

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

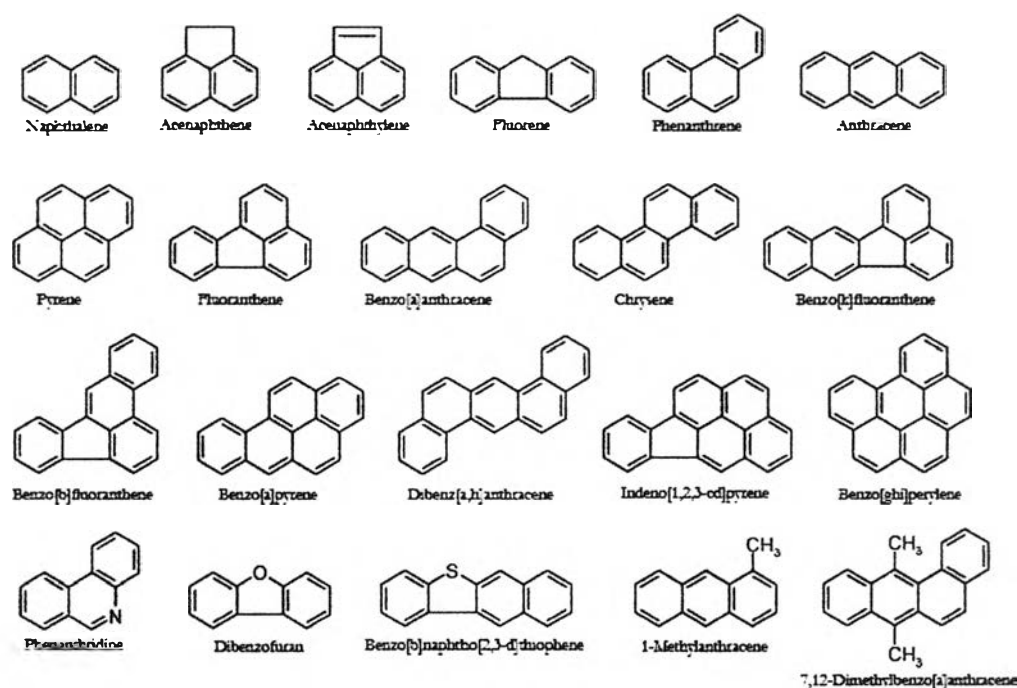
PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) เป็นกลุ่มสารเคมีที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงอะโรมาติก (aromatic ring) ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปอยู่ด้วยกัน โดยใช้คาร์บอนร่วมกัน 10 ตัว PAH ประกอบด้วยสารที่มีสูตรโครงสร้างแตกต่างกันถึง 35 ชนิด แต่ละชนิดประกอบด้วยอนุพันธ์ (derivative) ที่แตกต่างกันไป PAH ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น น้ำมันดิบ ถ่านหิน และควันของภูเขาไฟ PAH จึงเข้าสู่สิ่งแวดล้อมได้โดยการรั่วซึมของน้ำมันดิบจากแหล่งน้ำมันใต้ดิน ทำให้เกิดการปนเปื้อนเข้าสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติ และดิน หรือการเกิดไฟไหม้ป่า PAH ที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ นับเป็นกิจกรรมที่สำคัญที่ปล่อย PAH สู่สิ่งแวดล้อมมากที่สุดในปัจจุบัน ซึ่งการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์เป็นการทำให้ธาตุคาร์บอนไม่ถูกออกซิไดซ์ให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ทั้งหมด ชนิดของการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ทำให้เกิด PAH ที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับวัสดุที่ถูกเผาไหม้เป็นสำคัญ เช่น

รถยนต์ถือเป็นแหล่งกำเนิด PAH ที่ปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมที่สำคัญ เนื่องจากมีการใช้รถยนต์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทุก ๆ ปีซึ่งปริมาณ และชนิดของ PAH ที่เกิดขึ้น ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อเพลิงและการเผาไหม้ที่สมบูรณ์เพียงใด โดย Alsberg และคณะ (1985) ได้รายงานชนิด และปริมาณของ PAH ที่ถูกปล่อยออกมาจากรถยนต์ 4 สูบที่มีอายุ 1 ปี ที่ใช้น้ำมันผสมสารตะกั่วปริมาณ 0.15 กรัมต่อลิตร ที่ค่าออกเทน 96 ดังตารางที่ 1 การเผาสิ่งปฏิกูลเป็นอีกทางที่ก่อให้เกิด PAH พร้อมทั้งแพร่กระจายเข้าสู่สิ่งแวดล้อม เนื่องจากคุณสมบัติที่สำคัญของแอสเฟส คือ ไม่ละลายน้ำเมื่อเกิดการกระจายเข้าสู่สิ่งแวดล้อม จึงมักจะถูกดูดซับโดยดิน รวมทั้งการระเหยกลายเป็นไอ ซึ่งเกิดขึ้นได้น้อยมากที่อุณหภูมิห้อง จึงมักจะไม่ระเหยเป็นไอ แต่จะรวมตัวกับอนุภาคของฝุ่นละอองที่ฟุ้งกระจายอยู่ในอากาศ หรือ กลับไปรวมตัวกับดิน และเมื่อไหลลงสู่แหล่งน้ำจึงเกิดเป็นตะกอนสะสมอยู่ตามก้นของแหล่งน้ำ หรือก้นแม่น้ำ Putsch และ Domach (1993) ได้รายงานถึงการสะสมของสาร PAHs ในสิ่งมีชีวิตในปริมาณที่สูงกว่าในธรรมชาติหลายเท่า แสดงให้เห็นว่ามีการสะสมอยู่ในห่วงโซ่อาหารจนส่งผลกระทบต่อมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคลำดับสุดท้าย โดยสารประกอบ PAHs เหล่านี้เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) ก่อให้เกิดความผิดปกติทางด้านพันธุกรรม (mutagen) และก่อให้เกิดความผิดปกติของทารกในครรภ์ (teratogen)

ตารางที่ 1 ปริมาณของ PAH ที่ปล่อยออกมากับไอเสียรถยนต์ (Alsberg และคณะ, 1985)

PAH	ปริมาณ
	(ไมโครกรัม/ระยะการวิ่ง 1 กิโลเมตร)
anthracene	0.70
anthanthrene	0.75
benzo[<i>a</i>]anthracene	5.80
benzo[<i>a</i>]pyrene	3.20
benzo[<i>b</i>]fluoranthene และbenzo[<i>k</i>]fluoranthene	5.45
benzo[<i>e</i>]pyrene	4.40
benzo[<i>ghi</i>]fluoranthene	8.80
benzo[<i>ghi</i>]perylene	9.45
benzo[<i>j</i>]fluoranthene	1.00
chrysene	7.70
coronene	9.25
cyclopentano[<i>cd</i>]pyrene	7.45
fluoranthene	17.00
indeno[123- <i>cd</i>]fluoranthene	0.60
indeno[123- <i>cd</i>]pyrene	2.65
perylene	0.40
phenanthrene	2.75
pyrene	29.50
รวม	116.85

ดังนั้น หน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของประเทศสหรัฐอเมริกา (U.S. Environmental Protection Agency) จึงได้ประกาศให้สารประกอบ PAHs 16 ชนิด แสดงภาพที่ 1 และตารางที่ 2 เป็นสารที่ทำให้เกิดมลพิษทางน้ำ ทางดิน และในจำนวน 16 ชนิดนี้มี 8 ชนิดที่เป็นสารมวลโมเลกุลสูงและเป็นสารก่อมะเร็ง (Menzic และคณะ 1992) เพื่อป้องกันและกำจัดสารประกอบ PAHs เหล่านี้ออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างถูกวิธี



ภาพที่ 1 สารประกอบ PAHs 16 ชนิด และอนุพันธ์ ที่หน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของประเทศสหรัฐอเมริกาประกาศให้เป็นสารที่ทำให้เกิดมลพิษ (Menzic และคณะ, 1992)

ตารางที่ 2 สารประกอบ PAH 16 ชนิดที่หน่วยงาน U.S. Environmental Protection Agency ได้ประกาศว่าก่อให้เกิดมลพิษ (U.S. EPA 1998)

