



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟท์และแซปโพรไฟท์ที่มีความสามารถในการผลิต
เอ็นไซม์ย่อยสลายเมลานินเพื่อประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง
Screening of Endophytic and Saprobic Fungi Producing Melanin
Degrading Enzymes Potential Application in Cosmetics

โดย

อิทธิญากรณ์ พรหมพุกธา และคณะ

พฤศจิกายน พ.ศ. 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟท์และแซปโพรไฟท์ที่มีความสามารถในการผลิต
เอนไซม์ย่อยสลายเมลานินเพื่อประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง
Screening of Endophytic and Saprobic Fungi Producing Melanin
Degrading Enzymes Potential Application in Cosmetics

คณะผู้วิจัย

อิทธิยากรณ์ พรหมพุดา มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินอุดหนุนการวิจัยตลอดโครงการวิจัย ขอขอบคุณนางสาวซัมซัม อีรุล และ นางสาวธนวรรณ โรจน์ปิติกุล นักศึกษาสาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ที่ได้ช่วยดำเนินการวิจัยบางส่วน of โครงการนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในห้องปฏิบัติการชีววิทยา ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่ได้สนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการวิจัย และอำนวยความสะดวกให้ตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ดร. อิทธิญากรณ์ พรหมพุทธา

บทสรุปผู้บริหาร

ในปัจจุบันมีการนำสารเคมีสังเคราะห์และสารสกัดธรรมชาติหลายชนิดมาใช้เป็นส่วนประกอบของตำรับเครื่องสำอางเพื่อให้ผิวขาว ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานิน ยับยั้งกระบวนการขนส่งเมลานิน หรือออกฤทธิ์ลอกเซลล์ผิวหนึ่ง แต่พบรายงานว่าสารเหล่านี้ก่อให้เกิดการระคายเคือง ผิวหนังอักเสบ หรือผิวไวต่อแสงได้ จากปัญหาเหล่านี้ จึงเกิดงานวิจัยเพื่อทางเลือกใหม่ที่จะทำให้ผิวขาวขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยกว่าวิธีเดิมคือ จะไม่ยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานิน แต่จะทำให้สีของเมลานินที่สร้างขึ้นมาแล้วจางลง หรือการย่อยสลายเมลานิน (melanin degradation) โดยเอนไซม์จากแหล่งกำเนิดธรรมชาติ ซึ่งน่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ที่น่าจะได้รับการยอมรับมากกว่าการใช้สารเคมีในตำรับเครื่องสำอาง

ที่ผ่านมาพบว่า เอนไซม์จากเชื้อราแซปโพรไฟท์และเห็ดบางชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ แต่ยังไม่เคยมีรายงานว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก มีความสามารถดังกล่าวหรือไม่ จึงตั้งสมมุติฐานว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ในพืชอาจมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถทำให้ผิวขาวได้เช่นเดียวกับเชื้อรากลุ่มอื่นๆ ที่เคยมีรายงานมาแล้ว

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืช ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ ซึ่งอาจจะมีความสามารถในการทำให้ผิวขาวขึ้น และคาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางได้ โดยทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรไทย และ/หรือ พืชทั่วไป แล้วนำไปคัดกรองหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เคยมีรายงานว่าสามารถย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ ด้วยวิธีคัดกรองบนอาหารแข็ง และด้วยวิธีคัดกรองในอาหารเหลว (วิธีใหม่) แล้วคัดเลือกเชื้อราที่ให้ผลการคัดกรองเป็นบวกระดับสูง ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส วัดกิจกรรมเอนไซม์ และวัดค่าความสามารถของเอนไซม์ในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 4 ไอโซเลทให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงและสามารถทำให้สีของเมลานินสังเคราะห์ในปฏิกิริยาทดสอบจางลงได้ มี 1 ไอโซเลทที่ถูกเลือกเพื่อศึกษาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ จนได้กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า และมีความสามารถในการทำให้สีของเมลานินสังเคราะห์จางลงมากกว่าเอนไซม์ที่ได้จากสภาวะก่อน optimization

จากงานวิจัยนี้ทำให้ได้เชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลง ซึ่งสามารถนำไปทำวิจัยต่อยอดเพื่อพัฒนาและประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางเพื่อผิวขาวต่อไป และผลงานวิจัยนี้ยังได้เผยแพร่ในวงวิชาการในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ในรูปแบบ Proceeding และ poster ดังนี้

- 1) **Promptuttha I**, Hyde KD. 201x. An alternative approach for melanin lightening by lignin peroxidase from endophytic fungi. Letters in Applied Microbiology (in preparation)
- 2) **Promptuttha I**, Hyde KD. 2012. An alternative approach for melanin decolorization using biological-origin lignin peroxidase from endophytic and saprobic fungi. In Proceedings of The 4th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 4) (November 28–30, 2012, Chiang Mai Orchids Hotel, Chiang Mai, Thailand, pp. **224–227**.
- 3) **Promptuttha I.** and Hyde K.D. 2012. An alternative approach for melanin decolorization using biological-origin lignin peroxidase from endophytic and saprobic fungi. In The 4th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 4), November 28–30, 2012, Chiang Mai Orchids Hotel, Chiang Mai, Thailand. **[Poster]**
- 4) **Promptuttha I.**, Arour Z., Rojpitikul T., and Hyde K.D. 2011. Screening of melanin decolorizing ability of endophytic fungi. Chiang Mai International Conference on Biomaterials & Applications CMICBA2011, 9–10 August 2011, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand. **[Poster]**.

บทคัดย่อ

เชื้อราแซบโพรไฟท์และเห็ดบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ แต่ยังไม่เคยมีรายงานว่าเชื้อราเอนโดไฟท์มีความสามารถดังกล่าวหรือไม่ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ เพื่อหาแนวทางประยุกต์ใช้เป็นสารทำให้ผิวขาวจากธรรมชาติในตำรับเครื่องสำอาง โดยแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ 332 ไอโซเลท จากพืช 21 สายพันธุ์ และคัดกรองเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสด้วยวิธีคัดกรองแบบดั้งเดิมบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของสี Azure B และวัดผลจากโซนใสรอบๆ โคโลนีเชื้อรา และคัดกรองในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของสี Azure B แล้ววัดผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของ Azure B แล้วคำนวณค่าร้อยละการทำให้สี Azure B จางลง (% decolorization) ซึ่งเป็นวิธีใหม่ พบว่าวิธีใหม่มีความเหมาะสมสำหรับการคัดกรองลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรา โดยจะประเมินผลคัดกรองเป็นบวกเมื่อ %decolorization มีค่า ≥ 70 ซึ่งการคัดกรองด้วยวิธีใหม่นี้จะช่วยประหยัดเวลาและต้นทุน เนื่องจากสามารถทดสอบเชื้อราหลายไอโซเลทได้ในคราวเดียว ใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อน้อย (10 มล/ไอโซเลท) และได้ผลการคัดกรองในเชิงปริมาณเป็นเบื้องต้นอีกด้วย ในขณะที่วิธีแบบดั้งเดิมจะทำได้เพียง 1 ไอโซเลทต่ออาหารแข็ง 1 จาน (25 มล/ไอโซเลท) จากการคัดกรอง พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ 14 ไอโซเลท ให้ผลเป็นบวกกับทั้งสองวิธี โดยมีค่า %decolorization ≥ 95 โดยเมื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้ในอาหารเหลวแล้ว พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ MPO3 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด ซึ่งมีค่าสูงถึง 439 ยูนิต/มล. เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด และสามารถทำให้สีของเมลานินสังเคราะห์จางลงได้ประมาณ 36% การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อราเอนโดไฟท์อาจจะสามารถประยุกต์ใช้ในตำรับเครื่องสำอางเพื่อผิวขาวได้ และเนื่องจากเอนไซม์นี้ผลิตได้จากแหล่งชีวภาพ ดังนั้นจึงน่าจะเป็นสารที่ได้รับการยอมรับมากกว่าการใช้สารเคมีในตำรับเครื่องสำอาง

คำสำคัญ: เชื้อราเอนโดไฟท์, เมลานิน, สารทำให้ผิวขาว, ลิกนินเปอร์ออกซิเดส, เอนไซม์

ABSTRACT

Various species of saprobic fungi and mushroom have been reported to produce specific enzyme to degrade synthetic melanin and hypothesized that fungal enzyme could produce melanolytic activity which may potential application in cosmetics. However, endophytic fungi have never been reported for its application in melanolytic activity. This study aimed to investigate an alternative approach of melanin lightening through activity of lignin peroxidase (LiP) from endophytic fungi, which may help to avoid the adverse effects of chemical to skin. The 332 endophytic fungi isolated from 21 plant species were screened for LiP activity using traditional azure B agar medium together with a new introduce azure B liquid medium methods. The production of LiP with agar medium method was observed as clearance diameter of blue colored medium around fungal colony, while %decolorization of azure B was measured for analysis of LiP production under liquid medium method. A positive result of new screening method was interpreted from an occurrence of $\geq 70\%$ azure B decolorization. All positive strains were subjected to produce LiP in liquid medium, assayed for enzyme activity, and assessed melanin decolorization ability. Fourteen endophytes were signified as strongly positive since they showed $\geq 95\%$ azure B decolorization in liquid medium screening methods. Of these, isolate MP03 expressed highest activity of LiP and when cultured under optimized conditions, enzyme activity was expressed as high as 439 units/ml which able to reduced melanin pigment about 36%. This study demonstrated that LiP from endophytic fungi may possible to use as melanin lightening agent in whitening-cosmetic formulation. This approach appears to be importance because the enzyme is a biological origin and will be more acceptable for cosmetic purpose than chemical formulations.

Keywords: Endophytic fungi, Enzyme, Lignin peroxidase, Melanin, Whitening agent

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(3)
บทสรุปผู้บริหาร	(4)
บทคัดย่อ	(6)
ABSTRACT	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(9)
สารบัญภาพ	(10)
อักษรย่อและสัญลักษณ์	(12)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	20
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	36
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	
Proceeding	44

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3-1 พืชตัวอย่างสำหรับแยกเชื้อราเอนโดไฟท์	10
ตารางที่ 3-2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับฆ่าเชื้อบนผิวของชิ้นพืชแต่ละส่วน	12
ตารางที่ 3-3 สูตรอาหารแข็ง LME basal medium (LBM) (Stephen, 1999)	13
ตารางที่ 3-4 Reaction mixture ในการวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส	16
ตารางที่ 3-5 Reaction mixture การวัดความสามารถของเอนไซม์ ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลง	17
ตารางที่ 4-1 จำนวน และ Isolation code ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ จากพืชตัวอย่าง 21 ชนิด	20
ตารางที่ 4-2 ผลการคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถสร้าง เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส บนอาหารแข็ง LBM-Azure B agar medium โดยวัดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อรา	21
ตารางที่ 4-3 ผลการคัดกรองการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสใน อาหารเหลวของเชื้อราที่มีผลคัดกรองเป็นบวกบนอาหารแข็ง	26
ตารางที่ 4-4 กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ 14 ไอโซเลท	29

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 3-1 ลักษณะชิ้นส่วนพืชตัวอย่างที่ตัดให้ได้ขนาดเหมาะสม ก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่ผิว เพื่อแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ (A) ใบ (B) กิ่ง	12
ภาพที่ 3-2 ลักษณะการเจริญของเชื้อราเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อพืชบนจานอาหาร (A) การวางชิ้นพืชบนจานอาหาร PDA (B) เส้นใยเชื้อราเอนโดไฟท์ เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืช (C) เชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ในจานเพาะ เลี้ยงเดี่ยว	12
ภาพที่ 3-3 เชื้อราเอนโดไฟท์เจริญบนอาหาร LBM–Azure B agar medium (A) เชื้อราไม่เจริญบนอาหารและผลัดครองเป็นลบ (B) เชื้อราเจริญบน อาหารแต่ผลัดครองเป็นลบ (C) ผลัดครองเป็นบวก (D) ผลัด ครองเป็นบวกในระดับสูง	14
ภาพที่ 3-4 แสดงวิธีการคัดกรองความสามารถของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์ ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารเหลว LBM medium (A) การ inoculate อาหารที่มีเชื้อราจำนวน 5 discs ลงในอาหารเหลว LBM medium (B) สภาวะการบ่มเชื้อในเครื่องเขย่า (C) ลักษณะเชื้อที่เจริญหลังจากบ่มนาน 10 วัน (D) ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการเติม 0.01% (w/v) Azure B ทันที เปรียบเทียบกับ control (หลอดกลาง) (E–F) ลักษณะอาหาร เลี้ยงเชื้อที่บ่มนาน 24 ชั่วโมง หลังจากเติม 0.01% (w/v) Azure B (F) ลักษณะการจางลงของสี Azure B ในระดับที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบกับ control (หลอดซ้ายสุด)	15
ภาพที่ 4-1 ลักษณะโคโลนีเชื้อราอายุ 7 วัน บนอาหารแข็ง PDA	30
ภาพที่ 4-2 ความสามารถในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงของเอนไซม์ ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรา TM25, MP26, MP29 และ MP03	31

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4-3 กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหาร LBM ที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ บ่มนาน 7 วัน	32
ภาพที่ 4-4 กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหาร LBM ที่มี 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่า pH ต่างๆ บ่มนาน 7 วัน	32
ภาพที่ 4-5 กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหาร LBM ที่มี 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 6.0 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 7 วัน	33
ภาพที่ 4-6 กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหาร LBM ที่มี 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 6.0, บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ด้วยระยะเวลาบ่มนานต่างๆ กัน	34
ภาพที่ 4-7 ความสามารถในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรา MP03 ที่เพาะเลี้ยงใน optimized condition เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตได้ในสภาวะก่อน optimization	35

อักษรย่อและสัญลักษณ์

ซม.	:	เซนติเมตร
มม.	:	มิลลิเมตร
มล.	:	มิลลิลิตร
°ซ	:	องศาเซลเซียส
Abs	:	Absorbance
CT	:	Contaminate
hrs	:	Hours
LBM	:	LME basal medium
ml	:	Milliliter
mM	:	Milli molar
MnP	:	Manganese peroxidase
NA	:	Data not available
NG	:	No growth
nm	:	Nanometer
PDA	:	Potato dextrose agar
rpm	:	Revolutions per minute
w/v	:	weight by volume
μl	:	Microliter
%	:	Percentage

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาวิจัย

เม็ดสีผิวที่เรียกว่าเมลานิน (melanin) ถูกสร้างมาจากเซลล์ที่เรียกว่าเมลานोไซต์ (melanocyte) ที่อยู่ในชั้นผิวหนังกำพร้าส่วนสตราตัม บาซาล (stratum basale) เมลานินจะบรรจุอยู่ในเมลานโซม (melanosome) ซึ่ง melanosome นี้จะสามารถกระจายตัวไปยังเซลล์อื่นๆ ของชั้นผิวหนัง เช่น คีราติโนไซต์ (keratinocyte) การกระจายตัวของเมลานินในผิวหนังของแต่ละคนจะแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้สีผิวมีระดับความขาว-คล้ำ ที่แตกต่างกันออกไป (Young, 2006)

ความผิดปกติของสีผิวที่ถือว่าเป็นปัญหามากในวงการแพทย์และเครื่องสำอาง คือ การที่ผิวหนังสร้างเม็ดสีผิวที่มากเกินไป ส่งผลให้มีสีผิวที่คล้ำเกินความต้องการ (hyperpigmentation) ปัญหานี้คงไม่ค่อยมีผลกระทบต่อความรู้สึกของคนตะวันตกที่มีผิวขาว เพราะคนเหล่านี้ปรารถนาที่จะมีสีผิวที่เข้มที่เรียกกันคุ้นหูว่าผิวสีแทนมากกว่าผิวขาวซีด แต่คนแถบเอเชียส่วนใหญ่โดยเฉพาะผู้หญิง มักปรารถนาที่จะมีผิวขาวมากกว่า ดังนั้นผลิตภัณฑ์ปรับสีผิวให้ขาวขึ้นจึงมีอิทธิพลต่อคนผิวสีคล้ำมาก ทำให้ในเครื่องสำอางหรือเวชสำอางหลายๆ ชนิดได้มีการผสมสารออกฤทธิ์ที่เชื่อว่าจะทำให้ผิวขาวขึ้น (Rendon and Gaviria, 2005) เพื่อดึงดูดความสนใจของคนผิวคล้ำทั้งหลายเข้ามาทดลองใช้ ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้มีทั้งประทับใจเพราะขาวขึ้น หรือไม่มีการเปลี่ยนแปลง บางคนมีอาการแพ้ต่อเครื่องสำอางนั้นๆ ทำให้ผิวแฉะลงกว่าเดิม หรือขาวขึ้นแต่เมื่อหยุดใช้เครื่องสำอางนั้นๆ แล้วทำให้ผิวคล้ำขึ้นกว่าเดิม จากปัญหาต่างๆ เหล่านี้ การค้นหาสารทำให้ผิวขาวที่มีประสิทธิภาพทั้งการทำให้ขาวขึ้นจริงและปลอดภัยจึงยังต้องดำเนินต่อไป โดยพยายามค้นหาจากหลายๆ ต้นกำเนิด ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดจากพืชสมุนไพร เชื้อจุลินทรีย์ หรือสารเคมีสังเคราะห์ต่างๆ (Akhtar *et al.*, 2012; Boissy *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Mohamad *et al.*, 2010; Momtaz *et al.*, 2008; No *et al.*, 1999; Parvez *et al.*, 2006; Seiberg *et al.*, 2000)

