การผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* MA4 โดยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

Production of melanin-bleaching enzyme by *Aspergillus flavus* MA4 using solid state fermentation

ชุติมา ทองอ้ม ตรีทเศศ บัวศรี ศศิวรรณ ศิริชน นภัทรสกร พวงท้าว และปราณี พัฒนพิพิธไพศาล*

สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ. อุบลราชธานี 34190

*Email: scpranpa@gmail.com

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมการฟอกสีเมลานินจากตัวอย่างดิน อากาศ น้ำเสีย และเส้นผม รวมทั้งหมด 13 ตัวอย่าง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน สามารถคัดแยกเชื้อที่สามารถฟอกสีเมลานินโดยให้บริเวณใสรอบๆ โคโลนีจำนวน 7 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลทคือ ไอโซเลท MA3, MS1, MS2, และ MH1 และเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท MA1, MA2, และ MA4 เมื่อทำการคัดเลือกพบว่า ไอโซเลท MA4 มีค่า enzyme activity ratios สูงสุดเท่ากับ 2.04 จากนั้นนำเชื้อราไอโซเลท MA4 มาจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ยีนบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) rDNA พบว่าสามารถจัดจำแนกเชื้อราไอโซเลท MA4 เป็น *Aspergillus flavus* MA4 เมื่อศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งและกระบวนการหมักแบบอาหารเหลวพบว่าเอนไซม์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (35.29 units/ml) มีกิจกรรมสูงกว่าเอนไซม์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว (1.08 units/ml) สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium คือ ปริมาณขี้เลื่อยและกัวอีคอลที่เหมาะสมคือ 11 กรัม และ 3.0 มิลลิกรัมตามลำดับ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ภายใต้สภาวะการผลิตที่เหมาะสมเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 41.54 units/ml ผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินในระดับขยายขนาด ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้เพื่อการฟอกย้อมสีผมต่อไป

คำสำคัญ เมลานิน เอนไซม์ฟอกสีเมลานิน เชื้อราที่สร้างเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน

Abstract

A total of 13 samples of soil, air, wastewater and human hair were collected and isolated for decolorize melanin-producing microorganisms using melanin agar medium which incubated at 30 °C for 7-14 days. Only 7 microbial isolates including 4 bacteria (MA3, MS1, MS2, and MH1) and 3 fungi (MA1, MA2, and MA4) had ability to decolorize the pigment which showed the clear zone surrounding theirs colonies. After screening, isolate MA4 was the most promising of fungus that had the highest enzyme activity ratio of 2.04. Thereafter, this fungus was identified using analysis of internal transcribed spacer (ITS) rDNA. The result revealed that isolate MA4 was identified as *Aspergillus flavus* MA4. Based on the comparison study between production of enzyme-bleaching enzyme using solid state fermentation and submerge fermentation, the results showed that the enzyme activity from crude enzyme produced from solid state fermentation process (35.29 units/ml) had the value higher than those from submerge

fermentation process (1.08 units/ml). It was found that the optimum concentration of sawdust and guaicol in sawdust medium for enzyme production was 11 gram and 3.0 milligram, respectively. The initial pH of the medium was 6.0 and incubated at 30°C for 3 days. Under optimum condition, this strain could produce melanin-bleaching enzyme which showed the greatest activity of 41.54 units/ml. The results indicated that the possibility of large-scale production of melanin bleaching enzyme which could be useful for its application to the bleaching of hair stain.

Keywords: Melanin; melanin-bleaching enzyme; melanin- bleaching enzyme producing fungi; *Aspergillus flavus*

บทนำ

เส้นผมของคนเราประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน เมลานินและน้ำ [1] โดยพบว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผมแห้งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนที่เรียกว่าเคราทิน (keratin) ซึ่งประกอบด้วยซิสเทอีนเป็นจำนวนมาก ผมของคนเรายังประกอบด้วยน้ำประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการปรับแต่งคุณสมบัติทางกลของเส้นผม และผมยังประกอบด้วยเม็ดสีหรือเมลานิน (melanin) ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ จะอยู่ในชั้นกลาง (cortex) ของเส้นผม ทำให้เส้นผมมีสีตามธรรมชาติและเชื้อชาติ [2] ปัจจุบันการย้อมสีผมหรือการเปลี่ยนสีผมเป็นแฟชั่นที่ทุกคนยอมรับเพราะเกี่ยวข้องกับความสวยงามและการเสริมบุคลิกภาพ ซึ่งการเปลี่ยนสีผมนั้นอาจเกิดขึ้นจากหลายเหตุผลด้วยกันคือ บางคนอาจจะเปลี่ยนเพราะปกปิดผมขาวหรือเปลี่ยนเพราะไม่ชอบสีผมเดิม หรืออาจจะเปลี่ยนเพื่อให้เข้ากับบุคลิกของตนเอง หรือบางคนอาจเปลี่ยนตามแฟชั่นตามสมัยนิยม ในการย้อมสีผมจะต้องมีการฟอกสีผมก่อนการย้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งผมของชาวเอเชีย ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ทำให้ย้อมติดสีได้ยาก ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการฟอกสีผมหรือการฟอกสีเมลานินในเส้นผมเพื่อให้สีผมอ่อนลง เพื่อให้ย้อมติดสีย้อมตามต้องการ ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ย้อมผมจะประกอบด้วยสารเคมีที่ใช้สำหรับการฟอกสีผม [3] ได้แก่