PAH	Number of rings	Molecular weight
naphthalene	2	128
acenaphthylene	3	152
acenaphthene	3	154
flourene	3	166
phenanthrene	3	178
anthracene	3	178
pyrene	4	202
fluoranthene	4	202
benzo[<i>a</i>]anthracene	4	228
chrysene	4	228
benzo[<i>b</i>]fluoranthene	5	252
benzo[<i>c</i>]fluoranthene	5	252
benzo[<i>a</i>]pyrene	5	252
dibenzo[<i>a,b</i>]anthracene	6	278
indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	6	276
benzo[<i>ghi</i>]perylene	6	276

การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต (chemobiokinetics)

การดูดซึม

PAH ถูกดูดซึมทั้งจากการสูดดม ทางผิวหนัง และจากการกิน ทำให้สามารถตรวจพบ PAH ภายในร่างกาย หรือการเกิดเมตาบอลิซึมภายในเนื้อเยื่อ และจากการสิ่งขับถ่ายต่าง ๆ ได้ เช่น ตรวจพบ 1-hydroxypyrene, benzo[a]pyrene 7, -8-diol และ 3-hydroxybenzo[a]pyrene ในภาวะของ คนงานที่ได้รับ pyrene, benzo[a]pyrene จากการหายใจ (Linhachev et al., 1993; Van Rooij et al., 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบ 1-hydroxypyrene ซึ่งเป็นเมตาบอลิท์ของ benzo[a]pyrene ในปัสสาวะ และอุจจาระของอาสาสมัครที่กินอาหารอย่างซึ่งปนเปื้อนด้วย benzo[a]pyrene (Buckley and Liroy, 1992; Hecht et al., 1979)

ในสัตว์ทดลอง การดูดซึมของ PAH จากการสูดดมเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ในหนู หนูตะเภา และหนู hamster ที่ได้รับสารกัมมันตภาพรังสีของ benzo[a]pyrene โดยการสูดดม หรือฉีดพ่นเข้า หลอดคอ ปรากฏว่าสามารถตรวจพบสารกัมมันตภาพรังสีในระดับของสัตว์เหล่านั้นได้ภายใน 10 นาที และพบในน้ำดีและปัสสาวะได้ภายใน 3 ชั่วโมง (Wolff et al., 1989; Weyand and Bevan, 1986; 1987) การดูดซึมของ PAH แต่ละสารจากระบบทางเดินอาหารมีความแตกต่างกัน Chang (1943) รายงานว่า หนูที่ได้รับ PAH ชนิดต่าง ๆ ทางปากมีการดูดซึมของ benzo[a]pyrene ประมาณร้อยละ 38 - 58 anthracene ร้อยละ 53 - 74 และ phenanthrene เพียงร้อยละ 4 - 7

การแพร่กระจาย และการสะสมในร่างกาย

การแพร่กระจายของ benz[a]anthracene, chrysene และ pyrene ในหนูเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว หนูที่ได้รับ benz[a]anthracene และ chrysene โดยการกินประมาณ 76 และ 156 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่า มีระดับของสารทั้งสองนี้สูงสุดที่ ตับ เลือด และสมองภายในเวลา 1 - 2 ชั่วโมง ที่ไขมัน และต่อมน้ำนมภายใน 3 - 4 ชั่วโมง หลังจากการให้กิน (Bartosak et al., 1984) ใน หนูที่ได้รับ [¹⁴C] - benzo[a]pyrene โดยการกิน พบว่ามีการแพร่กระจายของสารกัมมันตภาพรังสี ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ ไขมัน > ไต > ตับ > สมอง (Withey et al., 1991)

หนูที่ได้รับ [³H] - benzo[a]pyrene โดยการกินหลายครั้ง พบว่า มีระดับของ [³H] - benzo[a]pyrene ในไต และอวัยวะสูงสุดภายใน 2 - 8 วัน (Yamazaki and Kakinchi, 1989) การศึกษาการแพร่กระจายของ benzo[a]pyrene ในระดับเซลล์ พบว่า benzo[a]pyrene ส่วนมาก กระจายอยู่ในส่วนของโปรตีน (Yamazaki 1987) หนูที่ได้รับ benzo[a]pyrene โดยการกินขณะตั้ง

ท้อง มีการแพร่กระจายของ benzo[a]pyrene จากแม่เข้าสู่ตัวอ่อนได้อย่างช้า ๆ และระดับของ benzo[a]pyrene ในตัวอ่อนอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าตัวแม่เสมอ (Neubert and Tapken, 1988)

สุกร โค และไก่ ที่ได้รับ naphthalene โดยการกินติดต่อกันเป็นเวลา 31 วัน พบว่า naphthalene และเมทตาโบไลต์ที่ ปอด ตับ ไต หัวใจ และม้าม ส่วนที่ไขมัน มีความเข้มข้นของ naphthalene ก่อนข้างต่ำ แต่ในสุกรที่ได้รับ naphthalene โดยการกินเพียง 1 ครั้ง กลับมีความเข้มข้นของ naphthalene และเมทตาโบไลต์สูงสุดที่ไขมัน

เมทตาโบลิซึมของ PAHs

เมทตาโบลิซึมของ PAH เกิดขึ้นได้ในอวัยวะหลายชนิด ได้แก่ ตับ ปอด เยื่อทางเดินหายใจ เยื่อทางเดินอาหาร และผิวหนัง ส่วนใหญ่เมทตาโบลิซึมของ PAH เกิดขึ้นในตับ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง และมีความจำเพาะต่อเมทตาโบลิซึมต่อ PAH คือ aromatic hydrocarbon hydroxylase (AHH) ซึ่งเป็น cytochrome P – 450 microsomal enzyme ปฏิกริยาแรกของเมทตาโบลิซึมของ PAH คือ ออกซิเดชันโดยเอนไซม์ AHH ได้ epoxide ซึ่งจะถูกละลายต่อไปได้หลายวิธี คือ

วิธีที่ 1 epoxide ถูกเปลี่ยนไปเป็น dihydrodiol โดยเอนไซม์ epoxide hydrolase แล้วเกิดปฏิกริยาออกซิเดชันอีกครั้งโดย AHH ได้เป็น dihydrodiol epoxide ซึ่ง dihydrodiol epoxide ที่เกิดขึ้นนี้สามารถเกิดปฏิกริยาต่อได้ 2 วิธี คือ ถูกละลายไปเป็น tetraols หรือ ทำปฏิกริยากับ glutathione (GSH) โดยเอนไซม์ glutathione – S – transferase ได้เป็น glutathione conjugate ซึ่งจะถูกละลายต่อไปหลายขั้นตอนจนได้เป็น mercapturic acid และถูกขับออกจากร่างกาย

วิธีที่ 2 epoxide ทำปฏิกริยาโดยตรงกับ glutathione – S – transferase แล้วถูกขับออกในรูป mercapturic acid

วิธีที่ 3 epoxide ถูกเปลี่ยนเป็น phenol, quinone และ phenol – diols ซึ่งเมทตาโบไลต์ทั้ง 3 นี้ สามารถทำปฏิกริยากับ glucuronic และ sulfuric acid ได้เป็น glucuronide และ sulfate conjugates และถูกขับออกจากร่างกาย

ในขบวนการเมทตาโบไลต์ (metabolite) ของ PAHs ด้วยเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (cytochrome P450) ภายในในอวัยวะต่าง ๆ โดยการเติมหมู่ไฮดรอกซี (OH) ซึ่งทำให้ได้เป็นสารอนุพันธ์อีพอกไซด์ (epoxide) ของ PAHs ทำให้ PAHs เกิดความเป็นพิษมากขึ้น อนุพันธ์อีพอกไซด์นี้เองเป็นสารที่ว่องไวต่อการสร้างพันธะโควาเลนต์ได้ค้ำกับโปรตีน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งแม้ว่าการเกิดพันธะโควาเลนต์ มีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ จากนั้นภายในเซลล์จะมีการซ่อมแซมความเสียหายเหล่านั้นให้เป็นปกติ โดยตัดส่วนที่เสียหายของดีเอ็นเอทิ้ง แล้วสร้างส่วนที่ขาดหายไป

