxidase, laccase และ polyphenol peroxidase ของเชื้อ GF โดยใช้อาหารแข็ง NA ที่เสริมด้วยสารตั้งต้น phenol red , ABTS และ tannic acid ตามลำดับ พบว่าเชื้อ GF สามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 3 ชนิด เช่นเดียวกับเชื้อเปรียบเทียบกับ YK505 โดยพบบริเวณสีเหลืองมะนาวในอาหาร NA ที่เสริมด้วย phenol red พบบริเวณสีเขียวในอาหารที่เสริมด้วย ABTS และบริเวณสีน้ำตาลรอบโคโลนีในอาหารที่เสริมด้วย tannic acid (ภาพที่ 9)

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนิน ได้แก่ manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP) และ laccase ในชิ้นไม้โดยการเลี้ยงเชื้อ GF และเชื้อ YK505 แบบ solid state fermentation ในไม้อัลคาไลปัสต์ที่ไม่ได้เสริมธาตุอาหาร วัดกิจกรรมของเอนไซม์ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าเชื้อ GF มีรูปแบบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกับรูปแบบของเอนไซม์

ในเชื้อ YK 505 (ภาพที่ 10) คือ มีการสร้างเอนไซม์ MnP สูงขึ้นอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 4 และมีค่าสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 6 เท่ากับ 93.0 และ 90.4 ยูนิตต่อลิตรสำหรับเชื้อ GF และ YK505 ตามลำดับ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ laccase จะสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 15.6 และ 21.1 ยูนิตต่อลิตรสำหรับเชื้อ GF และ YK505 ตามลำดับ ทั้งเชื้อ GF และ YK505 มีการสร้างเอนไซม์ LiP ต่ำมาก Kirk and Cullan (1998) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินของรากลุ่ม white-rot ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ MnP และ laccase ส่วนเอนไซม์ LiP จะพบได้ในบางเชื้อเท่านั้น ซึ่งในบางกรณีจะพบกิจกรรมของเอนไซม์ laccase เพียงชนิดเดียวได้ เช่น เชื้อ *Pycnoporus cinnabarinus*, *Flammulina velutipes* เป็นต้น

เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของทั้งเอนไซม์ MnP และ laccase ในช่วงเวลาเดียวกัน จะพบว่าเอนไซม์ทั้งสองมีการแสดงออกที่แปรผกผันกัน คือ ในสัปดาห์ที่เอนไซม์ MnP สูงขึ้นเอนไซม์ laccase จะต่ำ ส่วนสัปดาห์ที่เอนไซม์ MnP ต่ำเอนไซม์ laccase จะสูงขึ้น หลังจากนั้นเอนไซม์ MnP จะสูงอย่างสม่ำเสมอ ส่วนเอนไซม์ laccase จะลดลงจนไม่มีกิจกรรมในที่สุด เอนไซม์ที่เชื้อแต่ละชนิดใช้ในการย่อยลิกนินจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและชนิดของอาหารเพาะเลี้ยง ในการย่อยลิกนินนั้นเชื้อจะผลิตเอนไซม์ LiP เพื่อย่อยโครงสร้างลิกนินที่เป็นนอนฟีนอลิก (non-phenolic) และผลิตเอนไซม์ MnP และ laccase เพื่อย่อยโครงสร้างลิกนินที่เป็นฟีนอลิก (phenolic) D'Souza *et al.* (1999) พบว่าชนิดของไม้และวัตถุดิบที่ใช้เลี้ยงเชื้อมีผลต่อชนิดของเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินใน *Ganoderma lucidum* โดยไม้สนกระตุ้นให้ *G. lucidum* ผลิตเอนไซม์ laccase ขณะที่ไม้ poplar กระตุ้นการผลิตเอนไซม์ MnP และเมื่อเลี้ยงในอาหาร ไม้สนและไม้ poplar ในอัตราส่วนเท่ากัน พบว่า *G. lucidum* มีกิจกรรมของเอนไซม์ MnP ลดลงขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ laccase สูงขึ้น การย่อยสลายลิกนินด้วยเอนไซม์ laccase ของเชื้อ *G. lucidum* จะถูกกระตุ้นโดยสาร phenolic ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายไม้ poplar โดยเอนไซม์ MnP

ตารางที่ 2 ข้อมูลเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินและไม้จากธรรมชาติ

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
KKJ-1.1	1.3	1.9	+	+	-	เส้นใยฟูสีเหลืองนวล ละเอียด มีความ หนาแน่นมาก ได้เส้น ใยสีเหลืองอมส้ม
KKJ-1.2	0.9	1.3	+	+	-	เส้นใยบางใสละเอียด
KKJ-1.3	3.8	6.1	-	-	-	เส้นใยขาวละเอียดมี ความหนาแน่นมาก มี สีเขียว ขาวและใส เรียงเป็นวงซ้อนกัน จากจุดศูนย์กลางสปอร์ มีสีเขียวเข้มและมีเส้น ใยสีขาวขึ้นปกคลุมอยู่ ด้วย ได้เส้นใยมีสีเขียว อมเหลือง
KKJ-1.4	3.0	5.7	+	+	+	เส้นใยฟูขาวมีความ หนาแน่นมาก มีสปอร์ สีเขียวอยู่ใกล้จุด ศูนย์กลางบนสปอร์มี เส้นใยสีขาวขึ้นปก คลุมประปราย

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา กับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
KKJ-1.5	3.1	5.2	+	-	-	เส้นใยฟูขาวมีความหนาแน่นน้อยกว่า KKJ-1.4 สปอร์มีสีเขียว มีความหนาแน่นน้อยกว่า KKJ-1.4
KKJ-2.1	2.1	3.5	-	-	-	คล้าย KKJ-1.4 แต่เส้นใยบางกว่าและสปอร์มีสีเขียวอ่อนกว่าเล็กน้อย
KKJ-2.2	2.7	4.8	-	-	-	เส้นใยละเอียดใส มีความหนาแน่นไม่สม่ำเสมอ มีลักษณะคล้ายดาว ตรงกลางมีสปอร์สีเขียวอมขาว ข้างใต้เส้นใยบริเวณที่มีสปอร์ มีสีเหลือง
KKJ-2.3	3.5	6.5	-	-	-	เส้นใยฟูขาวมีความหนาแน่นมาก มีสปอร์สีเขียวอยู่ใกล้จุดศูนย์กลางบนสปอร์มีเส้นใยสีขาวขึ้นปกคลุมประปราย

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา กับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
KKJ-2.4	3.2	5.9	-	-	-	คล้าย KKJ-1.4 แต่เส้นใยบางกว่าและสปอร์มีสีเขียวอ่อนกว่าเล็กน้อย
KKJ-3.1	3.2	5.3	-	+	+	เส้นใยฟูขาวมีความหนาแน่นมากมีสปอร์สีเขียวอ่อนอยู่ตรงกลางสปอร์มีความหนาแน่นทั้งมากและน้อยสลับกันเป็นวงจากจุดศูนย์กลาง
KKJ-3.2	2.0	3.1	-	-	-	เส้นใยบางใส มีความละเอียด มีการเจริญเติบโตเป็นวงเรียงเป็นชั้นจากจุดศูนย์กลางสีเขียว, ขาว ขุ่นและใส สปอร์มีสีเขียว มีเส้นใยเจริญขึ้นปกคลุม

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา กับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
KKJ-3.3	2.1	5.1	-	-	+	เส้นใยฟูขาวมีความ หนาแน่นมากมีสปอร์ สีเขียวอ่อนคล้ายไข่ ดาวโดยสปอร์มีความ หนาแน่นทั้งมากและ น้อยสลับกันเป็นวง จากจุดศูนย์กลาง
KKJ-4.1	6.7	เต็มจาน อาหาร	-	+	-	เส้นใยละเอียด ขาว ใส มีสปอร์สีเขียวกระจาย ทั่วด้วยเส้นใยบาง แล้ว ตามด้วยวงสีขาว สุดท้ายเป็นเส้นใยใส เรียงกันจากจุดศูนย์กลาง ออกมาตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไปบริเวณ เส้นใยสีขาวกลายเป็น สปอร์สีเขียว
KKJ-4.2	7.0	เต็มจาน อาหาร	-	+	-	เส้นใยบางใส

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา กับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
KKJ-4.3	6.7	เต็มจาน อาหาร	-	-	-	เส้นใยบางใส ละเอียด สีเหลืองนวล มีความ หนาแน่นไม่สม่ำเสมอ เป็นแฉกๆ คล้ายดาว สปอร์สีขาว ใต้ฐานมีสี เหลืองเข้ม
KKJ-4.4	5.8	เต็มจาน อาหาร	-	+	-	เส้นใย ใส ละเอียด มี ความหนาแน่นไม่ สม่ำเสมอเป็นแฉกๆ คล้ายดาว มีสปอร์ หนาแน่นสีเขียวจืด ริมขอบวง สปอร์เป็น วงสีขาว ใต้เส้นใยมีสี เหลืองเข้ม
KKJ-4.5	5.5	เต็มจาน อาหาร	-	-	-	เส้นใยบางใส ที่ใกล้จุด ศูนย์กลางมีการรวม เส้นใยให้หนาแล้วมี สปอร์สีเขียวเข้มบน เส้นใยหนานั้น
KKJ-4.6	3.0	5.0	-	-	-	เส้นใยละเอียดสีเหลือง นวล มีสปอร์สีน้ำตาล

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา กับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
KKJ-5.1	6.4	เต็มจาน อาหาร	-	-	-	เส้นใยบางใส ละเอียด มีความหนาแน่นไม่ สม่ำเสมอ คล้ายรูปดาว มีสปอร์สีเขียวอมเทา และขาวกระจาย ออกมาจากจุด ศูนย์กลางประปราย ได้ สปอร์มีสีเหลืองอ่อน
KKJ-5.2	3.1	4.2	-	+	-	เส้นใยฟูละเอียดสีนวล มีเส้นใยยาวๆ ชี้ขึ้น ตอนปลายเป็นคุ่มสี น้ำตาลอ่อน
KKJ-5.3	5.5	เต็มจาน อาหาร	-	-	-	เส้นใยบางละเอียดใส
KKJ-6.1	6.8	เต็มจาน อาหาร	-	-	-	เส้นใยละเอียดใส ความหนาแน่นไม่ สม่ำเสมอ เมื่อเวลาผ่านไป สปอร์เปลี่ยนเป็นสี เขียวเข้ม ไม่มีเส้นใยปก คลุม ถัดจากวงของ สปอร์จะเป็นวงของ เส้นใยหนาแน่นสีขาว

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา กับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
KKJ-6.2	1.4	2.4	-	-	-	เส้นใยค่อนข้างแน่น บาง-เส้นยาวฟู มีสีน้ำตาล ตอนปลายมีจุดสี น้ำตาล
KKJ-7.1	6.5	เต็มจาน อาหาร	-	-	-	เส้นใยหนาแน่น ฟู สีเทา
KKJ-7.2	6.0	เต็มจาน อาหาร	-	-	-	เส้นใยบางใสละเอียด ขอบไม่เรียบ เส้นใยมี ความหนาแน่นไม่ สม่ำเสมอใกล้จุดศูนย์กลาง กลางมีสปอร์สีเทาแล้ว เปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม อยู่อย่างหนาแน่นมาก
KKJ-7.3	2.4	3.9	-	-	-	เส้นใยละเอียดมาก สี น้ำตาลออกขาว มีความ หนาแน่นมาก มีสปอร์ สีดำบนฐานจำนวนมาก ต่อมาสปอร์ ขยายใหญ่ขึ้นสปอร์มีสี น้ำตาลไหม้จำนวนมาก มากมาย