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

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

ดังจะเห็นได้ว่าการฟอกสีผมด้วยสารเคมีดังกล่าวข้างต้นเป็นการทำลายสุขภาพของเส้นผมอย่างรุนแรง เพราะเป็นการทำลายทั้งเมลานิน โปรตีนเคราทินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเส้นผม รวมทั้งทำลายหนังศีรษะอีกด้วย และยังอาจเกิดอาการแพ้ตามมาเช่น การระคายเคืองต่อหนังศีรษะ ระบบทางเดินหายใจและตา [2] ดังนั้น วิธีการฟอกสีผมโดยวิธีทางธรรมชาติ อ่อนโยนต่อเส้นผม ลดการแพ้และระคายเคืองที่เกิดจากสารเคมี จึงเป็นเรื่องหนึ่งที่ได้รับความ

สนใจ โดยเฉพาะการใช้สารสกัดจากธรรมชาติ อย่างเช่น เอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (melanin-bleaching enzyme) ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายซับสเตรตหรือเมลานินแต่เพียงอย่างเดียว ไม่ทำลายโปรตีนเคราทินและไม่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงอื่นๆ รวมทั้งเส้นผมยังมีคุณภาพที่ดีกว่าการฟอกด้วยสารเคมีอีกด้วย

การฟอกสีเมลานินด้วยเอนไซม์ได้รับความสนใจอย่างมากในด้านการประยุกต์ใช้ทางด้านความสวยความงามและเครื่องสำอาง Woo และคณะ [4] เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* สามารถฟอกสีเมลานินสังเคราะห์ได้ และสามารถนำไปประยุกต์เพื่อพัฒนาเป็นสารเพิ่มความกระจ่างใสในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ Mohorčič และคณะ [5] คัดแยกเชื้อรา *Sporotrichum pruinosum* ซึ่งสังเคราะห์เอนไซม์ฟอกสีเมลานินที่สามารถย่อยสลายเมลานินที่ผิวหนังได้ ในขณะเดียวกัน Nagasaki และคณะ [2] พบว่า *Ceriporiopsis* sp. MD-1 ที่คัดแยกจากดินในป่าสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ฟอกสีเมลานินในเส้นผมได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกและคัดเลือกเชื้อราจากแหล่งธรรมชาติที่มีความสามารถฟอกสีเมลานิน ศึกษากระบวนการหมักและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการขยายขนาดการผลิต เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีคุณภาพและราคาถูก สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีในการฟอกสีผม และพัฒนาต่อยอดสู่การพัฒนาเครื่องสำอางกระจ่างใสและผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับเส้นผมที่ยั่งยืนต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์เอนไซม์ฟอกสีเมลานิน

นำตัวอย่างดินบริเวณโคนต้นไม้ใหญ่ ตัวอย่างอากาศ ตัวอย่างน้ำเสีย และตัวอย่างเส้นผมมาทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเมลานินสังเคราะห์เป็นแหล่งคาร์บอน (Melanin agar medium) สำหรับตัวอย่างอากาศ จะทำการเปิดจานอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่ต้องการศึกษา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน คัดแยกเชื้อที่ให้บริเวณใส (clear zone) และนำไปทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยวิธี streak plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน ทำซ้ำจนกระทั่งได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ นำเชื้อแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมที่ไม่ได้เติมเมลานิน บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ cork borer no. 5 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร) เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญ นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง melanin agar medium ที่มีเมลานินสังเคราะห์เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-14 วัน โดยสังเกตวงใสรอบโคโลนีของเชื้อทุกวัน คำนวณหาอัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity ratios) คัดเลือกเชื้อไอโซเลทที่มีอัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์ สูงสุดเพื่อการทดลองต่อไป

$$\text{Enzyme activity ratios} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}$$