ขึ้นมาใหม่ แต่ถ้าหากเกิดการซ่อมแซมโดยที่ลำดับเบสผิดไปจากเดิม คือเอ็นเอยังคงความเสียหาย และคงความผิดปกติทางพันธุกรรม (Vo-Dinh, 1989)

ความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian toxicity)

PAHs มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่ำในสัตว์ทดลอง การได้รับ PAHs ในระยะเวลาสั้นมักไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของร่างกายอย่างเด่นชัด หรือ รุนแรง การให้ PAHs ทางปากในหนู mouse และหนู มีค่ามากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ยกเว้น naphthalene ในหนู mouse มีค่า LD₅₀ 354 – 710 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว LD₅₀ ของ PAHs ในสัตว์ทดลองแสดงในตารางที่ 3 รายงานความเป็นพิษเฉียบพลันของ PAH ในมนุษย์และสัตว์ทดลองมีดังนี้

anthracene มีฤทธิ์ในการกระตุ้นร่างกายให้มีความไวต่อแสงมากขึ้น (photosensitivity) ในมนุษย์ มีรายงานว่า anthracene ทำให้เกิดอาการผิดปกติของผิวหนัง คือ แสบร้อน คัน และมีอาการระคายเคืองของเยื่อเมือกและหลอดลมด้วย (ITII, 1982)

chrysene การป่าย chrysene บนผิวหนังของหนู mouse ปริมาณ 0.0125 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร 2 ครั้งต่อวัน เป็นระยะเวลา 2 วัน ทำให้ผิวหนังมีจำนวนเซลล์สีผิว (melanocyte) เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (Iwata et al., 1981)

naphthalene ทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง เนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic anemia) และต้อกระจก (cataract) ความผิดปกติทั้ง 2 อย่างนี้ เกิดได้ทั้งเฉียบพลัน และเรื้อรัง มีรายงานการตายของคนที่ยากุหมันในขนาด 5 กรัม ผลการชันสูตรร่างผู้ตาย พบว่า ที่ปอดมีการคั่งของโลหิต และบวมน้ำที่ตับ มีคั่งของเม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear leucocyte และ lymphocytes ในอวัยวะต่าง ๆ พร้อมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของไขมันในเซลล์ตับ นอกจากนี้ยังมีรายงานการตายของเด็กอายุ 6 ปี ที่กิน naphthalene ในขนาด 2 กรัม โดยการคำนวณ พบว่า ปริมาณของ naphthalene ที่ทำให้คนตายได้ มีค่าเท่ากับ 71.4 – 214.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยคิดจากคนที่มีน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ย 70 กิโลกรัม (U.S. EPA, 1998)

ตารางที่ 3 LD₅₀ ของ PAH ในสัตว์ทดลอง

สปีชีส์	(มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว)		
	วิธีการได้รับสาร	LD ₅₀	เอกสารอ้างอิง
anthracene หนู mouse	ทางปาก ฉีดเข้าช่องท้อง	18,000 > 430	Montizaan และคณะ (1989), Salamone (1981)
benzo[a]pyrene หนู mouse หนู	ทางปาก ฉีดเข้าช่องท้อง ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง	> 1,600 250 50	Awogi และ Sato (1989), Salamone (1981) Montizaan และคณะ (1989)
chrysene หนู mouse	ฉีดเข้าช่องท้อง	> 320	Simmon และคณะ (1979)
fluoranthene หนู mouse หนู กระต่าย	ฉีดเข้าเส้นเลือด ทางปาก ป้ายบนผิวหนัง	100 2,000 3,180	Montizaan และคณะ (1989) Smyth และคณะ (1962) Smyth และคณะ (1962)
naphthalene หนู mouse หนู	ทางปาก ฉีดเข้าช่องท้อง ทางปาก ฉีดเข้าช่องท้อง	354 – 710 150 – 400 490 – 9,430 1,000 – 1,600	Plasterer และคณะ (1985), Shopp และคณะ (1984) Sax และ Lewis (1984), Warren และคณะ (1982), Plopper และคณะ (1992) Montizaan และคณะ (1989), Gaines (1969), U.S.EPA (1978) Bolonova (1967), Plopper และคณะ (1992)
phenanthrene หนู mouse	ทางปาก ฉีดเข้าช่องท้อง ฉีดเข้าเส้นเลือด	700 – 1,000 700 56	Montizaan และคณะ (1989) Simmon และคณะ (1979) Montizaan และคณะ (1989)
pyrene หนู mouse	ฉีดเข้าช่องท้อง	514 – 678	Salamone (1981)

การศึกษาความเป็นพิษเฉพาะด้าน (special toxicity studies)

ปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical interactions)

PAH ออกฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด ที่สำคัญได้แก่

1. carboxylesterase เป็นเอนไซม์ใน microsome พบได้ในเซลล์ของตับ ไต และเยื่อลำไส้ ซึ่ง anthracene, phenanthrene, benz[a]anthracene และ benzo[a]pyrene มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ carboxylesterase ในเยื่อลำไส้ของหนู

2. aldehyde dehydrogenase (ADH) เป็นเอนไซม์ในไซโตพลาสซึม (cytosolic enzyme) พบได้มากในเซลล์ตับ การศึกษาในหนู พบว่า ความรุนแรงของการกระตุ้นการทำงานของ ADH มีความสอดคล้องกับฤทธิ์ก่อมะเร็งของ PAH นั้น ๆ เช่น benzo[a]pyrene สามารถกระตุ้นการทำงานของ ADH ได้มากกว่า และมีฤทธิ์ก่อมะเร็งที่แรงกว่า anthracene, chrysene และ phenanthrene (Torronen et al., 1981)

3. aromatic hydrocarbon hydroxylases (AHH) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม microsomal mixed function oxidases และเป็น cytochrome P – 450 AHH มีหน้าที่เฉพาะต่อเมตาโบลิซึมของ PAH ทุกชนิด PAH ส่วนมากมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ AHH โดยผ่าน Ah receptor ซึ่งความสามารถในการกระตุ้นได้มากน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของ PAH สปีชีส์ และสายพันธุ์ของสัตว์

การเป็นสารก่อเกิดมะเร็ง (carcinogenicity)

PAH แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการก่อมะเร็ง คือ กลุ่มที่ก่อมะเร็งและกลุ่มที่ไม่ก่อมะเร็ง ในกลุ่ม PAH ที่ก่อมะเร็ง IARC (1999) ได้จัดแยกกลุ่มโดยใช้ข้อมูลที่แสดงศักยภาพของการก่อมะเร็งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การจัดกลุ่ม PAH โดย International Agency for Research on Cancer (IARC) (1999)

กลุ่มที่ 2A	สารที่น่าจะก่อมะเร็งในคน (probable carcinogenic to humans) มี 3 สาร	
	benz[a]anthracene dibenz[a,h]anthracene	benzo[a]pyrene
กลุ่มที่ 2B	สารที่อาจจะก่อมะเร็งในคน (possibly carcinogenic to humans) มี 11 สาร	
	benzo[b]fluoranthene benzo[k]fluoranthene dibenzo[a,h]pyrene dibenzo[a,l]pyrene dibenzo[a,h]acridine naphthalene	benzo[j]fluoranthene dibenzo[a,e]pyrene dibenzo[a,i]pyrene dibenzo[a,j]acridine indeno[1,2,3-cd]pyrene
กลุ่มที่ 3	สารที่ไม่ทราบแน่ชัดว่าก่อให้เกิดมะเร็งในคนหรือไม่ (unclassifiable carcinogenic to humans) มี 23 สาร	
	anthracene benz[c]acridine benzo[a]fluorene benzo[c]fluorene benzo[a]phenanthrene chrysene cyclopenta[c,d]pyrene dibenzo[a]anthracene dibenzo[h,r,s]pentaphene fluorene phenanthrene triphenylene	benz[a]acridine benzo[ghi]fluoranthene benzo[b]fluorene benzo[ghi]perylene benzo[e]pyrene coronene dibenzo[a,h]acridine dibenz[a,c]anthracene dibenzo[a,e]fluoranthene fluoranthene perylene pyrene