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา กับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
KKJ-7.4	6	เต็มจาน อาหาร	-	-	-	เส้นใยบางใส ใกล้เคียง ศูนย์กลาง มีการรวม เส้นใยหนา สีขาว วง ด้านในมีสปอร์สีเทา อมเขียวจางๆ
KKJ-7.5	6	เต็มจาน อาหาร	-	+	-	เส้นใยบางใส ใกล้เคียง ศูนย์กลางมีการรวม เส้นใย สีขาวได้เส้นใย มีสีเหลือง เส้นใยใกล้ ศูนย์กลางที่มีสีขาว เปลี่ยน เป็นสปอร์สี เขียวเข้ม
KKJ-8.1	6.3	เต็มจาน อาหาร	-	+	-	เส้นใยบางใส ภายใน จะมีความหนาแน่น มากกว่าภายนอก ต่อมาจะบางใสเท่ากัน หมด
KKJ-8.2	3.6	6.7	-	-	-	เส้นใยละเอียดใส มี สปอร์เป็นวงใกล้ ศูนย์กลางสีเขียวเข้ม

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา กับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
KKJ-8.3	6.5	เต็มจาน อาหาร	-	+	-	เส้นใยบางใส อมสีเทา ตอนปลายเส้นใยจะมีการแตกแขนงและฟูกว่าตอนกลาง และตอนปลายมีสีเทาอ่อน
KKJ-8.4	4	7.4	-	-	-	เส้นใยละเอียดใส มีสปอร์หนาแน่นเป็นวงใกล้จุดศูนย์กลาง และมีสปอร์กระจายไปทั่วบนเส้นใยสีขาวที่หนาแน่นสปอร์มีสีเขียว
KKJ-9.1	5.7	เต็มจาน อาหาร	-	-	-	เส้นใยฟูมาก สูงเกือบเต็มจานอาหาร เส้นใยมีสีเทาอ่อนและมีลักษณะเหมือนปุยสำลี
KKJ-9.2	6.5	เต็มจาน อาหาร	-	-	+	เส้นใยหนาแน่น สีเทา ฟู
KKJ-9.3	4.2	7.4	+	+	-	เส้นใยแผ่จากจุดศูนย์กลางไปด้านต่างๆ ไม่สม่ำเสมอ ตอนกลางใกล้ฐานมีสีเทา เส้นใยมีความฟูมาก ตอนปลายเส้นใยจะมีลักษณะเป็นฝอยคล้ายรากพืช

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา กับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
KKJ-9.4	6	เต็มจาน อาหาร	+	-	+	เส้นใยฟูสีขาว ไม่หนาแน่น
KKJ-10.1	3.1	6.2	-	-	-	เส้นใยละเอียด บางใส มีการ สร้างสปอร์สีเขียวเป็นวงๆ รอบจุดศูนย์กลาง 2 วง ระหว่างวง 2 วงของ สปอร์ มีสีขาวอมเขียว ได้ เส้นใยมีสีเหลือง
KKJ-10.2	5.4	เต็มจาน อาหาร	-	-	-	เส้นใยบางใส มีการสร้าง สปอร์เป็นวงๆ จากจุด ศูนย์กลาง คือ เขียวเข้ม, เส้น ใยใสเป็นวงแคบๆ สปอร์ เขียวจางๆ และเส้นใยบางใส ได้เส้นใยมีสีเหลืองอ่อน
KKJ-10.3	1.2	-	-	-	-	ได้จากการ inoculate ด้วย สปอร์พบว่ามีการงอกของ สปอร์ที่งอกกระจายทั่วจาน อาหาร กระจุกมีลักษณะ ตอนกลางเป็นกลุ่มเป็นกลุ่ม ของสปอร์สีดำ ล้อมรอบด้วย เส้นใยสีขาวละเอียดสั้นๆ ไม่ ห่างจากกระจุกสปอร์นัก

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา กับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
KKJ-10.4	2.9	5.3	-	-	-	เส้นใยฟูละเอียด สี มีความ หนาแน่นมาก ใกล้จุด ศูนย์กลางมีสปอร์สีเขียว เป็นวง ปกคลุมด้วยเส้นใย
KKJ-10.5	3.5	7.2	-	-	-	เส้นใยฟูมาก มีสีเทา เข้ม กว่า KKJ-11.4 แต่จางกว่า KKJ-10.3
KKJ-11.1	5.1	เต็มจาน อาหาร	-	-	-	เส้นใยละเอียด สี มีสปอร์ หนาแน่นเป็นวงใกล้ ศูนย์กลางถัดไปเป็นสปอร์ กระจายตัวทั่วบนเส้นใย สี สปอร์มีสีเขียวอมเทา
KKJ-11.2	4.1	6.1	-	+	-	เส้นใยฟู หนาแน่น สีเหลือง อมน้ำตาล เส้นใยบางเส้น จะยาวขึ้นคล้ายเส้นขน ตรงปลายเส้นที่ขึ้นจะมี สปอร์เป็นจุดสีน้ำตาล ริม โคโลนีจะไม่เรียบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	(เซนติเมตร)		กับสารตั้งต้น			
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
KKJ-11.3	3.3	5.7	-	+	-	เส้นใยฟู หนาแน่น สีเหลืองอม น้ำตาล เส้นใยบางเส้นจะยาวขึ้น ขึ้นคล้ายเส้นขน ตรงปลายเส้น ที่ขึ้นี้จะมีสปอร์เป็นจุดสีน้ำตาล ริมโคโลนีเรียบ
KKJ-11.4	3.8	6.1	-	-	-	คล้าย KKJ-8.2 เส้นใยค่อนข้าง แน่น ยาวฟูสีเหลืองนวล บาง เส้นสีขาว มีจุดสีน้ำตาล ตรง ปลายเส้นใยจะมีสีอ่อนกว่า KKJ-8.2 และมีความหนาแน่น น้อยกว่า
HKK-1.1	5.5	เต็มจาน อาหาร	-	-	-	เส้นใยบางใส ละเอียด สีเหลือง นวล มีความหนาแน่นไม่ สม่ำเสมอเป็นแฉกๆ คล้ายดาว มีสปอร์สีขาวหนาแน่นกว่า KKJ-4.3 ใต้ฐานเป็นสีเหลือง
HKK-1.2	2.9	4.4	-	-	-	เส้นใยฟูสีนวล มีเส้นใยยาวๆ ขึ้น ขึ้นตอนปลายมีตุ่มสีน้ำตาลอม ดำกระจายอยู่ทั่วไป

ตารางที่ 2 (ต่อ)

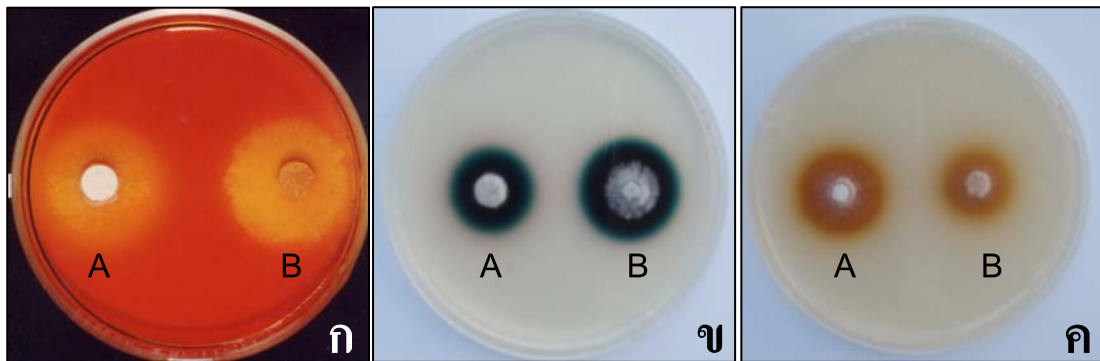
รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา กับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
HKK-1.3	3.4	5.4	-	-	-	เส้นใยฟูขาวละเอียด มีความหนาแน่นมาก มีสปอร์สีเขียวอ่อนใกล้จุด ศูนย์กลางบนสปอร์ มีเส้นใยสีขาวขึ้นปกคลุม เส้น ใยเจริญเป็นวงๆ
HKK-1.4	3.0	5.7	-	+	+	เส้นใยฟูละเอียดสีขาว มีความ หนาแน่น มาก ใกล้จุดศูนย์ กลางมีสปอร์สีเขียวเข้มปก คลุมด้วยเส้นใยสีขาวเจริญ เป็นวงๆ
HKK-1.5	1.7	4.5	-	+	-	เส้นใยบางใสละเอียด มีสปอร์ สีเขียวอ่อนเจริญเป็นวงใกล้จุด ศูนย์กลาง บนสปอร์มีเส้นใย ปกคลุมอยู่
HKK-1.6	1.4	2.0	-	-	-	เส้นใยฟูสีนวล มีเส้นใยยาวๆ ชี้ขึ้นตอนปลายมีตุ่มสีน้ำตาล อมดำกระจายอยู่ทั่วไป
HKK-1.7	2.0	3.3	+	+	-	เส้นใยฟูสีนวล มีเส้นใยยาวๆ ชี้ขึ้นตอนปลายมีตุ่มสีน้ำตาล อมดำกระจายอยู่ทั่วไป

ตารางที่ 2 (ต่อ)

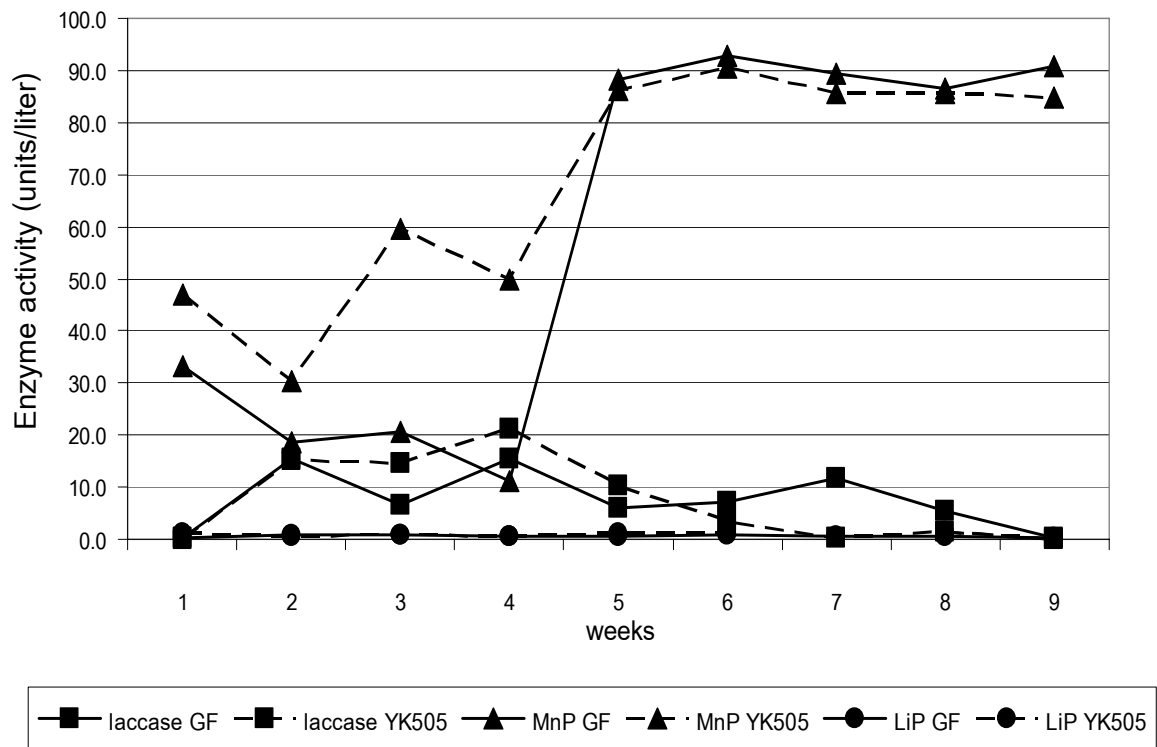
รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)		การเกิดสีจากการทำปฏิกิริยา กับสารตั้งต้น			ลักษณะเส้นใย ในวันที่ 3
	วันที่ 1	วันที่ 3	Tannic acid	Phenol red	ABTS	
GF	1.8	3.6	+	+	+	เส้นใยฟูสีขาวละเอียด
YK505	1.5	3.2	+	+	+	เส้นใยละเอียดใส ไม่ค่อยหนาแน่น