2. การจัดจำแนกเชื้อโดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

เพาะเลี้ยงเชื้อราบน malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อราโดยใช้ E.Z.N.A. Forensic DNA isolation Kit (Ormega Bio-Tek) และนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยาโพลีเมอร์เรสเชนรีเอกชั่น (Polymerase Chain Reaction; PCR) โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นดีในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้ปฏิกิริยาผสมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM of each primer (ITS5 and ITS4) และ 1U *Taq* DNA polymerase อุณหภูมิที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ เริ่มต้นด้วยอุณหภูมิ initial denaturation ที่ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยวงรอบอุณหภูมิ 35 วงรอบที่ประกอบด้วย 96

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1:30 นาที ตามด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปส่องดูภายใต้ ultraviolet (UV) transilluminator จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง automated DNA sequence (Macrogen Inc., Korea) วิเคราะห์ยีนบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS)

3. ศึกษากระบวนการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน

กระบวนการหมักแบบอาหารเหลว submerge fermentation ทำโดยการเพาะสปอร์แขวนลอย (spore suspension) 1 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว enzyme production medium ซึ่งประกอบด้วย glucose 10 กรัมต่อลิตร yeast extract 0.2 กรัมต่อลิตร veratryl alcohol 0.07 กรัมต่อลิตร tartaric acid 3.0 กรัมต่อลิตร, Tween 80 1.0 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.2 กรัมต่อลิตร, $CaCl_2 \cdot 2H_20$ 0.146 กรัมต่อลิตร $(NH_4)_2HPO_4$ 0.157 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 กรัมต่อลิตร NaCl 0.009 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ปริมาตร 250 มิลลิลิตร พีเอชเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วทำการสกัดเอนไซม์โดยการกรองผ่าน black ribbon นำสารละลายเอนไซม์ที่กรองได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อัตราความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินตามวิธีของ Nagasaki และคณะ [2] สำหรับกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (solid state fermentation) ทำโดยการเพาะสปอร์แขวนลอย 1 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ใน sawdust medium ซึ่งประกอบด้วยขี้เลื่อยไม้เนื้อแข็ง 7 กรัม กัวอีคอล 0.002 กรัม รำข้าวเจ้า 1 กรัม แกลบ 2 กรัม ปรับความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายเกลือแร่ที่ประกอบด้วย yeast extract 3.0 กรัมต่อลิตร $(NH_4)SO_4$ 5.0 กรัมต่อลิตร $Mg_2SO_4.7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร พีเอชเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอนไซม์ด้วย 0.2 M acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นนำมากรองผ่าน black ribbon นำสารละลายที่กรองได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อัตราความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินตามวิธีของ Nagasaki และคณะ [2] ทั้งนี้กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์มีค่าเท่ากับจำนวนของเอนไซม์ที่สามารถลดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.001 ภายในเวลา 5 นาที

4. พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

เพาะสปอร์แขวนลอย 1 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ใน sawdust medium ปริมาตร 10 มิลลิกรัม ปรับความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายเกลือแร่ที่มีพีเอชเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 และ 9.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอนไซม์และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3

5. อุณหภูมิที่เหมาะสม

เพาะสปอร์แขวนลอย 1 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ใน sawdust medium ปริมาตร 10 มิลลิกรัม ปรับความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายเกลือแร่ที่มีพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 30 35 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอนไซม์และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3

6. ช่วงเวลาที่เหมาะสม

เพาะสปอร์แขวนลอย 1 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ใน

sawdust medium ปริมาตร 10 มิลลิกรัม ปรับความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายเกลือแร่ที่มีพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4 บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5 เป็นเวลา 3 5 7 และ 9 วัน เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอนไซม์และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3

7. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

เพาะสปอร์แขวนลอย 1 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ใน sawdust medium ที่มีปริมาณขี้เลื่อยระดับต่างๆ คือ 3 5 7 9 11 13 และ 15 กรัมต่อลิตร ปรับความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายเกลือแร่ที่มีพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4 บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5 เป็นเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 6 เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอนไซม์และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3

8. ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเหนี่ยวนำ

เพาะสปอร์แขวนลอย 1 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ใน sawdust medium ที่มีขี้เลื่อยปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 7 และมีปริมาณกัวอีคอลระดับต่างๆ คือ 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายเกลือแร่ที่มีพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4 บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5 เป็นเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 6 เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอนไซม์และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์เอนไซม์ฟอกสีเมลานิน