ผลิตภัณฑ์ทำให้ผิวขาวมักใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานิน ได้แก่ สารประกอบของปรอท (mercury compounds) ไฮโดรควิโนน (hydroquinone) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ในกระบวนการสร้างเมลานิน ทั้งนี้สารประกอบของปรอทจัดเป็นสารอันตรายที่ทำให้เกิดอาการแพ้ ผื่นแดง ผิวบาง และเกิดรอยดำ บนใบหน้า และอาจทำให้เกิด

การสะสมพิษของปรอทซึ่งเป็นโลหะหนักอันตราย ทางเดินปัสสาวะอีกเสบ และไตอีกเสบ เป็นต้น ไฮโดรควิโนโนนทำให้ระคายเคือง เกิดจุดต่างขาว ผิวดำต่อแสง ผิวด่างและคล้ำดำในที่สุด หรืออาจเกิดฝ้าอย่างถาวรได้ ดังนั้นกระทรวงสาธารณสุขจึงประกาศห้ามใช้สารชนิดนี้ในเครื่องสำอาง (Al-Saleh *et al.*, 2004; Boissy *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; del Giudice and Yves., 2002; Dooley, 1997; Kim and Uyama, 2005; Matsubayashi *et al.*, 2003; Mauricio *et al.*, 2011; Mohamad *et al.*, 2010; Rendon and Gaviria, 2005; Seiberg *et al.*, 2000; Sugimoto *et al.*, 2004)

ในปัจจุบันมีการนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดมาใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ทำให้ผิวขาว ได้แก่ อาร์บูติน (arbutin) วิตามินซี (ascorbic acid) และอนุพันธ์ของมัน เช่น magnesium ascorbyl phosphate และกรดอ่อน kojic acid สารชนิดนี้มีผลรบกวนการสร้างเมลานินและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant) อย่างไรก็ตามพบว่ามีรายงานการทำให้เกิดอาการระคายเคือง ผื่นแพ้ หรือผิวดำอีกเสบได้บ้าง (Boissy *et al.*, 2005; Ha *et al.*, 2001; Parvez *et al.*, 2006; Sugimoto *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังพบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชอีกหลายชนิดมีฤทธิ์ทำให้ผิวขาว เช่น mulberry extract (Akhtar *et al.*, 2012) และ licorice extract (Parvez *et al.*, 2006) เป็นต้น สารที่ออกฤทธิ์ลอกเซลล์ผิวดำชั้นบนสุด (keratolytic) จัดเป็นสารทำให้ผิวขาวชนิดหนึ่งที่ช่วยลอกผิวดำชั้นบนสุดออกไป ทำให้สีผิวดำและสดใสขึ้น สารในกลุ่มนี้ได้แก่ กรดวิตามินเอ (retinoic acid หรือ tretinoin) สารชนิดนี้มีฤทธิ์ระคายเคืองผิวดำ และทำให้ผิวดำบางลง (Kasraee *et al.*, 2003)

สารออกฤทธิ์เพื่อทำให้ผิวขาวขึ้นในปัจจุบันนี้ ส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์รบกวนกระบวนการสร้างเมลานินโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase หรือยับยั้งกระบวนการขนส่ง melanosome ไปยัง keratinocyte อย่างไรก็ตามสารยับยั้งการสร้างเมลานินที่ใช้กันอยู่นี้อาจมีผลข้างเคียงหรืออาจเกิดพิษต่อร่างกายได้ หรือวิธีการใช้สารออกฤทธิ์เพื่อลอกผิวดำชั้นบนสุดนั้น จะทำให้ผิวดำและไวต่อแสง อาจทำให้เกิดผิวดำคล้ำมากกว่าเดิมหรือเกิดฝ้าถาวรได้ (Parvez *et al.*, 2006) จากปัญหาเหล่านี้การวิจัยเพื่อค้นหาวิธีการแบบใหม่ที่จะทำให้ผิวขาวขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยกว่าวิธีเดิมที่ใช้กันอยู่จึงเป็นเรื่องที่ควรให้ความสนใจ ซึ่งทางเลือกใหม่สำหรับการทำให้ผิวขาวขึ้น คือ การทำให้สีของเมลานินที่สร้างขึ้นมาแล้วจางลง หรือการย่อยสลายเมลานิน (melanin degradation) แทนการออกฤทธิ์รบกวนกระบวนการสร้างเมลานิน (Mohorčić *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2004)

ถึงแม้ว่าเมลานินจะเป็นสารประกอบที่มีความคงตัวมาก แต่สามารถถูกทำลายหรือย่อยสลายได้โดยสารเคมี เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2) ด้วยขบวนการ photochemical

degradation หรือด้วยขบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) โดยเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ melaninase หรือ manganese peroxidase ได้ เคยมีรายงานว่าเชื้อราแซปโฟรไฟท์และเห็ดบางชนิดมีความสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ (Butler and Day, 1998; Liu *et al.*, 1995; Luther and Lipke, 1980; Mohorčič *et al.*, 2007; Parvez *et al.*, 2006; Rättö *et al.*, 2001) แต่ยังไม่เคยมีรายงานว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก มีความสามารถดังกล่าวหรือไม่ จึงตั้งสมมุติฐานว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ในพืชอาจมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถทำให้ผิวขาวได้เช่นเดียวกับเชื้อรากลุ่มอื่นๆ ที่เคยมีรายงานมาแล้ว และเป็นสารที่ผลิตได้จากแหล่งชีวภาพ ที่น่าจะเป็นสารที่ได้รับการยอมรับมากกว่าการใช้สารเคมีในส่วนผสมของตำรับเครื่องสำอาง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดกรองความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืช ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ ซึ่งอาจจะมีความสามารถในการทำให้ผิวขาวขึ้น และคาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางได้

1.3 ความสำคัญของการวิจัย

1.3.1 ได้เชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลง ซึ่งสามารถนำไปทำวิจัยต่อยอดเพื่อพัฒนาและประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางเพื่อผิวขาวต่อไป

1.3.2 เกิดองค์ความรู้ใหม่ของเชื้อราเอนโดไฟท์เกี่ยวกับความสามารถในการสร้าง melanin degrading enzymes สำหรับประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง

1.3.3 นักศึกษาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอางที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยนี้จะได้รับทักษะการทำวิจัยด้านจุลชีววิทยาร่วมด้วย

1.3.4 เป็นการพัฒนาทักษะการทำวิจัยของผู้รับทุนเอง

1.3.5 ผลงานวิจัยสามารถนำไปเผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติได้

1.4 สมมติฐานของการวิจัย

เคยมีรายงานว่าเชื้อราแซบไฟรโฟท์และเห็ดบางชนิดมีความสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ แต่ยังไม่เคยมีรายงานว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก มีความสามารถดังกล่าวหรือไม่ จึงตั้งสมมติฐานว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ในพืชอาจมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถทำให้ผิวขาวได้ เช่นเดียวกับเชื้อราในกลุ่มอื่นๆ ที่เคยมีรายงานมาแล้ว และเป็นสารที่ผลิตได้จากแหล่งชีวภาพ ที่น่าจะเป็นสารที่ได้รับการยอมรับมากกว่าการใช้สารเคมีในส่วนผสมของตำรับเครื่องสำอาง

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรไทย และ/หรือ พืชทั่วไป จำนวน 21 ชนิด ได้เชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 332 ไอโซเลท นำเชื้อราไปคัดกรองหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดลิกนินเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีรายงานว่าสามารถย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ ด้วยวิธีบนอาหารแข็ง และด้วยวิธีในอาหารเหลว (วิธีใหม่) คัดเลือกเชื้อราที่ให้ผลการคัดกรองเป็นบวกระดับสูง ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส วัดกิจกรรมเอนไซม์ และวัดค่าความสามารถของเอนไซม์ในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์สังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

เชื้อราเอนโดไฟท์ หมายถึง เชื้อราที่อาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space) ของเนื้อเยื่อพืช โดยไม่ก่อให้เกิดโรคต่อพืชอาศัย และด้วยการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (mutualistic symbiosis) โดยพืชอาศัยให้อาหารและที่อาศัยแก่เชื้อราเอนโดไฟท์ ในขณะเดียวกันเชื้อราเอนโดไฟท์ก็สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหรือฮอร์โมนที่เป็นประโยชน์ต่อพืช

บทที่ 2

แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปัญหาสีผิวเข้มเกินระดับปกติและแนวทางการแก้ไข

เม็ดสีผิวที่เรียกว่าเมลานิน (melanin) ถูกสร้างมาจากเซลล์ที่เรียกว่าเมลานोไซท์ (melanocyte) ที่อยู่ในชั้นผิวหนังกำพร้าส่วน stratum basale เมลานินจะบรรจุอยู่ใน melanosome ซึ่ง melanosome นี้จะสามารถกระจายตัวไปยังเซลล์อื่นๆ ของชั้นผิวหนัง เช่น keratinocyte การกระจายตัวของเมลานินในผิวหนังของแต่ละคนจะแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้สีผิวมีระดับความขาว-คล้ำที่แตกต่างกันออกไป สีผิวของมนุษย์จำแนกได้เป็น 6 ระดับ (skin phototype) คือ ระดับ I ถึง IV ตามปริมาณของเม็ดสีผิวเมลานินที่เพิ่มมากขึ้นและระดับที่ลดลงของการยอมให้แดดไหม้ได้ ซึ่งสีผิวประเภทที่ 6 จะเป็นประเภทที่สีเข้มที่สุดแต่ยอมให้แดดไหม้ได้ในระดับที่น้อยที่สุด (Young, 2006) โดยปกติทั่วไปสีผิวจะเรียบสม่ำเสมอทั้งไปในแต่ละบริเวณของร่างกาย แต่อาจเกิดสีผิวที่ไม่สม่ำเสมอได้ เมื่อมีความผิดปกติของการสร้างเม็ดสีเมลานิน ซึ่งความผิดปกติอาจเป็นได้ทั้งสีผิวจางลงหรือเข้มขึ้นมากกว่าระดับปกติก็ได้

ความผิดปกติของสีผิวที่ถือว่าเป็นปัญหามากในวงการแพทย์และเครื่องสำอาง คือ ผิวหนังสร้างเม็ดสีผิวที่มากเกินไป ส่งผลให้มีสีผิวที่คล้ำเกินระดับปกติ (hyperpigmentation) เช่น กระ ฝ้า ปัญหานี้คงไม่ค่อยมีผลกระทบต่อความรู้สึกของคนตะวันตกที่มีผิวขาว เพราะคนเหล่านี้ปรารถนาที่จะมีสีผิวเข้ม ที่เรียกกันคุ้นหูว่าผิวสีแทนมากกว่าผิวขาวซีด แต่คนแถบเอเชียส่วนใหญ่โดยเฉพาะผู้หญิง มักปรารถนาที่จะมีผิวขาวมากกว่า ดังนั้นผลิตภัณฑ์ปรับสีผิวให้ขาวขึ้นจึงมีอิทธิพลต่อคนผิวสีเข้มมาก ทำให้ในเครื่องสำอางหรือเวชสำอางหลายๆ ชนิดได้มีการผสมสารออกฤทธิ์ที่เชื่อว่าจะทำให้ผิวขาวขึ้น เพื่อปรับลดระดับเม็ดสีเมลานิน (Rendon and Gaviria, 2005) ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้มีทั้งประทับใจเพราะขาวขึ้น หรือไม่มีการเปลี่ยนแปลง บางคนมีอาการแพ้ต่อเครื่องสำอางนั้นๆ ทำให้ผิวแฉะลงกว่าเดิม หรือขาวขึ้นแต่เมื่อหยุดใช้เครื่องสำอางนั้นๆ แล้วทำให้ผิวคล้ำขึ้นกว่าเดิม จากปัญหาต่างๆ เหล่านี้ การค้นหาสารทำให้ผิวขาวที่มีประสิทธิภาพทั้งการทำให้ขาวขึ้นจริงและปลอดภัยจึงยังต้องดำเนินต่อไป โดยพยายามค้นหาจากหลายๆ ต้นกำเนิด ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดจากพืช สมุนไพร เชื้อจุลินทรีย์ หรือสารเคมีสังเคราะห์ต่างๆ (Akhtar *et al.*, 2012; Boissy *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Mohamad *et al.*, 2010; Momtaz *et al.*, 2008; No *et al.*, 1999; Parvez *et al.*, 2006; Seiberg *et al.*, 2000)

การยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานิน เช่น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ในขบวนการสร้างเมลานิน จะช่วยปรับระดับสีผิวให้จางลงได้ (Boissy *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Momtaz *et al.*, 2008; Parvez *et al.*, 2006) สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่นิยมใช้ในเครื่องสำอาง ได้แก่ อาร์บูติน (arbutin) ที่สกัดได้จากพืชหลายๆ ชนิด เช่น common bearberry (*Arctophylos urvaursi*) สาร glabridin จากรากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra*) mulberry extract และ licorice extract (Akhtar *et al.*, 2012; Parvez *et al.*, 2006) เป็นสารที่ออกฤทธิ์ลอกเซลล์ผิวหนัง (keratolytic) จัดเป็นสารทำให้ผิวขาวชนิดหนึ่ง โดยมีฤทธิ์ลอกผิวหนังสัปดาห์ละครั้งนอกสุดออกไป ทำให้สีผิวดูขาวและสดใสขึ้น กรดแอสคอร์บิกและอนุพันธ์ (ascorbic acid and its derivatives) กรดโคจิก (kojic acid) ซึ่งเป็นสารชีวภาพที่ได้จากเชื้อราหรือแบคทีเรีย สารทำให้ผิวขาวที่กล่าวข้างต้น ถือเป็นสารที่ปลอดภัยกว่าไฮโดรควิโนน (hydroquinone) (Ha *et al.*, 2001; Mohamad *et al.*, 2010; Parvez *et al.*, 2006) ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากชาเขียว ซึ่งมีสารกลุ่ม catechin สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งอาจมีผลทำให้ผิวขาวขึ้นได้ (No *et al.*, 1999) นอกจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสแล้ว การยับยั้งกระบวนการขนส่งเมลานิน (melanosome transfer) ไปยังเซลล์ keratinocyte ของผิวหนัง ยังสามารถทำให้สีผิวจางลงได้เช่นกัน (Seiberg *et al.*, 2000)

อย่างไรก็ตามกระบวนการทำให้สีผิวจางลงด้วยสารดังกล่าวข้างต้นอาจมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์หรือเป็นพิษต่อผิวหนังได้ เช่น ผลกระทบทำให้ผิวขาวมักใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์รบกวนกระบวนการสร้างเมลานิน ได้แก่ สารประกอบของปรอท (mercury compounds) ไฮโดรควิโนน (hydroquinone) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ในกระบวนการสร้างเมลานิน ทั้งนี้สารประกอบของปรอทจัดเป็นสารอันตรายที่ทำให้เกิดอาการแพ้ ผื่นแดง ผิวด่าง และเกิดรอยดำ บนใบหน้า และอาจทำให้เกิดการสะสมพิษของปรอทซึ่งเป็นโลหะหนักอันตราย ทางเดินปัสสาวะอักเสบ และไตอักเสบ เป็นต้น ไฮโดรควิโนนทำให้ระคายเคือง เกิดจุดด่างขาว ผิวดำ ต่อแสง ผิวด่างและคล้ำดำในที่สุด หรืออาจเกิดผื่นอย่างถาวรได้ ดังนั้นกระทรวงสาธารณสุขจึงประกาศห้ามใช้สารชนิดนี้ในเครื่องสำอาง (Al-Saleh *et al.*, 2004; Boissy *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; del Giudice and Yves., 2002; Dooley, 1997; Kim and Uyama, 2005; Matsubayashi *et al.*, 2003; Parvez *et al.*, 2006; Rendon and Gaviria, 2005; Seiberg *et al.*, 2000; Sugimoto *et al.*, 2004)