ตารางที่ 3 จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากจากธรรมชาติแบ่งตามความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์กับสารตั้งต้น

การเกิดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ต่อสารตั้งต้น			จำนวนเชื้อราที่แยกได้
Tannic acid	Phenol red	ABTS	
ไม่เกิดปฏิกิริยากับสารตั้งต้น			
-	-	-	30
เกิดปฏิกิริยากับสารตั้งต้น 1 ชนิด			
+	-	-	1
-	+	-	12
เกิดปฏิกิริยากับสารตั้งต้น 2 ชนิด			
+	+	-	4
+	-	+	2
-	+	+	1
เกิดปฏิกิริยากับสารตั้งต้น 3 ชนิด			
+	+	+	1



ภาพที่ ๑ การผลิตเอนไซม์ manganese peroxidase (ก), laccase (ข) และ polyphenol peroxidase (ค) ในอาหารแข็ง NA ที่เติม phenol red, ABTS และ tannic acid ตามลำดับ ของเชื้อ GF (A) เปรียบเทียบกับเชื้อ YK505 (B) เชื้อที่ผลิตเอนไซม์จะเกิดสีบริเวณรอบๆ โคลโลนี



ภาพที่ 10 กิจกรรมของเอ็นไซม์ย่อยลิกนิน 3 ชนิดคือ laccase (◆), manganese peroxidase (▲) และ polyphenol peroxidase (●) จากการเลี้ยงเชื้อแบบ solid state fermentation ในไม้มัลลูปดัดที่ไม่เสริมธาตุอาหาร วัดกิจกรรมของเอ็นไซม์ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 9 สัปดาห์ของเชื้อ GF (—) เปรียบเทียบกับเชื้อ YK505 (-----)

3. การตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อราผลิตเอ็นไซม์ย่อยลิกนินที่แยกได้จากธรรมชาติ

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ GF ที่ได้จากการทำ PCR บริเวณ ITS ของ ribosomal DNA ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (TTC GTC GGT GAA CCT GCG G) และ ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) ไปทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อชนิดต่างๆกับฐานข้อมูลใน Gene Bank โดยใช้โปรแกรม BlastN พบว่าเชื้อ GF ที่ได้น่าจะเป็น *Ganoderma* sp. (ภาพที่ 11) ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลของเชื้อ *Ganoderma* ในการสังเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อสร้างสาย cDNA ต่อไป

4. การแยกและศึกษายีนที่สร้างเอ็นไซม์ย่อยลิกนิน

แยกยีนที่สร้างเอ็นไซม์ย่อยลิกนินโดยสังเคราะห์ cDNA จากเชื้อ GF ที่เลี้ยงในอาหารเสริม สารกระตุ้นการสร้างเอ็นไซม์ MnP และ laccase ด้วย veratryl alcohol และ CuSO_4 ตามลำดับ โดยการทำ PCR ด้วยเอ็นไซม์ SuperscriptIII RT-PCR ร่วมกับไพรเมอร์ Mn-P 5' (ATG TTC TCA AAA GTC TTC CTC GT) จากข้อมูลของเชื้อ *Ganoderma formosanum* และ *Ganoderma australe* จาก Gene Bank และ Oligo (dT)₂₀ (TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT) แสดงดังภาพที่ 12 พบว่า GF ที่ถูกกระตุ้นด้วย veratryl alcohol และ CuSO_4 ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกันและมีแถบดีเอ็นเอหลัก 6 แถบ มีขนาด 500-700 คู่เบส จำนวน 4 แถบ และขนาด 1000-1100 คู่เบส จำนวน 2 แถบ สกัดแยกแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบออกจากกันได้ 6 แถบคือ E1 ถึง E6 (ภาพที่ 13) แล้วเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pDrive (ภาพที่ 14) คัดเลือกโคลนได้รวม 24 โคลน แสดงดังตารางที่ 4 สกัดดีเอ็นเอจากโคลนแล้ววิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ด้วยเอ็นไซม์ Red Taq DNA Polymerase ร่วมกับไพรเมอร์ SP6 และ T7 ที่อยู่บนเวกเตอร์ พบว่าโคลน E1-1, E1-2 และ E2-3 มีขนาดของผลผลิต PCR อยู่ระหว่าง 1,200-1,500 คู่เบส โคลน E3-2, E5-2, E5-3 และ E6-1 มีขนาดประมาณ 700-800 คู่เบส ส่วนโคลน E6-2 มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (ภาพที่ 15) นำสายดีเอ็นเอจากโคลนที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

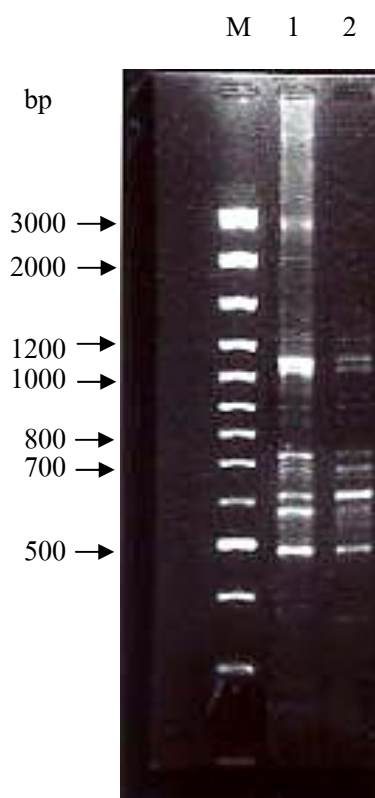
Address <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/Blast.cgi#55820075> Go

[Tree view](#) **NEW**

Sequences producing significant alignments:

	Score (Bits)	E Value
gi 55820075 gb AY593861.1 Ganoderma fornicatum AS5.539 type ...	575	6e-161
gi 55823909 gb AY593860.1 Ganoderma fornicatum AS5.539 type ...	573	2e-160
gi 55820077 gb AY593863.1 Ganoderma fornicatum AS5.539 type ...	565	6e-158
gi 90102794 gb DQ421110.1 Uncultured soil fungus clone 130-9...	565	6e-158
gi 55820076 gb AY593862.1 Ganoderma fornicatum AS5.539 type ...	559	4e-156
gi 90102793 gb DQ421109.1 Uncultured soil fungus clone 133-1...	557	1e-155
gi 49357493 gb AY636070.1 Ganoderma sp. OE-239 internal tran...	545	6e-152
gi 49357487 gb AY636064.1 Ganoderma sp. OE-248 internal tran...	545	6e-152
gi 57282649 emb AJ608712.1 Ganoderma sp. E7095 18S rRNA gene...	543	2e-151
gi 13897637 gb AF255097.1 AF255097 Ganoderma sp. JM97/52 inte...	537	1e-149
gi 49357492 gb AY636069.1 Ganoderma sp. OE-236 internal tran...	517	1e-143
gi 45644873 gb AY569450.1 Ganoderma cupreum isolate SUT H1 1...	474	2e-130
gi 29465791 gb AY089739.1 Perenniporia subacida isolate HHb-...	468	1e-128
gi 57868107 gb AY870653.1 Ganoderma lucidum from Turkey inte...	454	2e-124
gi 42557805 emb AJ627585.1 Ganoderma mastoporum 18S rRNA gen...	450	2e-123
gi 58081985 dbj AB158316.1 Coriolopsis caperata genes for 18...	428	9e-117
gi 21929942 gb AF519892.1 Basidiomycete C30 18S ribosomal RN...	424	1e-115
gi 29373924 gb AY216475.1 Marasmius cladophyllus 18S small s...	424	1e-115

ภาพที่ 11 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของเชื้อ GF กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อชนิดต่างๆจากฐานข้อมูลใน Gene Bank โดยใช้โปรแกรม BlastN

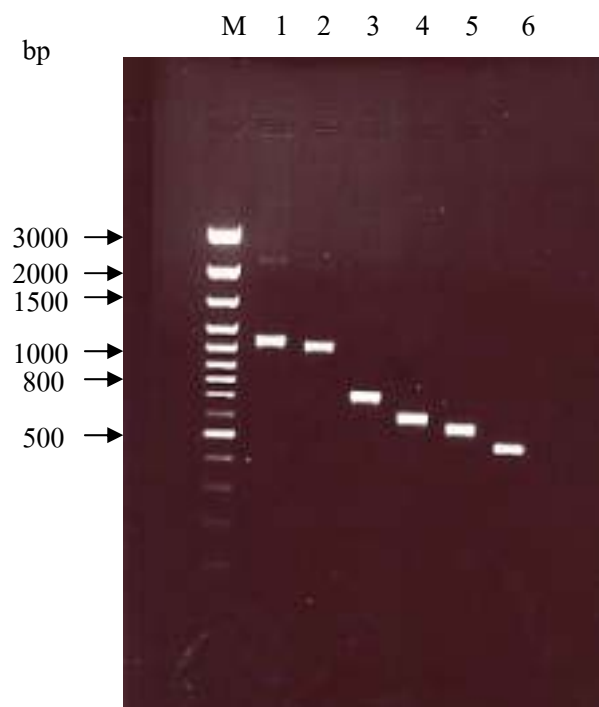


ภาพที่ 12 cDNA ของเชื้อ GF ที่สังเคราะห์จาก totalRNA ด้วยวิธี PCR

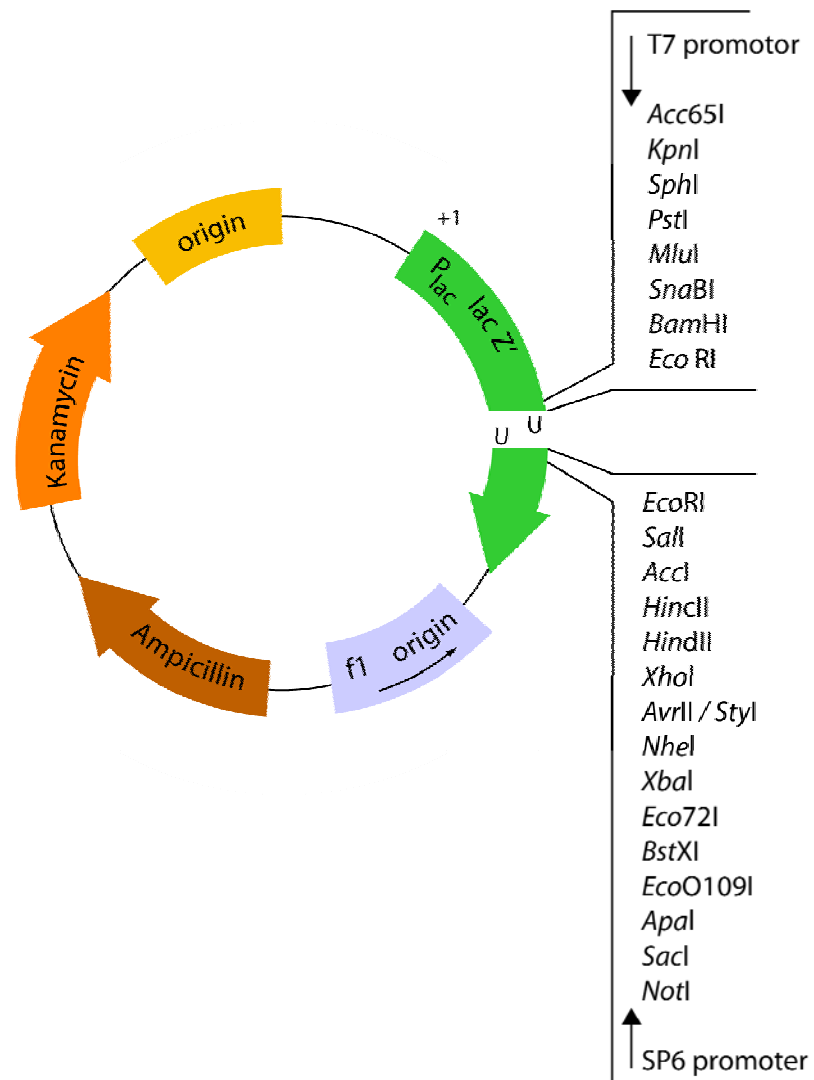
โดยใช้ไพรเมอร์ Mn-P 5' และ Oligo(dT)₂₀ 100 bp ladder (ช่อง M)

