L.114362.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินเพื่อประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง

Screening of Endophytic Fungi Producing Melanin Degrading Enzymes Potential Application in Cosmetics

โดย

ดร. อิทธญากรณ์ พรหมพุทธา

Assoc. Prof. Dr. Kevin D. Hyde

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่ให้การสนับสนุนเงินอุดหนุนการวิจัย ตลอดโครงการวิจัย ด้วยงบประมาณของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงประจำปีงบประมาณ 2554 ขอขอบคุณนางสาวชัมชัม อัรอูล และ นางสาวธนวรรณ โรจน์ปิติกุล นักศึกษาสาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ที่ได้ช่วยดำเนินการวิจัยบางส่วนของโครงการนี้ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือในกาวิจัย และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยาทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกให้ตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ดร. อิทธญากรณ์ พรหมพุทธา

บทสรุปผู้บริหาร

ในปัจจุบันมีการนำสารเคมีสังเคราะห์และสารสกัดธรรมชาติหลายชนิดมาใช้เป็นส่วนประกอบของตำรับเครื่องสำอางเพื่อทำให้ผิวขาว ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานิน ยับยั้งกระบวนการขนส่งเมลานิน หรือออกฤทธิ์ลอกเซลล์ผิวหนัง แต่พบรายงานว่าสารเหล่านี้ก่อให้เกิดการระคายเคือง ผิวหนังอักเสบ หรือผิวไวต่อแสงได้ จากปัญหาเหล่านี้ จึงเกิดงานวิจัยเพื่อทางเลือกใหม่ที่จะทำให้ผิวขาวขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยกว่าวิธีเดิม คือ จะไม่ยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานิน แต่จะทำให้สีของเมลานินที่สร้างขึ้นมาแล้วจางลง หรือการย่อยสลายเมลานิน (melanin degradation) โดยเอนไซม์จากแหล่งกำเนิดธรรมชาติ ซึ่งน่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ที่น่าจะได้รับการยอมรับมากกว่าการใช้สารเคมีในตำรับเครื่องสำอาง

ที่ผ่านมาพบว่า เอนไซม์จากเชื้อราแซบโพรไฟท์และเห็ดบางชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ แต่ยังไม่เคยมีรายงานว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก มีความสามารถดังกล่าวหรือไม่ จึงตั้งสมมุติฐานว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ในพืชอาจมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถทำให้ผิวขาวได้เช่นเดียวกับเชื้อรากลุ่มอื่น ๆ ที่เคยมีรายงานมาแล้ว

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ ซึ่งอาจจะมีความสามารถในการทำให้ผิวขาวขึ้นและคาดว่าจะนำจะไปใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางได้ โดยทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรไทย และ/หรือ พืชทั่วไป แล้วนำไปคัดกรองหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เคยมีรายงานว่าสามารถย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ ด้วยวิธีคัดกรองบนอาหารแข็ง และด้วยวิธีคัดกรองในอาหารเหลว (วิธีใหม่) แล้วคัดเลือกเชื้อราที่ให้ผลการคัดกรองเป็นบวกระดับสูง ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส วัดกิจกรรมเอนไซม์ และวัดค่าความสามารถของเอนไซม์ในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่ามีเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 4 ไอโซเลท ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงและสามารถทำให้สีของเมลานินสังเคราะห์ในปฏิกิริยาทดสอบจางลงได้

จากงานวิจัยนี้ทำให้ได้เชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลง ซึ่งสามารถนำไปทำวิจัยต่อยอดเพื่อพัฒนาและประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางเพื่อผิวขาวต่อไป และผลงานวิจัยนี้ยังได้เผยแพร่ในวงวิชาการในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ในรูปแบบ proceeding และ poster ดังนี้

1) **Promputtha I,** Hyde KD. 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): **Proceedings 224-227.**

2) **Promputtha I.** and Hyde K.D. 2012. An alternative approach for melanin decolorization using biological-origin lignin peroxidase from endophytic and saprobic fungi. 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]**

3) **Promputtha 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: Pam0171)]**.

บทคัดย่อภาษาไทย

เชื้อราแซบโพรไฟท์และเห็ดบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ แต่ยังไม่เคยมีรายงานว่าเชื้อราเอนโดไฟท์มีความสามารถดังกล่าวหรือไม่ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดครองเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ ซึ่งอาจจะมีความสามารถในการทำให้สีผิวหนังขาวขึ้น และคาดว่าจะนำจะไปใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางได้ โดยแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ จำนวน 332 ไอโซเลท จากตัวอย่างพืช 21 สายพันธุ์ และคัดกรองความสามารถของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ด้วยวิธีคัดกรองแบบดั้งเดิมบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของสี Azure B และวัดผลจากโซนใสรอบ ๆ โคโลนีเชื้อรา และคัดกรองในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของสี Azure B แล้ววัดผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของสี Azure B แล้วคำนวณเป็นค่าร้อยละการทำให้สี Azure B จงลง (% Decolorization) ซึ่งเป็นวิธีใหม่ พบว่าการคัดกรองด้วยวิธีใหม่มีความเหมาะสมสำหรับการคัดกรองลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรา โดยจะประเมินผลคัดกรองเป็นบวกเมื่อร้อยละการทำให้สี Azure B จางลงมีค่า ≥ 70 ซึ่งการคัดกรองด้วยวิธีใหม่แบบใช้อาหารเหลวนี้ช่วยประหยัดเวลาและต้นทุนสำหรับการคัดกรองด้วย เนื่องจากสามารถทดสอบได้กับเชื้อราหลายไอโซเลทได้ในคราวเดียวกัน ใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อน้อย (10 มล/ไอโซเลท) และได้ผลการคัดกรองในเชิงปริมาณเบื้องต้นอีกด้วย ในขณะที่แบบอาหารแข็ง จะทำได้เพียง 1 ไอโซเลท ต่ออาหารแข็ง 1 จาน (25 มล/ไอโซเลท) จากผลการคัดกรองบนอาหารแข็งและอาหารเหลว พบว่ามีเชื้อราเอนโดไฟท์ 14 สายพันธุ์ ให้ค่าเป็นบวกกับทั้งสองวิธี โดยมีค่าร้อยละการทำให้สี Azure B จางลง ≥ 95 และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสและวัดกิจกรรมเอนไซม์ พบว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ 4 สายพันธุ์ คือ TM25, MP03, MP26 และ MP29 มีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงกว่าเชื้อราอื่น ๆ (160, 170, 184, และ 204 ยูนิต/มล ตามลำดับ) เมื่อนำไปทดสอบค่าความสามารถในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลง พบว่าเอนไซม์จาก MP03 ซึ่งแยกได้จากต้นมะขามป้อมให้ค่าความสามารถในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงมากที่สุด การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อราเอนโดไฟท์อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางเพื่อทำให้สีเมลานินของผิวหนังจางลงได้ และเนื่องจากเอนไซม์นี้ผลิตได้จากแหล่งชีวภาพ ดังนั้นจึงน่าจะเป็นสารที่ได้รับการยอมรับมากกว่าการใช้สารเคมีในส่วนผสมของตำรับเครื่องสำอาง

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 the traditional azure B agar medium together with the new introduce azure B liquid medium methods. For the agar medium method, the production of LiP as clearance of blue colored medium was observed and diameter of the clear zone was measured. For liquid medium method, the % decolorization of azure B was measured. The new screening method was suited for screening of LiP with interpretation of positive results by % decolorization of azure B was ≥70. The positive strains were subjected to produce LiP in liquid medium, assayed for enzyme activity, and tested for ability of melanin decolorization. Fourteen endophytyes were signified positive result with both agar medium and presented ≥95% azure B decolorization in liquid medium screening methods were selected as positive strain for LiP. Of these, 4 endophytes; TM25, MP03, MP26, and MP29 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.). 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, Enzyme, Lignin peroxidase, Melanin, Whitening agent

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(3)
บทสรุปผู้บริหาร	(4)
บทคัดย่อภาษาไทย	(6)
ABSTRACT	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(9)
สารบัญภาพ	(10)
อักษรย่อและสัญลักษณ์	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	17
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	
ประวัตินักวิจัย	37