ทางเลือกที่ปลอดภัยกว่าการยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานิน คือ การทำให้เม็ดสีเมลานินที่สร้างขึ้นมาแล้วจางลง (decoloring of melanin) (Mohorčič *et al.*, 2007; Woo *et al.*,

2004) ถึงแม้ว่าเมลานินจะเป็นสารที่มีความคงตัวสูงมาก แต่ก็สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยสารเคมีบางชนิด หรือ แสงแดดร่วมกับสารเคมี (photo chemical degradation) (Robbins, 1994) หรือการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยเอนไซม์จากเชื้อราบางสายพันธุ์ (Butler and Day 1998; Mohorčič *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2004)

2.2 ความสามารถของเชื้อราในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเมลานิน

เชื้อราแซปโฟรไฟท์กลุ่ม white rot fungi สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลากหลาย ทั้งกลุ่ม oxidase และ peroxidases ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะทำหน้าที่ออกซิไดส์สารต่างๆ ได้หลายชนิด เช่น ลิกนิน ถ่าน (coal) แม้กระทั่งสารประกอบฟีนอลิก หรือ azo dye (Jeon, 2002; Nakamura and Mtui, 2003; Ryu *et al.*, 2003; Tekere *et al.*, 2001;) Ralph *et al.* (1994) รายงานว่า white-rot fungi สายพันธุ์ *Phanerochaete chrysosporium* สามารถทำให้สีของถ่าน (coal) จางลงได้ในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมลิกนินเข้าไปเพื่อเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน ซึ่งรายงานนี้ทำให้คาดการณ์ว่าเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินน่าจะมีความสามารถในการทำให้สีของเมลานินจางลงได้เช่นกัน ยังมีรายงานว่าเชื้อราแต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายเมลานินจากแหล่งที่มาแตกต่างกันด้วย (Butler and Day, 1998; Liu *et al.*, 1995; Luther and Lipke, 1980; Rättö *et al.*, 2001) และได้ตั้งสมมุติฐานว่าเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินจากเชื้อราน่าจะนำไปในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ (Mohorčič *et al.*, 2007)

มีรายงานว่าเชื้อราหลายชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายเมลานิน เช่น *Acrostaphylus* sp., *Galactomyces geotrichum* และ *Phanerochaete chrysosporium* (Butler and Day, 1998; Liu *et al.*, 1995; Rättö *et al.*, 2001) ต่อมาในปี 2007 Mohorčič *et al.* ได้ทำการคัดกรองเชื้อราที่แยกได้จากดินเพื่อหาความสามารถในการย่อยสลายเมลานิน โดยพบว่าเชื้อรา *Sporotrichum pruinosum* มีความสามารถในการทำให้สีของเมลานินสังเคราะห์จางลง และต่อมาได้นำเชื้อราตัวนี้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่มากขึ้นในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพและทำเอนไซม์ให้ถึงบริสุทธิ์ และได้นำไปทดสอบความสามารถในการทำให้สีเมลานินจางลงกับเซลล์ corneocyte ของผิวประเภท phototype III และ V พบว่าความหนาแน่นของเมลานินในเซลล์ corneocyte ของผิวประเภท phototype III และ V ลดลงถึง 50% เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม รายงานการวิจัยนี้แสดงให้เห็นความสามารถของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์ที่ช่วยทำให้เมลานินของผิวคนจางลง ซึ่งเป็นวิธีการทำให้ผิวขาวด้วยกระบวนการย่อยสลายเมลานินที่สร้างเสร็จแล้ว แทนวิธีการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน ซึ่งอาจจะนำมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อไปได้

โดยทั่วไปความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายองค์ประกอบของพืช โดยทั่วไปมักจะพบในเชื้อรากลุ่มแซปโพรไฟท์ คือ เชื้อราที่ทำหน้าสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ แต่ Promputtha *et al.*, (2010) ได้ให้ข้อเสนอแนะไว้ว่าเชื้อราเอนโดไฟท์น่าจะเป็นเชื้อราอีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้ดี เนื่องจากพวกเค้าพบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์หลายสายพันธุ์มีความสามารถในการผันตัวเองไปเป็นเชื้อราแซปโพรไฟท์หลังจากพืชอาศัยของมันตายลง โดยเชื้อราเหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินหลังจากที่ทราบว่าพืชอาศัยตายและไม่สามารถให้อาหารแก่พวกมันได้อีก ดังนั้นเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจะผลิตและหลั่งออกมาย่อยเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้ได้มาซึ่งอาหารและการอยู่รอดจนกลายเป็นเชื้อรากลุ่มแซปโพรไฟท์ต่อไป ดังนั้นเชื้อราเอนโดไฟท์น่าจะสามารถในการผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสและสามารถย่อยสลายเมลานิน ซึ่งอาจจะเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับผิวขาวได้

จากรายงานการวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นทำให้ผู้ทบทวนสนับสนุนการวิจัยเห็นว่าประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราสูงมาก (Bussaban *et al.*, 2001, 2003; Hyde *et al.*, 2003; Jones and Hyde, 2004; Kodsueb *et al.*, 2006; Photita *et al.*, 2001, 2002; Promputtha *et al.*, 2002, 2004) โดยเฉพาะเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สามารถแยกได้จากทุกส่วนของพืชทำให้เชื้อรากลุ่มนี้มีความหลากหลายสูง (Lin *et al.*, 2007) แต่ในประเทศไทยเชื้อราถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางน้อยมาก จึงต้องการนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ในประเทศไทยมาใช้เป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืชทั้งที่เป็นพืชสมุนไพรและพืชทั่วไป (Theantana *et al.*, 2007) ซึ่งเชื้อราเหล่านี้ยังไม่เคยถูกนำมาคัดกรองหา melanin degrading enzymes ที่อาจนำไปใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอาง

2.3 เชื้อราเอนโดไฟท์

เชื้อราเอนโดไฟท์เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชอาศัยโดยไม่ทำลายหรือก่อโรคในพืชอาศัย แต่จะอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Freeman and Rodriguez, 1993; Sinclair and Cerkaskas, 1996). ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าราเอนโดไฟท์มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ที่มีประโยชน์ทางยา (Strobel and Daisy, 2003) และมีการตั้งสมมุติฐานกันว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากพืช เช่น taxol นั้น อาจมีต้นกำเนิดมาจากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในพืชชนิดนั้นก็ได้ (Stierle *et al.*, 1993; Strobel *et al.*, 1996) ผู้ทบทวนสนับสนุนการวิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ในพืชที่มีรายงานว่าทำ

ให้ผิวขาวได้ อาจมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ทำให้ผิวขาวได้ด้วย ซึ่งพืชที่เคยมีรายงานว่ามีส่วนทำให้ผิวขาว เช่น กระเจียวหรือทานาคา (*Naringi crenulata*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) เมล็ดลำไย (*Euphoria longana* Lam.) ข่าตาแดง (*Alpinia officinarum*) แขนเมล็ดยะมวง (*Mangifera indica* L.) ใบและรากขิง (Chan *et al.*, 2008; Maisuthisakul and Gordon, 2009; Matsuda *et al.*, 2009; Pongpunyayuen *et al.*, 2010; Rangkadilok *et al.*, 2007) ก็มีความเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาแยกเชื้อราเอนโดไฟท์เพื่อใช้ในการคัดกรองหาเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งสลายเมลานินในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

2.4 เอนไซม์ย่อยสลายเมลานินที่ใช้ในเครื่องสำอาง

ทางเลือกสำหรับการทำให้ผิวขาวด้วยเอนไซม์ย่อยสลายเมลานิน มักจะให้ความสำคัญกับเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) (Woo *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้ผลิตโดยเชื้อรา เช่น สายพันธุ์ *Phanerochaete chrysosporium* โดยปกติแล้วเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ย่อยสลายลิกนินในพืชที่ตายแล้ว ซึ่งลิกนินเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อพืช เอนไซม์นี้ยังทำให้สีของลิกนินจางลงอย่างรวดเร็ว ระหว่างขบวนการย่อยสลายลิกนินด้วย (Nagasaki *et al.*, 2008) ลิกนินเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบได้ในผนังเซลล์พืช มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายคลึงกับเม็ดสีผิวเมลานิน และยังมีรายงานเมื่อไม่นานมานี้ยืนยันผลว่าเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีความสามารถในการย่อยสลายโมเลกุลของเมลานินได้จริง ซึ่งได้มีการนำเอนไซม์นี้ไปผสมในตำรับเครื่องสำอางสำหรับผิวขาวบ้างแล้ว แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดว่าลิกนินเปอร์ออกซิเดส สามารถย่อยสลายเมลานินที่ชั้นผิวหนังกำพวดได้อย่างไรหลังจากทาเครื่องสำอางแล้ว ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป (Mauricio *et al.*, 2011)

ยังมีเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (ligninolytic enzyme) ในพืชอีกหลายชนิดที่กำลังเป็นที่นิยมศึกษาฤทธิ์ในการย่อยสลายเมลานิน เช่น แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส [manganese peroxidase (MnP)] แลคเคส (laccase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างและหลั่งออกมาจากเชื้อราชนิด white rot fungi มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินในพืชที่ตายโดยธรรมชาติอยู่แล้ว (Shinya *et al.*, 2010) ได้มีการนำเอนไซม์เหล่านี้มาใช้เป็นสารออกฤทธิ์ผสมในเครื่องสำอาง เช่น สารทำให้ผิวขาว ยังเคยมีรายงานว่าเอนไซม์กลุ่มไซลาเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายองค์ประกอบของเนื้อเยื่อพืชส่วนที่เป็นไซแลนก็มีความสามารถในการย่อยกำจัดเมลานินออกจากชั้นผิวหนังกำพวดได้ โดยทำหน้าที่ลดความสามารถในการยึดเกาะระหว่างเมลานินกับเซลล์ชั้นหนังกำพวดได้ (Punitha *et al.*, 2009)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 พืชตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

เก็บตัวอย่างพืชที่มีชีวิต สุขภาพดี ไม่มีรอยโรค ในเขตและพื้นที่โดยรอบมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย จำนวน 21 ชนิด (ตารางที่ 3-1) ล้างพืชตัวอย่างด้วยน้ำประปาไหลผ่านนาน 1 ชั่วโมง เพื่อชะล้างจุลินทรีย์อื่นๆ ที่เกาะอยู่ตามผิวนอกออกไป

ตารางที่ 3-1 พืชตัวอย่างสำหรับแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

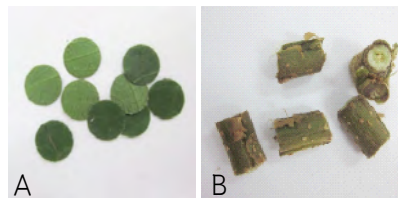
ลำดับ ที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	เนื้อเยื่อ สำหรับแยก
1	<i>Phyllanthus emblica</i> L.	มะขามป้อม	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	กิ่ง
2	<i>Tamarindus indica</i> L.	มะขาม	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	กิ่ง
3	<i>Mangifera indica</i> L.	มะม่วง	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	ใบและกิ่ง
4	<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.	ขนุน	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	ใบและกิ่ง
5	<i>Litchi chinensis</i> Sonn.	ลิ้นจี่	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	ใบและกิ่ง
6	<i>Camellia sinensis</i> L.	ชาชง	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบและกิ่ง
7	<i>Camellia oleifera</i>	ชาน้ำมัน	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบและกิ่ง
8	<i>Psidium guajava</i> Linn.	ฝรั่ง	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบและกิ่ง
9	<i>Hylocercus undatus</i> (Haw) Brit. & Rose	แก้วมังกร	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ลำต้น

ตารางที่ 3-1 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	เนื้อเยื่อสำหรับ แยกเชื้อรา
10	<i>Zingiber officinale</i>	ขิง	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบและราก
11	<i>Lpinia galanga</i> (L.) Willd	ข่า	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบและลำต้น
12	<i>Carica papaya</i>	มะละกอ	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบและลำต้น
13	<i>Ficus elastica</i> Roxb. ex Hornem.	ยางอินเดีย	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	ใบและกิ่ง
14	<i>Musa sapientum</i> Linn.	กล้วย	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบและลำต้น
15	<i>Citrus aurantifolia</i> Swing	มะนาว	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบและกิ่ง
16	<i>Citrus hystrix</i> DC.	มะกรูด	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบและกิ่ง
17	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Staph	ตะไคร้	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบและลำต้น
18	<i>Cymgopogon winterianus</i> Jowitt	ตะไคร้หอม	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบและลำต้น
19	<i>Dimocarpus longan</i> (Lour.)	ลำไย	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	ใบและกิ่ง
20	<i>Hevea brasiliensis</i> (A. Juss) Muell. Arg.	ยางพารา	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบและกิ่ง
21	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr	สับปะรด	ต. ท่าสุด จ. เชียงราย	ใบ ก้านผล และเปลือก

3.2 การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

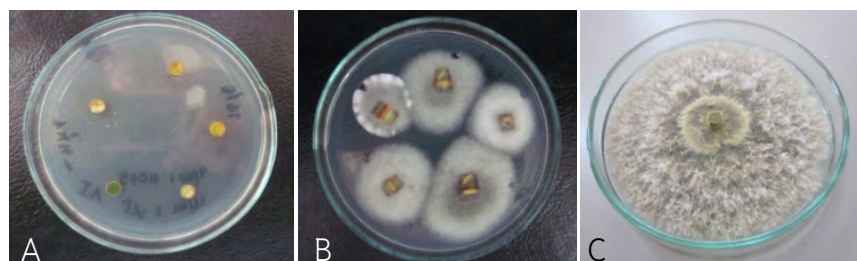
ตัดพืชตัวอย่างที่ล้างแล้ว ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มม. หรือความกว้าง × ยาว ที่ 5×5 มม. (ภาพที่ 3-1) นำไปฆ่าเชื้อที่ผิว ด้วยวิธีดังต่อไปนี้ แช่ชิ้นพืชในน้ำกลั่นนาน 1 นาที แช่ใน sodium hypochlorite (NaOCl) ที่ความเข้มข้นและเวลาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความหนาของชิ้นส่วนพืช แล้วแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 75% นาน 1 นาที สุดท้ายแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นาน 1 นาที (ตารางที่ 3-2) นำชิ้นพืชขึ้นจากน้ำแล้วปล่อยให้แห้งในภาชนะที่ปลอดเชื้อ ก่อนนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งมีเส้นใยเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นพืช ทำการแยกเชื้อราให้ได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์โดยตัดชิ้นอาหารของแต่ละโคโลนี ไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเดี่ยวๆ เพื่อเก็บไว้ทำวิจัยขั้นต่อไป (ภาพที่ 3-2)



ภาพที่ 3-1 ลักษณะชิ้นส่วนพืชตัวอย่างที่ตัดให้ได้ขนาดเหมาะสม ก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่ผิว เพื่อแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ (A) ใบ (B) กิ่ง

ตารางที่ 3-2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับฆ่าเชื้อบนผิวของชิ้นพืชแต่ละส่วน

ชิ้นส่วนพืช	น้ำกลั่น	NaOCl	75% เอทานอล	น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
ใบ / ลำต้นอ่อน	1 นาที	3%, 2 นาที	1 นาที	1 นาที
กิ่ง	1 นาที	6%, 2 นาที	1 นาที	1 นาที



ภาพที่ 3-2 ลักษณะการเจริญของเชื้อราเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อพืชบนจานอาหาร (A) การวางชิ้นพืชบนจานอาหาร PDA (B) เส้นใยเชื้อราเอนโดไฟท์เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืช (C) เชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ในจานเพาะเลี้ยงเดี่ยว

3.3 การคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการสร้าง melanin degrading enzymes ชนิดลิกนินเปอร์ออกซิเดส บนอาหารแข็ง

นำเชื้อราเอนโดไฟท์มาคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส บนอาหารแข็งที่ผสมสี Azure B สูตรอาหารพัฒนาจาก Stephen (1999) มีชื่ออาหารว่า LME basal medium (LBM) สูตรอาหารดังแสดงในตารางที่ 3-3 และมีวิธีการเตรียมดังนี้