เป็นที่น่าสังเกตว่าไม่มี PAHs สารใดที่ IARC จัดให้เป็นสารก่อมะเร็งในคน (กลุ่มที่ 1) ในขณะที่ PAHs หลายสารเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง และเป็นส่วนประกอบอยู่ในสารผสมที่ได้รับการยืนยันทางระบาดวิทยาแล้วว่าเป็นสาเหตุ หรือ มีส่วนทำให้เกิดมะเร็งในคน เช่น คันนุหรี่ น้ำมันดิน เชม่า คันนุเสียดจากเตาเผาถ่านหิน หรือ จากท่อไอเสียรถยนต์ เนื่องจากการยากที่จะตรวจยืนยันปริมาณ หรือ ความเข้มข้นของ PAHs แต่ละสารที่มนุษย์ได้รับจากสารผสมเหล่านี้ นอกจากนี้ยังมีสารก่อมะเร็งอื่น ๆ ปะปนอยู่ในสารผสมดังกล่าวด้วย

การเป็นสารก่อเกิดการกลายพันธุ์ (mutagenicity)

PAH ที่เป็นสารก่อมะเร็งจะมีฤทธิ์เป็นสารที่ก่อเกิดการกลายพันธุ์ด้วย และ PAH ต้องถูกเมตาโบไลต์โดย cytochrome P – 450 เป็น epoxide ก่อน จึงสามารถรวมตัวกับ DNA แล้วได้ผลของปฏิกิริยาที่มีความคงตัวสูง สามารถแยกได้จากสัตว์ทดลอง (IPCS, 1998)

การเสริมพิษ/การต่อต้านพิษ (potentiation/antagonism)

โดยทั่วไป PAH ที่เกิดจากแหล่งต่าง ๆ อยู่ในรูปของสารผสมมากกว่าในรูปของสารเดี่ยว และอาจมีสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่ PAH ปะปนอยู่ด้วย เช่น สาร nicotine ที่ปะปนกับ PAH ในควันบุหรี่ เส้นใยแอสเบสตอสที่ปะปนกับ PAH ในผงเขม่าจากโรงงาน เป็นต้น การเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่าง PAH ด้วยกันเอง และระหว่าง PAH กับสารชนิดอื่น ๆ จึงอาจเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังการได้รับเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์และสัตว์ เนื่องจาก PAH ที่เป็นสารก่อมะเร็งและก่อการกลายพันธุ์ จะต้องถูกเมตาโบไลต์เพื่อเปลี่ยนเป็นเมตาโบไลต์ที่มีความเป็นพิษ และสามารถรวมตัวกับสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ที่สำคัญของเซลล์ เช่น DNA, RNA และโปรตีนได้ ฉะนั้นการยับยั้ง หรือ กระตุ้นเอนไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับเมตาโบลิซึมของ PAH ไม่ว่าจะเนื่องจาก PAH ด้วยกันเอง หรือ จากสารชนิดอื่นก็ตาม ย่อมมีผลในการเสริม หรือ ต่อต้านความเป็นพิษของ PAH ได้ (U.S. DHHS, 1995) benzo[a]pyrene เป็นสารก่อมะเร็งที่มีฤทธิ์ร้ายแรง การศึกษาในหนูที่ได้รับ benzo[a]pyrene ร่วมกับ PAH ชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ก่อมะเร็งอย่างอ่อน หรือ ไม่มีฤทธิ์เลย ได้แก่ benzo[e]pyrene, benzo[ghi]perylene, fluoranthene และ pyrene พบว่าสารเหล่านี้ทำให้ฤทธิ์การก่อมะเร็งของ benzo[a]pyrene เพิ่มมากขึ้น โดย benzo[e], fluoranthene และ pyrene สามารถเสริมฤทธิ์ของ benzo[a]pyrene ได้มากกว่า benzo[ghi]perylene (Van Duuren et al., 1967) และพบว่าสารเหล่านี้ทำให้ปริมาณของสารประกอบระหว่าง benzo[a]pyrene และ DNA เพิ่มมากขึ้นด้วย (DiGiovanni et al., 1982; Lau and Baird, 1992; Rice et al., 1986)

ความเป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxicity)

ไม่มีรายงานความเป็นพิษต่อระบบประสาทจากการได้รับ PAH ยกเว้น naphthalene ที่มีรายงานว่าทำให้เกิดอาการทางประสาทในเด็กทารกได้ เช่น มีอาการเซื่องซึม การร้องไห้ลดน้อยลง มีดีซ่านในสมอง (kernicterus) อาการเหล่านี้เข้าใจว่าเกิดจากการขาดออกซิเจนในสมอง ซึ่งเป็นผลของภาวะโลหิตจางที่เกิดจากเม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic anemia) (U.S. EPA, 1998) การศึกษาความเป็นพิษต่อระบบประสาทของ acenaphthene, anthracene และ fluoranthene ในหนู โดยการ

กินติดต่อกันนาน 13 สัปดาห์ ไม่พบว่า PAH ทั้ง 3 สารนี้มีผลต่อระบบประสาทและพฤติกรรมของสัตว์ (U.S. EPA, 1998, 1989a, b)

การระคายเคืองเบื้องต้น (primary irritation)

PAH บางสารสามารถก่อให้เกิดอาการระคายเคืองของผิวหนังและเยื่อต่าง ๆ ได้ PAH **anthracene** ทำให้เกิดอาการแพ้แสง (photosensitivity) ได้ทั้งในคนและสัตว์ทดลอง มีรายงานว่าคนที่ได้สัมผัสกับ anthracene เกิดการอักเสบอย่างเฉียบพลันของผิวหนัง คือ มีอาการบวมแดง แสบร้อน และคันในบริเวณที่ได้สัมผัสกับ anthracene นอกจากนี้ anthracene ยังทำให้เกิดการระคายเคืองของดวงตา เยื่อตาอักเสบ ตาแดง หนังตาบวม น้ำตาไหล แพ้แสง และมีอาการระคายเคืองของเยื่อทางเดินหายใจตอนต้นร่วมด้วย อาการเฉียบพลันเหล่านี้กลับหายเป็นปกติได้ในเวลาหลายวันหลังจากการได้รับ anthracene หากได้รับเป็นระยะเวลานาน ผิวหนังส่วนที่ได้รับสัมผัสจะมีสีเข้มขึ้น ส่วนบนของผิวหนังหนาและคัน และมีการพองตัวของเส้นโลหิตฝอยของผิวหนังในบริเวณนั้น ในบางกรณีอาจมีการอักเสบของเยื่อทางเดินอาหารเกิดขึ้น (International Labour Office, 1983) แสงอัลตราไวโอเลตมีส่วนร่วมในการก่อความระคายเคืองของ anthracene ด้วย Singha และ Chignell (1983) รายงานว่าแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 295 นาโนเมตรสามารถกระตุ้นให้เกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่าง DNA และ anthracene เพิ่มขึ้น