เชื้อ GF ที่กระตุ้นด้วย veratryl alcohol (ช่อง 1)

เชื้อ GF ที่กระตุ้นด้วย CuSO₄ (ช่อง 2)



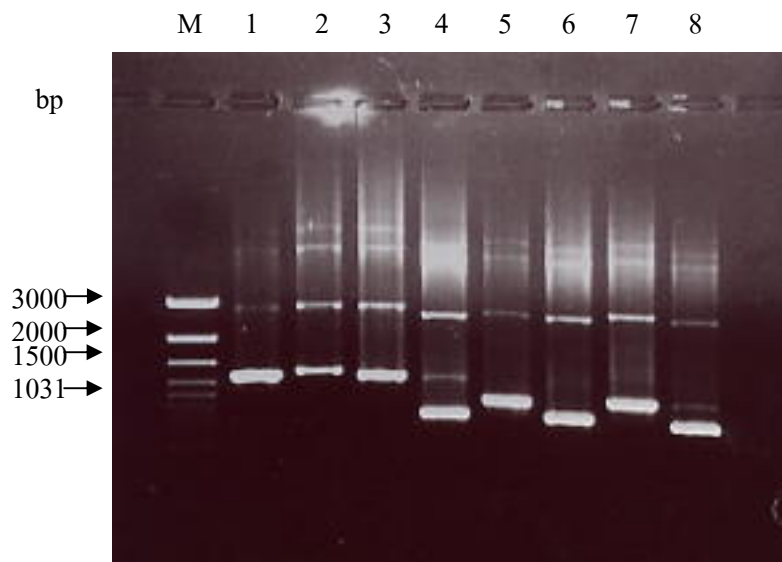
ภาพที่ 13 ขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดจาก agarose gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ
มาตรฐาน 100 bp ladder (ช่อง M) แถบ E1 (ช่อง 1) แถบ E2
(ช่อง 2) แถบ E3 (ช่อง 3) แถบ E4 (ช่อง 4) แถบ E5 (ช่อง 5)
และ แถบ E6 (ช่อง 6)



ภาพที่ 14 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดเวกเตอร์ pDrive

ตารางที่ 4 จำนวนโคลนที่ได้จากการเชื่อมต่อแถบดีเอ็นเอที่สกัดจาก agarose gel เข้ากับพลาสมิด
เวกเตอร์ pDrive แล้ว transform สู่ *E.coli* DH 5 α

ชื่อแถบดีเอ็นเอ	ขนาด (คู่เบส)	จำนวนโคลนที่ได้
E1	1100	7
E2	1000	2
E3	700	6
E4	600	2
E5	550	5
E6	500	2



ภาพที่ 15 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอในโคลนที่แยกได้เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน(ช่อง M) โคลน E 1-1 (ช่อง 1) โคลน E 1-2 (ช่อง 2) โคลน E 2-3 (ช่อง 3) โคลน E 3-2 (ช่อง 4) โคลน E 5-2 (ช่อง 5) โคลน E5-3 (ช่อง 6) โคลน E6-1 (ช่อง 7) และ โคลน E6-2 (ช่อง 8)

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนดีเอ็นเอในโคลน E 1-1, E 1-2, E 5-2 และ E 6-2 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในภาพที่ 16-19 เมื่อมาหาบริเวณที่เป็น promoter ของยีนซึ่งประกอบด้วย TATA box, CAT box และ start codon (ATG) ร่วมกับ stop codon (TGA, TAG, TAA) พบว่าเฉพาะจีนดีเอ็นเอของโคลน E 1-2 เท่านั้นที่มีส่วนที่เป็น promoter ของยีน คือ มี TATA box ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 144-149 เป็น TATAAA มี CAT box อยู่ 2 แห่งที่ตำแหน่ง 306-311 และ 326-330 เป็น CAATAT และ CAATA ตามลำดับ มี initiation sequence ที่มี start codon (ATG) อยู่ที่ตำแหน่ง 596-602 เป็น ACGATGG ซึ่งสอดคล้องกับ Kozak (1981) ที่พบว่า initiator codon ของ eukaryote คือ (A/G)NNATGG นอกจากนี้ยังพบ MRE (metal response element) ACCCCG อยู่ระหว่าง TATA box และ CAT box ในตำแหน่งที่ 162-167 แต่ไม่พบ stop codon (ภาพที่ 17) โคลน E1-2 น่าจะถูกทำให้เป็นยีนที่สมบูรณ์ได้โดยออกแบบไพรเมอร์ด้าน 5' ให้อยู่ในบริเวณใกล้ปลาย 3' ให้มากขึ้นและยังต้องทดสอบว่าเป็นยีนหรือโปรตีนที่สนใจหรือไม่ โดยให้เกิดการแสดงออกใน heterologous host ที่ไม่มีการแสดงออกของเอ็นไซม์ที่สนใจนั้น ได้ทดลองแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน เพื่อนำไปเปรียบเทียบหาบริเวณจำเพาะต่างๆ ของเอ็นไซม์ต่อไป

1	GGCCTGGCAGCGCAGACGCGTTACGTTATCGGATCCAGAATTCGTGATTATGTTCTCAAAAGTCT	65
66	TCCTCTCCCTCGTTGCCCTATCTCGCCGCTTGACTGCCCCTGGCTCGACACTTGACCTGAAACCC	130
131	CCGCGACACGGAACAGAAAAAGGGACGACATGGCCGACGCGAGGGCACAGAAGCGGGCAAAAGTTCG	195
196	AGGCGGTCTACCCCGTCCTCCGCGAGGAGCTGCTGGCGTACATGAAGCAGGAGGGGATGCCTGCC	260
261	GATGCCGTGCGACTGGTTCAAGCGGAATCTTGACTACAATGTACCCGGCGGGGAAGCTCAACCGCGG	325
326	CATCTCGGTGCTCGACTCTGTGAGATCCTCAAGGGCCGCAAGCTGTCCGACGACGAGTACTTCA	390
391	AGGCTGCGCTCCTCGGTTGGTGATCGAGCTCCTCCAAGCATTCTTCCTAGTCTCAGACGACATG	455
456	ATGGACCAGTCCGTGGCCCGCCGCGGCCAGCCGTGCTGGTACCGCGTCAAGAGTGTAGGGCTACA	520
521	TCGCGATCAACGACTCGTTCCATGCTCGAGGGCGCAATCTATTACCTCCTCCAGAAAGCATTTC	585
586	CGCACCGAAGACAGTACTACAGTCCAACCTTGACTTGAGCTCTTCCNAGTGNAACACACGGACGGT	650
651	TANCCAAGNAACAAGAAGGCCTTGGGGACCAGCTTCCATTGGAACCCTGGAATTCAACCCGAAGA	715
716	CNGGGAAGGACACCACAGGTTTGAACCACAAGAAAGTTCTACGACACNGAAAAAGCAACCCAAA	780
781	AGAATCGTGGACACGAAAGAAANCNCGGGCGAGNACAAACACAGAAAACTCACACGAAACACACA	845
846	CGCGAAAGANACAAGATGCGGGAACCAGAGAGGG	880

ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอจากโคลน E 1-1 จำนวน 880 นิวคลีโอไทด์

```

1      GGCCGCGANCTCGGGCCCCACACGNTGNTGGNTCTAGAGCTAGCCTAGGCTCGNAGNAAGCTTG 65
66     NTCGNACGNAATTCAGNATTATGTTCTCAAAAGTCTTCCTCTCCCTCGTATGTTCTCAAAAGTCT 130
131    TCCTCTCCCTCGTTTATAAACGACATCGTGAGACCCCGAAGCGGCCGTGGAGGATATGGCTGTTT 195
196    GATGTCTCAAAGCAGATTGTCGGCCAGATGTTTCGTCCATGGAGTAAACGTGCTCATCTCGGATGT 260
261    GGTTCGCGACCTTTCCACCGCGAACGCTTGCGTTCTTTACTTCCTCAATATCCTGCTCGATACCA 325
326    CAATAGGTGTTGGCTTGATATACCTCATACTGCAGGTTTCAACATACGTCTTGACGGAGAAGTTA 390
391    CATCTCAAAGGATTTCAGTCAAGCGTTTATGGCACCCCTCCTTCAGTCATATACTGGTTCAAGCA 455
456    AGCAGCGGTCTACGTTTTTGCCTGACGACTATGAAGCTTCTCGTCGTCGCGCTGTTGCTGCTC 521
521    TCCCAGCAATATTCAACTTGGGCGAGTGGTTACTGAGCTTCCTCGGGCCCAGTGATGCTGCGCAG 391
586    ATAATATTCACGATGGGCATATTCCCAATAATGATGAACGTGCTTCAGTTCTGGTTGATTGATTG 650
651    CATCGTGAAGGGGTCAAGCGACTACACACCGCTTGCCTCGTCAACGAGACCCCGCGCGTTCAA 715
716    TGGATCCCAGCAGCGAGCCATTGTTCCGCGCATCGGAAGATGACGACGACGACGAGGGTTGTCG 780
781    GGAANGCATGATATTGAAGTCCTGCACCAAGGTCGATTTGCGGTTCACTTTCACGGGATTACG 845
846    GCGGATGTCTGCTGGCGAATCCAAGTCACTGAGCTCTGGAACAGCAACCGTCATACCCTCGGGCT 910
911    CTCCACACCANTNCCAAACCATCGATACAGACGTGCGAGTCCACGCCTACCCTCCGCGGTCGT 975
976    GGGNCTCGAGCTCCGCTCCTCGCATGTTGCTAGCTCTCTGTGAGAGCCAAACGNCACTCNCC 1040
1041   CCNCTGNCCTCANGTCGAAGGATCGATCAANNCGAATCCAGGAGGCCTCCGACAGAGANGCCAAA 1105
1106   GACAAACAAATGGCTCTGGGAATANACGAGGCGACAGGNAGAANTTNAANA 1156

```

ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอจากโคลน E 1-2 จำนวน 1156 นิวคลีโอไทด์

TATA box (แถบสีฟ้า) CAT box (แถบสีเหลือง) initiation sequence (แถบสีแดง)

และ metal response element (MER) (แถบสีเขียว)

1 AGCAGAAAAAGGAGAGAAAAGCGTAACGTAAATCGGATCCAGAATTCGTGATTATGTTCTCAAA 65
 66 AGTCTTCCTCTCCCTCGTTGCACGCTCATGTNTGCTGTCCCTCAACCATCCACAAAGCCCCTCGC 130
 131 AACCCCGCCAGCGTACTCAGAGTACCTTGTTCCTCACCAGCAGCATCTGTCTCCAGTACAGGTC 195
 196 GCGTCGGGGAGCACCCAGAGCCCCGTTATCCGTCACCGCTTTCCTTCCCACCCATGCTGCATAC 260
 261 ATACGGACCAACGCCAATAGCCCAGACAGACTCAGGCTGCTGCACAGNACTACGACCCACGCTCA 335
 336 TCGTATGCCATTGCGGAGGCGAATCAGCGGGCAAGATAGGAGGTGATACTACAGCGGCGGTGTGC 390
 391 GCGTGGGCAATGTATACGCTGTAGAGCCTTGACAGAACGTGACGGAGGTTACCTACCATAAGC 455
 456 CATCTGGAANGTGNGGGTGGGTGTAGGAAGTGTGAGTGACGATGCAAGGGAGCCAGAAAGAAGAA 520
 521 GAGAACNAGGAGGCAGAAGGAANGAACAAGAANGCANAGACAAGANAACAAAAAACAACAA 584

ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนดิเอ็นเอจากโคลน E 5-2 จำนวน 880 นิวคลีโอไทด์