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3-1	พืชตัวอย่างสำหรับแยกเชื้อราเอนโดไฟท์	10
ตารางที่ 3-2	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับฆ่าเชื้อบนผิวของชิ้นพืชแต่ละส่วน	11
ตารางที่ 3-3	สูตรอาหารแข็ง LME basal medium (LBM) (Stephen, 1999)	12
ตารางที่ 3-4	Reaction mixture ในการวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส	15
ตารางที่ 3-5	Reaction mixture การวัดความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลง	16
ตารางที่ 4-1	จำนวน และ Isolation code ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชตัวอย่าง 21 ชนิด	17
ตารางที่ 4-2	ผลการคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส บนอาหารแข็ง LBM-Azure B agar medium โดยวัดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อรา	18
ตารางที่ 4-3	ผลการสร้างคัดกรองการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารเหลวของเชื้อราที่มีผลคัดกรองบนอาหารแข็งเป็นบวก	23
ตารางที่ 4-4	กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ 14 ไอโซเลท	26

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 3-1	ลักษณะชิ้นส่วนพืชตัวอย่างที่ตัดให้ได้ขนาดเหมาะสม ก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่ผิว เพื่อแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ (A) ใบ (B) กิ่ง	11
ภาพที่ 3-2	ลักษณะการเจริญของเชื้อราเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อพืชบนจานอาหาร (A) การวางชิ้นพืชบนจานอาหาร PDA (B) เส้นใยเชื้อราเอนโดไฟท์เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืช (C) เชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ในจานเพาะเลี้ยงเดี่ยว	11
ภาพที่ 3-3	เชื้อราเอนโดไฟท์เจริญบนอาหาร LBM-Azure B agar medium (A) เชื้อราไม่เจริญบนอาหารและผลคัดกรองเป็นลบ (B) เชื้อราเจริญบนอาหารแต่ผลคัดกรองเป็นลบ (C) ผลคัดกรองเป็นบวก (D) ผลคัดกรองเป็นบวกระดับสูง	13
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 ชั่วโมง หลังจากเติม 0.01% (w/v) Azure B **(F)** ลักษณะการจางลงของสี Azure B ในระดับที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบกับ control (หลอดซ้ายสุด)	14
ภาพที่ 4-1	ลักษณะโคโลนีเชื้อราอายุ 7 วัน บนอาหารแข็ง PDA	27
ภาพที่ 4-2	ความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรา TM25, MP26, MP29 และ MP03 ในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง	28

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) ถูกสร้างมาจากเซลล์ที่เรียกว่าเมลาโนไซต์ (melanocyte) ที่อยู่ในชั้นผิวหนังกำพร้าส่วนสตราตัม บาซาเล (stratum basale) เมลานินจะบรรจุอยู่ในเมลาโนโซม (melanosome) ซึ่ง melanosome นี้จะสามารถกระจายตัวไปยังเซลล์อื่น ๆ ของชั้นผิวหนัง เช่น คีราติโนไซต์ (keratinocyte) การกระจายตัวของเมลานินในผิวหนังของแต่ละคนจะแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้สีผิวมีระดับความขาว-คล้ำ ที่แตกต่างกันออกไป (Young, 2006)

ความผิดปกติของสีผิวที่ถือว่าเป็นปัญหามากในวงการแพทย์และเครื่องสำอาง คือ การที่ผิวหนังสร้างเม็ดสีผิวที่มากเกินไป ส่งผลให้มีสีผิวที่คล้ำเกินความต้องการ (hyperpigmentation) ปัญหานี้คงไม่ค่อยมีผลกระทบต่อความรู้สึกของคนตะวันตกที่มีผิวขาว เพราะคนเหล่านี้ปรารถนาที่จะมีสีผิวที่เข้มที่เรียกกันคุ้นหูว่าผิวสีแทนมากกว่าผิวขาวซีด แต่คนแถบเอเชียส่วนใหญ่ โดยเฉพาะผู้หญิง มักปรารถนาที่จะมีผิวขาวมากกว่า ดังนั้นผลิตภัณฑ์ปรับสีผิวให้ขาวขึ้นจึงมีอิทธิพลต่อคนผิวสีคล้ำมาก ทำให้ในเครื่องสำอางหรือเวชสำอางหลาย ๆ ชนิดได้มีการผสมสารออกฤทธิ์ที่เชื่อว่าจะทำให้ผิวขาวขึ้น (Rendon and Gaviria, 2005) เพื่อดึงดูดความสนใจของคนผิวคล้ำทั้งหลายเข้ามาทดลองใช้ ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้มีทั้งประทับใจเพราะขาวขึ้น หรือไม่มีการเปลี่ยนแปลง บางคนมีอาการแพ้ต่อเครื่องสำอางนั้น ๆ ทำให้ผิวแย่ลงกว่าเดิม หรือขาวขึ้นแต่เมื่อหยุดใช้เครื่องสำอางนั้น ๆ แล้วทำให้ผิวคล้ำขึ้นกว่าเดิม จากปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ การค้นหาสารทำให้ผิวขาวที่มีประสิทธิภาพทั้งการทำให้ขาวขึ้นจริงและปลอดภัยจึงยังต้องดำเนินต่อไป โดยพยายามค้นหาจากหลาย ๆ ต้นกำเนิด ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดจากพืช สมุนไพร เชื้อจุลินทรีย์ หรือสารเคมีสังเคราะห์ต่าง ๆ (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)

ผลิตภัณฑ์ทำให้ผิวขาวมักใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์รบกวนกระบวนการสร้างเมลานิน ได้แก่ สารประกอบของปรอท (mercury compounds) ไฮโดรควิโนน (hydroquinone) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ในกระบวนการสร้างเมลานิน ทั้งนี้สารประกอบของปรอทจัดเป็นสารอันตรายที่ทำให้เกิดอาการแพ้ ผื่นแดง ผิวบาง และเกิดรอยดำ บนใบหน้า และอาจทำให้เกิดการสะสมพิษของปรอทซึ่งเป็นโลหะหนักอันตราย ทางเดินปัสสาวะอักเสบ และไตอักเสบ เป็นต้น ไฮโดรควินโนนทำให้ระคายเคือง เกิดจุดด่างขาว ผิวไวต่อแสง ผิวแดงและคล้ำดำในที่สุด 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 หรือผิวหนังอักเสบได้บ้าง (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 สารที่ออกฤทธิ์ลอกเซลล์ผิวหนังชั้นบนสุด (keratolytic) จัดเป็นสารทำให้ผิวขาวชนิดหนึ่งที่ช่วยลอกผิวหนังสีคล้ำชั้นบนสุดออกไป ทำให้สีผิวดูขาวและสดใสขึ้น สารในกลุ่มนี้ได้แก่ กรดวิตามินเอ (retinoic acid หรือ tretinoin) สารชนิดนี้มีฤทธิ์ระคายเคืองผิวหนัง และทำให้ผิวหนังบางลง (Kasraee *et al.*, 2003)

สารออกฤทธิ์เพื่อทำให้ผิวขาวขึ้นในปัจจุบันนี้ สวนใหญ่จะมีฤทธิ์รบกวนกระบวนการสร้างเมลานินโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase หรือยับยั้งกระบวนการขนส่ง melanosome ไปยัง keratinocyte อย่างไรก็ตามสารยับยั้งการสร้างเมลานินที่ใช้กันอยู่นี้อาจมีผลข้างเคียงหรืออาจเกิดพิษต่อร่างกายได้ หรือวิธีการใช้สารออกฤทธิ์เพื่อลอกผิวหนังสีคล้ำชั้นบนสุดนั้น จะทำให้ผิวบางและไวต่อแสง อาจทำให้เกิดผิวดำคล้ำมากกว่าเดิมหรือเกิดฝ้าถาวรได้ (Parvez *et al.*, 2006) จากปัญหาเหล่านี้การวิจัยเพื่อค้นหาวิธีการแบบใหม่ที่จะทำให้ผิวขาวขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยกว่าวิธีเดิมที่ใช้กันอยู่จึงเป็นเรื่องที่ควรให้ความสนใจ ซึ่งทางเลือกใหม่สำหรับการทำให้ผิวขาวขึ้น คือ การทำให้สีของเมลานินที่สร้างขึ้นมาแล้วจางลง หรือการย่อยสลายเมลานิน (melanin degradation) แทนการออกฤทธิ์รบกวนกระบวนการสร้างเมลานิน (Mohorčič *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 เคยมีรายงานว่าเชื้อราแซบโพรไฟท์และเห็ดบางชนิดมีความสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ (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 เชื้อราเอนโดไฟท์ในพืชอาจมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถทำให้ผิวขาวได้เช่นเดียวกับเชื้อรากลุ่ม