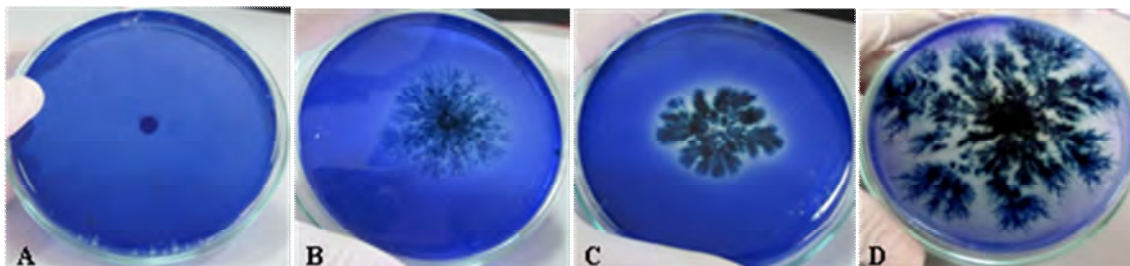
ตารางที่ 3-3 สูตรอาหารแข็ง LME basal medium (LBM) (Pointing, 1999)

องค์ประกอบ	กรัม/ลิตร ในน้ำกลั่น
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1
Tartaric acid ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$)	0.5
Magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5
Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.01
Copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.001
Yeast extract	0.01
Iron (III) sulfate ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$)	0.001
Manganese (II) sulfate monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.001

นึ่งฆ่าเชื้ออาหาร LBM แล้ว เติมสารละลายปลอดเชื้อ Azure B ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.01% (w/v) และ สารละลายวุ้น (agar) ปลอดเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1.6% (w/v) ลงใน LBM medium และสุดท้ายเติมสารละลายปลอดเชื้อของ 20% (w/v) น้ำตาลกลูโคส ปริมาตร 10 มล. ต่อปริมาตรอาหารสุดท้าย 1000 มล. ผสมให้เข้ากันดี แล้วเทอาหารที่เตรียมได้ลงในจานเพาะเลี้ยง (Petri dish) ด้วยวิธีปลอดเชื้อ และเรียกชื่ออาหารนี้ว่า LBM-Azure B agar medium

ตัดชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์มาเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร LBM-Azure B agar medium และปมไว้ที่อุณหภูมิห้องและบันทึกการเจริญเติบโตของเชื้อราทุกวัน เพื่อสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสีอาหารบริเวณใต้และรอบๆ โคโลนีของเชื้อรา ซึ่งจากเดิมอาหารจะมีสีน้ำเงิน ถ้าเชื้อราตัวใดมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิ

เดส จะเกิดโซนใสบริเวณใต้และรอบๆ โคโลนีของเชื้อรา นั้น (ภาพที่ 3-3) ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสทุกวัน คัดเลือกเชื้อราที่ให้ผลเป็นบวก เพื่อนำไปคัดกรองอีกชั้นด้วยอาหารเหลวต่อไป



ภาพที่ 3-3 เชื้อราเอนโดไฟต์เจริญบนอาหาร LBM-Azure B agar medium (A) เชื้อราไม่เจริญบนอาหารและผลคัดกรองเป็นลบ (B) เชื้อราเจริญบนอาหารแต่ผลคัดกรองเป็นลบ (C) ผลคัดกรองเป็นบวก (D) ผลคัดกรองเป็นบวกระดับสูง

3.4 การสร้างคัดกรองการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารเหลวของเชื้อราที่มีผลคัดกรองบนอาหารแข็งเป็นบวก

นำเชื้อราที่ให้ผลเป็นบวกบนอาหารแข็ง มาคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ในอาหารเหลว LBM medium ที่ผสมสี Azure B โดยเตรียมอาหารเหลว LBM medium และ สารละลายน้ำตาลกลูโคส 20% (w/v) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วผสมสารละลายน้ำตาลกลูโคสปริมาตร 10 มล. ใส่ในอาหาร LBM medium (ปริมาตรสุดท้าย 1000 มล.) แบ่งอาหารที่เตรียมได้ 5 มล. ใส่ในหลอดทดลอง ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้ว inoculate ขึ้นอาหาร PDA ที่มีโคโลนีเชื้อราสายพันธุ์ที่ให้ผลคัดกรองเป็นบวก ที่เลี้ยงไว้ไม่เกิน 10 วัน จำนวน 5 ชัน (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.) ลงในอาหารเหลว ด้วยวิธีปลอดเชื้อ แล้วบ่มในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °ซ) นาน 10 วัน [ภาพที่ 3-4 (A-C)] จากนั้นเติมสารละลายปลอดเชื้อของ 0.01% (w/v) Azure B ปริมาตร 0.5 มล. ในแต่ละตัวอย่าง [ภาพที่ 3-4 (D)] แล้วนำบ่มต่อในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °ซ) นาน 24 ชั่วโมง สังเกตสีความเข้มของสี Azure B ด้วยตาเปล่าว่าจางลงหรือไม่ [ภาพที่ 3-4(E-F)] จากนั้นปั่นเหวี่ยงน้ำเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 6000 rpm นาน 10 นาที เก็บส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 645 nm โดยมีอาหาร LBM medium ผสม 0.01% (w/v) Azure B เป็น control และ LBM medium เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณ %Decolorization ของ Azure B ดังสูตร

$$\% \text{Decolorization} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

เลือกเชื้อราที่มีค่า %Decolorization ≥ 95 เพื่อนำไปผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ในอาหารเหลวปริมาณใหญ่ขึ้นต่อไป



ภาพที่ 3-4 แสดงวิธีการคัดกรองความสามารถของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารเหลว LBM medium (A) การ inoculate อาหารที่มีเชื้อราจำนวน 5 discs ลงในอาหารเหลว LBM medium (B) สภาวะการบ่มเชื้อในเครื่องเขย่า (C) ลักษณะเชื้อที่เจริญหลังจากบ่มนาน 10 วัน (D) ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการเติม 0.01% (w/v) Azure B ทันที เปรียบเทียบกับ control (หลอดกลาง) (E-F) ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มนาน 24 ชั่วโมงหลังจากเติม 0.01% (w/v) Azure B (F) ลักษณะการจางลงของสี Azure B ในระดับที่แตกต่างกันเปรียบเทียบกับ control (หลอดซ้ายสุด)

หมายเหตุ: ตะกอนกันหลอดสีดำ คือ กลุ่มเส้นใยเชื้อราของสายพันธุ์ที่มีเข็ม ไม่ได้เกิดจากการดูดซับเอาสีของ Azure B เข้าสู่เซลล์ บางสายพันธุ์มีสีขาว จะยังคงเป็นตะกอนสีขาวถึงแม้จะเติม Azure B แล้วก็ตาม

3.5 การผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสโดยเชื้อราที่ให้ผลการคัดกรองเป็นบวก ระดับสูงในอาหารเหลว

เตรียมอาหารเหลว LBM medium และ 20% (w/v) สารละลายน้ำตาลกลูโคส นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วผสมสารละลายน้ำตาลกลูโคสปริมาตร 10 มล. ใส่ในอาหาร LBM medium (ปริมาตรสุดท้าย 1000 มล.) แบ่งอาหารที่เตรียม 50 มล. ใส่ใน flask ขนาด 250 มล. ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้ว inoculate ขึ้นอาหาร PDA ที่มีโคโลนีเชื้อราสายพันธุ์ที่ให้ผลคัดกรองเป็นบวกระดับสูง ที่เลี้ยงไว้ไม่เกิน 10 วัน จำนวน 10 ช้อน (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.) ลงในอาหารเหลว ด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำ flask ไป incubate ในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °ซ) และทำการเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงในวันที่ 6 8 และ 10 โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 10 นาที เก็บส่วนใสไว้เพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสต่อไป

3.6 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส อ้างอิงวิธีของ Arora and Gill (2001) โดยตรวจวัดความสามารถของเอนไซม์ในการออกซิไดส์สี Azure B ซึ่งใน reaction mixture ประกอบด้วย 125 mM sodium tartrate buffer (pH 3.0) ปริมาตร 1 ml, 0.160 mM Azure B ปริมาตร 500 μ l, ส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (crude enzyme) ปริมาตร 500 μ l, และ 2.0 mM hydrogen peroxide ปริมาตร 500 μ l (ตารางที่ 3-4) ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองและบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ แล้วเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม hydrogen peroxide และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 645 nm หลังจากเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง โดยใช้น้ำกลั่นแทน crude enzyme ในหลอด control กำหนดให้ 1 ยูนิต ของเอนไซม์มีค่าเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง 0.001 ใน 1 ชั่วโมง ต่อ crude enzyme 1 มล.

ตารางที่ 3-4 Reaction mixture ในการวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

สารเคมี	ปริมาตร
125 mM Sodium tartrate buffer (pH 3.0)	1.0 ml
0.16 mM Azure B	500 μ l
2.0 mM Hydrogen peroxide	500 μ l
Crude enzyme (containing lignin peroxidase)	500 μ l

3.7 การวัดค่าความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง (melanin decolorization activity)

การศึกษาความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง ทำได้โดยอ้างอิงวิธีของ Woo *et al.* (2004) ซึ่งได้มีการปรับสภาวะเล็กน้อยเพื่อให้เหมาะสมต่อผลการทดลองที่ดีที่สุด ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 125 mM tartrate buffer solution (pH 3.0) ปริมาตร 1 ml, 100 mg/L synthetic melanin ปริมาตร 500 µl, lignin peroxidase (crude enzyme) ปริมาตร 500 µl และ 2.0 mM H₂O₂ ปริมาตร 500 µl (ตารางที่ 3-5) ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองและบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C แล้วเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม H₂O₂ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 300 nm หลังจากเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง โดยใช้ น้ำกลั่นแทน crude enzyme ในหลอด control แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณค่า Melanin decolorization rate ต่อ 1 ชั่วโมง จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{Melanin decolorization rate/ 1 hr} = \frac{A_{t12} - A_{t0}}{12 \text{ hrs}}$$

A_{t12} คือ Absorbance เมื่อบ่มปฏิกิริยาไปแล้ว 12 ชั่วโมง

A_{t0} คือ Absorbance เมื่อเริ่มปฏิกิริยา ณ ชั่วโมงที่ 0

เลือกสายพันธุ์เชื้อราที่ให้ค่าความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลองได้ดีที่สุด เพื่อศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 3-5 Reaction mixture การวัดความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลง

สารเคมี	Volume
125 mM Tartrate buffer (pH 3.0)	1.0 ml
100 mg/L Synthetic melanin	500 µl
2.0 mM Hydrogen peroxide	500 µl
Crude enzyme	500 µl
(Exactly known the unit of enzyme lignin peroxidase)	

3.8 การปรับสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส จากเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหารเหลว

3.8.1 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source)

เตรียมอาหารเหลว LME basal medium (LBM) โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยสูตรอาหารดั้งเดิมใช้ 0.01% yeast extract และจะถูกแทนที่ด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ ได้แก่ ammonium nitrate (NH_4NO_3), ammonium tartrate [$(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$], potassium nitrate (KNO_3) หรือ peptone ที่ความเข้มข้น 0.01% ปรับ pH ของอาหารให้ได้ 6.0 แบ่งอาหารแต่ละชนิดที่เตรียมได้ 50 มล. ใส่ใน flask ขนาด 250 มล. อาหารแต่ละแหล่งไนโตรเจนจะทำซ้ำ 3 flask นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้น inoculate ขึ้นวุ้นอาหาร PDA ที่มีโคโคไนซ์เชื้อราสายพันธุ์ MP03 (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.) ที่เลี้ยงไว้ไม่เกิน 10 วัน จำนวน 10 ชิ้น ลงในอาหารเหลวแต่ละ flask ด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำ flask ไป incubate ในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °ซ) นาน 7 วัน และทำการเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงในวันที่ 7 โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 10 นาที เก็บส่วนใสไว้เพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

3.8.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหาร

เตรียมอาหารเหลว LME basal medium (LBM) โดยใช้ 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน แบ่งอาหารที่เตรียมได้ 50 มล. ใส่ใน flask ขนาด 250 มล. ปรับ pH ของอาหารให้ได้ 3.0, 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 8.0 โดยทำซ้ำ 3 flask ในแต่ละค่า pH นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้น inoculate ขึ้นวุ้นอาหาร PDA ที่มีโคโคไนซ์เชื้อราสายพันธุ์ MP03 (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.) ที่เลี้ยงไว้ไม่เกิน 10 วัน จำนวน 10 ชิ้น ลงในอาหารเหลวแต่ละ flask ด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำ flask ไป incubate ในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °ซ) นาน 7 วัน และทำการเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงในวันที่ 7 โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 10 นาที เก็บส่วนใสไว้เพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

3.8.3 อุณหภูมิในการบ่ม

เตรียมอาหารเหลว LME basal medium (LBM) ที่มี 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับ pH ให้มีค่า 6.0 แบ่งอาหารที่เตรียมได้ 50 มล. ใส่ใน flask ขนาด 250 มล. นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้น inoculate ขึ้นวุ้นอาหาร PDA ที่มีโคโคไนซ์เชื้อราสายพันธุ์ MP03 (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.) ที่เลี้ยงไว้ไม่เกิน 10 วัน จำนวน 10 ชื้น ลงในอาหารเหลวแต่ละ flask ด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำ flask ไป incubate ในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 °C นาน 7 วัน โดยทำซ้ำ 3 flask ในแต่ละอุณหภูมิ และทำการเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงในวันที่ 7 โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เก็บส่วนใสไว้เพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

3.8.4 ระยะเวลาบ่ม

เตรียมอาหารเหลว LME basal medium (LBM) ที่มี 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับ pH ให้มีค่า 6.0 แบ่งอาหารที่เตรียมได้ 50 มล. ใส่ใน flask ขนาด 250 มล. นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้น inoculate ขึ้นวุ้นอาหาร PDA ที่มีโคโคไนซ์เชื้อราสายพันธุ์ MP03 (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.) ที่เลี้ยงไว้ไม่เกิน 10 วัน จำนวน 10 ชื้น ลงในอาหารเหลวแต่ละ flask ด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำ flask ไป incubate ในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C บ่มไปเรื่อยๆ และเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงในวันที่ 2, 4, 6 และ 8 เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

3.9 การวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรา MP03 ที่เตรียมได้ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง

ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 125 mM tartrate buffer solution (pH 6.0) ปริมาตร 1 ml, 100 mg/L synthetic melanin ปริมาตร 500 μ l, lignin peroxidase (crude enzyme) ปริมาตร 500 μ l และ 2.0 mM H_2O_2 ปริมาตร 500 μ l ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองและบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C แล้วเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม H_2O_2 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 300 nm หลังจากเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง โดยใช้ น้ำกลั่นแทน crude enzyme ในหลอด control แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณค่า Melanin decolorization rate ต่อ 1 ชั่วโมง จากสูตรในข้อ 3.7

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืชตัวอย่าง

แยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 332 ไอโซเลท จากพืชตัวอย่าง 21 ชนิด โดยพืชแต่ละชนิดให้จำนวนเอนโดไฟต์ที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 จำนวน และ Isolation code ของเชื้อราเอนโดไฟต์ ที่แยกได้จากพืชตัวอย่าง 21 ชนิด

ลำดับที่	พืชตัวอย่าง	Isolation code	จำนวนไอโซเลท
1	มะขาม	TM01-TM33	33
2	มะขามป้อม	MP01-MP34	34
3	มะม่วง	MG01-MG25	25
4	ขนุน	KN01-KN34	34
5	ลิ้นจี่	LC01-LC17	17
6	ฝรั่ง	GV01-GV22	22
7	แก้วมังกร	KK01-KK13	13
8	ชิง	GG01-GG15	15
9	ชาชง	ET01-ET14	14
10	ชาน้ำมัน	OT01-OT11	11
11	มะละกอ	PP01-PP08	8
12	ข่า	GL01-GL04	4
13	ยางอินเดีย	IR01-IR14	14
14	กล้วย	BB01-BB14	14
15	มะนาว	LM01-LM12	12
16	ยางพารา	YA01-YA07	7
17	มะกรูด	LI01-LI06	6
18	ตะไคร้	LA01-LA05	5
19	ตะไคร้หอม	CG01-CG04	4
20	ลำไย	LG01-LG23	23
21	สับปะรด	PA01-PA17	17
รวม			332