1	GGGGAGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGATTATGTTCTCAAAAGTCTTCCTCTCCCTCGT	65
66	CCTCCCCGTCGTCTCCAATGAACTACCTCCGNGGCGCGGTTCGTCAGCGCAATCAGTGCCCCGTAC	130
131	CAGTATGTACAAGGATCTCAACCCCTCCACCCTCACAGGCGCCATCGACGTCATCGTCGTTCCGCC	195
196	GACCCTAAGCATTTACCACAACATCCAAGCAGAGGGTCCCATTACTCCTCTCACAGATGCAGAGA	260
261	CAGAGCTTGATGCTCTCCTTTCCACGTGCGCTTCGGAAAATGGCAGGTCCTAAGGCCGCGAGGAT	335
336	AAGAAGGTCGATGTATTGTTAATGGCCAGCTTGTTCCATTCTCTATGAAAATAGGAGAAGCGGG	390
391	AGAAGCGTGCTATTGTGTAACAGAGACCGAGGAGGAGATCCCCGACGACTCGATNACTAGCCA	455
456	CAAATCCTTGAGGCAACCAAGCCAAGGAGAGGCGAATGCCGACCGTACGAGGGAGAGGAAGACTG	520
521	TAAGGAGAACATACATCTGCAATCGTACGAAAAGCTATCTCGAGCCAAGGCTAAGCATCTACACG	585
586	AACCAAACAGTTGTGGGGGCCAGAGCTCCGCGGCCCGAATCGNATACTATAGNGTCAACCTAAA	650
651	AATGGGCACGCACAATTCAACATGGGCCGACNAAAACAACANGTCAAGAAACNGGNAAAAAACCT	715
716	GGACGTTACACCAAATTAACGCCATAGCANACACCCACNTANGCAAGGAGGGAGATAAAACAAA	780
781	AAAGGCCCGGCCAAAATACACACCAAATGNAACACCNCAGGACNGAAAGAANGTAAATAGTAGG	845
846	AAAAGCAGAAAATGAAACACA	867

ภาพที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนดิเอ็นเอจากโคลน E 6-2 จำนวน 867 นิวคลีโอไทด์

6. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโคลนที่ได้กับเอ็นไซม์ย่อยลิกนิน

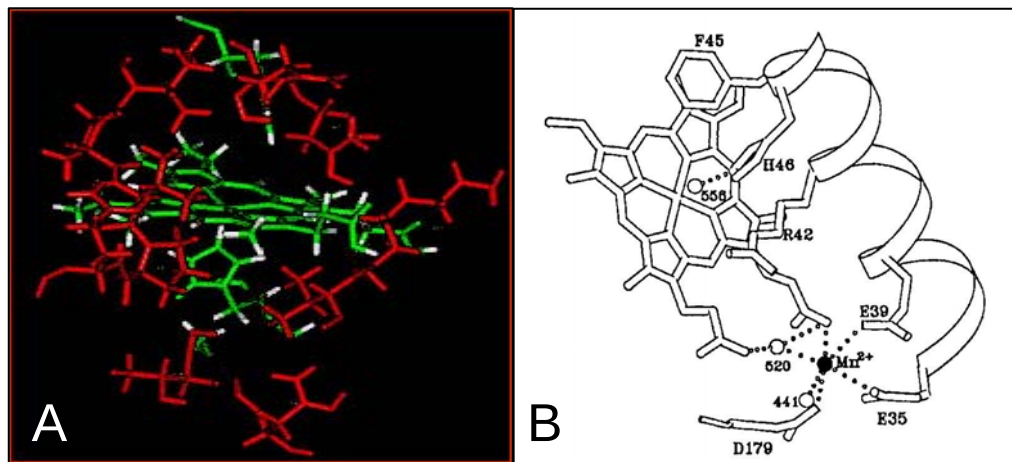
manganese peroxidase (MnP) และ lignin peroxidase (LiP) เป็นเอ็นไซม์ที่มี heme group จัดอยู่ใน peroxidase class II ซึ่งเป็น secretory fungal peroxidase glycoprotein ที่มี domain เดียว มี conserved calcium binding site 2 แห่งและมี conserved disulfide bridge 4 แห่ง (<http://metallo.scripps.edu/PROMOTE/FPBPEROXIDASE.html>, 1999) เอ็นไซม์ MnP จะออกซิไดส์ Mn^{2+} เป็น Mn^{3+} ซึ่งจะไปออกซิไดส์ลิกนินที่เป็นโมเลกุลใหญ่ต่อไป (Gold and Alic, 1993) จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนของเอ็นไซม์ MnP ใน *Phanerochaete chrysosporium* ของ Sundaramoorthy *et al.* (1997) พบว่า Mn^{2+} จะจับกับกรดอะมิโน 3 ตัว คือ Glu 35, Glu 39 และ Asp 179 โดยมี His 46 และ Arg 42 เป็นตัวจับกับ H_2O_2 ที่ใช้ในการออกซิไดส์ Mn^{2+} ไปเป็น Mn^{3+} (ภาพที่ 20)

เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของแต่ละโคลนมาเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนและเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอ็นไซม์ MnP จากฐานข้อมูลกับโคลน E5-2 (ภาพที่ 21) พบว่ากรดอะมิโนที่ได้เริ่มจากตำแหน่งที่ 59 มี conserved manganese binding site และ calcium binding site สอดคล้องกับเห็ดชนิดอื่นในฐานข้อมูล โดยมี Glu 62, Val 65 และ Asp 142 เป็นกรดอะมิโนที่จับกับ Mn^{2+} ส่วน Arg 70 Arg 72 และ Arg 136 อยู่บริเวณ heme group ทำหน้าที่จับกับ H_2O_2 นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนที่ conserved ในเห็ดทุกชนิดที่ตำแหน่งต่างๆ

กรดอะมิโนของโคลน E1-2 จะเริ่มจากตำแหน่งที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับเอ็นไซม์ lignin peroxidase จากเห็ดชนิดต่างๆ (ภาพที่ 22) พบว่าโปรตีนที่ได้เป็นกลุ่มเอ็นไซม์ oxidase โดยมีหมู่ที่จับกับ Mn^{2+} (กรอบสีแดง) หมู่ที่จับกับ H_2O_2 บริเวณ heme group (กรอบสีน้ำเงิน) และกรดอะมิโนบริเวณ calcium binding site (กรอบสีเขียว) รวมทั้งกรดอะมิโนที่มีลักษณะ conserved ในหลายตำแหน่งและที่บริเวณปลายด้าน C ของเอ็นไซม์จะเป็นบริเวณที่มี proline (P) มาก โดยมีลำดับกรดอะมิโนเป็น IPPPPGA, IPPHKA หรือ IPPPPSPN ซึ่งเป็นลำดับกรดอะมิโนที่บ่งชี้ว่าเป็นบริเวณใกล้ปลาย C-terminal ของโปรตีน หรือใกล้ปลาย 3' ของยีน

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโคลน E6-2 และโคลน E1-1 เข้ากับเอ็นไซม์ MnP และ LiP จากฐานข้อมูลตามลำดับ (ภาพที่ 23 และภาพที่ 24) พบว่ากรดอะมิโนตัวแรกของทั้งสองโคลนจะเริ่มจากตำแหน่งที่ 1 และเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนที่มี prosthetic group โดยโคลน E1-1

จะเป็นโปรตีนที่จับกับ Mn^{2+} อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบว่าเป็นยีนหรือโปรตีนที่สนใจหรือไม่ จำเป็นต้องมีการทดสอบโดยดูการแสดงออกของยีนใน heterologous host ที่ไม่สร้างโปรตีนหรือเอ็นไซม์นั้นต่อไป



ภาพที่ 20 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ manganese peroxidase (A) และ กลุ่มกรดอะมิโนที่จับกับ Mn^{2+} (manganese binding site) (B) แสดงกรดอะมิโน 3 ตัว คือ E 35, E 39 และ D 179 ที่จับกับ Mn^{2+} โดยมี H 46 และ R 42 เป็นตัวจับกับ H_2O_2

ที่มา: Mauricio *et al.* (1998) and Sundaramoorthy *et al.* (1997)