ทำการเก็บตัวอย่างในบริเวณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ได้แก่ตัวอย่างดินบริเวณโคนต้นไม้ใหญ่ ตัวอย่างอากาศ ตัวอย่างน้ำเสีย และตัวอย่างเส้นผม รวมทั้งหมด 13 ตัวอย่าง มาทำการแยกเชื้อบนอาหาร melanin agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-30 วัน ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อที่ให้บริเวณใสได้จำนวน 7 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลทคือ ไอโซเลท MA3, MS1, MS2, และ MH1 และเชื้อรา จำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท MA1, MA2, และ MA4 ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 7 ไอโซเลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ melanin agar medium ผลการทดลองพบว่า ไอโซเลท MA4 มีค่า enzyme activity ratios สูงสุดเท่ากับ 2.04 ในระยะเวลา 3 วัน รองลงมาคือ ไอโซเลท MA1 มีค่า enzyme activity ratios สูงสุดเท่ากับ 1.45 ในระยะเวลา 4 วัน จึงคัดเลือกไอโซเลท MA4 ซึ่งคัดแยกได้จากอากาศเพื่อการทดลองต่อไป

2. การจัดจำแนกเชื้อโดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

จากการนำเชื้อราไอโซเลท MA4 มาจัดจำแนกระดับสปีชีส์ด้วยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) rDNA โดยใช้ primer ITS5 และ ITS4 และนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส แล้วนำลำดับเบสนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบหาลำดับเบสที่เหมือนกันที่สุดในฐานข้อมูลของ EMBL database โดยใช้ BLAST search ผลการสืบค้นข้อมูลพบว่า ลำดับเบสของเชื้อราไอโซเลท MA4 สอดคล้อง 100 เปอร์เซ็นต์กับลำดับเบสของ *Aspergillus flavus* isolate TDPEF52 ดังนั้นเชื้อราไอโซเลท MA4 คือ *Aspergillus flavus* MA4

3. กระบวนการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

จากการศึกษากระบวนการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *A. flavus* MA4 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมื่อหมักแบบอาหารเหลว เชื้อราจะผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 1.08 units/ml ส่วนการหมักแบบอาหารแข็ง เชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 35.29 units/ml ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA4 ด้วยกระบวนการ

หมักแบบอาหารแข็งจึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์หยาบสาหรับการฟอกสีเมลานินต่อไป

4. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง

4.1 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0, 8.0 และ 9.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 32.17 32.74 36.88 35.17 34.27 และ 33.41 units/ml ตามลำดับ ดังนั้น พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยการหมักแบบอาหารแข็งคือ พีเอชเท่ากับ 6.0 ซึ่งเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 36.88 units/ml ดังแสดงในภาพที่ 1

4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA 4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 35 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 40.18 38.10 35.41 และ 33.63 units/ml ตามลำดับ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยการหมักแบบอาหารแข็งคือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุดเท่ากับ 40.18 units/ml ดังแสดงในภาพที่ 2

4.3 ช่วงเวลาที่เหมาะสม

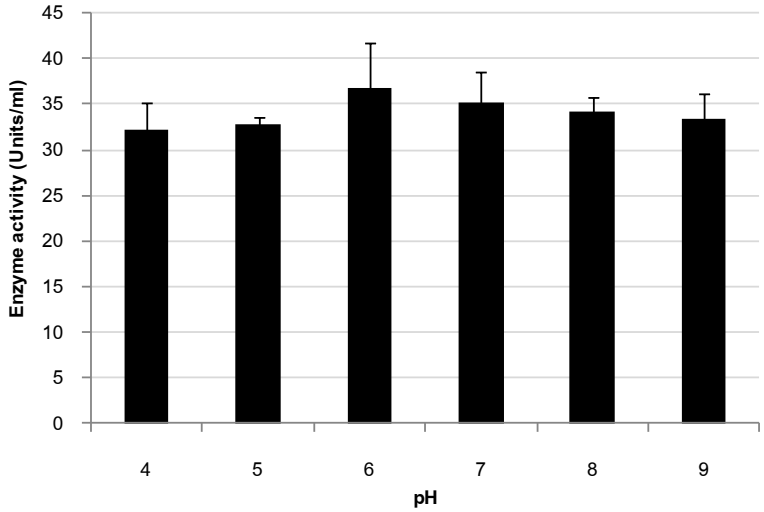
การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA 4 เพื่อผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium พีเอชเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตามช่วงเวลาต่างๆ ผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการหมักในช่วงเวลา 3 5 7 9 และ 11 วัน เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 34.78 32.24 32.24 32.04 และ 32.55 units/ml ตามลำดับ ดังนั้นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยการหมักแบบอาหารแข็งคือ 3 วัน ซึ่งเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุดเท่ากับ 34.78 units/ml ดังแสดงในภาพที่ 3