อื่น ๆ ที่เคยมีรายงานมาแล้ว และเป็นสารที่ผลิตได้จากแหล่งชีวภาพ ที่น่าจะเป็นสารที่ได้รับการยอมรับมากกว่าการใช้สารเคมีในส่วนผสมของตำรับเครื่องสำอาง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดกรองความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืช ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ ซึ่งอาจจะมีความสามารถในการทำให้ผิวขาวขึ้น และคาดว่าจะนำจะไปใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางได้

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

เคยมีรายงานว่าเชื้อราแซบโพรไฟท์และเห็ดบางชนิดมีความสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ แต่ยังไม่เคยมีรายงานว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก มีความสามารถดังกล่าวหรือไม่ จึงตั้งสมมุติฐานว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ในพืชอาจมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถทำให้ผิวขาวได้เช่นเดียวกับเชื้อรากลุ่มอื่น ๆ ที่เคยมีรายงานมาแล้ว และเป็นสารที่ผลิตได้จากแหล่งชีวภาพ ที่น่าจะเป็นสารที่ได้รับการยอมรับมากกว่าการใช้สารเคมีในส่วนผสมของตำรับเครื่องสำอาง

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรไทย และ/หรือ พืชทั่วไป จำนวน 21 ชนิด ได้เชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 332 ไอโซเลท นำเชื้อราไปคัดกรองหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดลิกนินเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีรายงานว่าสามารถย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ด้วยวิธีบนอาหารแข็ง และด้วยวิธีในอาหารเหลว (วิธีใหม่) คัดเลือกเชื้อราที่ให้ผลการคัดกรอง

เป็นบวกระดับสูง ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส วัดกิจกรรมเอนไซม์ และวัดค่าความสามารถของเอนไซม์ในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์สังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง

1.6 นิยามศัพท์เฉาะ

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

บทที่ 2
แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปัญหาสีผิวเข้มเกินระดับปกติและแนวทางการแก้ไข

เม็ดสีผิวที่เรียกว่าเมลานิน (melanin) ถูกสร้างมาจากเซลล์ที่เรียกว่าเมลาโนไซท์ (melanocyte) ที่อยู่ในชั้นผิวหนังกำพร้าส่วน stratum basale เมลานินจะบรรจุอยู่ใน melanosome ซึ่ง melanosome นี้จะสามารถกระจายตัวไปยังเซลล์อื่น ๆ ของชั้นผิวหนัง เช่น keratinocyte การกระจายตัวของเมลานินในผิวหนังของแต่ละคนจะแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้สีผิวมีระดับความขาว-คล้ำที่แตกต่างกันออกไป สีผิวของมนุษย์จำแนกได้เป็น 6 ระดับ (skin phototype) คือ ระดับ I ถึง IV ตามปริมาณของเม็ดสีผิวเมลานินที่เพิ่มมากขึ้นและระดับที่ลดลองของการยอมให้แดดไหม้ได้ ซึ่งสีผิวประเภทที่ 6 จะเป็นประเภทที่สีเข้มที่สุดแต่ยอมให้แดดไหม้ได้ในระดับที่น้อยที่สุด (Young, 2006) โดยปกติทั่วไปสีผิวจะเรียบสม่ำเสมอกันทั่วไปในแต่ละบริเวณของร่างกาย แต่อาจเกิดสีผิวที่ไม่สม่ำเสมอได้ เมื่อมีความผิดปกติของการสร้างเม็ดสีเมลานิน ซึ่งความผิดปกติอาจเป็นได้ทั้งสีผิวจางลงหรือเข้มขึ้นมากกว่าระดับปกติก็ได้

ความผิดปกติของสีผิวที่ถือว่าเป็นปัญหามากในวงการแพทย์และเครื่องสำอาง คือ ผิวหนังสร้างเม็ดสีผิวที่มากเกินไป ส่งผลให้มีสีผิวที่คล้ำเกินระดับปกติ (hyperpigmentation) เช่น กระฝ้า ปัญหานี้คงไม่ค่อยมีผลกระทบต่อความรู้สึกของคนตะวันตกที่มีผิวขาว เพราะคนเหล่านี้ปรารถนาที่จะมีสีผิวเข้ม ที่เรียกกันคุ้นหูว่าผิวสีแทนมากกว่าผิวขาวซีด แต่คนแถบเอเชียส่วนใหญ่ โดยเฉพาะผู้หญิง มักปรารถนาที่จะมีผิวขาวมากกว่า ดังนั้นผลิตภัณฑ์ปรับสีผิวให้ขาวขึ้นจึงมีอิทธิพลต่อคนผิวสีเข้มมาก ทำให้ในเครื่องสำอางหรือเวชสำอางหลาย ๆ ชนิดได้มีการผสมสารออกฤทธิ์ที่เชื่อว่าจะทำให้ผิวขาวขึ้น เพื่อปรับลดระดับเม็ดสีเมลานิน (Rendon and Gaviria, 2005) ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้มีทั้งประทับใจเพราะขาวขึ้น หรือไม่มีการเปลี่ยนแปลง บางคนมีอาการแพ้ต่อเครื่องสำอางนั้น ๆ ทำให้ผิวแย่ลงกว่าเดิม หรือขาวขึ้นแต่เมื่อหยุดใช้เครื่องสำอางนั้น ๆ แล้วทำให้ผิวคล้ำขึ้นกว่าเดิม จากปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ การค้นหาสารทำให้ผิวขาวที่มีประสิทธิภาพทั้งการทำให้ขาวขึ้นจริงและปลอดภัยจึงยังต้องดำเนินต่อไป โดยพยายามค้นหาจากหลาย ๆ ต้นกำเนิด ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดจากพืช สมุนไพร เชื้อจุลินทรีย์ หรือสารเคมีสังเคราะห์ต่าง ๆ (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 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในขบวนการสร้างเมลานิน 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) ที่สกัดได้จากพืช

หลายๆ ชนิด เช่น common bearberry (*Arctophylos urvaursi*) สาร glabridin จากรากชะเอม-เทศ (*Glycyrrhiza glabra*) mulberry extract และ licorice extract (Akhtar *et al.*, 2012; Parvez *et al.*, 2006) เป็นสารที่ออกฤทธิ์ลอกเซลล์ผิวหนัง (keratolytinocyte) จัดเป็นสารทำให้ผิวขาวชนิดหนึ่ง โดยมีฤทธิ์ลอกผิวหนังสีคล้ำชั้นนอกสุดออกไป ทำให้สีผิวดูขาวและสดใสขึ้น กรดแอสคอบิคและอนุพันธ์ (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 cathechin สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง (*in* vitro) ซึ่งอาจมีผลทำให้ผิวขาวขึ้นได้ (No *et al.*, 1999) นอกจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสแล้ว การยับยั้งกระบวนการขนส่งเมลาโนโซม (melanosome transfer) ไปยังเซลล์ keratinocyte ของผิวหนัง ยังสามารถทำให้สีผิวจางลงได้เช่นกัน (Seiberg *et al.*, 2000)