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

Trametes-versicolor      ---MAFKSLLSFVSVIGALQGANA--LTRRVACPDGVNTATNAACCQLF 45
Coriolus-versicolor      ---MAFKTLLSIVSLLAAFQGATA--LTRRVACPDGVNTATNAACCQLF 45
Phanerochaete-chrysosporium ---MAFKQLFAAISLALSLSAANAAVIEKRATCSNGK-TVGDASCCAWF 46
Trametes-cervina         ---MAFQTLFALATLATTVLAVPSP-----LVSCGGGR-SVKNAACCAWF 41
E1-2F1                   GRXLGPPHXXGSRASLGSSXXAXSXX-IQXYVLKSLPLPRMFSKVFLSLVY 49
                          :. . . : : . . . . :
Trametes-versicolor      AVREDLQNNLFHGGGLCTAEAHESURLTHDAIAISPALAQGIFGGGGAD 95
Coriolus-versicolor      AVRDDLQENLFHGGGLCTAEAHESURLTHDAIAISPALAQGIFGGGGAD 95
Phanerochaete-chrysosporium DVLDDIQNNLFHGGGCGAEAHESIRLVHDSIAISPAMEAQGKFGGGGAD 96
Trametes-cervina         PVLDDIQANLFNGGKCEEAHAEVRLTHDAVGFSLAAQKAGKFGGGGAD 91
pe1-2aa1                 KRHRETPKRPWRIWLFVDSKQIVGMFVHGVMVLISDVVP----HLSTAN 95
                          : . . . . : : : : : * :
Trametes-versicolor      GSIATFPEIETNFHPNIGLDEIIELQKPFIAHNNISVADFIFAGAGIGAS 145
Coriolus-versicolor      GSIATFSDIETAFHPNIGLDEIVELQKPFIAHNNLSVADFIFAGAGIGAS 145
Phanerochaete-chrysosporium GSIATFDDIETAFHPNIGLDEIVKLQKPFVQKHGVTGAFATAGAVALS 146
Trametes-cervina         GSILATFSDIETAFIPNFGLEFTEGTFIPFALAHGVSFGDFVQFAGAVGAA 141
E1-2F1                   ACVLYFLNILLDTTIGVGLIYLILQVSTYVLTLEKLHLKGFESGVYGTTPS 145
                          . : * : * . . ** . : . : * . . :
Trametes-versicolor      NCAGAPQLAAAFVGRKDATQ---PAPDGLVPEPFHTPDQIFDRLADASQGE 192
Coriolus-versicolor      NCAGAPQLAAAFVGRVDATQ---PAPDGLVPEPFHTPDQIFARLADASQGE 192
Phanerochaete-chrysosporium NCPGAPQMNFFTGRAPATQ---PAPDGLVPEPFHTVDQIINRVNDA--GE 191
Trametes-cervina         NCAGGPRQLQFLAGRSNISQ---PSPDGLVPDPTDSADKILARMADIG--- 185
E1-2F1                   VIYWFKAQAVYVFALTMTKLLVVALFAALPAIFNLGEWLLSFLGPSDAQA 195
                          : . . . : : : : * . : : :
Trametes-versicolor      FDPILTVMLLTAHTVAAANDVDPTKSGLPFDSFTEPELWDQFFLETQLRG 242
Coriolus-versicolor      FDEILTVMLLVAHTVAAANDVDPTVPGSPFDSFTEPELWDQFFVEVLNLT 242
Phanerochaete-chrysosporium FDELELVWMLSAHSAVAVNDVDPTVQGLPFDSFTEPELWDQFFVETQLRG 241
Trametes-cervina         FSPTEVHLLASHSTAAQYEVDTDVAGSPFDSFTEPELWDQFFVESLLHGT 235
E1-2F1                   IIFTMGIFPIMNLVLQFWLTDISIVKG-SSDYTPALVNETPRGSMDDPS 243
                          : . . . : : : : * . * * * . :
Trametes-versicolor      SFPGS6GNQGEVESPLAG--EMRLQSDHTIARDRTACEWQSFVDNQPKA 290
Coriolus-versicolor      TFPGT6DNQGEVASPIAG--EFRLQSDFAIARDRTACEWQSFVDNQPKA 290
Phanerochaete-chrysosporium AFPGS6GNQGEVESPLPG--EIRIQSDHTIARDRTACEWQSFVNNQSKL 289
Trametes-cervina         QFTGS6-QGGEVMSPIPG--EFRLQSDFALSRDPRTACEWQALVNNQAM 282
E1-2F1                   EPLFRASEDDDDDDGLSGXHDIEAPRSISRSLSRDSRRMSAGESKSL 293
                          . : . : . : * . : : : * . . : :
Trametes-versicolor      QQMFFQVFVHDLISIFGQDINTLVDCTEVVPPIADPQG--HTHFPAGLSNA 337
Coriolus-versicolor      QAMFQVFVHDLISIFGQDINTLVDCTEVVPPIAPLQG--VTHFPAGLTVN 337
Phanerochaete-chrysosporium VDDFQFIFLALTLQGGQPNAMTDCSDVIPQSKPIPGNLPFSFFPAGKTIK 339
Trametes-cervina         VNNFEAVMSRLAVIGQIPSELVDCSDVIPTP-PLAKVAQVGSLLPPGKSMA 331
E1-2F1                   SGTATVIPS6SPHXX-QTHRYRRSPRLPSRGRGXRAPLLACSSSLSEP 342
                          : . . . : : : : * . . . :
Trametes-versicolor      DIEQACAE-TPFPTFTDPGPKTAVAPVPKPPAARK----- 372
Coriolus-versicolor      DIDQPCVE-TPFPTLTDPGPATSVAPVPLP----- 367
Phanerochaete-chrysosporium DVEQACAE-TPFPTLTLPGPETSQVRIPPPAGA----- 372
Trametes-cervina         DVQVACTNGMPFSPSLTSPGVPQTVAPLG----- 360
E1-2F1                   KRHSPPXPPXVEGSIXXNPGGLRQRXQRQTNGSGNXRGDRXXXX 385
                          . . . . . . . *

```

ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน E1-2

กับเห็ดชนิดต่างๆ กรอบสีแดงเป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนที่จับกับ Mn^{2+} บริเวณ manganese binding site กรอบสีน้ำเงินเข้มเป็นกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ heme group จับกับ H_2O_2 กรอบสีเขียวเป็นกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ calcium binding site และที่ Asn (N) เป็นบริเวณที่มี N-glycosylation

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

Trametes-versicolor      MAFKLLGSFVSLAALQVANGALTR---RVTCATGQVTSNAACCAALFPVIDDIQTNLFDG 57
Coriolopsis-gallica      -----
Pleurotus-ostreatua      MTFASLSALVLFVAVTVQVAQAVSLPQKRATCAGGQVTANAACCVLFPLMEDLQKNLFDD 60
Ganoderma-australe      MFSKVFLSLVVLASSVAAAVPSVGR---RATCANGKTTANDACCVWFDVLDLQENLFHG 57
Ganoderma-formosanum    MFSKVFLSLVVLAAASAAAVPSVSR---RATCSNGKTTANDACCVWFDVLDLQENLFHG 57
E6-2F2                    -----GSVTYRIQNSLCSQKSSSPSSSPSPMNYLRGAVVSAISA 40

Trametes-versicolor      GECQEEVHESLRLTHDAIGISPAIAKTGVFGGGGADGSIIFADIEITNFHAN--NGVDE 115
Coriolopsis-gallica      -----FHDAIGISPAIANRGQFGGGGADGSIALFEDIETNFHAN--NGVDE 44
Pleurotus-ostreatua      GACGEDAHEALRLTHDAIGFSP---SRGVMG--GADGSVITFSDTEVNFAN--LGIDE 113
Ganoderma-australe      GQCQEDAHESLRLTHDAIAFSPALTAAGQFGGGGADGSIIAHSDVELTYPVN--DGLDE 115
Ganoderma-formosanum    GQCQEDAHESLRLTHDAIGFSPALTAAGQFGGGGADGSIIAHSDVEMTYPAN--DGLDE 115
E6-2F2                    P--YQYVQGSQPLHPRHRRHRRSPTLSIYHNIQAEGPITPLTDAETELVCSPFHVRF 98
                        *:*:*

Trametes-versicolor      IIEQAPFIARHNLTT-ADFIQLAGAIQVSNCPGAPRLNVFIGRKDATQPAPDLTVPEPF 174
Coriolopsis-gallica      IINEQRPFIRHNLTT-ADFIQFAGAVGVSNCPGAPRLNVFIGRPDATQPAPDLTVPEPF 103
Pleurotus-ostreatua      IVEAEKPFARHNISA-GDLVHFAGTLAVTNCPGAPRIPFPLGRPPAKAASPIGLVPEPF 172
Ganoderma-australe      IVEASRPFARKHNVSF-GDFIQFAGAVGVANCNGGPQLSFFAGRSNDSPSPNNLVPLPS 174
Ganoderma-formosanum    IIEASRPFARKHNVSF-GDFIQFAGAVGVANCNGGPQLSFFAGRSNDSPSPNNLVPLPS 174
E6-2F2                    KWQVLRPQDKKVDVPVNGQLVPSMKIGEAECYCVTETEEIPDSRXLATNPGNQAK 158
                        * : : : : : : : : : : : :

Trametes-versicolor      DDVTKILARFEDAGKFTPAEVVALLAHTTAAADHVDPTIPG----- 216
Coriolopsis-gallica      DTVDISILQRFEDAGGFTPEEVVALLAHTTAAADHVDDESIPGTPFDSTPGLFDTOFFIET 163
Pleurotus-ostreatua      DTITDILARMDDAG-FVSVEVWVLLSHSVAAADHVDDETIPGTPFDSTPNLFDQSIFDIET 231
Ganoderma-australe      DTADTILSRFSDAG-FDSVEVWVLLVHTVGSQNTVDPSIPGAPFDSTPSDFDAQFFVET 233
Ganoderma-formosanum    DSADSILSRFSDAG-FASVEVWVLLVHTVGSQNTVDPSIPGAPFDSTPSDFDAQFFVET 233
E6-2F2                    ERRMPTVRGRGRLGEHTSAIVRKAISQGASTR-TKQLWGPRAPRPESXTIXSTKWARTI 217
                        : : * : : * : : : : :

Trametes-versicolor      -----
Coriolopsis-gallica      QLRGTLFP--GTGGNQGEVESPLRGEIRLQSD----- 193
Pleurotus-ostreatua      QLRGISFP--GTGGNHGEVQSPLKGEMLQSDHLFARDDRTSCEWQSMNTNDQKIQDRFS 289
Ganoderma-australe      MLNGTLVP--GNGLQDGEVLSPPYGEFRLQSDFALSRSRTTCEWQKMIADRANMLEKFE 291
Ganoderma-formosanum    MLNGTLVP--GDALHDGEVNSPPYGEFRLQSDFALSRSRTACEWQKMIADRANMLEKFE 291
E6-2F2                    QHGPTKTTXQETGKKPGRYTKLTPXHTHXXKEGDKTKKARPKYTPKXNTGXKXEXKEQK 277

Trametes-versicolor      -----
Coriolopsis-gallica      DTLFKMSMLGQNQDAMIDCSVDVIPVPAALVTKPHLPAGKSKTDVEQACATGAFFALGADP 349
Pleurotus-ostreatua      ITMLKMSLLGFQDQSALTDCSDVIPTATGTVDQDFIPAGLTVDDLQACSSSAFPTVTVA 351
Ganoderma-australe      VTMLKMSLLGFNQSMMLTDCSDVIPTATGTVDQDFIPAGLTVDDLQACSSSAFPTVTVA 351
Ganoderma-formosanum    MKH----- 280
E6-2F2

Trametes-versicolor      -----
Coriolopsis-gallica      -----
Pleurotus-ostreatua      GPVTSVPRVPPA- 361
Ganoderma-australe      GAVTSIPAVPLNS 364
Ganoderma-formosanum    GAVTSIPAVPLNS 364
E6-2F2                    -----

```

ภาพที่ 23 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน E6-2

กับเห็ดชนิดต่างๆ กรอบสีแดงเป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนที่จับกับ Mn^{2+} บริเวณ manganese binding site กรอบสีน้ำเงินเข้มเป็นกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ heme group จับกับ H_2O_2 กรอบสีเขียวเป็นกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ calcium binding site และที่ Asn (N) เป็นบริเวณที่มี N-glycosylation

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

Trametes-versicolor      MAFKSLLSFVSIGALQGANA--LTRRVACPDGVNTATNAACQQLFAVR 48
Coriolus-versicolor     MAFKTLISIVSLLAAFQGATA--LTRRVACPDGVNTATNAACQQLFAVR 48
Phanerochaete-chrysosporium MAFKQLFAAISLALSLSAANAAVIEKRATCSNGK-TVGDASCCAWFDVL 49
Trametes-cervina        MAFQTLFALATLATTVLAVPSP-----LVSCGGGR-SVKNAACCAWFPVL 44
E1-1F3                  -----

Trametes-versicolor      EDLQQLFHGGGLCTAEAEHSIRLTFHDAIAISPALAEQGI FGGGGAD6SI 98
Coriolus-versicolor     DDLQENLFHGGGLCTAEAEHSIRLTFHDAIAISPALAEQGI FGGGGAD6SI 98
Phanerochaete-chrysosporium DDIQQLFHGGQCGAEAEHSIRLVFHDIAISPAMEAQGK FGGGGAD6SI 99
Trametes-cervina        DDIQANLFGGKCEEAEAEVRLTFHDAVGFSLAAQKAGK FGGGGAD6SI 94
E1-1F3                  EYFKALLG--WCIELLQAFELVSDMDQSVARRGQPCWYRVKSVG-- 45
: : : * : * : : * : * : : * : : :

Trametes-versicolor      AIFPGEITNHPNIGLDEIIEIQKPFIARHNISVADFIFQAGAIGASNCA 148
Coriolus-versicolor     AIFSDIETAFHPNIGLDEIVELQKPFIARHNLVADFIFQAGAIGASNCA 148
Phanerochaete-chrysosporium MIFDDIETAFHPNIGLDEIVKLQKPFVQKHGVTPGAFIAFAGAVALSNC 149
Trametes-cervina        LAFSDIETAFIPNFGLEFTEGFIPIALAHGVSGFDVQFAGAVGAANCA 144
E1-1F3                  ---LHRDQRLVPCSRAQSITSSRKHFPHRRQYYSPTLELFX---VXHTD 88
: : : * : : : * : : :

Trametes-versicolor      GAPQLAAAFVGRKDATQAPDGLVPEPFHTPDQIFDRLADASQGEFDPILT 198
Coriolus-versicolor     GAPQLAAAFVGRVDATQAPDGLVPEPFHTPDQIFARLADASQGEFDEILT 198
Phanerochaete-chrysosporium GAPQMNFFTGRAPATQAPDGLVPEPFHTVDQIINRVNDA--GEFDELEL 197
Trametes-cervina        GGPRLQLFLAGRSNISQPSDGLVDPDTSADKILARMADIG---FSPTEV 191
E1-1F3                  GXPXNKKALGTSFHSNP---GIQPEDX----- 112
* * * * : : * : * :

Trametes-versicolor      VWLLTAHTVAAANDVDPTKSGLPFDSTPELWDTQFFLETQLRGTSFP6SG 248
Coriolus-versicolor     VWLLVAHTVAAANDVDPTVPGSPFDSTPEVWDTQFFVEVLLNGTTFP6TG 248
Phanerochaete-chrysosporium VWMLSAHSVAAVNDVDPTVQGLPFDSTPGIFDSQFFVETQLRGTAFF6SG 247
Trametes-cervina        VHLLASHSTAAQYEVDTDVAGSPFDSTPSVFDQFFVESLLHGTQFT6SG 241
E1-1F3                  -----EGHHRFEPQESSTTX-----KKATQKNRG 136
: : : : : : : : : : : :