การทดสอบในหนู mouse สายพันธุ์ที่ไม่มีขน โดยการป้ายสารละลาย anthracene บนผิวหนังส่วนหลัง แล้วส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตนาน 40 นาที พบว่า มีการอักเสบของผิวหนังอย่างรุนแรง และมากกว่าในหนูชนิดเดียวกันที่ได้รับแค่ anthracene หรือแสงอัลตราไวโอเลตเพียงอย่างเดียว (Forbes et al., 1976)

pyrene ทำให้เกิดอาการแพ้แสงบนผิวหนังหนูตะเภาได้อย่างรุนแรง ซึ่งจากการศึกษาการแพ้แสงของสารประกอบ 8 ชนิด ที่มีอยู่ในน้ำมันดิบ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 มิลลิโมโครโมล ถึง 5 ไมโครโมล โดยป้ายสารละลายเหล่านี้บนผิวหนังของหนูตะเภาแล้วฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต พบว่า pyrene ทำให้เกิดอาการอักเสบ บวมแดงของผิวหนังได้มากที่สุด (Kochevar et al., 1982)

benzo[a]pyrene ทำให้เกิดการระคายเคืองของผิวหนังและเยื่อทางเดินหายใจ มีรายงานว่าคนที่ได้รับ benzo[a]pyrene โดยการหายใจ มีอาการไอ หลอดลมอักเสบ การได้รับ benzo[a]pyrene หรือน้ำมันดิบ ซึ่งมี PAH หลายชนิดเป็นส่วนประกอบ โดยการสัมผัสทางผิวหนัง ทำให้เกิดอาการผิดปกติของผิวหนัง คือ เป็นหูด นอกจากนี้ยังมีการแสบร้อน ไวต่อแสง และมีตุ่มหนองเกิดขึ้น อาการเหล่านี้รุนแรงมากขึ้นเมื่อได้รับแสงอัลตราไวโอเลต (Cottini and Mazzone, 1939)

benz[a]anthracene ทำให้เกิดอาการระคายเคืองของเยื่อทางเดินหายใจในมนุษย์ สำหรับในสัตว์ทดลอง พบว่า benz[a]anthracene ทำให้เกิดอาการระคายเคืองของเยื่อทางเดินหายใจ และการตรวจทางพยาธิของเยื่อทางเดินหายใจ พบว่า มีการบวมน้ำ มีการแทรกตัว (infiltration) ของเม็ดเลือดขาวชนิด granulocyte และ mononuclear cells เข้าไปในเยื่อทางเดินหายใจ และมีจำนวนเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เพิ่มขึ้น ในระยะท้ายของการทดลอง พบว่า มีภาวะการเกิดพังผืด (fibrosis) ของเยื่อทางเดินหายใจด้วย (Topping et al., 1978)

ผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อน (embryotropic action)

ไม่พบรายงานผลของ PAH ต่อการพัฒนาของตัวอ่อนในมนุษย์ มีเพียงรายงานของ benzo[a]pyrene ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น หนู mouse ที่ได้รับ benzo[a]pyrene ระหว่างการตั้งท้อง ทำให้การพัฒนาของตัวอ่อนผิดปกติไป คือ อัตราการรอดชีวิตของลูกหนูเมื่อคลอดลดลง การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักของลูกหนูที่มีชีวิตลดลง ตัวอ่อนมีการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์อย่างผิดปกติ คือ เซลล์สืบพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ผิดปกติ ลูกหนูเหล่านี้เมื่อโตเต็มที่จะมีความสมบูรณ์ทางเพศลดลง และบางตัวเป็นหมัน (MacKenzie and Angevine, 1981)

ความเป็นพิษต่อภูมิคุ้มกัน (immunotoxicity)

ข้อมูลความเป็นพิษต่อภูมิคุ้มกันของ PAH ส่วนใหญ่เป็นข้อมูลของ benzo[a]pyrene การศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า การได้รับ benzo[a]pyrene ทางผิวหนัง สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกันแบบ allergic contact hypersensitivity ทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มีต่อสารชนิดอื่นลดลง ชะงักการสร้างแอนติบอดี และสามารถเปลี่ยนแปลงการทำงานของ macrophages, T – cells และ B – cells (Blanton et al., 1988; Zhao et al., 1990)

ความผิดปกติต่อการสืบพันธุ์ (reproductive toxicology)

ไม่พบรายงานความเป็นพิษของ PAH ที่มีต่อระบบสืบพันธุ์ในมนุษย์ และมี PAH เพียง 2 สารเท่านั้นที่มีรายงานว่าทำให้เกิดความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ คือ acenaphthene, acenaphthene benzo[a]pyrene การทดสอบความเป็นพิษของ acenaphthene ในหนู mouse ทั้งสองเพศ โดยการให้ acenaphthene เข้ากระเพาะอาหารในขนาดตั้งแต่ 0 – 700 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ติดต่อกันนาน 13 สัปดาห์ พบว่า หนูเพศผู้ไม่มีความผิดปกติใด ๆ ของระบบสืบพันธุ์ ในขณะที่หนูตัวเมียที่ได้รับ acenaphthene ในขนาด 700 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน มีน้ำหนักของรังไข่ลดลงอย่างสอดคล้องกับการลดลงของการทำงานของรังไข่ และมดลูก (U.S. EPA, 1989c)

benzo[a]pyrene หนู mouse สายพันธุ์ CD - 1 ที่ได้รับ benzo[a]pyrene โดยการกรอกเข้ากระเพาะอาหาร ปริมาณ 160 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ติดต่อกันนาน 10 วัน ทำให้อัตราการตั้งท้องจนครบกำหนดคลอดของแม่หนูลดลง และทำให้ลูกหนูทั้งหมดที่รอดชีวิตกลายเป็นหมันเมื่อเติบโตเต็มที่แล้ว นอกจากนี้หนูที่ได้รับ benzo[a]pyrene ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ขณะตั้งท้อง มีผลทำให้รูปร่างของอวัยวะสืบพันธุ์ และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ของลูกหนูผิดปกติไป (MacKenzie and Angevine, 1981) แต่การทดสอบในแม่หนู mouse สายพันธุ์ Swiss ที่ได้รับ benzo[a]pyrene ผสมในอาหารปริมาณ 133 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ไม่พบว่าทำให้เกิดอาการผิดปกติใด ๆ ของระบบสืบพันธุ์ (Rigdon and Neal, 1965)

ความผิดปกติที่เกิดในทารก (teratogenicity)

ไม่มีรายงานความผิดปกติที่เกิดในทารกของ PAH ในมนุษย์ มีรายงานแต่เพียงของ benzo[a]pyrene ในสัตว์ทดลอง หนูที่ได้รับ benzo[a]pyrene โดยการกินระหว่างตั้งท้อง ทำให้ลูกหนูมีความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ ความผิดปกติดังกล่าว ทำให้ลูกหนูเมื่อโตเต็มวัย มีความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง หรือ เป็นหมัน ได้ (MacKenzie and Angevine, 1981)

วิธีการทำลาย PAHs

แอนทราซีน และสารพิษต่าง ๆ ที่อยู่ในดิน อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงได้หลายลักษณะ เช่น สลายตัวโดยปฏิกิริยาเคมี (chemical decomposition) สลายตัวโดยแสง (photooxidation) ระเหยจากดินสู่บรรยากาศ (volatilization) เคลื่อนย้ายไปสู่แหล่งน้ำ (movement by runoff and watertable) เข้าสู่สิ่งมีชีวิต (bioaccumulation) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการบำบัดทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ (bioremediation) เป็นการเปลี่ยนแปลงในลักษณะดังกล่าว ทำให้สารพิษส่วนหนึ่งลดปริมาณลง แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณการปนเปื้อนของสารเคมีอันตรายต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมยังคงมีปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงก็ยังคงตกค้างในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากละลายน้ำได้น้อยมาก และถูกดูดซับโดยอนุภาคที่อยู่ในดิน จึงยากต่อการถูกทำลาย (Cerniglia, 1992)

ขั้นตอนของการบำบัดสารพิษจะต้องทราบถึงองค์ประกอบของสาร เพื่อให้สามารถคัดเลือกและกำหนดวิธีการที่เหมาะสมในการจัดการ โดยอาจใช้วิธีการทำลายฤทธิ์ด้วยระบบเคมี - ฟิสิกส์ (chemical - physical treatment) การเผาที่อุณหภูมิสูง (incineration) และกำจัดกากที่เหลือโดยวิธีฝังกลบ (land disposal) ในที่สุด แต่อาจมีมลพิษบางตัวที่เกิดขึ้นจากการทำลายสาร ซึ่งต้องมีการกำจัดในขั้นตอนต่อไป วิธีลดการปนเปื้อนของแอนทราซีน และสารพิษดังกล่าว มีข้อดี คือ ใช้ประโยชน์

ในกรณีที่สารเคมีแพร่กระจายไปสู่บริเวณข้างเคียงอย่างรวดเร็ว แต่มีข้อเสีย คือ อาจก่อให้เกิดสารพิษชนิดใหม่ขึ้นได้ และขั้นตอนการบำบัดยังคงเสียค่าใช้จ่ายสูงอีกด้วย (Lee, 1995)