อย่างไรก็ตามกระบวนทำให้สีผิวจางลงด้วยสารดังกล่าวข้างต้นอาจมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์หรือเป็นพิษต่อผิวหนังได้ เช่น ผลิตภัณฑ์ทำให้ผิวขาวมักใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์รบกวนกระบวนการสร้างเมลานิน ได้แก่ สารประกอบของปรอท (mercury compounds) ไฮโดรควิโนน (hydroquinone) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ในกระบวนการสร้างเมลานิน ทั้งนี้สารประกอบของปรอทจัดเป็นสารอันตรายที่ทำให้เกิดอาการแพ้ ผื่นแดง ผิวบาง และเกิดรอยดำบนใบหน้า และอาจทำให้เกิดการสะสมพิษของปรอทซึ่งเป็นโลหะหนักอันตราย ทางเดินปัสสาวะอักเสบ และไตอักเสบ เป็นต้น ไฮโดรควินโนนทำให้ระคายเคือง เกิดจุดด่างขาว ผิวไวต่อแสง ผิวแดงและคล้ำดำในที่สุด 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; 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

เชื้อราแซบโพรไฟท์กลุ่ม white rot fungi สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลากหลาย ทั้งกลุ่ม oxidase และ peroxidases ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะทำหน้าที่ออกซิไดส์สารต่าง ๆ 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) และได้ตั้งสมมุติไว้ว่าเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินจากเชื้อราน่าจะนำไปในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ (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 โดยพบว่า เชื้อรา *Sporotrichum pruinosum* มีความสามารถในการทำให้สีของเมลานินสังเคราะห์จางลง และต่อมาได้นำเชื้อราตัวนี้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่มากขึ้นในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพและทำเอนไซม์ให้กึ่งบริสุทธิ์ และได้นำไปทำสอบความสามารถในการทำให้สีเมลานินจางลงกับเซลล์ corneocyte ของผิวประเภท phototype III และ V พบว่าความหนาแน่นของเมลานินในเซลล์ corneocyte ของผิวประเภท phototype III และ V ลดลงถึง 50% เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม รายงานการวิจัยนี้แสดงให้เห็นความสามารถของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์ที่ช่วยทำให้เมลานินของผิวคนจางลง ซึ่งเป็นวิธีการทำให้ผิวขาวด้วยกระบวนการย่อยสลายเมลานินที่สร้างเสร็จแล้ว แทนวิธีการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน ซึ่งอาจจะนำมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อไปได้

โดยทั่วไปความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายองค์ประกอบของพืช โดยทั่วไปมักจะพบในเชื้อรากลุ่มแซบโพรไฟท์ คือ เชื้อราที่ทำหน้าสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ แต่ Promputtha *et al.*, (2010) ได้ให้ข้อเสนอแนะไว้ว่าเชื้อราเอนโดไฟท์น่าจะเป็นเชื้อราอีกกลุ่มหนึ่งที่อาจจะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้ดี เนื่องจากพวกเค้าพบว่ามีเชื้อราเอนโดไฟท์หลายสายพันธุ์มีความสามารถในการผันตัวเองไปเป็นเชื้อราแซบโพรไฟท์หลังจากพืชอาศัยของมันตายลง โดยเชื้อราเหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ย่อนสลายลิกนินหลังจากที่ทราบว่าพืชอาศัยตายและไม่สามารถให้อาหารแก่พวกมันได้อีก ดังนั้นเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจะผลิตและหลั่งออกมาย่อยเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้

ได้มาซึ่งอาหารและการอยู่รอดจนกลายไปเป็นเชื้อรากลุ่มแซบโพรไฟท์ต่อไป ดังนั้นเชื้อราเอนโดไฟท์น่าจะมีความสามารถในการผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสและสามารถย่อยสลายเมลานิน ซึ่งอาจจะเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับผิวขาวได้

จากรายงานการวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นทำให้ผู้ขอทุนสนับสนุนการวิจัยเห็นว่าประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราสูงมาก (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 โดยเฉพาะเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืชทั้งที่เป็นพืชสมุนไพรและพืชทั่วไป (Theantana *et al.*, 2007) ซึ่งเชื้อราเหล่านี้ยังไม่เคยถูกนำมาคัดกรองหา melanin degrading enzymes ที่อาจนำไปใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอาง

2.3 เชื้อราเอนโดไฟท์

เชื้อราเอนโดไฟท์เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชอาศัยโดยไม่ทำลายหรือก่อโรคในพืชอาศัย แต่จะอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Freeman and Rodriguez, 1993; Sinclair and Cerkauskas, 1996). ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าราเอนโดไฟท์มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ ที่มีประโยชน์ทางยา (Strobel and Daisy, 2003) และมีการตั้งสมมุติฐานกันว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากพืช เช่น taxol นั้น อาจมีต้นกำเนิดมาจากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในพืชชนิดนั้นก็ได้ (Stierle *et al.*, 1993; Strobel *et al.*, 1996) ผู้ขอทุนสนับสนุนการวิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ในพืชที่มีรายงานว่าทำให้ผิวขาวได้อาจมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ทำให้ผิวขาวได้ด้วย ซึ่งพืชที่เคยมีรายงานว่ามีสารทำให้ผิวขาว เช่น กระแจะหรือทานาคา (*Naringi crenulata*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) เมล็ดลำไย (*Euphoria longana* Lam.) ข่าตาแดง (*Alpinia officinarum*) แกนเมล็ดมะม่วง (*Mangifera indica* L.) ใบและรากขิง (Chan *et al.*, 2008; Maisuthisakul and Gordon, 2009; Matsuda *et al.*, 2009; Pongpunyayuen *et al.*, 2010; Rangkadilok *et al.*, 2007) ก็มีความเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาแยกเชื้อราเอนโดไฟท์เพื่อใช้ในการคัดกรองหาเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายเมลานินในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

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 แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดว่าลิกนินเปอร์ออก-ซิเดส สามารถย่อยสลายเมลานินที่ชั้นผิวหนังกำพร้าได้อย่างไรหลังจากทาเครื่องสำอางแล้ว 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 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายองค์ประกอบของเนื้อเยื่อพืชส่วนที่เป็นไซแลนก็มีความสามารถในการย่อยกำจัดเมลานินออกจากชั้นผิวหนังกำพร้าได้ โดยทำหน้าที่ลดความสามารถในการยึดเกาะระหว่างเมลานินกับเซลล์ชั้นหนังกำพร้าได้ (Punitha *et al.*, 2009)

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 พืชตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

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

ตารางที่ 3-1 พืชตัวอย่างสำหรับแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

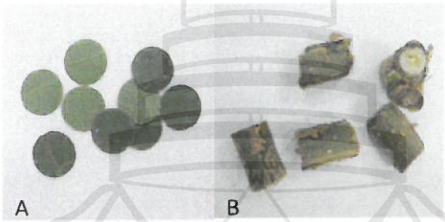
ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	เนื้อเยื่อสำหรับแยกเชื้อรา
1	*Phyllanthus emblica* L.	มะขามป้อม	หอพักบุคลากรมะขามป้อม	กิ่ง
2	*Tamarindus indica* L.	มะขาม	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	กิ่ง
3	*Mangifera indica* L.	มะม่วง	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	ใบและกิ่ง
4	*Artocarpus heterophyllus* Lam.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

ตารางที่ 3-1 (ต่อ)

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

3.2 การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

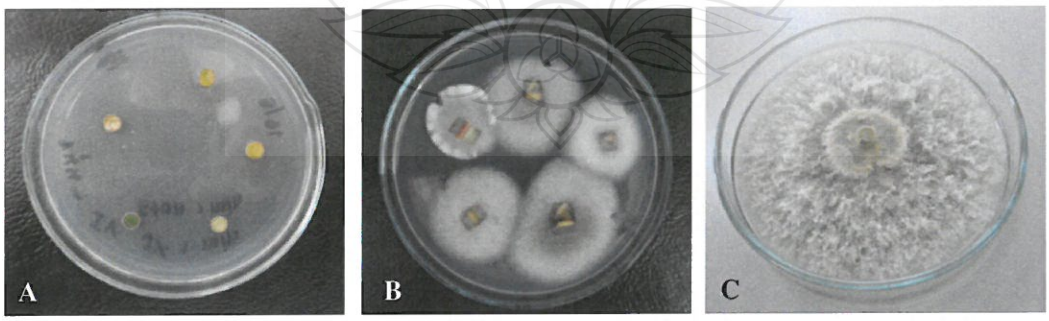
ตัดพืชตัวอย่างที่ล้างแล้ว ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มม. หรือความกว้าง × ยาว ที่ 5×5 มม. (ภาพที่ 3-1) นำไปฆ่าเชื้อที่ผิว ด้วยวิธีดังต่อไปนี้ แช่ชิ้นพืชในน้ำกลั่นนาน 1 นาที แช่ใน sodium hypochlorite (NaOCl) ทีความเข้มข้นและเวลาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความหนาของชิ้นส่วนพืช แล้วแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 75%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