Trametes-versicolor      GNQGEVESPLAGEMRLQSDHTIARDSTRACEWQSFVDNQPKAQMQFQVF 298
Coriolus-versicolor     DNQGEVASPIAGEFRLQSDFAIARDSTRACEWQSFVDNQPKAQMQFQVF 298
Phanerochaete-chrysosporium GNQGEVESPLPGEIRIQSDHTIARDSTRACEWQSFVNNQSKLVDDFQFIF 297
Trametes-cervina        -QGGEVMSPIPGGEFRLQSDFALSRDPRACEWQALVNNQQAMVNNFEAVM 290
E1-1F3                  HERX-----XGRXQTQKTHTKHTRERXKMRPER----- 165
: * * : : : : * : :

Trametes-versicolor      HDLSIFGQDINTLVDCTEVVPPIADPQG---HTHFPAGLSNADIEQACAE 345
Coriolus-versicolor     HDLSIFGQDINSLVDCTEVVPPIAPLQG---VTHFPAGLTVNDIDQPCVE 345
Phanerochaete-chrysosporium LALTQLGQDPNAMTDCSDVIPQSKPIPGNLPFSFFPAGKTIKDVEQACAE 347
Trametes-cervina        SRLAVIGQIPSELVDCSDVIPTP-PLAKVAQVGSLLPPGKSMADVQVACTN 339
E1-1F3                  -----