4.2 ผลการคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ลิกนินเปอร์ออกซิเดสบนอาหารแข็ง

เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟต์ 332 ไอโซเลท มาคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์
ลิกนินเปอร์ออกซิเดสบนอาหารแข็ง LBM–Azure B agar medium แล้ว พบว่า มีเชื้อราจำนวน
170 ไอโซเลท ที่ให้ผลเป็นบวกด้วยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสรอบโคโลนีที่แตกต่างกัน
ระหว่างไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4–2

ตารางที่ 4–2 ผลการคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์-
ออกซิเดส บนอาหารแข็ง LBM–Azure B agar medium โดยวัดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อรา

ลำดับ ที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)	
		โคโลนี	โซนใส
1	GV01	4.5	2
2	GV05	6.2	1.5
3	GV09	2	2
4	GV18	6	3.5
5	IR02	1.1	1.9
6	IR04	2.1	2.5
7	IR09	3.5	1.9
8	IR14	NA	2.5
9	IR07	5	2.5
10	OT08	1.8	2.5
11	OT10	1.4	2
12	BG02	3.5	3.4
13	PA01	6	1.3
14	LC10	2.5	3
15	LC02	3.9	3.9
16	PA17	1.6	3
17	MG11	1.3	2
18	YA01	0.9	1.5
19	MP31	1	1,1.3
20	KK01	4	1
21	CG01	2.4	2.4
22	MP13	1.3	1.7
23	LG07	2.9	2.8
24	PA12	3.5	3.7
25	LC09	3.5	1.3

ลำดับ ที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)	
		โคโลนี	โซนใส
26	PP04	7	1.5
27	YA02	0.8	1.5
28	IR12	2	3
29	LG14	4	4.2
30	BB03	4.5	2.5
31	KK13	4	1.2
32	LC08	3	3.5
33	LC11	2.5	2.5
34	PP03	7.5	1.7
35	GL01	1	1.5
36	KK12	5	1
37	KK03	7	7.2
38	LM04	0.7	1
39	MG01	2.5	3.2
40	LM05	5	5.2
41	YA03	3	2
42	CG04	3.3	2.5
43	IR08	NA	1.4
44	LC12	4	2
45	MP22	1.2	2
46	LG23	3.2	3.2
47	KN25	1.5	1.5
48	MP20	1	1.5
49	ET08	3	3
50	KN12	4.1	4.2

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ลำดับ ที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ชม)	
		โคโลนี	โซนใส
51	KN24	1.5	11.5
52	LM07	3	1.2
53	BG05	4	1.5
54	PA09	7	7
55	LM03	1.8	2.5
56	CG03	2.6	3
57	LG15	3.6	2
58	BG03	3	1.5
59	KK10	3.5	3.5
60	GL03	7	2
61	LM10	0.9	1.2
62	LC14	2	2.7
63	ET07	3	2
64	KK02	4	4
65	TM27	2.3	2.6
66	LG01	3.5	1.8
67	TM13	2.6	3
68	LC07	3	3.5
69	LC17	3.2	3.2
70	MP32	0.8	1.3
71	MG07	4.4	5
72	KK07	3.9	4
73	MP01	2.3	3
74	MG08	4	4.5
75	LM12	4	2
76	KN29	5	5.5
77	LC01	1.5	2.4
78	GV04	4.5	1.5
79	ET10	4	2.4
80	ET11	1.3	2
81	MG16	2.5	2.8
82	LM11	1.2	1.5
83	KN01	1.7	2.5
84	IR05	4.3	4.4

ลำดับ ที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ชม)	
		โคโลนี	โซนใส
85	GG09	7	6.5
86	PA10	6.6	6.6
87	LC04	3.4	4
88	KK05	5	1.5
89	KN19	3.5	4
90	MG02	3	4
91	MP34	2.5	1.1
92	LC06	4	1.5
93	MP08	2.3	2.7
94	GG08	6	1.5
95	MG06	4	4.5
96	OT06	4	4.5
97	MP33	2.3	3
98	MP14	2.1	2.3
99	MG22	3.5	4.2
100	MP17	2	2.6
101	GG13	4	4
102	KN11	4	4.5
103	KK04	5	3
104	TM16	2.3	2.4
105	KN17	2.7	3.2
106	GV10	3.8	3.8
107	GV06	4	4.2
108	MG19	4.5	5
109	KN27	5	5.5
110	TM32	3	3
111	TM28	1.7	2.3
112	LC03	2	2.5
113	LG19	1.7	2
114	GV21	7	7.5
115	GV07	4.3	4.3
116	MP28	2.2	2.5
117	GV20	7.5	8
118	MP18	1.6	1.6

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ลำดับ ที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)	
		โคโลนี	ไซนส์
119	TM26	2.5	1.6
120	TM19	1.7	1.5
121	MP30	2.5	2.5
122	KN18	2.2	2.7
123	MP23	1	1.6
124	MP12	1.4	1.5
125	MP04	0.8	1
126	MG24	3	3.5
127	KN10	4	4.5
128	MP16	2.8	3.2
129	MG25	2.5	3.5
130	LG05	2	2
131	MG20	3	3.5
132	TM18	3	3.7
133	MG23	3.2	3.8
134	KN04	4	4.7
135	TM11	1.1	1.5
136	TM12	2.6	3.7
137	KN09	3.7	4
138	GV19	7	8
139	GV13	4.5	4.8
140	KN34	3.5	4.3
141	GV22	7.2	7.2
142	GV14	4.5	5
143	MP02	2	2.5
144	MP21	1.6	2.2
145	MG10	3.2	3.8
146	TM08	2.8	3.7
147	KN22	4	4.7
148	GV11	4	5
149	KN16	3.3	3.5
150	LC13	2.5	1.9
151	MP27	4.8	5
152	IR03	1.5	2.2

ลำดับ ที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)	
		โคโลนี	ไซนส์
153	KN13	1.3	1.8
154	TM05	2.8	3.2
155	MP09	2.3	1.5
156	MP24	3	3.3
157	TM06	2.6	3.5
158	TM10	3.0	3.5
159	MP11	1.5	2.5
160	MP06	1.7	1.4
161	MG14	2	2.5
162	TM03	3.5	3.6
163	TM25	1.5	1.7
164	TM04	2.5	2
165	TM15	1.7	2.5
166	TM24	1.5	1.6
167	MP10	3	3.2
168	MP29	1.5	2
169	MP26	1.9	2.2
170	MP03	1.5	2.3
171	GV12	NA	–
172	LG18	NA	–
173	LG16	NA	–
174	ET01	NA	–
175	KN07	NA	–
176	KN06	NA	–
177	GV12	NA	–
178	BG06	NA	–
179	LG06	NA	–
180	IR01	NA	–
181	LG17	NA	–
182	GG04	NA	–
183	LG10	NA	–
184	KN05	NA	–
185	KN02	NA	–
186	KN26	NA	–

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ลำดับ ที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ชม)	
		โคลินี่	ไซนส์
187	ET14	NA	-
188	GV16	NA	-
189	TM20	NA	-
190	GG10	NA	-
191	LG11	NA	-
192	LG03	NA	-
193	KN20	NA	-
194	LG12	NA	-
195	BG01	NG	NG
196	GG15	NG	NG
197	GG07	CT	CT
198	GG11	NG	NG
199	KN32	CT	CT
200	KN03	NG	NG
201	GG12	NG	NG
202	TM31	NG	NG
203	TM29	NA	-
204	KN15	CT	CT
205	TM22	NG	NG
206	TM30	CT	CT
207	MP07	CT	CT
208	TM14	NG	NG
209	GG14	CT	CT
210	MP05	NG	NG
211	KN21	NA	-
212	IR11	7	-
213	OT03	NA	-
214	OT07	NA	-
215	OT09	NA	-
216	PA03	NA	-
217	PA06	NA	-
218	LA04	NA	-
219	PA11	NA	-
220	YA07	NA	-

ลำดับ ที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ชม)	
		โคลินี่	ไซนส์
221	PA15	NA	-
222	LA02	NA	-
223	YA05	NA	-
224	LA03	NA	-
225	LA05	NA	-
226	YA06	NA	-
227	BB12	NA	-
228	KN30	NA	-
229	PA05	NA	-
230	PA04	NA	-
231	PA16	NA	-
232	PA13	NA	-
233	BB11	NA	-
234	PP05	NA	-
235	BB09	NA	-
236	MG17	NA	-
237	BB07	NA	-
238	BG04	NA	-
239	PP08	NA	-
240	OT11	NA	-
241	BB01	NA	-
242	IR06	NA	-
243	PA08	NA	-
244	PA14	NA	-
245	LA01	NA	-
246	BB05	NA	-
247	GG03	NA	-
248	KN14	NA	-
249	KK11	NA	-
250	BB02	NA	-
251	KN23	NA	-
252	MG09	NA	-
253	LM06	NA	-
254	MG03	NA	-

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ลำดับ ที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)	
		โคโลนี	โซนใส
255	KK09	NA	-
256	OT04	NA	-
257	IR10	NA	-
258	MG05	NA	-
259	MG15	NA	-
260	PP01	NA	-
261	TM21	NA	-
262	LG13	NA	-
263	PA07	NA	-
264	GV15	NA	-
265	OT02	NA	-
266	ET05	NA	-
267	TM01	NA	-
268	LM09	NA	-
269	ET09	NA	-
270	LG21	NA	-
271	LG22	NA	-
272	BB14	NA	-
273	ET02	NA	-
274	LC05	NA	-
275	BB08	NA	-
276	MP19	NA	-
277	GG06	NA	-
278	GV03	NA	-
279	CG02	NA	-
280	KN08	NA	-
281	GG05	NA	-
282	GL02	NA	-
283	ET04	NA	-
284	LM08	NA	-
285	PA02	NA	-
286	TM07	NA	-
287	YA04	NA	-
288	LM01	NA	-

ลำดับ ที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)	
		โคโลนี	โซนใส
289	GV02	NA	-
290	OT01	NA	-
291	GV08	NA	-
292	KK06	NA	-
293	GL04	NA	-
294	PP02	NA	-
295	PP07	NA	-
296	BB13	NA	-
297	ET06	NA	-
298	BB10	NA	-
299	KN33	NA	-
313	KN28	NA	-
314	GG02	NA	-
315	LM02	NA	-
316	MP25	NA	-
317	LG04	NA	-
318	GG01	NA	-
319	LG08	NA	-
320	PP06	NA	-
321	MG13	NA	-
322	LG21	NA	-
323	MG04	NA	-
324	BB04	NA	-
325	MG18	NA	-
326	ET13	NA	-
327	BB06	NA	-
328	LG02	NA	-
329	LG09	NA	-
330	OT05	NA	-
331	KK08	NA	-
332	LG20	NA	-

CT = Contaminate (มีเชื้ออื่นปนเปื้อน)

NA = Data not available (ไม่ได้บันทึกข้อมูล)

NG = No growth (เชื้อไม่เจริญ)

- = ไม่เกิดโซนใส

4.3 ผลการสร้างคัดกรองการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารเหลวของเชื้อราที่มีผลคัดกรองบนอาหารแข็งเป็นบวก

เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลบวกในการคัดกรองบนอาหารแข็งจำนวน 170 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเหลว และวัดความสามารถในการทำให้สี Azure B จางลง (%Azure B decolorization) พบว่า มีเชื้อรา จำนวน 14 ไอโซเลท มีค่า %Azure B decolorization ≥ 95 (ลำดับที่ 157-170 ในตารางที่ 4-3) จึงเลือกเชื้อรา 14 ไอโซเลทนี้ เพื่อเลี้ยงในอาหารเหลว สำหรับผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในปริมาณที่ใหญ่ขึ้น และวัดกิจกรรมเอนไซม์ต่อไป

ตารางที่ 4-3 ผลการคัดกรองการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารเหลวของเชื้อราที่มีผลคัดกรองเป็นบวกบนอาหารแข็ง

ลำดับ ที่	Isolation code	ผลการคัดกรอง	
		โซนใส (ซม.)	%Decolorization ในอาหารเหลว
1	GV01	2	0
2	GV05	1.5	0
3	GV09	2	0
4	GV18	3.5	0
5	IR02	1.9	0
6	IR04	2.5	0
7	IR09	1.9	0
8	IR14	2.5	0
9	IR07	2.5	0
10	OT08	2.5	0
11	OT10	2	0
12	BG02	3.4	0
13	PA01	1.3	1.42
14	LC10	3	4.16
15	LC02	3.9	9.75
16	PA17	3	9.76
17	MG11	2	10.66
18	YA01	1.5	12.78
19	MP31	1.3	18.13
20	KK01	1	19.77
21	CG01	2.4	20.34
22	MP13	1.7	23.33

ลำดับ ที่	Isolation code	ผลการคัดกรอง	
		โซนใส (ซม.)	%Decolorization ในอาหารเหลว
23	PA12	3.7	30.25
24	LC09	1.3	31.57
25	PP04	1.5	31.91
26	YA02	1.5	31.99
27	IR12	3	32.03
28	LG14	4.2	32.73
29	BB03	2.5	33.48
30	KK13	1.2	33.84
31	LC08	3.5	34.52
32	LC11	2.5	34.86
33	PP03	1.7	36.24
34	GL01	1.5	36.51
35	KK12	1	36.99
36	LG07	2.8	37.56
37	KK03	7.2	38.07
38	LM04	1	39.40
39	MG01	3.2	41.63
40	LM05	5.2	42.28
41	YA03	2	42.90
42	PA09	7	44.49
43	LM03	2.5	44.60
44	CG03	3	44.63

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

ลำดับ ที่	Isolation code	ผลการคัดกรอง	
		โซนสี (ชม.)	%Decolorization ในอาหารเหลว
45	LG15	2	45.31
46	KK10	3.5	46.44
47	GL03	2	46.79
48	LM10	1.2	47.48
49	LC14	2.7	47.60
50	ET07	2	48.02
51	CG04	2.5	48.58
52	IR08	1.4	48.98
53	LC12	2	49.38
54	MP22	2	51.00
55	LG23	3.2	51.33
56	KN25	1.5	51.34
57	MP20	1.5	51.95
58	ET08	3	52.25
59	KN12	4.2	52.32
60	KN24	11.5	52.47
61	LM07	1.2	52.57
62	BG05	1.5	52.96
63	BG03	1.5	53.39
64	KK02	4	54.70
65	TM27	2.6	54.73
66	LG01	1.8	54.85
67	TM13	3	54.90
68	MG07	5	58.22
69	KK07	4	59.48
70	MG08	4.5	59.92
71	LC01	2.4	60.64
72	GV04	1.5	60.48
73	ET10	2.4	60.87
74	MP34	1.1	61.58
75	LC06	1.5	63.40
76	LC07	3.5	64.35
77	LC17	3.2	64.50

ลำดับ ที่	Isolation code	ผลการคัดกรอง	
		โซนสี (ชม.)	%Decolorization ในอาหารเหลว
78	MP32	1.3	65.66
79	MP01	3	67.22
80	LM12	2	68.13
81	KN29	5.5	68.20
82	ET11	2	68.67
83	MG16	2.8	68.85
84	LM11	1.5	69.38
85	KN01	2.5	69.94
86	IR05	4.4	70.21
87	GG09	6.5	70.23
88	PA10	6.6	70.27
89	LC04	4	70.51
90	KK05	1.5	71.37
91	KN19	4	72.14
92	MG02	4	72.33
93	MP08	2.7	72.85
94	GG08	1.5	74.68
95	MG06	4.5	75.27
96	OT06	4.5	75.72
97	MP33	3	75.89
98	MG19	5	77.09
99	KN27	5.5	77.17
100	TM32	3	77.28
101	TM28	2.3	77.36
102	LC03	2.5	77.39
103	LG19	2	77.72
104	GV21	7.5	78.44
105	GV07	4.3	79.63
106	MP28	2.5	79.88
107	GV20	8	79.96
108	MP18	1.6	80.49
109	TM26	1.6	81.18
110	TM19	1.5	81.35

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

ลำดับ ที่	Isolation code	ผลการคัดกรอง	
		โซนสี (ชม.)	%Decolorization ในอาหารเหลว
111	MP30	2.5	81.44
112	KN18	2.7	81.80
113	MP23	1.6	82.05
114	MP14	2.3	82.31
115	MG22	4.2	82.70
116	MP17	2.6	83.17
117	GG13	4	83.31
118	KN11	4.5	83.43
119	KK04	3	83.87
120	TM16	2.4	84.22
121	KN17	3.2	84.24
122	GV10	3.8	84.46
123	GV06	4.2	84.74
124	MP12	1.5	85.60
125	MP04	1	85.95
126	MG24	3.5	86.01
127	KN10	4.5	86.11
128	MP16	3.2	86.38
129	MG25	3.5	87.15
130	LG05	2	87.64
131	MG20	3.5	87.75
132	TM18	3.7	88.64
133	MG23	3.8	88.92
134	KN04	4.7	89.07
135	TM11	1.5	89.16
136	TM12	3.7	89.16
137	KN09	4	89.51
138	GV19	8	89.51
139	GV13	4.8	89.57
140	KN34	4.3	89.72
141	GV22	7.2	89.89
142	GV14	5	90.01