4.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

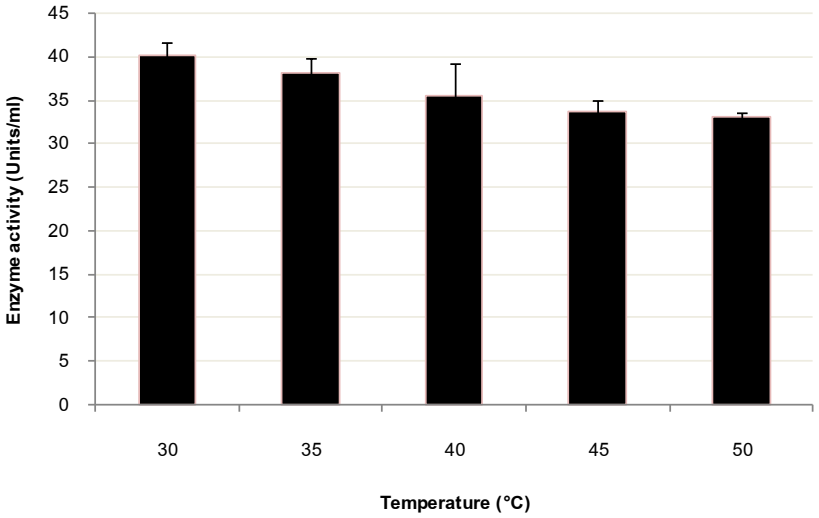
การใช้ขี้เลื่อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA 4 เพื่อผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium โดยปรับปริมาณความเข้มข้นของขี้เลื่อย เท่ากับ 3 5 7 9 11 13 และ 15 กรัม พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 33.53 34.99 34.54 38.80 40.03 38.90 และ 39.13 units/ml ตามลำดับ ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นของขี้เลื่อยที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยการหมักแบบอาหารแข็งคือ 11 กรัม ซึ่งเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุดเท่ากับ 40.03 units/ml ดังแสดงในภาพที่ 4

4.5 ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเหนี่ยวนำ

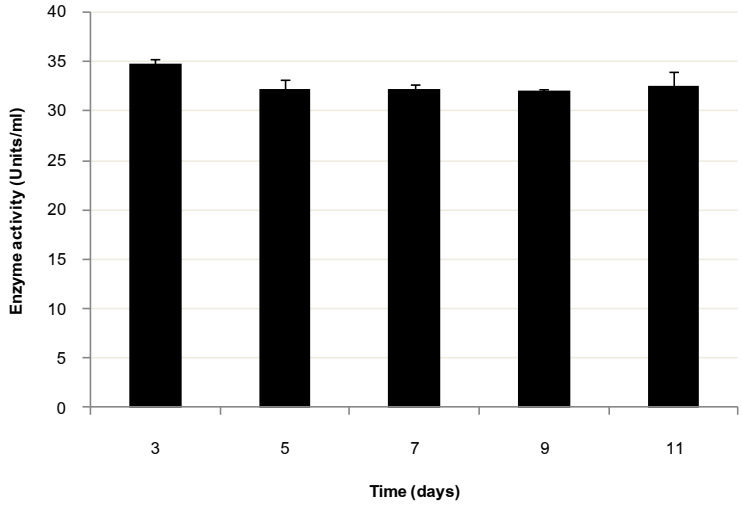
การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของกัวอีคอลในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA 4 เพื่อผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีปริมาณความเข้มข้นของกัวอีคอลเท่ากับ 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 มิลลิกรัม พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 36.31 40.03 41.54 37.23 37.47 36.41 และ 36.73 units/ml ตามลำดับ ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นของกัวอีคอลที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยการหมักแบบอาหารแข็งคือ 3.0 กรัม ซึ่งเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุดเท่ากับ 41.54 units/ml ดังแสดงในภาพที่ 5