กฎหมายเกี่ยวกับสารประกอบ PAH ในประเทศไทย

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

naphthalene เป็น PAH เพียงสารเดียวที่อยู่ในรายชื่อสารเคมีในประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่องบัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย พ.ศ. 2538 ออกตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ซึ่งกำหนดให้ naphthalene เป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 2 ซึ่งหมายความว่า การผลิต การนำเข้า การส่งออก หรือการมีไว้ในครอบครอง ต้องแจ้งให้พนักงานเจ้าหน้าที่ทราบก่อนและต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ และวิธีการที่กำหนด (กระทรวงอุตสาหกรรม 2538)

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2540)

เรื่อง สารกำจัดสิ่งปฏิกูล หรือ วัสดุที่ไม่ใช้แล้ว ออกตามความในพระราชบัญญัติโรงงาน พ.ศ. 2535 กำหนดให้กากของเสีย PAH จำนวน 8 สาร ได้แก่ benzo[a]anthracene, benzo[a]pyrene, chrysene, dibenzo[a,h]anthracene, dibenzo[a,i]pyrene, fluoranthene, indeno[1,2,3-cd]pyrene และ naphthalene เป็นเคมีภัณฑ์ที่เป็นอันตรายแบบเป็นพิษ (toxic hazardous chemicals) การกำจัดกากของเสีย PAH ดังกล่าว ต้องเป็นไปตามหลักเกณฑ์ และวิธีการที่กำหนด (ภาคผนวก) กล่าวคือ การทำลายฤทธิ์ กำจัดทิ้ง หรือฝังกากของเสีย PAH ดังกล่าวนั้น ให้ผู้ประกอบการโรงงานดำเนินการโดยวิธีการบำบัด (treatment) หรือการกำจัด (disposal) วิธีการใดวิธีการหนึ่ง หรือทำลายด้วยวิธีที่ต่อเนื่องกัน (chain treatments) ขึ้นกับลักษณะและคุณสมบัติของกากของเสียที่มี PAH ดังกล่าวปนเปื้อนอยู่ ซึ่งต้องได้รับความเห็นชอบจากอธิบดีกรมโรงงานอุตสาหกรรม หรือผู้ซึ่งอธิบดีกรมโรงงานอุตสาหกรรมมอบหมาย วิธีการที่กำหนดไว้ มีดังนี้ 1. การบำบัดโดยวิธีฟิสิกส์ (physical treatment) 2. การบำบัดโดยวิธีเคมี - ฟิสิกส์ (physical/chemical treatment) 3. การบำบัดโดยวิธีเคมี (chemical treatment) 4. การบำบัดโดยวิธีชีวภาพ (biological treatment) 5. การบำบัด หรือการกำจัดโดยกระบวนการใช้ความร้อน (thermal process for treatment and/or disposal) 6. การบำบัดโดยกระบวนการปรับเสถียร กระบวนการตรึงสาร กระบวนการทำให้เป็นก้อนแข็ง (stabilization/fixation/solidification processes) 7. การบำบัด หรือการกำจัดแบบ land treatment and/or disposal 8. วิธีการอื่น ๆ ที่ต่างไปจากที่กำหนดไว้ในข้อ 1 ถึงข้อ 7 หรือวิธีการอื่น ๆ ที่สามารถพิสูจน์ได้ว่าได้ผลเทียบเท่า หรือดีกว่าวิธีที่กำหนดไว้ หรือเป็นวิธีการที่ลดปริมาณของสิ่งปฏิกูล และวัสดุที่ไม่ใช้แล้ว ซึ่งจะต้องนำไปกำจัดโดยวิธีการปรับสภาพ หรือปรับคุณสมบัติของสิ่งปฏิกูลและวัสดุที่ไม่ใช้

แล้วนั้นให้นำมาใช้ประโยชน์ได้ใหม่ (reuse/ recycle) ได้อย่างปลอดภัย ได้แก่ การนำกลับคืนมาใช้ของตัวทำละลาย (solvent recovery) น้ำมัน (oil recovery) กรด (acid regeneration) และโลหะ (metals recovery) หรือการทำเชื้อเพลิงผสม (fuels blending) เพื่อใช้ในการเผาไหม้ในเตาอุตสาหกรรมประเภทอื่น ๆ (co - incineration in industrial kilns/furnaces) หรือ การแลกเปลี่ยนของเสีย (wastes exchange) เพื่อใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิต ตลอดจนการใช้บริการการค้าเนิ่นการต่าง ๆ ดังกล่าวของบุคคลอื่นแทน

การบำบัดโดยวิธีชีวภาพ (bioremediation)

เป็นทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดความเป็นพิษของแอนทราซีน และ PAHs รวมทั้งกากของเสียอันตรายชนิดอื่น ๆ มีรายงานวิจัย พบว่า การทำปฏิกิริยากับสารพิษโดยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการหลักที่มีผลลดการปนเปื้อนของดิน และตะกอนดิน โดย PAHs บางชนิดจะถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงานในการเจริญของเชื้อ หรือ PAHs บางชนิดอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วน (partially transformed) (Cerniglia, 1992)

มีจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา หลายชนิดที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs ได้ ดังตารางที่ 5 (Cerniglia, 1997)

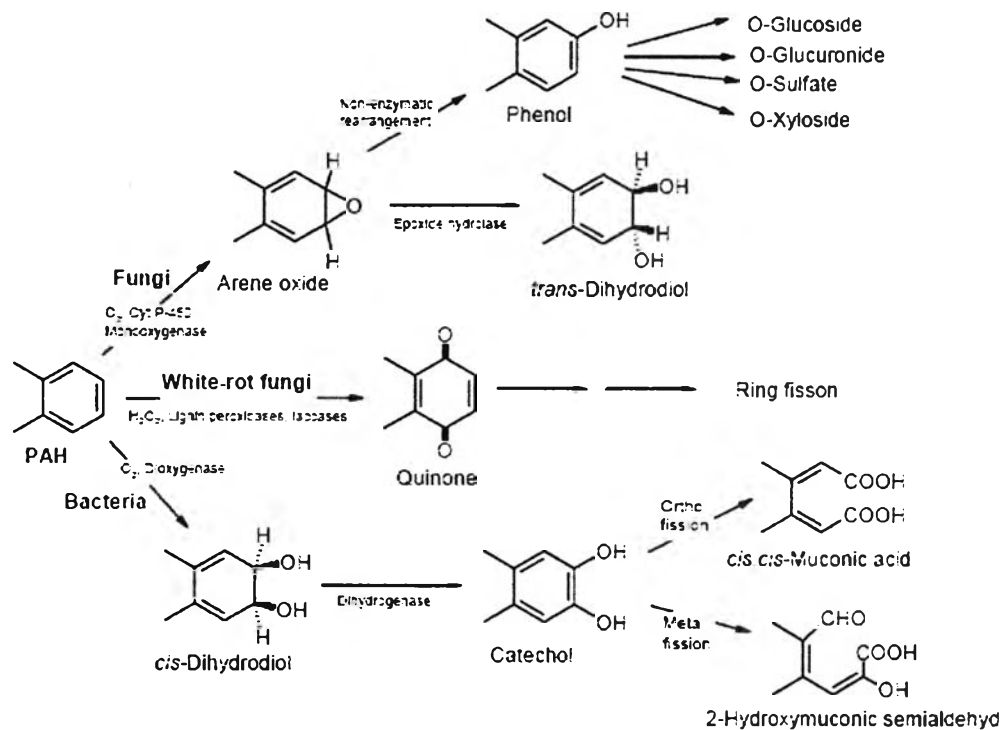
ตารางที่ 5 เชื้อราบางชนิดที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs (Cerniglia, 1997)