ลำดับ ที่	Isolation code	ผลการคัดกรอง	
		โซนสี (ชม.)	%Decolorization ในอาหารเหลว
143	MP02	2.5	90.11
144	MP21	2.2	90.20
145	MG10	3.8	90.28
146	TM08	3.7	90.71
147	KN22	4.7	90.98
148	GV11	5	91.09
149	KN16	3.5	91.18
150	LC13	1.9	91.34
151	MP27	5	94.02
152	IR03	2.2	94.22
153	KN13	1.8	94.64
154	TM05	3.2	94.80
155	MP09	1.5	94.80
156	MP24	3.3	94.80
157	TM06	3.5	95.49
158	TM10	3.5	95.84
159	MP11	2.5	95.84
160	MP06	1.4	95.92
161	MG14	2.5	95.99
162	TM03	3.6	96.62
163	TM25	1.7	96.62
164	TM04	2	96.79
165	TM15	2.5	96.96
166	TM24	1.6	97.49
167	MP10	3.2	97.79
168	MP29	2	98.53
169	MP26	2.2	98.61
170	MP03	2.3	99.91

CT = Contaminate (มีเชื้อปนเปื้อน)

NA = Data not available (ไม่ได้บันทึกข้อมูล)

NG = No growth (เชื้อไม่เจริญ)

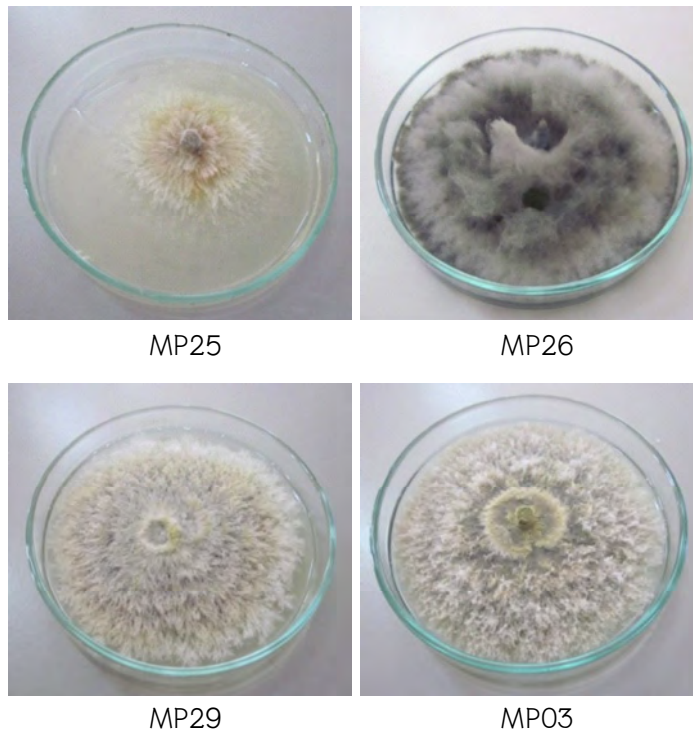
- = ไม่เกิดโซนสี

4.4 กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตได้ในอาหารเหลว

เมื่อเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ 14 ไอโซเลท ที่ให้ผลการคัดกรองเป็นบวกในระดับสูง ในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และนำน้ำเลี้ยงมาวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ พบว่ามีเชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ TM25, MP26, MP29 และ MP03 ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากมะขาม และมะขามป้อม ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ในระดับสูงกว่าเชื้อราไอโซเลทอื่นๆ อย่างชัดเจน โดย MP03 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 204 Units/ml (ตารางที่ 4-4) จึงได้เลือกเชื้อรา 4 ไอโซเลทนี้ไปทำการวัดค่าความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลองต่อไป ลักษณะโคโลนีเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท บนอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) มีลักษณะดังแสดงในภาพที่ 4-1

ตารางที่ 4-4 กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ 14 ไอโซเลท

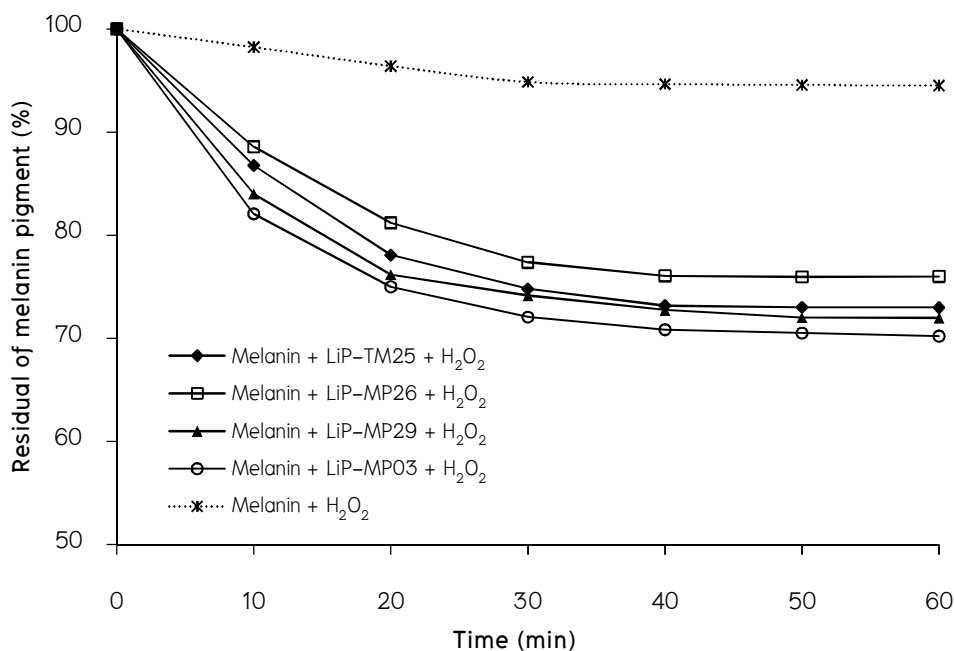
ลำดับที่	Fungal isolation code	กิจกรรมเอนไซม์ (Units/ml)
1	MP06	22
2	MG14	42
3	TM10	61
4	TM04	64
5	MP11	66
6	TM03	68
7	TM06	68
8	MP10	82
9	TM24	100
10	TM15	106
11	TM25	160
12	MP26	170
13	MP29	184
14	MP03	204



ภาพที่ 4-1 ลักษณะโคโลนีเชื้อราอายุ 7 วัน บนอาหารแข็ง PDA

4.5 ความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง

ความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรา TM25, MP26, MP29 และ MPO3 ในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลองนั้น พบว่าพบว่าเอนไซม์จากเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท มีความสามารถในการย่อยสลายให้สีของเมลานินสังเคราะห์จางลง แต่มีระดับความสามารถที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์จาก MPO3 (จากมะขามป้อม) มีความสามารถในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงได้มากที่สุด (ภาพที่ 4-2) ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ในจำนวนเชื้อรา 4 ไอโซเลท จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าเชื้อราแซบไฟรบที่แยกได้จากซากพืชและดิน มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ (Woo *et al.*, 2004; Mohorčič *et al.*, 2007) และจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ก็มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดลิกนินเปอร์ออกซิเดส เพื่อย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้เช่นกัน



ภาพที่ 4-2 ความสามารถในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรา TM25, MP26, MP29 และ MP03

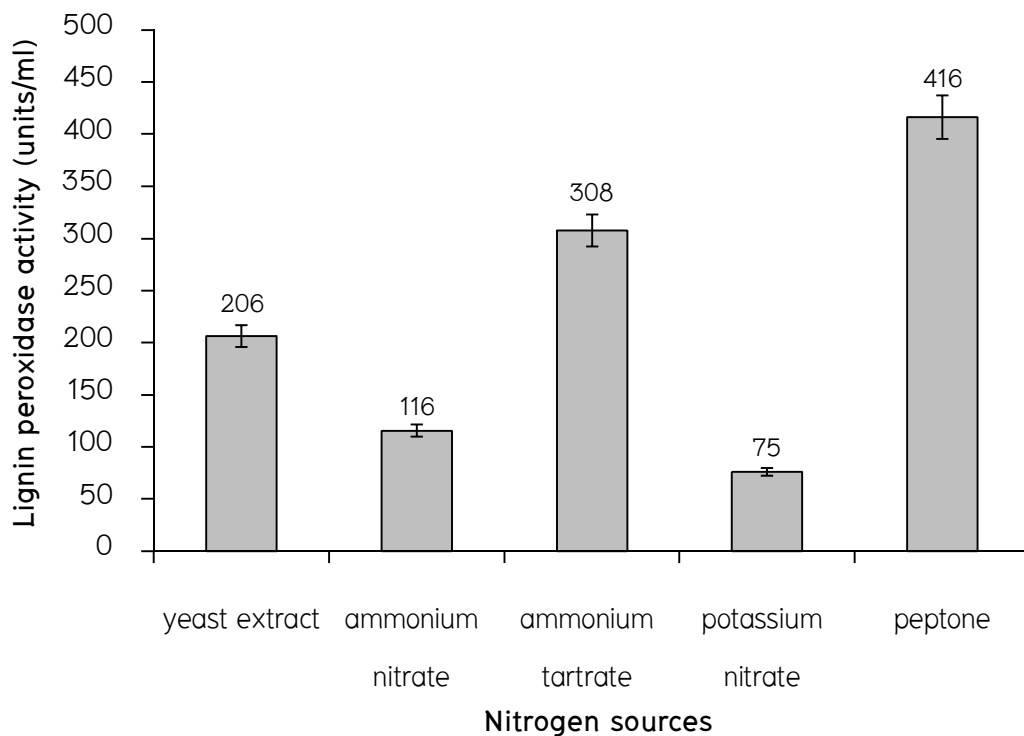
4.6 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสของเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหารเหลว

4.6.1 แหล่งไนโตรเจน

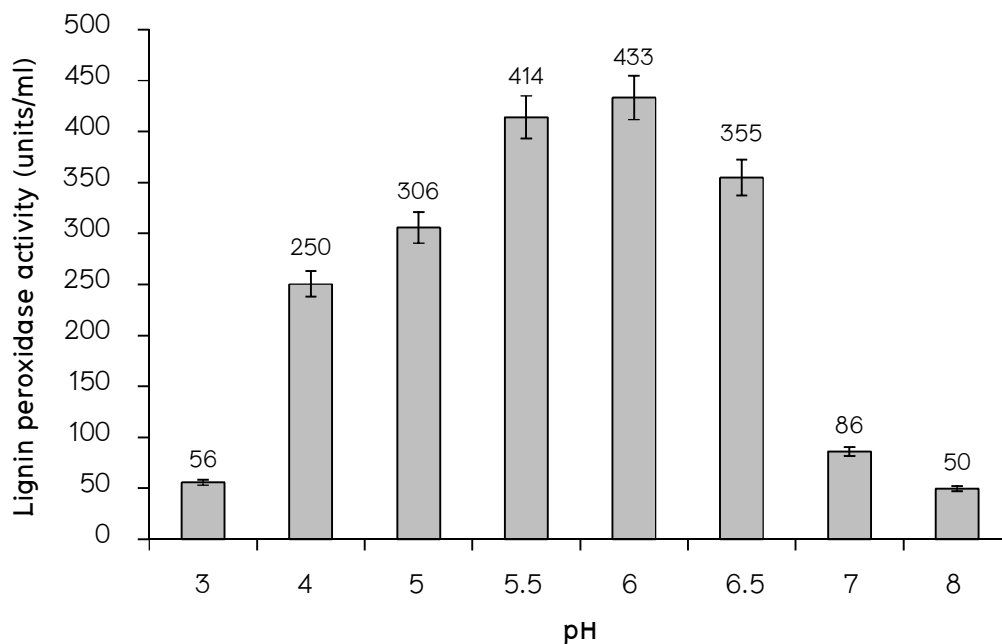
เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหารเหลว LME basal medium (LBM) ที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 0.01% บ่มนาน 7 วันแล้วนั้น พบว่าอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของ 0.01% peptone ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ (ภาพที่ 4-3) ซึ่งแหล่งไนโตรเจนนี้จะถูกใช้แทนที่ yeast extract ในสูตรอาหาร LBM เพื่อใช้ทดสอบสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในปัจจุบันด้านอื่นๆ ต่อไป

4.6.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหารเหลว LBM ที่มี 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับให้อาหารมี pH ต่างๆ กัน และบ่มนาน 7 วันแล้วนั้น พบว่าอาหารเหลวที่มี pH 6.0 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสูงกว่า pH ค่าอื่นๆ ที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 4-4) ซึ่งในการเตรียมอาหาร LBM เพื่อทดสอบสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของปัจจัยเพาะเลี้ยงด้านอื่นๆ ต้องปรับ pH ของอาหาร LBM ให้ได้เท่ากับ 6.0



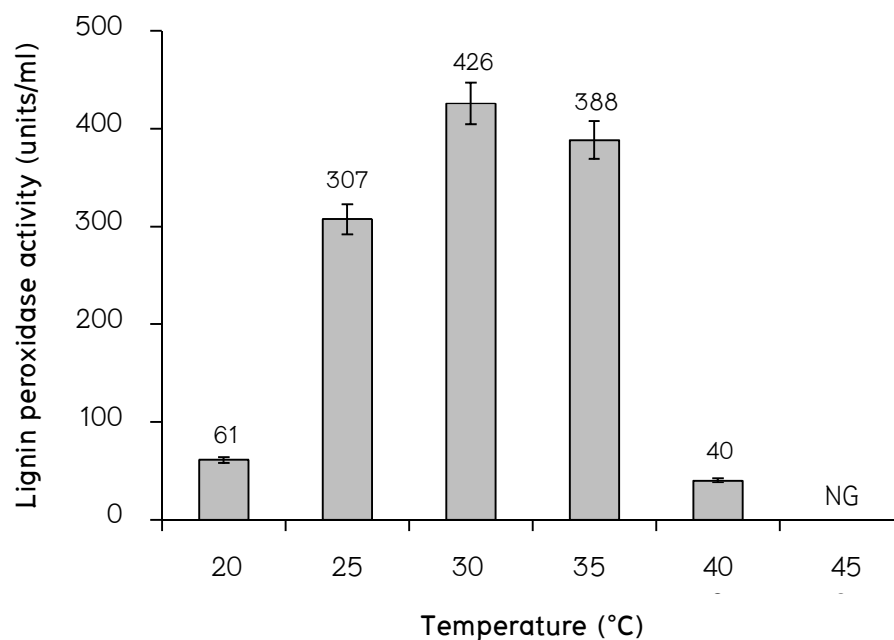
ภาพที่ 4-3 กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหาร LBM ที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ บ่มนาน 7 วัน



ภาพที่ 4-4 กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหาร LBM ที่มี 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่า pH ต่างๆ บ่มนาน 7 วัน

4.6.3 อุณหภูมิ

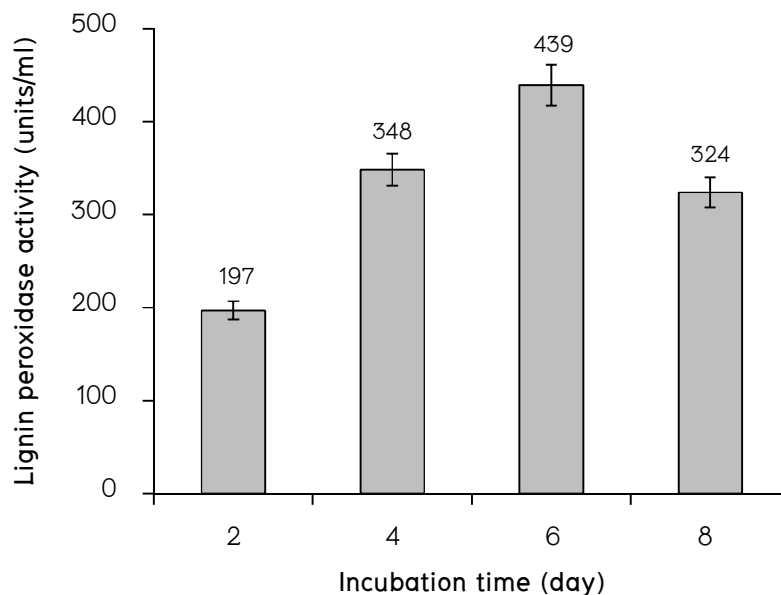
เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหารเหลว LBM ที่มี 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน อาหารมี pH 6.0 และบ่มนาน 7 วัน ในอุณหภูมิต่างๆ แล้วนั้น พบว่าการเพาะเลี้ยงที่บ่มในอุณหภูมิ 30 °ซ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสูงกว่าอุณหภูมิอื่นที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 4-5) ซึ่งในอุณหภูมินี้จะถูกนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของปัจจัยเพาะเลี้ยงด้านอื่นๆ ต่อไป