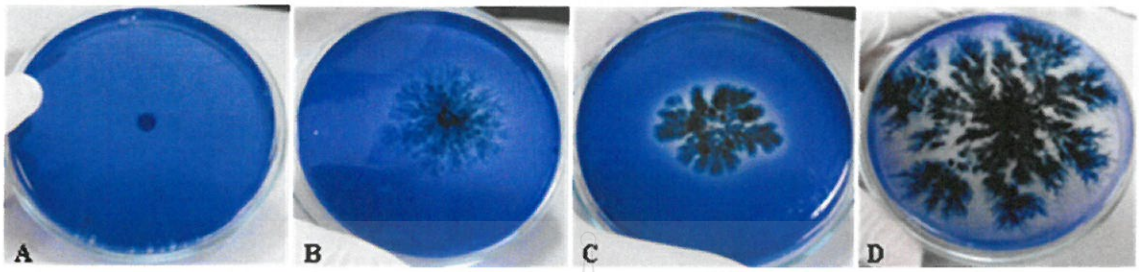
นำเชื้อราเอนโดไฟท์มาคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส บนอาหารแข็งที่ผสมสี Azure B สูตรอาหารพัฒนาจาก Stephen (1999) มีชื่ออาหารว่า LME basal medium (LBM) สูตรอาหารดังแสดงในตารางที่ 3-3 และมีวิธีการเตรียมดังนี้

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

องค์ประกอบ	กรัม/ลิตร ในน้ำกลั่น
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1
Tartaric acid ($C_4H_{12}N_2O_6$)	0.5
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5
Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)	0.01
Copper (II) sulfate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$)	0.001
Yeast extract	0.01
Iron (III) sulfate ($Fe_2(SO_4)_3$)	0.001
Manganese (II) sulfate monohydrate ($MnSO_4.H_2O$)	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 และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องและบันทึกการเจริญเติบโตของเชื้อราทุกวัน เพื่อสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสีอาหารบริเวณใต้และรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อรา ซึ่งจากเดิมอาหารจะมีสีน้ำเงิน ถ้าเชื้อราตัวใดมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส จะเกิดโซนใสบริเวณใต้และรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อรานั้น (ภาพที่ 3-3) ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสทุกวัน คัดเลือกเชื้อราที่ให้ผลเป็นบวก เพื่อนำไปคัดกรองอีกขั้นด้วยอาหารเหลวต่อไป



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

3.4 การสร้างคัดกรองการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารเหลวของเชื้อราที่มีผลคัดกรองบนอาหารแข็งเป็นบวก

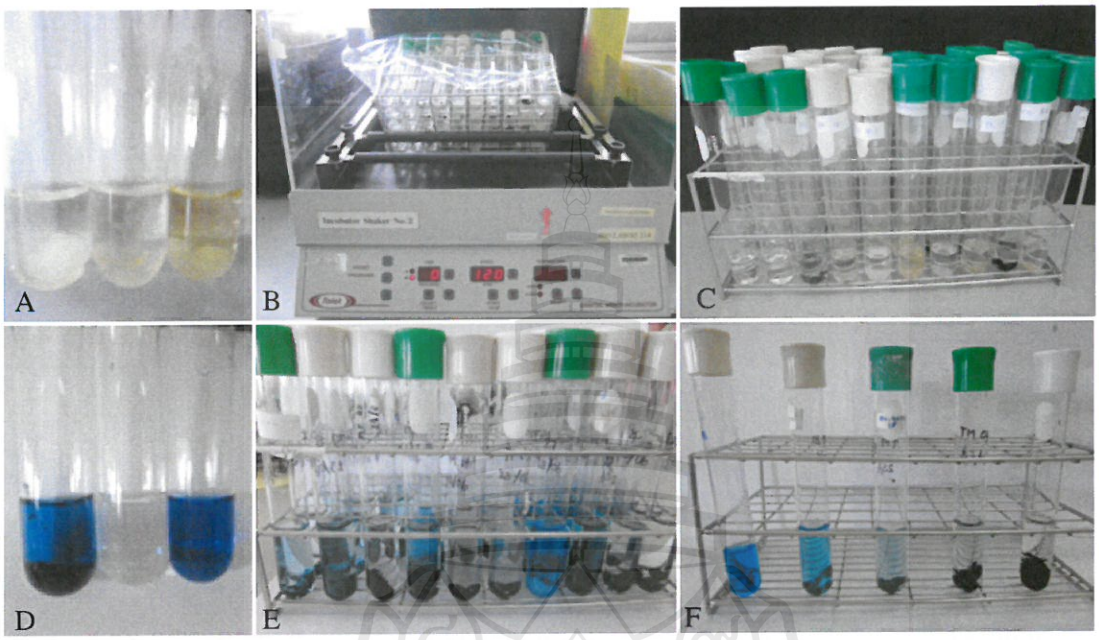
นำเชื้อราที่ให้ผลเป็นบวกบนอาหารแข็ง มาคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ในอาหารเหลว LBM medium ที่ผสมสี Azure B โดยเตรียมอาหารเหลว LBM medium และ สารละลายน้ำตาลกลูโคส 20% (w/v) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วผสมสารละลายน้ำตาลกลูโคสปริมาตร 10 มล. ใส่ในอาหาร LBM medium (ปริมาตรสุดท้าย 1000 มล.) แบ่งอาหารที่เตรียมได้ 5 มล. ใส่ในหลอดทดลอง ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้ว inoculate ชิ้นอาหาร PDA ที่มีโคโลนีเชื้อราสายพันธุ์ที่ให้ผลคัดกรองเป็นบวก ที่เลี้ยงไว้ไม่เกิน 10 วัน จำนวน 5 ชิ้น (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.) ลงในอาหารเหลว ด้วยวิธีปลอดเชื้อ แล้วบ่มในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) 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 องศาเซลเซียส) 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

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

เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

เลือกเชื้อราที่มีค่า %Decolorization ≥95 เพื่อนำไปผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารเหลวปริมาตรใหญ่ขึ้นต่อไป



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 ชั่วโมง หลังจากเติม 0.01% (w/v) Azure B **(F)** ลักษณะการจางลงของสี Azure B ในระดับที่แตกต่างกันเปรียบเทียบกับ control (หลอดซ้ายสุด)

หมายเหตุ: ตะกอนก้นหลอดสีดำ คือ กลุ่มเส้นใยเชื้อราของสายพันธุ์ที่มีเข้ม ไม่ได้เกิดจากการดูดซับเอาสีของ Azure B เข้าสู่เซลล์ บางสายพันธุ์มีสีขาว จะยังคงเป็นตะกอนสีขาวถึงแม้จะเติม Azure B แล้วก็ตาม

3.5 การผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสโดยเชื้อราที่ให้ผลการคัดกรองเป็นบวกระดับสูงในอาหารเหลว

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 ชิ้นอาหาร PDA ที่มีโคโลนีเชื้อราสายพันธุ์ที่ให้ผลคัดกรองเป็นบวกระดับสูง ที่เลี้ยงไว้ไม่เกิน 10 วัน จำนวน 10 ชิ้น (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.) ลงในอาหารเหลว ด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำ flask ไป incubate ในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) และทำการเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงในวันที่ 6 8 และ 10 โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 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 µl, ส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (crude enzyme) ปริมาตร 500 µl, และ 2.0 mM hydrogen peroxide ปริมาตร 500 µl (ตารางที่ 3-4) ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองและบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ แล้วเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม hydrogen peroxide และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 645 nm หลังจากเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง โดยใช้น้ำกลั่นแทน crude enzyme ในหลอด control กำหนดให้ 1 ยูนิต ของเอนไซม์มีค่าเท่ากับความการดูดกลืนแสงที่ลดลง 0.001 ใน 1 ชั่วโมง ต่อ crude enzyme 1 มล.