Trametes-versicolor      -TPFPTFPTDPGPKTAVAPVPKPPAARK 372
Coriolus-versicolor     -TPFPTLPTDPGPATSVAPVPLP----- 367
Phanerochaete-chrysosporium -TPFPTLTTLPGPETSQRIPPPFGA-- 372
Trametes-cervina        GMPFPSLPTSPGPVQTVAPLG----- 360
E1-1F3                  -----

```

ภาพที่ 24 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน E1-1 กับเห็ดชนิดต่างๆ กรอบสีแดงเป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนที่จับกับ Mn^{2+} บริเวณ manganese binding site กรอบสีน้ำเงินเข้มเป็นกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ heme group จับกับ H_2O_2 กรอบสีเขียวเป็นกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ calcium binding site และที่ Asn (N) เป็นบริเวณที่มี N-glycosylation

สรุป

จากการคัดเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินจากธรรมชาติ พบว่าได้เชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ polyphenol oxidase, manganese peroxidase และ laccase ทั้งสามชนิดเพียง 1 เชื้อให้ชื่อว่า GF เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งแบบ solid-state fermentation เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าเชื้อ GF มีรูปแบบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินใกล้เคียงกับรูปแบบของเอนไซม์ในเชื้อเปรียบเทียบกับ YK505 โดยสร้างเอนไซม์ manganese peroxidase ได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 มีปริมาณ 95 ยูนิตต่อลิตร สร้างเอนไซม์ laccase สูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 มีปริมาณ 21 ยูนิตต่อลิตร แต่มีการสร้างเอนไซม์ lignin peroxidase ในปริมาณต่ำมาก ผลของการทำ BlastN ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ ribosomal DNA ของเชื้อ GF กับฐานข้อมูลใน Gene Bank แสดงให้เห็นว่า เชื้อ GF เป็นเชื้อ *Ganoderma* sp.

สามารถโคลนยีนสร้างเอนไซม์ย่อยลิกนินจาก cDNA ของเชื้อ GF ที่เลี้ยงในสารกระตุ้นเอนไซม์ได้ 7 โคลน คือ E1-1, E1-2, E2-3, E3-2, E5-2, E5-3 และ E6-1 มีขนาดอยู่ระหว่าง 600-1500 คู่เบส

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ พบว่าเฉพาะ E1-2 เท่านั้นที่น่าจะเป็นยีนเนื่องจากพบบริเวณของ TATA box ที่ตำแหน่ง 144-149 เป็น TATAA พบ CAT box 2 แห่ง คือ CAATAT และ CAATA ที่ตำแหน่ง 306 - 311 และ 326-330 ตามลำดับ มี initiation sequence ที่มี start codon (ATG) คือ ACGATGG อยู่ที่ตำแหน่ง 596-602 และพบว่ามี metal response element (MRE) เป็น ACCCCG อยู่ระหว่าง TATA box และ CAT box ในตำแหน่งที่ 162-167 แต่ไม่พบ stop codon ดังนั้นจึงคาดว่าโคลน E1-2 นี้จะเป็นส่วนตอนต้นของยีนที่ประกอบด้วย promoter, start codon, MRE และส่วนของยีนด้าน 5'

จากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ย่อยลิกนินในเห็ดชนิดต่างๆ พบว่าโคลน E5-2 น่าจะเป็นโปรตีนในกลุ่มเอนไซม์ manganese peroxidase เนื่องจากมีบริเวณ conserved manganese binding site และ calcium binding site สอดคล้องกับเห็ดอื่นๆ ในฐานข้อมูลเอนไซม์ manganese peroxidase โดยมี Glu 62, Val 65

และ Asp 142 เป็นกรดอะมิโนที่จับกับ Mn^{2+} และมี Arg 70, Arg 72 และ Arg 136 อยู่ในบริเวณ heme group ทำหน้าที่จับกับ H_2O_2

โคลน E1-2 น่าจะเป็นส่วนของโปรตีนในกลุ่ม oxidase ด้านปลาย C เพราะมีหมู่ที่สามารถจับกับ Mn^{2+} และ H_2O_2 ได้ มีกรดอะมิโนของบริเวณ calcium binding site ทั้งยังมีกรดอะมิโน Proline (P) อยู่เป็นจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าเป็นตำแหน่งใกล้ปลาย N ของโปรตีน

ลำดับกรดอะมิโนของโคลน E6-2 และ E1-1 แสดงให้เห็นว่ายีนที่โคลนได้ทั้งสองโคลนเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนที่มี prosthetic group โดยโคลน E1-1 จะเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับ Mn^{2+} ได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- Anderson, L.A., V. Renganathan, A.A. Chiv, T.M. Loehr and M.H. Gold. 1985. Spectral characterization of diarylpropane oxygenase, a novel peroxidase-dependent, lignin-degrading enzyme. **J. Biol. Chem.** 260: 6080-6087.
- Anonymous. 1999. Fungal, plant and bacterial haem peroxidases. Available Source: <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/FPBPEROXIDASE.html/>, May 2, 2006.
- _____. 2006. Available Source: <http://www.sasc.ucsf.edu/home/Ortiz/images/ccp-350.gif/>, May 23, 2007.
- Avgerinos, G.C. and D.I.C. Wang. 1983. Selective solvent delignification for fermentation enhancement. **Biotech. Bioeng.** 25: 67-83.
- Bisaria, V.S. and T. Chose. 1981. Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme Microb. Technol.** 3: 90-103.
- Blanchette, R.A. and C.G. Shaw. 1978a. Associations among bacteria, yeasts, and basidiomycetes during wood decay. **Phytopathology** 68: 631-637.
- _____. 1978b. Management of forest residues for rapid decay. **Can. J. Bot.** 56: 2904-2909.
- Bollag, J.M. and A. Lenonowicz. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccase. **Appl. Environ. Microbiol.** 48: 849-854.
- Bressler, D.C., P.M. Fedorak and M.A. Pickard. 2000. Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Coriolopsis gallica*. **Biotech. Lett.** 22: 1119-1125.

- Brown, A. 1985. Review of lignin in biomass. **J. Appl. Biochem.** 7: 371-387.
- Buswell, J.A. and E. Odier. 1987. Lignin degradation CRC Crit. **Rev. Biotechnol.** 6: 1-60.
- Christopher, F.T. 1994. The structure and Function of Fungal laccases. **Microbiology** 140: 19-26.
- Cowling, E.B. and T.K. Kirk. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. **Biotechnol. Bioeng.** 6: 95-123.
- Crawford, R.L. 1981. **Lignin Biodegradation and Transformation.** John Wiley and Sons, Inc, New York.
- Declan, M.S. and A.D.W. Dobson. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiology** 147: 1755-1763.
- D'Souza, T.M., C.S. Merritt and C.A. Reddy. 1999. Lignin-Modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycetes *Ganoderma Lucidum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65(12): 5307-58313.
- Dawson, J.H. 1988. Probing structure-function relations in heme-containing oxygenase and peroxidase. **Science** 240: 433-439.
- Eggeling, L. 1983. Lignin-an exceptional biopolymer...and a rich resource. **Trends in Biotechnol.** 1: 123-127.
- Evans, C. 1987. Lignin degradation. **Process Biochem.** 22(4): 102-104.
- Fakoussa, R.M. and P.J. Frost. 1999. *In vivo*-decolorization of coal-derived humic acids by laccase-excreting fungus *Trametes versicolor*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 52: 60-65.

- Farrell, R.L., K.E. Murtagh, M. Tien, M.D. Mozuch and T.K. Kirk. 1989. Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. **Enzyme Microb. Technol.** 11: 322-328.
- Fenn, P. and T.K. Kirk. 1981. Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. **Arch. Microbiol.** 130: 59-65.
- Forrestes, I.T., A.C. Grabski, R.R. Burgess and G.F. Leatham. 1988. Manganese, Mn-dependent peroxidase, and the biodegradation of lignin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 157: 992-999.
- Gibson, C.A., L.M. Dunster, M. Bouloy, P.D. Minor, P.G. Sanders and A.D. Barrett. 1990. Primer extension dideoxy chain termination nucleotide sequencing of partially purified RNA virus genomes: A Technique for Investigating Low Titre with Extensive Genome Secondary Structure. **J. Virol. Methods.** 29: 167-171.
- Glenn, J.K. and M.H. Gold. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycetes, *Phanerochaete chrysosporium*. **Arch. Biochem. Biophys.** 242: 329-341.
- Gold, M. and M. Alic. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiol. Rev.** 57(3): 605-622.
- Gould, J.M. 1984. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. **Biotech. Bioeng.** 26: 46-52.

- Harvey, P.J., H.E. Schoemaker and J.M. Palmer. 1986. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cation in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Lett.** 195: 242-246.
- Hatakka, A. 1986. **Degradation and Conversion of Lignin, Lignin-related Aromatic Compounds and Lignocellulose by Selected White-rot Fungi**. PhD. Thesis, Department of Microbiology, University of Helsinki.
- Heather, L.Y., M.D.S. Gelpke, D Li, M. Sundaramoorthy and M.H. Gold. 2001. The role of glu39 in Mn^{II} binding and oxidation by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry** 40: 2243-2250.
- Hublik, G. and F. Schinner. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme Microb. Technol.** 27:330-336.
- Huynh, V.-B. and R.L. Crawford. 1985. Novel extracellular enzymes (ligninases) of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiol. Lett.** 28: 119-123.
- Jeffries, T.W., S. Choi and T.K. Kirk. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 42: 290-292.
- Joachim. 2007. Modeling and design of laccases and dirigent proteins. Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart. Available Source: www.itb.uni-stuttgart.de/research/bioinformatic_project_description19.html/, May 23, 2007.
- Kazutomo, N., K. Kataoka and T. Sakurai. 2002. Primary structure of a Japanese lacquer tree laccase as a prototype enzyme of multicopper oxidases. **Journal of Inorganic Biochemistry** 91: 125-131.

Keyser, P., T.K. Kirk and J.G. Zeikus. 1987. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium* : synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation.

J. Bacteriol. 135: 790-797.

Kirk, T.K. 1984. Degradation of lignin, pp. 399-437. In Gibson, D.T., ed. **Microbial**

Degradation of Organic Compounds. Dekker, New York.

_____ and D. Cullen. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi, pp. 273-374. In Young, R.A. and M. Akhtar, eds. **Environmentally**

Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. John Wiley and Sons, Inc. New York.

_____ and K.E. Hammol. 1992. What is the primary agent of lignin degradation in white-rot fungi, pp.535-540. In Kuwahara, M. and M. Shimada, eds. **Biotechnology in Pulp and**

Paper Industry. n.p., Tokyo.

_____ and R.L. Farrell. 1987. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin.

Annu. Rev. Microbiol. 41: 465-505.

_____, W.J. Connors and J.G. Zeikus. 1976. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two white-rot fungi. **Appl. Environ. Microbiol.** 32: 192-194.

Kozak, M. 1981. Possible role of flanking nucleotides in recognition of AUG initiator codon by eukaryotic ribosome. **Nucleic Acids Res.** 9: 5233-5252.

Kuila, D., M. Tien, J.A. Fee and M.R. Ondrias. 1985. Resonance raman spectra of extracellular ligninase : Evidence for a heme active site similar to those of peroxidases. **Biochemistry** 24: 3394-3397.

- Kuwahara, M., J.K. Glenn, M.A. Morgan and M.H. Gold. 1984. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Lett.** 169: 247-250.
- Larsson, S., P. Cassland and L.j. Jonsson. 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibition in lignocellulose hydrolysates heterologous expression of laccase. **Appl. Environ. Microb.** 67: 1163-1170.
- Lecch, D. and F. Daigle. 1998. Optimization of a regentless laccase electrode for the detection of the inhibition azide. **Analyst.** 123: 1976-14974.
- Leisola, M.S.A., B. Kozulic, F. Meussdoerffer and A. Fiechter. 1987. Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Biol. Chem.** 262: 419-424.
- Leontievsky, A.A., N.M. Myasoedova, B.P. Baskunov, C.S. Evans and L.A. Golovleva. 2000. Transformation of 2, 4, 6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. **Biodegradation** 11: 331-340.
- MacDonald, M.J., A. Paterson and P. Brode. 1984. Possible relationship between cyclic AMP and idiophasic metabolism in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Bacteriol.** 160: 470-472.
- Mauricio, C., S. Lobos and R. Vicu@a. 1998. Molecular modeling of manganese peroxidase from the lignin-degradation fungus *Ceriporiopsis subvermispota* and structural comparison with other peroxidase. **Electronic Journal of Biotechnology** 1(2) ISSN: 0717-3458.

- Mario, T., G. Corsini, L.F. Larrondo, L. Salas, S. Lobos and R. vicuña. Characterization of three new manganese peroxidase genes from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1490: 37-144.
- Niku-Paavola, M.-L., E. Karhunen, P. Jalola and V. Raunio. 1988. Ligninolytic enzyme of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. **Biochem. J.** 254: 877-884.
- Norkrans, B. 1967. Cellulose and cellulolysis. **Adv. Appl. Microbiol.** 9: 91-215.
- Odier, E. and B. Monties. 1978. Biodegradation of wheat lignin by *Xanthomonas* 23. **Annu. Microbiol.** (Inst. Pasteur) 129A: 361-377.
- Onuki, T., M. Noguch and J. Mitamura. 2000. Oxidative hair dye compositive containing Laccaes. Pat Int. **Appl. Wo 0037,030. Chem. Abstr.** 133: 18994.
- Osiadacz, J.A.I., A.J.H. Adhami, D. Bjrasszewska, P. Fischer and C.W. Peczyniska. 1999. On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthanilic acid to actinocin the chromophore. **J. Biotechnol.** 72: 141-149.
- Pal, M., A.M. Calvo, M.C. Terron and A.E. Gonzalez. 1995. Solid state fermentation of sugar cane bagasse with *Flemmulina velutipes* and *Trametes versicolor*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 11: 541-545.
- Pasczynski, A., R.L. Crawford and V.B. Huynh. 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. **Methods Enzymol.** 161: 264-270.
- _____, V.B. Huynh and R.L. Crawford. 1985. Enzymatic activities of an extracellular manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiol. Lett.** 29: 37-41.

_____. 1986. Comparison of ligninase-1 and peroxidase M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Arch. Biochem. Biophys.** 244: 750-765.

Pekka, M., T.C. Harrington and M. Raudaskoski. 2003. A peroxidase gene family and gene trees in *Heterobasidion* and related genera. **Mycologia** 95 209-221.

Poulos, T.L. and J. Kraut. 1980. The stereochemistry of peroxidase catalysis. **J. Biol. Chem.** 255: 8199-8205.

Pruche, F., L. Saint and B. Bernards. 2000. Hair dye composition containing hydroxystillbene, Eur Pat. **Appl. Ep 1013,260. Chem. Abstr.** 133: 63587.

Raghukumar, C. 2000. Fungi from marine habitats: an applications containing in bioremediation. **Mycol. Res.** 104: 1222-1226.

Renganathan, V. and M.H. Gold. 1986. Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry** 25: 1626-1631.

Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 74: 5463-5467.

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

Sundaramoorthy, M., K. Kishi, M.H. Gold and T.K. Poulos. 1997. Crystal structures of substrate binding site mutants of manganese peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry** 272: 17574-17580.

- Sullivan, J.T. and T.V. Hershberger. 1959. Effect of Chlorine dioxide on lignin content and cellulose digestibility of forages. **Science** 3384(6): 1252.
- Tien, M. and T.K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 81: 2280-2284.
- _____. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Methods Enzymol.** 161: 2280-2284.
- Thomas, C., W. Blodig, K.H. Winterhalter and K. Piontek. 1999. The Crystal Structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxyl group on the C^β of tryptophan 171: a noval radical site formed during the redox cycle. **J. Mol. Biol.** 286: 809-827.
- Thomas, L.P., S.L. Edwards, H. Wariishi and M.H. Gold. 1993. Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. **The Journal of Biological Chemistry** 268 (6): 4429-4440.
- Wariishi, H. and M.H. Gold. 1989. Lignin peroxidase compound III: Formation, inactivation and conversion to the native enzyme. **FEBS Lett.** 243: 165-168.
- _____, L. Marquez, H.B. Dunford and M.H. Gold. 1990. Lignin peroxidase compounds II and III: Spectral and kinetic characterization of reactions with peroxides. **J. Biol. Chem.** 265: 11137-11142.
- _____, L. Akileswaran and M.H. Gold. 1988. Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. **Biochemistry** 27: 5365-5370.

Zimmermann, J., H.Voss, C. Schwager, J. Stegemann and W. Ansorge. 1988. Automated sanger dideoxy sequencing reaction protocol. **FEBS Lett.** 133: 432-436.

Zimmermann, W. 1990. Degradation of lignin by bacteria. **J. Biotechnol.** 13: 119-130.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Nutrient Agar (NA)

Beaf extract	3	กรัม
Pepton	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำปริมาตร 900 มิลลิลิตรให้เข้ากันโดยยังไม่ต้องใส่วุ้น ปรับ pH 7.0 ตั้งไฟและใส่ผงวุ้นต้มจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. อาหาร Basal สูตร Low nitrogen and carbon source

อาหารส่วนที่ 1

glucose	10	กรัม
ammonium tartrate	1	กรัม
2,2-dimethyl succinate	2.92	กรัม
KH_2PO_4	50	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20	กรัม

อาหารส่วนที่ 2

nitrilotriacetate	1.5	กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
CoCl	0.1	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
$\text{Alk}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	20	กรัม

ผสมส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 1 ปรับ pH 6.0 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นิ่งมาเชื้อ

ผสมส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 2 ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร กรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ก่อนเลี้ยงเส้นใยนำอาหารส่วนที่ 1 ปริมาตร 1 ลิตรที่เย็นลงแล้วมาเติมสารละลาย thiamine 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารส่วนที่ 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในสภาพปลอดเชื้อ

3. อาหาร Potato-Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาล Dextrose	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือกล้างให้สะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มให้เดือดในน้ำปริมาตร 900 มิลลิลิตรนาน 20 นาที กรองเอากากออก เติมน้ำตาลละลายส่วนผสมให้เข้ากันโดยยังไม่ต้องใส่วุ้น ปรับ pH 7.0 ตั้งไฟและใส่ผงวุ้นต้มจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

4. อาหาร Potato-Dextrose Broth (PDB)

ส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหาร PDA แต่ไม่เติมวุ้น

5. อาหาร Luria-Betani Agar (LA)

Tryptone	10	กรัม
Yeast Extrac	5	กรัม

NaCl	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำปริมาตร 900 มิลลิลิตรให้เข้ากันโดยไม่ต้องใส่วุ้น ปรับ pH 7.0 ตั้งไฟและใส่ผงวุ้นคัมจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

6. อาหาร Luria-Betani Broth (LB)

ส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหาร LA แต่ไม่เติมวุ้น

7. อาหาร SOB

bacto-tryptone	20	กรัม
bacto-yeast extract	5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมน้ำ 250 มิลลิโมลาร์ KCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนใช้ใส่ 2 โมลาร์ $MgCl_2$ จำนวน 5 มิลลิลิตร

หมายเหตุ

วิธีการฆ่าเชื้อแบบปกติหนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการฆ่าเชื้อสารละลายน้ำตาลกรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมครอนที่ปลอดเชื้อ

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

1.1 streptomycin ชั่ง streptomycin จำนวน 0.6 กรัม ละลายในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 30 มิลลิลิตร กรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้นำมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงอุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส เติมยาปฏิชีวนะในอัตราส่วน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 ampicillin ชั่ง ampicillin จำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้นำมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงอุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส เติมยาปฏิชีวนะในอัตราส่วน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. สารเคมีสำหรับสกัดแยกดีเอ็นเอ

TE Buffer pH 8.0

Tris-HCl pH 8.0	10	มิลลิโมลาร์
EDTA pH 8.0	1	มิลลิโมลาร์

3. สารเคมีสำหรับอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.1 DNA loading dye

Bromophenol blue	0.025	กรัม
Xylene cyanol FF	0.025	กรัม
Glycerol	3	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2 10X TBE Buffer

Tris base	108	กรัม
Glacial acetic acid	55	กรัม
0.5 M EDTA pH 8.0	40	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

4. สารเคมีสำหรับเตรียม competent cell

4.1 สาร RF1 ประกอบด้วย

100 mM KCl
50 mM MnCl₂
30 mM potassium acetate
10 mM CaCl₂
15% glycerol

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH 5.8 ด้วย acetic acid ปรับปริมาตรตามต้องการ กรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2 สาร RF2 ประกอบด้วย

10 mM MOP (3-(N-morpholino) propane sulfonic acid)
10 mM KCl
75 mM CaCl₂
15% glycerol

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH 6.8 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรตามต้องการ กรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. สารเคมีสำหรับคัดเลือกโคลน

5.1 Isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG) เตรียมโดยละลายสาร 2 กรัมในน้ำปริมาตร 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร กรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5.2 5-Bromo-4-chloro-3-indotyl- β -D-galactoside (X-gal) ละลาย X-gal จำนวน 20 มิลลิกรัม ใน dimethylformamide ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บในหลอดทึบแสงหรือห่อด้วยแผ่นอลูมิเนียมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องกรอง สารละลายที่ได้ควรเป็นสารละลายใส ไม่มีสี ถ้ามีสีออกเหลืองไม่ควรใช้

6. สารเคมีสำหรับสกัดพลาสมิด

6.1 Solution I

50 mM glucose	ทำเป็น stock ความเข้มข้น 1 โมลาร์
25 mM Tris-HCl pH 8.0	ทำเป็น stock ความเข้มข้น 1 โมลาร์
10 mM EDTA pH 8.0	ทำเป็น stock ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

เตรียมสารละลายแต่ละชนิดแยกกัน นำมาเชื้อ (ยกเว้น glucose ใช้กรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมครอน) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อผสมสารเข้าด้วยกันแล้วสามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 1 เดือน

6.2 Solution II

0.2 N NaOH	ทำเป็น stock ความเข้มข้น 1 นอร์มอล
1% SDS	ทำเป็น stock ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

เตรียมสารละลายแต่ละชนิดแยกกัน นำมาเชื้อเฉพาะ NaOH ส่วน SDS ไม่ต้องนำเชื้อ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เวลาใช้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง

6.3 Solution III

3 M sodium acetate pH 4.8

ละลายสารในน้ำกลั่น ปรับ pH 4.8 ด้วย acetic acid ปรับปริมาตรตามต้องการ นิ่งมาเชื้อ
แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวศลยา สุขสอาด
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 20 มีนาคม 2511
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	รับราชการ (อาจารย์)
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการทำวิจัย ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กองทุนศรีชุมแสง โดยอาจารย์แสงสุรีย์ สิ้นฐานิก อดีต คณบดีคณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย- เกษตรศาสตร์ ทุนโครงการพัฒนาอาจารย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2546) NPO PLANT A TREE PLANT LOVE, Japan