ภาพที่ 4-5 กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหาร LBM ที่มี 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 6.0 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 7 วัน (NG: no growth)

4.6.4 ระยะเวลาบ่ม

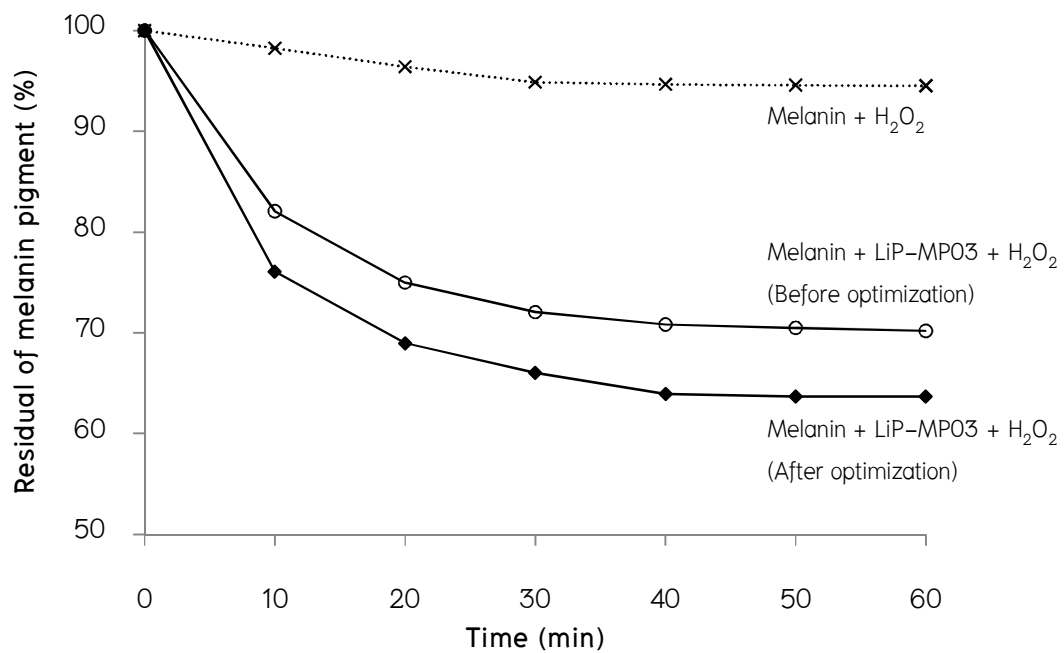
เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ MP03 ในอาหารเหลว LBM ที่มี 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน อาหารมี pH 6.0 บ่มในอุณหภูมิ 30 °ซ แล้วเก็บส่วนของน้ำเลี้ยงเพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในวันที่ 2, 4, 6 และ 8 แล้วนั้น พบว่าการเพาะเลี้ยงที่บ่มนาน 6 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสูงกว่าระยะเวลาบ่มอื่นๆ ที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 4-6) ซึ่งระยะเวลาบ่มนี้จะถูกนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อไป



ภาพที่ 4-6 กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ MPO3 ในอาหาร LBM ที่มี 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 6.0, บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ด้วยระยะเวลาบ่มนานต่างๆ กัน

4.7 ผลการวัดค่าความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสที่ผลิตได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง

กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดสจากเชื้อราเอนโดไฟท์ MPO3 ที่เพาะเลี้ยงใน optimized condition มีค่า 439 units/ml ซึ่งได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นกว่าก่อนทำการ optimization ประมาณ 2 เท่า และเมื่อทดสอบความสามารถของเอนไซม์ในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง พบว่ามีความสามารถในการทำให้สีของเมลานินสังเคราะห์จางลงได้มากกว่าเอนไซม์ที่ได้จากสภาวะก่อน optimization โดยในนาที่ที่ 60 มีปริมาณความเข้มข้นของสีเมลานินคงเหลือ (residual of melanin pigment) ประมาณ 63.7% ในขณะที่เอนไซม์ได้จากสภาวะก่อน optimization มีปริมาณความเข้มข้นของสีเมลานินคงเหลือ 70.2% (ภาพที่ 4-7)



ภาพที่ 4-7 ความสามารถในการทำให้สีเมลานินสั้เคราะห์จางลงของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรา MP03 ที่เพาะเลี้ยงใน optimized condition เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตได้ในสภาวะก่อน optimization

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากพืชตัวอย่าง 21 สายพันธุ์ สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 332 ไอโซเลท โดยพืชแต่ละสายพันธุ์ให้เอนโดไฟต์ได้จำนวนที่แตกต่างกัน เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟต์ทุกไอโซเลท มาคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสบนอาหารแข็ง LBM–Azure B agar medium พบว่า มีเชื้อราจำนวน 170 ไอโซเลท ที่ให้ผลเป็นบวกด้วยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนไฮดรอลิซิสที่แตกต่างกัน เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ให้ผลบวกในการคัดกรองบนอาหารแข็ง จำนวน 170 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเหลว และวัดความสามารถในการทำให้สี Azure B จางลง (%Azure B decolorization) พบว่า มีเชื้อรา จำนวน 14 ไอโซเลท ให้ค่า %Azure B decolorization ≥ 95 และเมื่อเลี้ยงเอนโดไฟต์ 14 ไอโซเลทนี้ ในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส พบว่ามีเชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ TM25 (แยกจากมะขาม), MP26, MP29 และ MP03 (แยกจากมะขามป้อม) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ในระดับสูงกว่าเชื้อราไอโซเลทอื่นๆ อย่างชัดเจน จึงได้นำเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อรา 4 ไอโซเลทนี้ ไปวัดค่าความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง พบว่าเอนไซม์จากเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท มีความสามารถในการย่อยสลายให้สีของเมลานินสังเคราะห์จางลง แต่มีระดับความสามารถที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์จาก MP03 มีความสามารถในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงได้มากที่สุด ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ในจำนวนเชื้อรา 4 ไอโซเลท และเมื่อนำเชื้อรา MP03 ไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (optimization) เพื่อผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส คือ ในอาหารเหลว LBM ที่มี 0.01% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 6.0, บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 6 วัน สามารถส่งเสริมให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะก่อน optimization และเอนไซม์นี้มีความสามารถในการทำให้สีของเมลานินสังเคราะห์จางลงได้มากกว่าเอนไซม์ที่ได้จากสภาวะก่อน optimization โดยในนาที่ที่ 60 มีปริมาณความเข้มข้นของสีเมลานินคงเหลือ (residual of melanin pigment) ประมาณ 63.7% จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าเชื้อราแซบโพรบที่แยกได้จากซากพืช และจากดินมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ (Woo *et al.*, 2004; Mohorčić *et al.*, 2007) และจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโด

ไฟท์ก็มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดลิกนินเปอร์ออกซิเดส เพื่อย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้เช่นเดียวกัน

จากปฏิกิริยาทดสอบความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์นั้น มีการใช้ H_2O_2 ในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา ซึ่ง H_2O_2 เป็นสารที่ไม่เหมาะสมต่อการทำดาร์บเครื่องสำอาง ถึงแม้ในครั้งนี ผู้วิจัยได้พยายามปรับสภาวะจนกระทั่งใช้ความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ต่ำมากถึง 2 mM เพื่อกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาแล้ว แต่อย่างไรก็ตามควรมีการต่อยอดการศึกษาเพื่อให้ได้สภาวะการเกิดปฏิกิริยาโดยปราศจาก H_2O_2 เพื่อความปลอดภัยในการนำไปใช้ในดาร์บเครื่องสำอางต่อไป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อราเอนโดไฟท์อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางเพื่อทำให้สีเมลานินของผิวหนังจางลงได้ และเนื่องจากเอนไซม์นี้ผลิตได้จากแหล่งชีวภาพ ดังนั้นจึงน่าจะเป็นสารที่ได้รับการยอมรับมากกว่าการใช้สารเคมีในส่วนผสมของดาร์บเครื่องสำอาง แต่ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

5.2 แนวทางการทำวิจัยในลำดับต่อไป

- 1) ควรศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายเมลานินของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ให้มีสภาวะที่ปราศจาก H_2O_2 และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ใกล้เคียงกับสภาพผิวมากขึ้น เพื่อความปลอดภัยในการใช้เอนไซม์ในดาร์บเครื่องสำอาง
- 2) ควรมีการศึกษาความเป็นพิษของเอนไซม์ก่อนนำไปใช้ในดาร์บเครื่องสำอาง
- 3) ควรมีการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ก่อนนำไปใช้ในดาร์บเครื่องสำอาง

เอกสารอ้างอิง

- Akhtar N, Hisham J, Khan HMS, Khan BA, Mahmood T, Saeed T. 2012. Whitening and antierythemic effect of a cream containing *Morus alba* extract. Hygeia Journal for Drugs and Medicines 4: 97–103.
- Al-Saleh I, Shinwari N, El-Doush I, Billedo G, Al-Amodi M, Khogali F. 2004. Comparison of mercury levels in various tissues of albino and pigmented mice treated with two different brands of mercury skinlightening creams. Biometals 17: 167–175.
- Arora DS, Gill PK. 2011. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. Enzyme and Microbial Technology 28: 602–605.
- Boissy RE, Visscher M, de Long MA. 2005. DeoxyArbutin: a novel reversible tyrosinase inhibitor with effective in vivo skin lightening potency. Experimental Dermatology 14: 601–8.
- Bussaban B, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. 2001. A synopsis of the genus *Berkleasium* with two new species and new records of *Canalisporium caribense* from Zingiberaceae in Thailand. Fungal Diversity 8: 73–85.
- Bussaban B, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. 2003. Three new species of *Pyricularia* isolated as Zingiberaceous endophytes from Thailand. Mycologia 95: 519–524.
- Butler MJ, Day AW. 1998. Destruction of fungal melanins by ligninases of *Phanerochaete chrysosporium* and other white rot fungi. International Journal of Plant Science 159: 989–995.
- Chan EWC, Lim YY, Wong LF, Lianto FS, Wong SK, Lim KK, Joe CE, Lim TY. 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. Food Chemistry 109: 477–483.
- Cho SJ, Roh JS, Sun WS, Kim SH, Park KD. 2006. *N*-Benzylbenzamides: a new class of potent tyrosinase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16: 2682–2684.
- Cho YH, Kim JH, Park SM, Lee BC, Pyo HB, Park HD. 2006. New cosmetic agents for skin whitening from *Angelica dahurica*. Journal of Cosmetic Science 57: 11–21.

- del Giudice P, Yves P. 2002. The widespread use of skin lightening creams in Senegal: a persistent public health problem in West Africa. *International Journal of Dermatology* 41: 6972.
- Dooley TP. 1997. Topical skin depigmentation agents: current products and discovery of novel inhibitors of melanogenesis. *Journal of Dermatological Treatment* 8: 275–279.
- Freeman S, Rodriguez RJ. 1993. Genetic conversion of fungal plant to a non pathogenic, endophyte mutualist. *Science* 260: 75–78.
- Ha TJ, Yang MS, Jang DS, Choi SU, Park KH. 2001. Inhibitory activities of flavanone derivatives isolated from *Sophora flavescens* for melanogenesis. *Bull Korean Chemical Society* 22: 97–99.
- Hyde KD, Yanna, Pinnoi A, Jones EBG. 2003. *Goidanichiella fusiforma* sp. nov. from palm fronds in Brunei and Thailand. *Fungal Diversity* 11: 119–122.
- Jones EBG, Hyde KD. 2004. Introduction to Thai fungal diversity. In: *Thai Fungal Diversity* (eds. E.B.G. Jones, M. Tanticharoen and K.D. Hyde). BIOTEC, Thailand: 7–35.
- Jeon JH. 2002. Purification and characterization of 2,4-dichlorophenol oxidizing peroxidase from *Streptomyces* sp. AD001. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 12: 972–977.
- Kasraee B, Handjani F, Aslani FS. 2003. Enhancement of the depigmenting effect of hydroquinone and 4-hydroxyanisole by all-trans-retinoic acid (tretinoin): the impairment of glutathione-dependent cytoprotection. *Dermatology* 206: 289–291.
- Kim YJ, Uyama H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 1707–1723.
- Kim Y.J., No J.K., Lee J.H., Chung H.Y. 2005. 4,4'-Dihydroxybiphenyl as a new potent tyrosinase inhibitor. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28: 323–327.
- Kodsueb R, Lumyong S, Hyde KD, Lumyong P, McKenzie EHC. 2006. *Acrodictys micheliae* and *Dictyosporium manglietiae*, two new anamorphic fungi from woody litter of Magnoliaceae in northern Thailand. *Cryptogamie Mycologie* 27: 111–119.

- Lin X, Lu C, Huang Y, Zheng Z, Su W, Shen Y. 2007. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1037–1040.
- Liu YT, Lee SH, Liao YY. 1995. Isolation of a melanolytic fungus and its hydrolytic activity on melanin. *Mycologia* 87: 651–654.
- Luther JP, Lipke H. 1980. Degradation of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 40: 145–155.
- Maisuthisakul P, Gordon MH. 2009. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry* 117: 332–341.
- Matsubayashi T, Sakaeda T, Kita T, Kurimoto Y, Nakamura T, Nishiguchi K, Fujita T, Kamiyama F, Yamamoto A, Okumura K. 2003. Intradermal concentration of hydroquinone after application of hydroquinone ointments is higher than its cytotoxic concentration. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 26: 1365–1367.
- Matsuda H, Nakashima S, Oda Y, Nakamura S, Yoshikawa M. 2009. Melanogenesis inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* in B16 melanoma cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17: 6048–6053.
- Mauricio T, Karmon Y, Khaiat A. 2011. A randomized and placebo-controlled study to compare the skin-lightening efficacy and safety of lignin peroxidase cream vs. 2% hydroquinone cream. *Journal of Cosmetic Dermatology* 10: 253–259.
- Mohamad R, Mohamed MS, Suhaili N, Salleh MM, Ariff AB. 2010. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 5: 24–37.
- Mohorčič M, Friedrich J, Renimel I, André P, Mandin D, Chaumont J. 2007. Production of melanin bleaching enzyme of fungal origin and its application in cosmetics. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12: 200–206.
- Mohorčič M, Teodorovič S, Golob V, Friedrich J. 2006. Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths. *Chemosphere* 63: 1709–1717.
- Momtaz S, Mapunya BM, Houghton PJ, Edgerly C, Hussein A, Naidoo S, Lall N. 2008. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem

- bark, used in South Africa for skin lightening. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 507–512.
- Nagasaki K, Kumazawa M, Murakami S, Takenaka S, Koike K, Aoki K. 2008. Purification, characterization, and gene cloning of *Ceriporiopsis* sp. strain MD-1 peroxidases that decolorize human hair melanin. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5106–5112.
- Nakamura Y, Mtui G. 2003. Biodegradation of endocrine-disrupting phenolic compounds using laccase followed by activated sludge treatment. *Biotechnol. Bioprocess Engineering* 8: 294–299.
- No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY. 1999. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sciences* 65: 241–246.
- Parvez S, Kang M, Chung HS, Cho C, Hong MC, Shin MK, Bae H. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy research* 20: 921–934.
- Photita W, Lumyong S, Lumyong P, Hyde KD. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research* 105: 1508–1514.
- Photita W, Lumyong S, McKenzie EHC, Hyde KD, Lumyong P. 2002. A new *Dictyosporium* species from *Musa acuminata* in Thailand. *Mycotaxon* 82: 415–419.
- Pointing SB. 1999. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity* 2: 17–33.
- Pongpunyayuen S, Kanlayavattanukul M, Lourith N. 2010. Study of skin whitening of *Narangi crenulata* for cosmetic raw material. Independence Study for Master of Cosmetic Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.
- Prompttha I, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. 2002. Fungal succession on senescent leaves of *Manglietia garrettii* in Doi Suthep–Pui National Park, northern Thailand. *Fungal Diversity* 10: 89–100.
- Prompttha I, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. 2004. A new species of *Pseudohalonectria* from Thailand. *Cryptogamie Mycologie* 25: 43–47.