ตารางที่ 3-4 Reaction mixture ในการวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

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

3.7 การวัดค่าความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง (melanin decolorization activity)

การศึกษาความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลง 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 H_2O_2 ปริมาตร 500 µl (ตารางที่ 3-5) ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองและบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C แล้วเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม H_2O_2และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 300 nm หลังจากเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง โดยใช้น้ำกลั่นแทน crude enzyme ในหลอด control แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณค่า Melanin decolorization rate ต่อ 1 ชั่วโมง จากสูตรต่อไปนี้

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

A_{t12} คือ Absorbance เมื่อบ่มปฏิกิริยาไปแล้ว 12 ชั่วโมง

A_{t0} คือ Absorbance เมื่อเริ่มปฏิกิริยา ณ ชั่วโมงที่ 0

ตารางที่ 3-5 Reaction mixture การวัดความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลง

สารเคมี	Volume
125 mM Tatrate 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)	

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชตัวอย่าง

แยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 332 ไอโซเลท จากพืชตัวอย่าง 21 ชนิด โดยพืชแต่ละชนิดให้จำนวนเอนโดไฟท์ที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 จำนวน และ Isolation code ของเชื้อราเอนโดไฟท์ 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	ขิง	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 ผลการคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสบนอาหารแข็ง

เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟท์ 332 ไอโซเลท มาคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสบนอาหารแข็ง LBM-Azure B agar medium แล้ว พบว่า มีเชื้อราจำนวน 170 ไอโซเลท ที่ให้ผลเป็นบวกด้วยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสรอบโคโลนีที่แตกต่างกันระหว่างไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ผลการคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออก-ซิเดส บนอาหารแข็ง LBM-Azure B agar medium โดยวัดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อรา

ลำดับที่	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

ลำดับที่	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)

ลำดับที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)	
		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

ลำดับที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)	
		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)

ลำดับที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)	
		โคโลนี	โซนใส
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

ลำดับที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)	
		โคโลนี	โซนใส
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)

ลำดับที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)	
		โคโลนี	โซนใส
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	-

ลำดับที่	Isolation code	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)	
		โคโลนี	โซนใส
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)

ลำดับที่	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	-
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

เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลบวกในการคัดกรองบนอาหารแข็ง จำนวน 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 เพื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารปริมาตรใหญ่ขึ้นเพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ต่อไป

ตารางที่ 4-3 ผลการสร้างคัดกรองการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารเหลวของเชื้อราที่มีผลคัดกรองบนอาหารแข็งเป็นบวก

ลำดับที่	Isolation code	ผลการคัดกรอง	
		โซนใสบนอาหารแข็ง (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

ลำดับที่	Isolation code	ผลการคัดกรอง	
		โซนใสบนอาหารแข็ง (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)

ลำดับที่	Isolation code	ผลการคัดกรอง	
		โซนใสบนอาหารแข็ง (ซม.)	%Azure B 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

ลำดับที่	Isolation code	ผลการคัดกรอง	
		โซนใสบนอาหารแข็ง (ซม.)	%Azure B 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)

ลำดับที่	Isolation code	ผลการคัดกรอง	
		โซนใสบนอาหารแข็ง (ซม.)	%Azure B 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
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 (มีเชื้ออื่นปนเปื้อน)

NA = Data not available (ไม่ได้บันทึกข้อมูล)

NG = No growth (เชื้อไม่เจริญ)

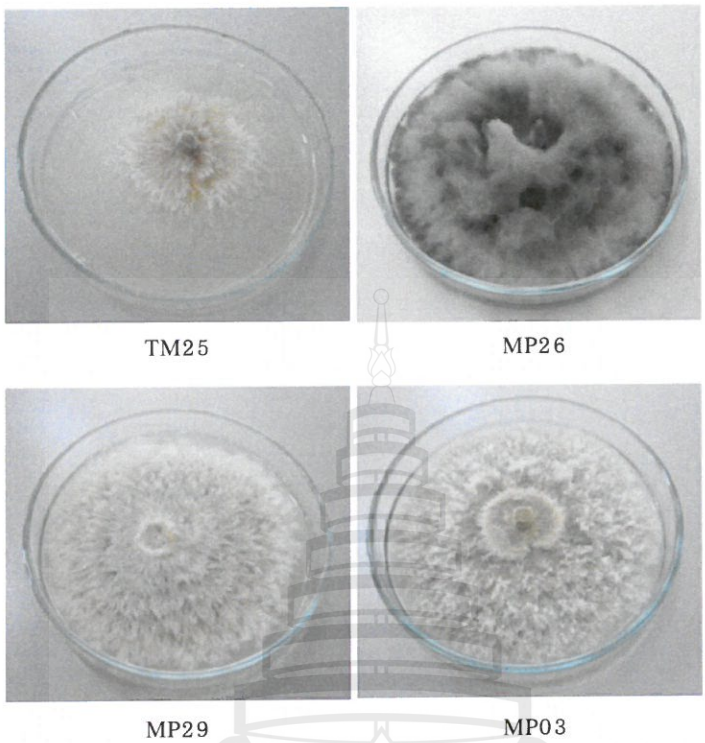
- = ไม่เกิดโซนใส

4.4 ผลการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตในอาหารเหลว

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

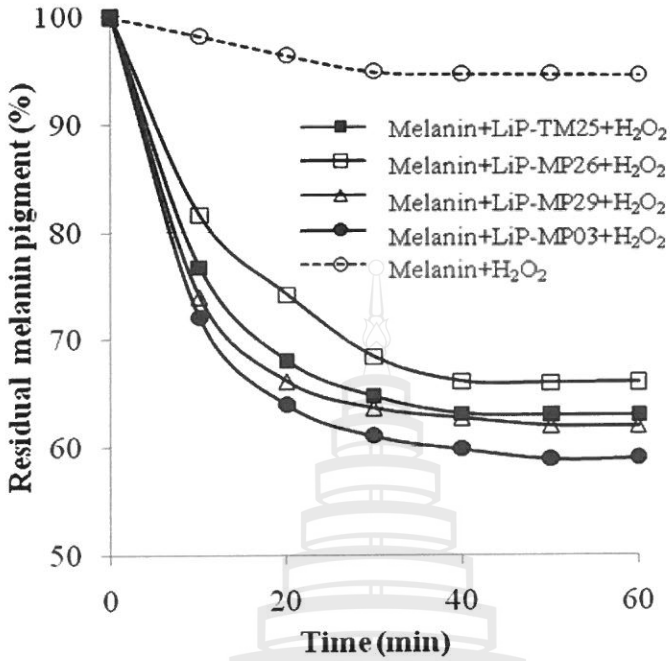
ลำดับที่	Fungal isolation code	กิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Units/ml)
1	MP06	22
2	MG14	42
3	TM10	61
4	TM04	64
5	MP11	66
6	TM03	68
7	TM06	68
8	MP10	82
9	TM24	100
10	TM15	106
11	**TM25**	**160**
12	**MP26**	**170**
13	**MP29**	**184**
14	**MP03**	**204**