สารประกอบ PAHs	เชื้อราที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs
Acenaphthene	<i>Cunninghamella elegans</i>
Anthracene	<i>Bjerkandera sp</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Naematoloma frowardii</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phanerochaete laevis</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Ramaria sp</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Trametes versicolor</i>
Phenanthrene	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Naematoloma frowardii</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phanerochaete laevis</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Trametes versicolor</i>
Fluoranthene	<i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Naematoloma frowardii</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Penicillium sp</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i>
Fluorene	<i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trametes versicolor</i>
Pyrene	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Agrocybe aegerita</i> , <i>Candida parapsilopsis</i> , <i>Crinipellis maxima</i> , <i>Crinipellis pernicioso</i> , <i>Crinipellis stipitaria</i> , <i>Crinipellis zonata</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Kuehneromyces mutabilis</i> , <i>Marasmiellus ramealis</i> , <i>Marasmius rotula</i> , <i>Mucor sp</i> , <i>Naematoloma frowardii</i> , <i>Penicillium janczewskii</i> , <i>Penicillium janthinellum</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i>
Benz[a]anthracene	<i>Candida krusei</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phanerochaete laevis</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Rhodotorula minuta</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Trametes versicolor</i>
Benzo[a]pyrene	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Bjerkandera sp</i> , <i>Candida maltosa</i> , <i>Candida maltosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Chrysosporium pannorum</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Mortierella verrucosa</i> , <i>Naematoloma frowardii</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Penicillium janczewskii</i> , <i>Penicillium janthinellum</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phanerochaete laevis</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Ramaria sp</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Trichoderma sp</i> , <i>Trichoderma viride</i>
Chrysene	<i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Penicillium janthinellum</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i>
Benzo[e]pyrene	<i>Cunninghamella elegans</i>

โดยกระบวนการทำปฏิกิริยานี้ จะมีหลายกระบวนการ และสารที่เกิดขึ้นจะมีได้หลายชนิด ขึ้นอยู่กับชนิดของลูตินทรย์ที่ทำปฏิกิริยา และสารนั้น ๆ ดังตารางที่ 6 (Cerniglia, 1997) และภาพที่ 2

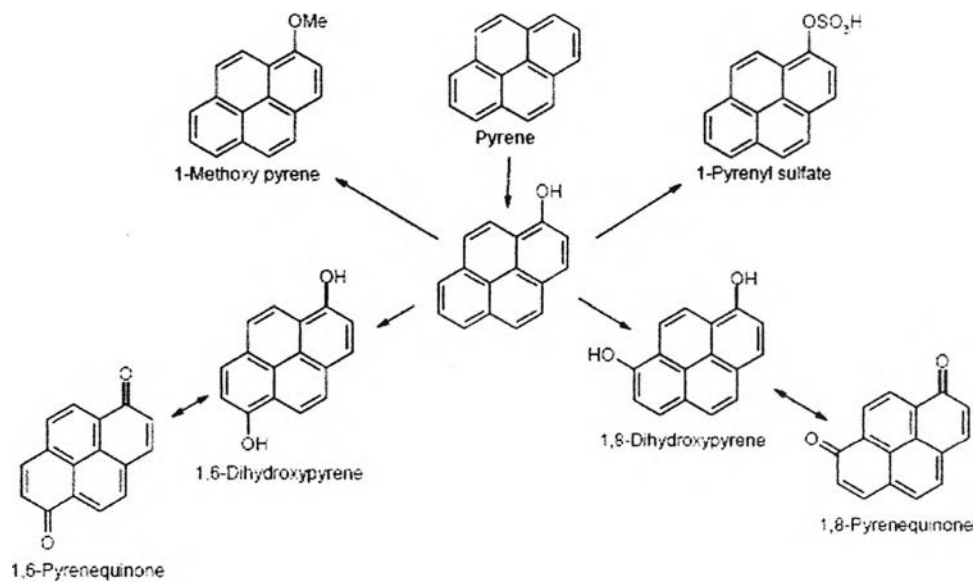
ตารางที่ 6 ปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นของสารอะโรมาติกบางชนิด (Cerniglia, 1997)

Compounds	Reaction patterns	Major products
Acetosyringone	Single electron transfer	Acetosyringone phenoxy radical
Vanillic acid	Polymerization	2-Methoxy-6-(2-methoxy-4-carboxyphenyl)-1-4-benzoquinone
1-(3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-(3,5-dimethoxy-4-ethoxyphenyl)propane-1,3-diol: β -1 lignin model compound	Depolymerization C_{α} oxidation Alkyl-aryl cleavage C_{α} - C_{β} cleavage	 1-(3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-(3,5-dimethoxy-4-ethoxyphenyl)-3-hydroxypropanone 2,6-Dimethoxy- p -hydroquinone and 1-(3,5-dimethoxy-4-ethoxyphenyl)-3-hydroxypropanal Syringaldehyde and 1-(3,5-dimethoxy-4-ethoxyphenyl)-2-hydroxyethanone
1-(3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-(2-methoxyphenyl)-1,3-dihydroxypropane: β -O-4 lignin model compound	Depolymerization C_{α} oxidation Alkyl-aryl cleavage C_{α} - C_{β} cleavage	 1-(3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-(2-methoxyphenyl)-1-oxo-3-hydroxypropane 2-(2-Methoxyphenyl)-3-hydroxypropanal and 2,6-dimethoxybenzoquinone Guaiacol and syringic acid
4,6-Di(<i>tert</i> -butyl)guaiacol: aromatic ring compound	Ring cleavage	2,4-Di(<i>tert</i> -butyl)-4-(methoxycarbonylmethyl)-2-buten-4-olide
1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-phenoxyethane-1,2-diol: non-phenolic β -1 lignin model compound	C_{α} - C_{β} cleavage (+ABTS)	Veratraldehyde and benzaldehyde

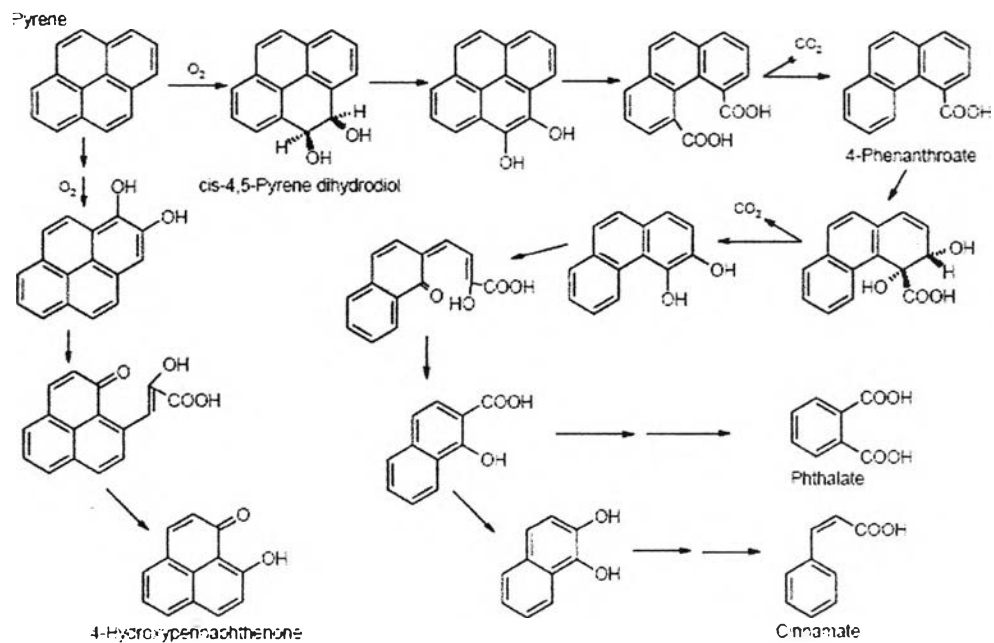


ภาพที่ 2 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย เชื้อรากลุ่มไวท์รอต และเชื้อราอื่น ๆ

เมื่อพิจารณาถึงการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแต่ละชนิดนั้น เช่น การย่อยสลาย pyrene พบว่า สามารถถูกย่อยสลายได้โดยแบคทีเรีย และเชื้อราบางชนิด ดังภาพที่ 3 และ ภาพที่ 4 ซึ่งจากปฏิกิริยา พบว่า *Penicillium glabrum* จะทำปฏิกิริยากับ pyrene เกิดเป็นปฏิกิริยาสุดท้าย คือ pyrene quinones ในขณะที่ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 จะเกิดปฏิกิริยาสุดท้ายคือ 4-hydroxyperinaphthenone