- Promptutha I, Hyde KD, McKenzie EHC, Peberdy JF, Lumyong S. 2010. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? *Fungal Diversity* 41: 89–99.
- Punitha V, Kannan P, Saravanabhavan S, Thanikaivelan P, Raghava RJ, Nair BU. 2009. Chemical degradation of melanin in enzyme based dehairing and fiber opening of buff calfskins. *Springer–Verlag* 11: 299–306.
- Ralph JP. 1994. Decolourisation and depolymerisation of solubilised low-rank coal by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42: 536–542.
- Rangkadilok N, Sitthimonchai S, Worasuttayangkurn L, Mahidol C, Ruchirawat M, Satayavivad J. 2007. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food and Chemical Toxicology* 45: 328–336.
- Rättö M, Chatani M, Ritschkoff AC, Viikari L. 2001. Screening of micro-organisms for decolorization of melanins produced by bluestain fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 210–213.
- Rendon MI, Gaviria JL. 2005. Review of skin lightening agents. *Dermatology and Plastic Surgery* 31: 886–889.
- Robbins CR. 1994. Chemical and physical behaviour of human hair. 3rd ed. Springer Verlag 142–150.
- Ryu WT, Jang MY, Cho MH. 2003. The selective visualization of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase, produce by white rot fungi on solid media. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8 130–135.
- Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade–Gordon P, Constanzo M, Eisinger M, Shapiro SS. 2000. Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *The Journal of Investigative Dermatology* 115: 162–167.
- Shinya F, Masanori H, Akihiko S, Mikio S. 2010. Production of manganese peroxidase by white rot fungi from potato-processing wastewater: Role of amino acids on biosynthesis. *African Journal of Biotechnology* 9: 725–731.

- Sinclair JB, Cerkaskas RF. 1996. Latent infection vs endophytic colonization by fungi. Minnesota: APS Press.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D. 1993. Taxol and taxol production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 260: 214–216
- Strobel G, Daisy B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:491–502.
- Strobel G, Yang XS, Sears J, et al. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142:435–440.
- Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, Sugimoto K, Kuriki T. 2004. Inhibitory effects of alpha-arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27: 510–514.
- Tekere M, Mswaka AY, Zvavya R, Read JS. 2001. Growth, dye degradation, and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 420–426.
- Theantana T, Hyde KD, Lumyong S. 2007. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. *Science and Technology Journal* 7(S1): 13–18.
- Woo SH, Cho JS, Lee BS, Kim EK. 2004. Decolorization of melanin by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 9: 256–260.
- Young AR. 2006. Acute effects of UVR on human eyes and skin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 92: 80–85.

ภาคผนวก
Proceeding

An alternative approach for melanin decolorization using biological-origin lignin peroxidase from endophytic fungi

Itthayakorn Promputtha¹ and Kevin Hyde²

¹School of Cosmetic Science, Mae Fah Luang University, 333 Moo 1, Tasud, Muang, Chiang Rai 57100, Thailand

²School of Science, Mae Fah Luang University, 333 Moo 1, Tasud, Muang, Chiang Rai, 57100 Thailand

E-mail address: itthayakorn.pro@mfu.ac.th

Abstract:

Introduction and Objective: Whitening melanin by chemical formulation is generally worked by inhibition of tyrosinase activity, reduction of melanosome transfer, or activation of cell turn over. However, these applications taking long time to see satisfying result and may have some undesirable effects to skin. This study aimed to investigate an alternative approach of melanin lightening through activity of lignin peroxidase (LiP) from endophytic and saprobic fungi, which may help to avoid the adverse effects of chemical to skin.

Methods: The 332 endophytic fungi isolated from 21 plant species and 69 saprobic fungi were screened for LiP activity using an azure B agar medium together with the azure B liquid medium methods. The positive strains were subjected to produce LiP in liquid medium, assayed for enzyme activity, and tested for ability of melanin decolorization.

Results: Fourteen endophytes and four saprobes signified positive result with both agar medium and presented $\geq 95\%$ azure B decolorization in liquid medium screening methods were selected as positive strain for LiP. Of these, 4 endophytes; TM25, MP26, MP29, and MP03 were expressed high LiP activity in liquid medium (160, 170, 184, and 204 units/ml, respectively). The greatest melanin decolorization rate was activated by LiP produced from endophyte MP03 which isolated from Indian gooseberry (*Phyllanthus emblica* L.).

Conclusion: This study demonstrated that LiP from endophytic fungi may possible in cosmetic application for purpose of melanin lightening. This approach appears to be importance because the enzyme is a biological origin and will be more acceptable for cosmetic purpose than chemical formulations.

Keywords: Endophytic fungi, lignin peroxidase, melanin decolorization, saprobic fungi,

1. Introduction

Skin whitening by chemical formulation is usually focused on decreasing of melanin concentration such as, inhibition of tyrosinase activity using arbutin, kojic acid (1), reduction of melanosome transfer using niacinamide (2). Others have looked at activation of cell turn-over using vitamin A, or azelic acid (3). However, skin whitening with these applications take long time to see satisfying result and may have some

undesirable effects to skin e.g. allergy, thin skin, more sensitive to heat or UV radiation, or lasting darken (3). For this reason, an alternative approach of skin whitening is the decoloring of melanin pigment using biological enzyme originated from fungi (4-5). Various species of saprophytic fungi, especially white rot have been reported to degrade melanin by ligninolytic enzymes e.g. lignin peroxidase (EC 1.11.1.14), manganese peroxidase (EC 1.11.1.13) (4-5). The soil

fungi, *Sporotrichum pruinosum* capability to produce melanolytic enzyme to decolorized synthetic melanin (4). Whereas, endophytic fungi have never been investigated for its melanolytic activity since Promputtha et al. (6) suggested that endophytic fungi potential to produce lignin degrading enzymes for their survival. These led to hypothesize that endophytic fungi might produce ligninolytic enzymes for melanolytic activity.

2. Objective

This study aimed to investigate an alternative approach for decolorization of melanin pigment using lignin peroxidase (LiP) originated from endophytic fungi.

3. Methods

3.1 Fungal strains: Endophytic fungi were isolated from 21 plant species criterion based on lignin content in each plant species (hardwood, annual, and edible plant). Plant samples were washed, cut to small piece, surface sterilization to eliminate all surface microorganisms (1 min pre-wet in H_2O_2 , 2 min in 3% NaOCl, 1 min in 75% EtOH, and 1 min in sterile water), aseptically dried, placed on potato dextrose agar (PDA) plate, and incubated at $28 \pm 1^\circ C$. Fungal growth was observed and transferred to new PDA plate. Saprobic fungi were isolated from decayed plant materials using single spore isolation techniques. The fungal pure cultures were subjected for screening of LiP.

3.2 Screening of fungal lignin peroxidase: 332 endophytes and 69 saprobes were screened for their ability of LiP production with azure B agar medium and azure B liquid medium method. For the agar medium method, the LME basal medium (LBM) (7) supplemented with 0.01% (w/v) azure B, 0.2% (w/v) glucose, and 1.6% (w/v) agar was prepared. The single agar disc cut from the active growing colony margin of each fungal culture was inoculated on each agar medium plate, incubated at $28 \pm 1^\circ C$ and examined daily for 10 days. The production of LiP as clearance of blue

colored medium was observed and diameter of the clear zone was measured. For liquid medium method, a 5 ml of LBM medium supplemented with 0.2% (w/v) glucose was dispensed to test tube. Five agar discs of each fungal culture were inoculated in each medium tube and incubated on 120 rpm incubator shaker at $28 \pm 1^\circ C$ for 10 days. The 0.5 ml of 0.01% (w/v) azure B solution was added to each 10-days culture broth, continue incubated on 120 rpm shaker at $28 \pm 1^\circ C$ for 24 h, and azure B decolorization was measured at 645 nm. The fungal isolates indicated positive result on agar medium and presented $\geq 95\%$ azure B decolorization with liquid medium methods were selected for LiP production.

3.3 Lignin peroxidase production by positive fungal strain and enzyme assay: LBM medium supplemented with 0.2% (w/v) glucose and 0.1% (w/v) lignin powder was prepared. A 50 ml of medium broth was inoculated with 10 agar discs of fungal culture of each positive strain and incubated on 120 rpm shaker at $28 \pm 1^\circ C$. The culture broth was harvested daily and determined for LiP activity following the assay of Woo et al. (5) with some modification. The assay reaction was carried out in test tubes at $30^\circ C$, and the reaction mixture contained 1 ml of 125 mM sodium tartrate buffer (pH 3.0), 500 μ l of 0.160 mM azure B, 500 μ l of the culture filtrate (crude enzyme), and 500 μ l of 2.0 mM H_2O_2 . One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required for the decrease in 0.01 absorbance at 645 nm per min per ml of the culture filtrate.

3.4 Melanin decolorization by LiP: Decolorization of synthetic melanin was measured as the decrease in the absorbance at 300 nm in reaction mixture of 1 ml of 125 mM tartrate buffer solution (pH 3.0), 500 μ l of 100 mg/l synthetic melanin, 500 μ l of LiP, and 500 μ l of 2.0 mM H_2O_2 at $30^\circ C$ for 1 h. The percentage of melanin residual remained in the reaction was calculated (5).

4. Results and Discussions

4.1 Fungal isolates and their ability of lignin peroxidase activity

Almost of endophytes presented positive screening results on agar medium with $\geq 75\%$ decolorization of azure B in liquid medium methods were isolated from hardwood plant species e.g. Indian gooseberry and tamarind, while the annual plants are not found endophytes contain this qualifications (Table 1). The earlier study reported that fungi do certainly produce lignin-degrading peroxidases in the presence of a wood substrate. Therefore, hardwood plant samples yielded endophytic fungi that produced higher LiP activity than annual crops (8). Of those positive strains, 14 endophytes and 4 saprobes presented positively screening result on agar medium with $\geq 95\%$ decolorization of azure B in the liquid medium methods (Table 2). These 18 strains were subjected to produce LiP in liquid medium supplemented with lignin powder for LiP induction.

4.2 Lignin peroxidase activity

Throughout 10-days cultivation, the enzyme activity of all 18 strains were highest at day 6 with gradually declined afterward (data not shown). Four endophytes; TM25, MP26, MP29, and MP03 expressed significant greater LiP activity (160, 170, 184, and 204 units/ml, respectively) than the others even if the saprobic fungi which have been reported the main fungi produced large amount of LiP (Table 2) (4-5).

4.3 Melanin decolorization by lignin peroxidase of endophytic fungi

Decolorization of synthetic melanin was investigated with crude enzyme solution of TM25, MP26, MP29, and MP03. Figure 1 shows percentage of residual melanin pigment at 300 nm in the presence of LiP with H_2O_2 compared with reaction without additional of LiP. The highest melanin decolorization rate was activated by LiP of MP03 which was endophytic fungi isolated from Indian gooseberry. Since several species of saprobic and soil fungi have been reported

that potentially to produce melanolytic enzymes to decolorized synthetic melanin (4-5), nevertheless, this study is the first report that melanin was decolorized by LiP from endophytic fungi.

Table 1 Endophytic fungi isolated from 21 plants and their ability of LiP activity.

Plant sample	No. of isolate	Isolation code	No. of positive isolate*
Indian gooseberry	34	MP01-MP34	21
Jackfruit	34	KN01-KN34	11
Tamarind	33	TM01-TM33	17
Mango	25	MG01-MG25	9
Longan	23	LG01-LG23	2
Guava	22	GV01-GV22	10
Lychee	17	LC01-LC17	2
Pineapple	17	PA01-PA17	0
Ginger	15	GG01-GG15	1
Tea	14	ET01-ET14	0
Indian Rubber	14	IR01-IR14	1
Banana	14	BB01-BB14	0
Dragon fruit	13	KK01-KK13	1
Lime	12	LM01-LM12	0
Oil tea	11	OT01-OT11	0
Papaya	8	PP01-PP08	0
Para rubber	7	YA01-YA07	0
Leech lime	6	LI01-LI06	0
Lemongrass	5	LA01-LA05	0
Galanga	4	GL01-GL04	0
Citronella Grass	4	CG01-CG04	0

* The isolate presented positive screening results on agar medium and with $\geq 75\%$ decolorization of azure B in liquid medium methods.

5. Conclusion

This study demonstrated that LiP of fungal endophytes can decolorize synthetic melanin based on the detection method of Woo et al. (5) which have statement that LiP able to decolorize melanin with association of H_2O_2 . However, H_2O_2 with high concentration ($\sim 30\%$) can itself decolorize melanin since H_2O_2 is a strong oxidant (5). Consequently, this study has attempted to optimize the functional LiP to degrade

Table 2 Summarization of screening results, enzyme activity, and melanin decolorization ability of LiP from 4 saprobes and 14 endophytes.

Code	Screening		LiP activity (u/ml) (Day 6)	Residual melanin pigment (%)**
	Clear zone (cm)	%D*		
BOM4	2.3	95.92	56	-
RP026	2.5	95.59	66	-
KSUA4	1.6	95.60	76	-
RP028	2.7	95.11	76	-
TM06	3.5	95.49	68	-
TM10	3.5	95.84	61	-
MP11	2.5	95.84	66	-
MP06	1.4	95.92	22	-
MG14	2.5	95.99	42	-
TM03	3.6	96.62	68	-
TM04	2	96.79	64	-
TM15	2.5	96.96	106	-
TM24	1.6	97.49	100	-
MP10	3.2	97.79	82	-
TM25	1.7	96.62	160	63
MP26	2.2	98.61	170	67
MP29	2	98.53	184	62
MP03	2.3	99.91	201	59

* %D stands for %decolorization of azure B

** After treated with LiP for 1 h.

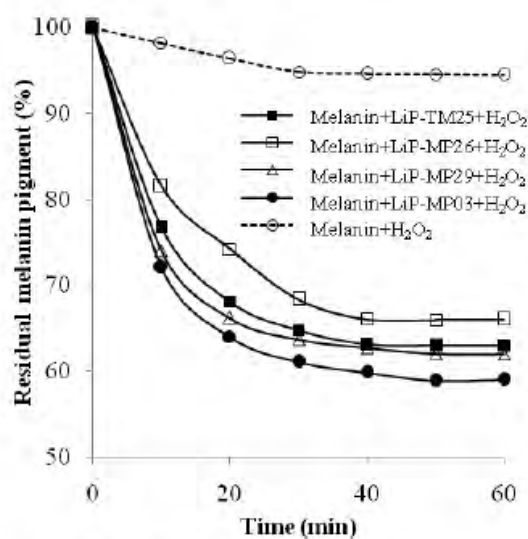


Figure 1 The capacity of LiP from endophytic fungi on the decolorization of synthetic melanin. melanin with minimal concentration of 2 mM H₂O₂. Therefore, further investigation

of melanin degradation by LiP-free H₂O₂ together with verification of its stability and toxicity is needed before use it as melanin-lightening agent in cosmetic formulation. This approach appears to be importance because the enzyme is a biological origin and will be more acceptable for cosmetic purpose.

6. Acknowledgements

This worked was supported by the research grant of Mae Fah Luang University 12/2554 (54108030012), and Thailand Research Fund MRG5480073.

7. References

- (1) Couteau C, Coiffard LJM. Photostability determination of arbutin, a vegetable whitening agent. *Farmaco*. 2000;55:410–413.
- (2) Hakoziaki T, Minwalla L, Zhuang J, et al. The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *Br J Dermatol*. 2002;147:20–31.
- (3) Rendon MI, Gaviria JJ. Review of skin lightening agents. *Dermatol Surg*. 2005;31:886–889.
- (4) Mohorčić M, Friedrich J, Renimel I, et al. Production of melanin bleaching enzyme of fungal origin and its application in cosmetics. *Biotechnol Bioproc Eng*. 2007;12:200–206.
- (5) Woo SH, Cho JS, Lee BS, Kim EK. Decolorization of melanin by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Bioproc Eng*. 2004;9:256–260.
- (6) Promputta I, Hyde KD, McKenzie EHC, et al. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? *Fungal Diversity*. 2010;41:89–99.
- (7) Pointing SB. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity*. 1999;2:17–33.
- (8) Ann BO, Daniel JR, Ming T. Ubiquity of Lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59:4017–4023.