ภาพที่ 4-1 ลักษณะโคโลนีเชื้อราอายุ 7 วัน บนอาหารแข็ง PDA

4.5 ผลการวัดค่าความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง

ความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรา TM25, MP26, MP29 และ MP03 ในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลองนั้น พบว่าพบว่าเอนไซม์จากเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท มีความสามารถในการย่อยสลายให้สีของเมลานินสังเคราะห์จางลง แต่มีระดับความสามารถที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์จาก MP03 (จากมะขามป้อม) มีความสามารถในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงได้มากที่สุด (ภาพที่ 4-2) ซึ่งอาจเนื่องมากจากมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ในจำนวนเชื้อรา 4 ไอโซเลท จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าเชื้อราแซบโพรบที่แยกได้จากซากพืชและจากดินมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ (Woo *et al.*, 2004; MohorČiČ *et al.*, 2007) และจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ก็มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดลิกนินเปอร์ออกซิเดส เพื่อย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 4-2 ความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรา TM25, MP26, MP29 และ MP03 ในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากพืชตัวอย่าง 21 สายพันธุ์ สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 332 ไอโซเลท โดยพืชแต่ละสายพันธุ์ให้เอนโดไฟท์ได้จำนวนที่แตกต่างกัน เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟท์ทุกไอโซเลทมาคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสบนอาหารแข็ง LBM-Azure B agar medium พบว่า มีเชื้อราจำนวน 170 ไอโซเลท ที่ให้ผลเป็นบวกด้วยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสรอบโคโลนีที่แตกต่างกัน เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลบวกในการคัดกรองบนอาหารแข็ง จำนวน 170 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเหลว และวัดความสามารถในการทำให้สี Azure B จางลง (%Azure B decolorization) พบว่า มีเชื้อรา จำนวน 14 ไอโซเลท ให้ค่า %Azure B decolorization ≥95 และเมื่อเลี้ยงเอนโดไฟท์ 14 ไอโซเลทนี้ ในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส พบว่ามีเชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ TM25 (แยกจากมะขาม), MP26, MP29 และ MP03 (แยกจากมะขามป้อม) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ในระดับสูงกว่าเชื้อราไอโซเลทอื่น ๆ อย่างชัดเจน จึงได้นำเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อรา 4 ไอโซเลทนี้ ไปวัดค่าความสามารถของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงในหลอดทดลอง พบว่าเอนไซม์จากเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท มีความสามารถในการย่อยสลายให้สีของเมลานินสังเคราะห์จางลง แต่มีระดับความสามารถที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์จาก MP03 มีความสามารถในการทำให้สีเมลานินสังเคราะห์จางลงได้มากที่สุด ซึ่งอาจเนื่องมากจากมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ในจำนวนเชื้อรา 4 ไอโซเลท จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าเชื้อราแซบโพรบที่แยกได้จากซากพืชและจากดินมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้ (Woo *et al.*, 2004; MohorČiČ *et al.*, 2007) และจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อเราเอนโดไฟท์ก็มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดลิกนินเปอร์ออกซิเดสเพื่อย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์ได้เช่นเดียวกัน

จากปฏิกิริยาทดสอบความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์นั้น มีการใช้ H_2O_2 ในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา ซึ่ง H_2O_2 เป็นสารที่ไม่เหมาะสมต่อการทำตำรับเครื่องสำอาง ถึงแม้ในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้พยายามปรับสภาวะจนกระทั่งใช้ความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ต่ำมากถึง 2 mM เพื่อกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาแล้ว แต่อย่างไรก็ตามควรมีการต่อยอดการศึกษาเพื่อให้ได้สภาวะการเกิดปฏิกิริยาโดยปราศจาก H_2O_2 เพื่อความปลอดภัยในการนำไปใช้ในตำรับเครื่องสำอางต่อไป

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในปฏิกิริยาทดสอบความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายเมลานินสังเคราะห์นั้น มีค่าความเป็นกรดมากเกินไป ซึ่งถ้านำไปผสมในตำรับเครื่องสำอางแล้ว

จะไม่เหมาะสมต่อสภาพผิวของมนุษย์ ดังนั้นควรมีการต่อยอดงานวิจัยให้ได้สภาวะที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่าง ให้ใกล้เคียงกับสภาพผิวของมนุษย์มากที่สุด เพื่อความปลอดภัยในการนำไปใช้ในตำรับเครื่องสำอางต่อไป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อราเอนโดไฟท์อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางเพื่อทำให้สีเมลานิน ของผิวหนังจางลงได้ และเนื่องจากเอนไซม์นี้ผลิตได้จากแหล่งชีวภาพ ดังนั้นจึงน่าจะเป็นสารที่ได้รับการยอมรับมากกว่าการใช้สารเคมีในส่วนผสมของตำรับเครื่องสำอาง แต่ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

5.2 แนวทางการทำวิจัยในลำดับต่อไป

1) ควรศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายเมลานินของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ให้มีสภาวะที่ปราศจาก H_2O_2 และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ใกล้เคียงกับสภาพผิวมากขึ้น เพื่อความปลอดภัยในการใช้เอนไซม์ในตำรับเครื่องสำอาง

2) ควรมีการศึกษาความเป็นพิษของเอนไซม์ก่อนนำไปใช้ในตำรับเครื่องสำอาง

3) ควรมีการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ก่อนนำไปใช้ในตำรับเครื่องสำอาง

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 *Berkleasmium* 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 flvanone derivatives isolated from *Sophora flvescens* 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-dicholorophenol 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, Kanlayavattanakul 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.

Promputtha 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.

Promputtha I, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. 2004. A new species of *Pseudohalonectria* from Thailand. Cryptogamie Mycologie 25: 43-47.

Promputtha 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 JI. 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, Cerkauskas 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. Progreass in Biophysics and Molecular Biology 92: 80-85.

ภาคผนวก

ประวัตินักวิจัย

Name	ITTHAYAKORN PROMPUTTHA, Ph.D.
Date of Birth	September 6, 1978
Place of Birth	Loei province, Thailand
Home Address	98 Moo 5, Na-kham, Muang, Loei, 42100, Thailand
Current Address	Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, 50200, Thailand
E-mail Address	ppam118@hotmail.com
Phone	66 53 94 1946 ext. 118 (office) 66 83 334 4392 (mobile)

Education Background

- **Ph.D. (Biology)**, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, October, 2006
- **B.Sc. (Medical Technology) Hons**, Faculty of Associated Medical Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, May, 2001

Scholarship The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (2001-2006)

Current Employment Lecturer for Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand (July 2013-current).

Past Employment

- October 2009-June 2013
  Lecturer for School of Cosmetic Science,
  Mae Fah Luang University, Chiang Rai, 57100, Thailand.

- April 2008-August 2009
  Post-doctoral mycologist for Department of Botany,
  The Field Museum of Natural History, Chicago, IL, USA.

- April 2007-April 2008
  Post-doctoral mycologist for Illinois Natural History Survey, University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign, IL, USA.

- October 2006-March 2007
  Research assistant for Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Scientific Interests/Expertise

1. Applied microbiology
2. Cosmetic technology
3. Fungal taxonomy, fungal isolation, identification, fungal cultures
4. Molecular biology including technique of DNA extraction from mycelium and fruitbody, PCR techniques, DNA sequencing, DNA bar coding
5. Enzymatic study from endophytic and saprobic fungi and its application
6. Production of online interactive key for ascomycete fungi for www.discoverlife.org

Publications

1. Monkai J, **Promputtha I**, Kodsueb R, Chukeatirote E, McKenzie EHC, Hyde KD. 2013. Fungi on decaying leaves of *Magnolia liliifera* and *Cinnamomum iners* show litter fungi to be hyperdiverse. Mycosphere 4: 292-301.

2. Ko Ko TW, McKenzie EHC., Bahkali AH, To-anun C, Chukeatirote E, **Promputtha I**, Abd-Elsalam KA, Soytong K, Wulandari NF, Sanoamuang N, Jonglaekha N, Kodsueb R, Cheewangkoon R, Wikee S, Chamyuang S, Hyde KD. 2011. The need for re-inventory of Thai phytopathogens. *Chiang Mai Journal of Science* 38(4): 625-637.

3. **Promputtha I,** Hyde KD, McKenzie EHC, Peberdy JF, Lumyong S. 2010. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobe? *Fungal Diversity* 41: 89-99.

4. **Promputtha I,** Miller AM. 2010. Three new species of *Acanthostigma* (Tubeufiaceae, Pleosporales) from the Great Smoky Mountains National Park. *Mycologia* 102: 574-587.