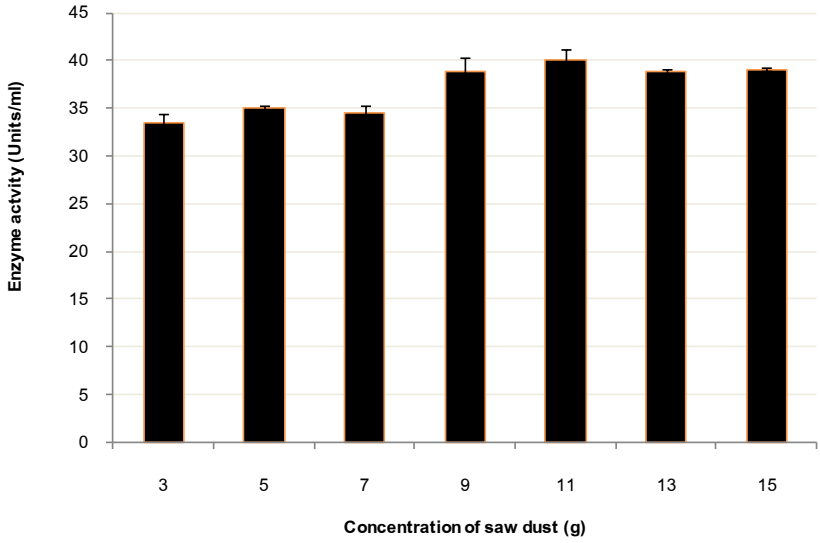
ภาพที่ 1 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) จากเชื้อรา *A. flavus* MA4 ที่เพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับต่างๆ



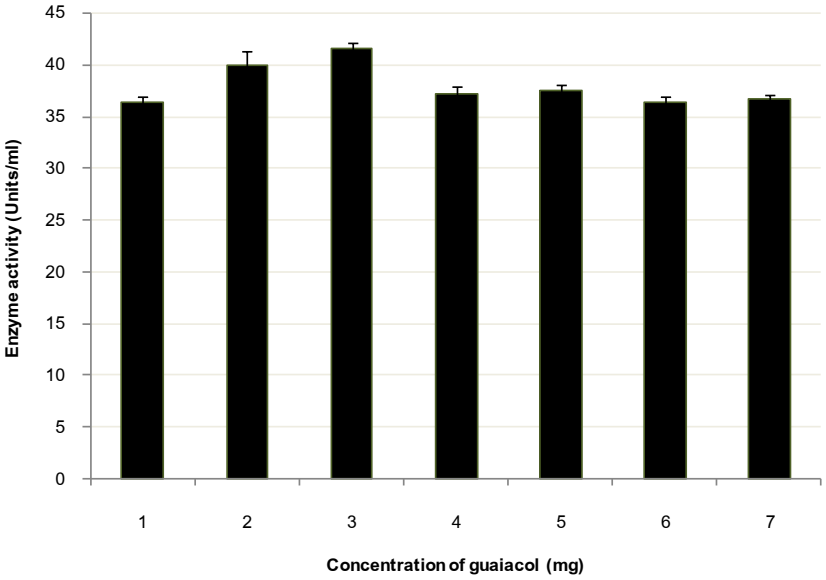
ภาพที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) จากเชื้อรา *A. flavus* MA4 ที่เพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 3 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) จากเชื้อรา *A. flavus* MA4 ที่เพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium บ่มในช่วงเวลาต่างๆ



ภาพที่ 4 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) จากเชื้อรา *A. flavus* MA4 ที่เพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีปริมาณความเข้มข้นของขี้เลื่อยระดับต่างๆ



ภาพที่ 5 กิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน (units/ml) จากเชื้อรา *A. flavus* MA4 ที่เพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium ที่มีความเข้มข้นของกัวอีคอลที่ระดับต่างๆ

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

เมื่อนำเชื้อราไอโซเลท MA4 มาจัดจำแนกระดับสปีชีส์และเปรียบเทียบหาลำดับเบสที่เหมือนกันที่สุดในฐานข้อมูลของ EMBL database โดยใช้ BLAST search พบว่าลำดับเบสของเชื้อราไอโซเลท MA4 สอดคล้อง 100 เปอร์เซ็นต์กับลำดับเบสของ *A. flavus* isolate TDPEF52 ดังนั้นเชื้อราไอโซเลท MA4 คือ *A. flavus* MA4 มีรายงานวิจัยหลายฉบับกล่าวว่า เชื้อราหลายชนิดมีกิจกรรมฟอกสีเมลานินได้แก่ *Aspergillus fumigatus* ที่แยกจากดินกองปุ๋ยที่ประกอบด้วยกากเมล็ดกาแฟและเศษใบไม้ [6] *Acrostaphylus* sp. a fungi imperfecti [7] *Phanerochaete chrysosporium* ซึ่งเป็น ligninolytic white rot fungus [8], *Galactomyces geotrichum* VTT-D-84228 [9], *Sporotrichum pruinosum* [5], *Ceriporiopsis* sp. [2]

กระบวนการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *A. flavus* MA4 คือ กระบวนการหมักแบบอาหารแข็งหรือ solid state fermentation โดยใช้ขี้เลื่อยเป็นซับสเตรต เชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 35.29 units/ml ภายในเวลา 7 วัน ส่วนกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว เชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 1.08 units/ml ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ทั้งนี้เพราะกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งเหมาะสำหรับการผลิตเอนไซม์โดยเชื้อราเนื่องจากมีปริมาณน้ำอิสระน้อยหรือมีปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ประโยชน์ (a_w, available water) ค่อนข้างต่ำ เชื้อราจะเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย จึงเป็นการลดปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีข้อดีคือ มีค่าใช้จ่ายด้านการให้อากาศต่ำและลดต้นทุนการกำจัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิต กากหรือของเหลือทิ้งจากกระบวนการหมักสามารถกำจัดได้ง่ายและสามารถนำไปปรับปรุงเป็นปุ๋ยได้ [10]

กระบวนการหมักแบบอาหารเหลวไม่เหมาะสำหรับเชื้อราโดยเฉพาะอย่างยิ่งหากใช้ถังหมักหรือถังปฏิกรณ์แบบถังกวน (stirred tank) เพราะเส้นใยจะไปเกาะพันกับใบพัด (stirrer) ทำให้มีปัญหากับการกวนและการให้อากาศ แต่สามารถปรับปรุงได้โดยใช้เทคโนโลยีการตรึง

เซลล์และเลือกใช้ถังปฏิกรณ์ที่เหมาะสมเช่น ถังปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์-เบดและถังปฏิกรณ์แบบฟิกซ์เบด Sarnthima และคณะ [11] และ Khammuang และ Sarnthima [12] ทำการผลิตเอนไซม์แล็กเคสที่มีประสิทธิภาพในการฟอกสีเมลานินโดยใช้เชื้อรา *Lentinus polychrous* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งที่ประกอบด้วยรำข้าวและฟางข้าวเป็นซับสเตรต โดยอาหารแข็ง รำข้าว จะให้กิจกรรมแล็กเคส 1,449 U/L หลังการเพาะเลี้ยง 21 วัน ส่วนอาหารแข็งฟางข้าวจะให้กิจกรรมแล็กเคส 1,425 U/L หลังการเพาะเลี้ยง 21 วัน อย่างไรก็ตาม Mohorčič และคณะ [5] ทำการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยใช้เชื้อรา *Sporotrichum pruinosum* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลวหรือ submerge fermentationในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร พบว่า เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 140 Units/L ภายในเวลา 200 ชั่วโมงหรือ 8.33 วัน นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อราเจริญเป็นแผ่นฟิล์มตามด้านข้าง ด้านล่างของถังปฏิกรณ์ รวมทั้งเจริญตามใบพัด

พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *A. flavus* MA 4 คือ พีเอช 6.0 โดยเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 36.88 units/ml เชื้อราส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงพีเอช 2-10 แต่พีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4-6 ซึ่งเป็นกรด ดังนั้นในสภาวะที่เป็นกรดจะทำให้เชื้อราเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย และในสภาวะที่เหมาะสมเชื้อราจะสามารถสร้างสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Nakasaki และคณะ [2] ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *Ceriporiopsis* sp. MD-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งมีส่วนประกอบของมอลต์สกัดและกลูโคส พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 6.0 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่มีประสิทธิภาพในการฟอกสีเมลานินจากผมของมนุษย์ได้

Rättö และคณะ [9] ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *G. geotrichum* VTT-D-84228 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีพีเอชเท่ากับ 6.5 เพื่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน Mohorčič และคณะ [5] ทำการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยใช้เชื้อรา *S. pruinosum* โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *A. flavus* MA 4 คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 40.18 units/ml เชื้อรามีช่วงอุณหภูมิในการเจริญได้แคบกว่าแบคทีเรีย ส่วนมากเจริญที่อุณหภูมิ 0-35 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส บางชนิดเป็นพวก thermophilic fungi สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Nakasaki และคณะ [2] รายงานว่าเชื้อ *Ceriporiopsis* sp. MD-1 เป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่มีประสิทธิภาพในการฟอกสีเมลา-นินจากผมของมนุษย์โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Mohorčič และคณะ [5] ผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยใช้เชื้อรา *S. pruinosum* โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินโดยเชื้อรา *A. flavus* MA 4 คือ เมื่อทำการหมักเชื้อราเป็นเวลา 3 วัน ซึ่งเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินเท่ากับ 34.78 units/ml และช่วงเวลาที่มีการเจริญของเชื้อราที่ดีที่สุด คือเมื่อทำการหมักเชื้อราเป็นเวลา 3 วัน ตัวอย่างเซลล์มีน้ำหนักเท่ากับ 1.74 กรัม ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าเชื้อรา *S. pruinosum* ซึ่งใช้เวลา 10 วันในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน [5]