5. **Promputtha I,** Lumyong S, Vijaykrishna D, McKenzie EHC, Hyde KD, Jeewon R. 2007. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology* 53: 579-590.

6. **Promputtha I,** Jeewon R, Lumyong S, McKenzie EHC, Hyde KD. 2005. Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (*Magnoliaceae*). *Fungal Diversity* 20: 167-186.

7. **Promputtha I,** Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. 2005. A new species of *Anthostomella* on *Magnolia liliifera* from northern Thailand. *Mycotaxon* 91: 413-418.

8. **Promputtha I;** Hyde KD; Lumyong P; McKenzie EHC, Lumyong S. 2005. Fungi on *Magnolia liliifera*: *Cheiromyces magnoliae* sp. nov. from dead branches. *Nova Hedwigia* 80: 527-532.

9. **Promputtha I,** Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. 2004. Fungal saprobes on dead leaves of *Magnolia liliifera* (*Magnoliaceae*) in Thailand. *Cryptogamie Mycologie* 25: 315-321.

10. **Promputtha I,** Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. 2004. A new species of *Pseudohalonectria* from Thailand. *Cryptogamie Mycologie* 25: 43-47.

11. **Promputtha I,** Hyde KD, Lumyong P, McKenzie EHC. Lumyong S. 2002. *Dokmaia monthadangii* gen. et sp. nov., a synnematous anamorphic fungus on *Manglietia garrettii*. *Sydowia* 55: 99-103.

12. **Promputtha 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.

Proceedings

1. **Promputtha I,** Saytakep N, Pekthong T. 2013. Sun protection properties of sunflower oil extract containing astaxanthin from algae *Haematococcus pluvialis*. In Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013), January 23-25, 2013, Bang Saen Beach, Chonburi, Thailand. Proceedings 221-224.

2. **Promputtha I,** Hyde KD. 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. Proceedings 224-227.

3. **Promputtha I,** Pekthong T. 2012. Extraction of natural red color from microalgae *Haematococcus pluvialis* using bio-solvent vegetable oils for application in cosmetics. 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. Proceedings 220-223.

4. Phromthong P, Nakbat S, **Promputtha I.** 2012. Antimicrobial Activities of Vegetable Oil-Extracted Astaxanthin from Microalgae *Haematococcus pluvialis* . In The 1st Mae Fah Luang International Conference 2012 (MFUIC 2012) on Future Challenges towards ASEAN Integration. November 29-30 and December 1, 2012, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand. Proceedings 1-8.

Presentations at international conferences

1. **Promputtha I.,** Saytakep N., and Pekthong T. 2013. Sun protection properties of sunflower oil extract containing astaxanthin from algae *Haematococcus pluvialis*. Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013), January 23-25, 2013, Bang Saen Beach, Chonburi, Thailand. **[Poster]**

2. **Promputtha I.** and Pekthong T. 2012. Extraction of natural red color from microalgae *Haematococcus pluvialis* using bio-solvent vegetable oils for application in cosmetics. 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]**

3. **Promputtha I.** and Hyde K.D. 2012. An alternative approach for melanin decolorization using biological-origin lignin peroxidase from endophytic and saprobic fungi. 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. Phromthong P., Nakbat S., and **Promputtha I.** 2012. Antimicrobial activities of vegetable oil-extracted astaxanthin from microalgae *Haematococcus pluvialis* . The 1st Mae Fah Luang International Conference 2012 (MFUIC 2012) on Future Challenges towards ASEAN Integration, November 29,30 and December 1, 2012, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand. **[Poster]**

5. **Promputtha 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: Pam0171)]**

6. **Promputtha I.**, Hyde K.D., and Lumyong S. 2011. Role of Endophytic Fungi on the Diversity of Saprobic Fungi. The 1st Conference on Taxonomy and Systematics in Thailand, May 2-4, 2011, Faculty of Science, Naresuan University, Pitsanulok, Thailand. **[Poster]**

7. Monkai J., **Promputtha I.**, Chukeatirote E., McKenzie E.H.C., and Hyde K.D. 2010. Diversity of fungi on leaf litter of *Magnolia liliifera* and *Cinnamomum iners* from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. International Symposium on "Fungal Biodiversity and Resources", November 12-13, 2010, Wangcome Hotel, Chiang Rai, Thailand. **[Oral]**

8. Yacharone S., **Promputtha I.**, Kidsueb R., Chukeatirote E., McKenzie E.H.C., and Hyde K.D. 2010. Biodiversity of saprobic fungi on woody litter of northern Thailand and screening for some insecticidal activity. International Symposium on "Fungal Biodiversity and Resources", November 12-13, 2010, Wangcome Hotel, Chiang Rai, Thailand. **[Poster]**

9. **Promputtha I.**, Hyde K.D., Peberdy J.F., and Lumyong S. 2007. How can endophytes survive as saprobes after host senescence? MSA Annual Meeting and Foray, August 6-9, 2007, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA. **[Poster]**

10. **Promputtha I.**, Hyde K.D., Peberdy J.F., and Lumyong S. 2006. Enzymatic activity of endophytic fungi on leaf decomposition. 8th International Mycological Congress, August 21-25, 2006, Cairns Convention Centre, Queensland, Australia. **[Poster]**

11. **Promputtha I.**, Jeewon R., Hyde K.D., Vijaykrishna D., McKenzie E.H.C., and Lumyong S. 2006. Do fungal endophytes of *Magnolia liliifera* become saprobes at host senescence? RGJ-Ph.D. Congress VII, April 20-22, 2006, Jontein Palmbeach Resort, Pattaya, Chonburi, Thailand. **[Oral]**

12. **Promputtha I.**, Lumyong P., Hyde K.D., Peberdy J.F., and Lumyong S. 2005.The production pattern of carbohydrases during the decomposition of *Magnolia liliifera* leaves. British Mycological Society Annual Scientific Meeting, September 5-8, 2005, Hulme Hall, University of Manchester, England **[Oral]**

13. **Promputtha I.**, Lumyong S., Lumyong P., McKenzie E.H.C., and Hyde K.D. 2004. Diversity and succession of fungi on senescent leaves of *Meliosma simplicifolia Sabiaceae*). The IV Asia-Pacific Mycological Congress and The IX International Marine and Freshwater Mycology Symposium, November 14-19, 2004, Chiang Mai, Thailand. **[Poster]**

14. **Promputtha I.**, Lumyong S., Lumyong P., McKenzie E.H.C., and Hyde K.D. 2002. Fungal succession on senescent leaves of *Manglietia garrettii* in Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand. 3rd Asia-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology (AMC2002), November 4-8, 2002, Yunnan University, Kunming, China. **[Oral]**

15. **Promputtha I.**, Lumyong S., Lumyong P., McKenzie E.H.C., and Hyde K.D. 2002. Fungal saprobes on dead leaves of *Manglietia garrettii* in Thailand. The 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "BIOTECHNOLOGY FOR BETTER LIVING IN THE NEW ECONOMY", November 12-15, 2002, Khonkaen University, Khonkaen, Thailand. **[Poster]**

16. **Promputtha I.**, Lumyong S., Lumyong P., McKenzie E.H.C., and Hyde K.D.2001. Saprobic Fungi on *Magnolia garrettii*. BioThailand 2001: From Research to Market, November 7-10, 2001, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. **[Poster]**

Research grant received

1. Screening of endophytic fungi producing melanin degrading enzymes potential application in cosmetics
   (Funding source: Mae Fah Luang University, 2011)

2. Screening of endophytic and saprobic fungi producing melanin degrading enzymes potential application in cosmetics
   (Funding source: Thailand Research Fund, 2011-2013)

3. The ability of chitinase from latex of *Hevea brasiliensis* to inhibit the growth of dandruff caused-*Malassezia* for application in anti-dandruff shampoo
   (Funding source: Small Projects on Rubber; SPR, TRF, 2011)

4. Astaxanthin from microalgae *Haematococus pluvialis* for application in sunscreen product
   (Funding source: Mae Fah Luang University, 2012)