ปริมาณขี้เลื่อยหรือซับสเตรตหรือแหล่งคาร์บอนที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานิน โดยเชื้อรา *A. flavus* MA 4 พบว่า ปริมาณความเข้มข้นของขี้เลื่อยที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินคือ 11 กรัม เชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุดเท่ากับ 40.03 units/ml การใช้ขี้เลื่อยเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากขี้เลื่อยมีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบจำนวนมากโดยเฉพาะเซลลูโลส เฮมิ-เซลลูโลส และลิกนินที่มีหมู่โพลีฟีนอล แม้ว่าโครงสร้างของเมลานินยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัด Prota [13] รายงานว่า เมลานินเป็นสารเฮตเทอโรจีนัสพอลิเมอร์ประกอบด้วยสารจำพวกอินโดลที่เชื่อมต่อกัน

ด้วยพันธะโควาเลนซ์ Woo และคณะ (2004) [4] รายงานว่าเมลานินมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบในเซลล์พืชและถ่านหิน เนื่องจากประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลและอินโดลมาต่อกันเป็นพอลิเมอร์เช่นเดียวกัน ดังนั้น การนำขี้เลื่อยซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการแปรรูปไม้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium เพื่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินจึงเป็นการนำวัตถุดิบธรรมชาติที่มีราคาถูกมาช่วยลดต้นทุนการผลิตเหมาะสำหรับการขยายขนาดในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ปริมาณความเข้มข้นของกัวอีคอล (guaiacol) ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ sawdust medium เพื่อการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินจากเชื้อรา *A. flavus* MA 4 โดยการหมักแบบอาหารแข็งคือ 3.0 มิลลิกรัม ซึ่งเชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุดเท่ากับ 41.54 units/ml กัวอีคอลเป็นสารต้นตอของสารให้กลิ่นรสหลายชนิด เช่น ยูจีนอล (eugenol) และวานิลลิน (vanillin) [14] กัวอีคอลเป็นผลจากปฏิกิริยาไพโรไลซิสของลิกนิน จึงพบได้ในควันไม้และน้ำมันรักษาเนื้อไม้ [15] Khammuang and Sarnthima (2013) [12] ศึกษาการฟอกสีเมลานินสังเคราะห์โดยเอนไซม์หยาบของแลคเคส (crude laccase) ที่สังเคราะห์โดย *L. polychrous* พบว่า การเติมสารวานิลลินที่ระดับความเข้มข้น 1.0 mmol/L ลงในปฏิกิริยาจะทำให้กิจกรรมฟอกสีเมลานินมีค่าเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่ากระบวนการหมักที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* MA 4 คือ กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง และสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงคือ ปริมาณขี้เลื่อยและกัวอีคอลเท่ากับ 11 กรัมและ 3 มิลลิกรัมตามลำดับ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอกสีเมลานินสูงสุด ซึ่งการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการผลิตเอนไซม์ฟอกสีเมลานินในระดับขยายขนาดเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมสีผมอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่สำหรับทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

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

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

[3] เคมี กับ "การเปลี่ยนสีผม" http://www.nsm.or.th /index.php Accessed 12 มีนาคม 2559

[4] Woo, S.H., J.S. Cho, B.S. Lee, and E.K. Kim. 2004. " Decolorization of melanin by lignin peroxidase from Phanerochaete chrys-osporium**" . Biotechnology and Biopro-cess Engineering**. 9: 256-260.

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

[6] Luther, J.P., and H. Lipke. 1980. "Degradation of melanin by *Aspergillus fumigatus*" **. Applied and Environmental Micro- biology**. 40: 145-155.

[7] Liu, Y.T., S.H. Lee, and Y.Y. Liao. 1995. “Isolation of a melanolytic fungus and its hydrolytic activity on melanin”. **Myco- logia**. 87: 651-654.

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

[9] Rättö, M., M. Chatani, A.C. Ritschkoff, and L. Viikari. 2001. “ Screening of microorg-anisms for decolorization ofmelanins produced by bluestain fungi”. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 55: 210-213.

[10] ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2556. **เอนไซม์เทคโนโลยี**. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

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

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

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

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