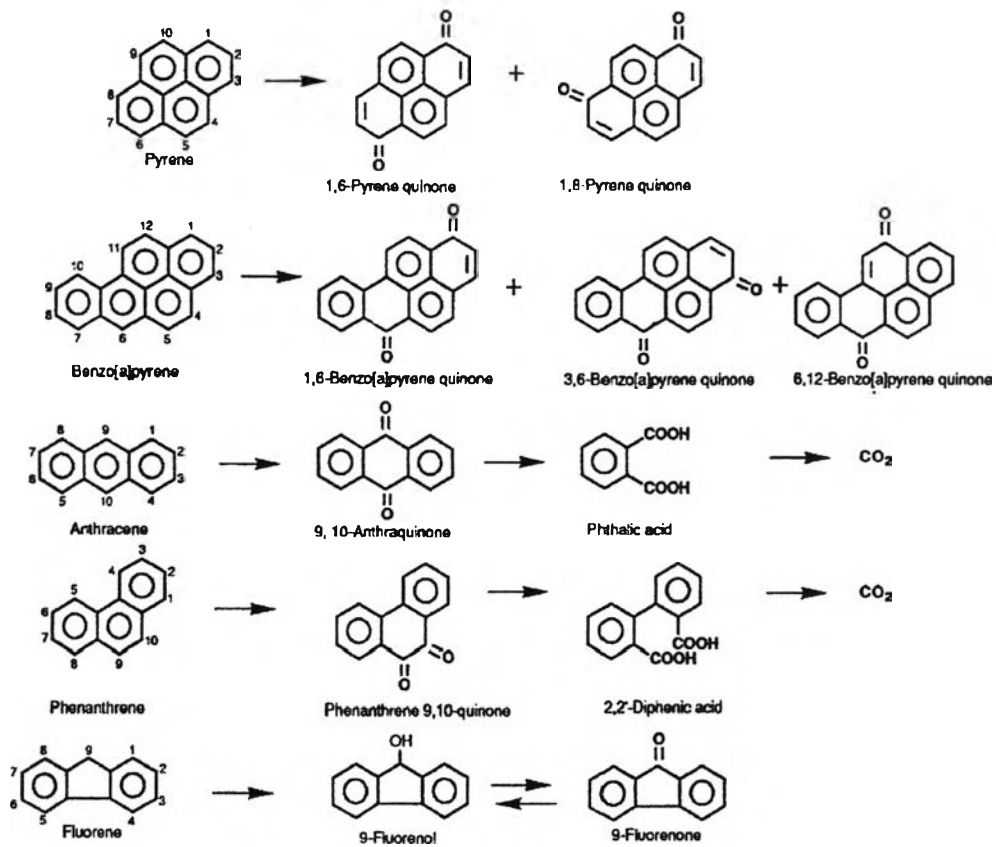


ภาพที่ 3 การเข้าทำปฏิกิริยากับ pyrene ของ *Penicillium glabrum*



ภาพที่ 4 การเข้าทำปฏิกิริยากับ pyrene ของ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1

สำหรับเชื้อราพวกไวท์รอต จะมีกระบวนการทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs นี้แตกต่างกันไป โดยเชื้อราจะมีการหลั่งเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ เช่น ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แลคเคส เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยากับลิกนินในเนื้อไม้ โดยเอนไซม์เหล่านี้ สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ แต่ปฏิกิริยาจะไม่เกิดจำเพาะเจาะจง ((Cerniglia, 1997)) PAHs บางชนิด เช่น fluorene anthracene benzo[a]pyrene สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบจำพวก quionones ได้ด้วยเชื้อราในกลุ่มนี้ โดยสารประกอบจำพวก quionones อาจถูกเปลี่ยนโครงสร้างต่อไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำได้ (Cerniglia, 1997) ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กระบวนการออกซิเดชันในการทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs โดยเชื้อรากลุ่มไวท์รอต (Cerniglia, 1997)

เมื่อเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs โดยเชื้อรากลุ่มไวท์รอตบางชนิด เช่น *Pleurotus ostreatus* *Phanerochaete chrysosporium* พบว่า *P. ostreatus* ซึ่งมีการผลิตแลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส นั้น จะย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ดีกว่า *P. chrysosporium* ซึ่งมีการผลิตทั้ง ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส แมงกานีส เปอร์ออกซิเดส และ แลคเคส แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า

การมีเอนไซม์ทั้ง 3 ตัวในกลุ่มนี้ที่แตกต่างกันนั้น ไม่มีผลต่อการทำปฏิกิริยากับสาร PAHs นี้ที่แตกต่างกัน (Harayama, 1997)

ดังนั้นจึงสามารถสรุปถึงกระบวนการทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs โดยเชื้อราได้ดังนี้ (Cerniglia, 1997) โดยมีเชื้อราในกลุ่ม Zygomycete เช่น *Cunninghamella elegans* กลุ่ม Ascomycetes เช่น *Aspergillus niger* กลุ่ม White-rot basidiomycetes เช่น *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* และในกลุ่ม Brown rot basidiomycete เช่น *Lentinus lepideus* ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs ได้ และมีโครงสร้างเบนซินริง 2 – 6 วง โดยเชื้อราไม่สามารถใช้สารประกอบ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอน หรือแหล่งพลังงานในการดำรงชีพได้ ดังนั้น ถ้าจะศึกษาเชื้อราในการทำปฏิกิริยากับสารนี้ จะต้องมีแหล่งพลังงาน หรือแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ เพื่อใช้เป็นสารอาหารให้เชื้อราเจริญเติบโตด้วย ในเชื้อราชั้นต่ำ (nonbasidiomycete fungi) มีการศึกษาถึงการย่อยสลายสารประกอบ PAHs และพบว่ามีการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเท่านั้น นอกจากนี้เชื้อรากลุ่มนี้ไม่สามารถใช้ PAHs เป็นแหล่งธาตุอาหารในการเจริญได้

เชื้อรากลุ่มไวท์รอตบางชนิดสามารถแยกโครงสร้างวงเบนซินของสารประกอบ PAHs ได้ พวกเชื้อราที่ไม่ใช่ในกลุ่มที่สามารถย่อยสลายลิควินินได้ จะสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs แล้วเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ dihydrodiols phenols quinones และ dihydrodiol epoxides กลุ่มของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอาจมารวมกันเกิดเป็นสารประกอบที่คล้ายกับสารในกลุ่มของ glucuronides xyiosides glucosides sulfates และปฏิกิริยาโดยรวมก็สามารถทำลายความเป็นพิษของสารนี้ได้ ในขณะที่บางปฏิกิริยาผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอาจเกิดเป็นพวก oxidation products ที่ยังคงมีความเป็นพิษได้ เช่น quinones หรือ dihydrodiol epoxides มีเอนไซม์หลายชนิดที่สามารถผลิตจากสิ่งมีชีวิต เช่น เชื้อรา สามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs เช่น intracellular cytochrome P450 และ extracellular lignin peroxidase manganese peroxidase รวมไปถึง laccase ด้วย การทำปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยเชื้อรา จะมีความแตกต่างกัน ซึ่งในบางกรณี อาจเหมือนกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิดได้ การทำปฏิกิริยาการย่อยสลายกับสารประกอบ PAHs ด้วยเชื้อรา จะช้ากว่าในแบคทีเรีย

เห็นได้ว่าเอนไซม์กลุ่มเปอร์ออกซิเดส เช่น แลคเคส ลิควินิน เปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ซึ่งพบในเชื้อรากลุ่มไวท์รอต มีความสำคัญมากในการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เพื่อเปลี่ยนโครงสร้าง และลดความเป็นพิษของสารชนิดนี้ นอกจากนี้ หน้าที่ยังเกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยากับลิควินิน เอนไซม์เหล่านี้มักใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษในกระบวนการฟอกเยื่อและกระดาษ (Call, 1994) ซึ่งใช้ในการทำปฏิกิริยากับลิกโนเซลลูโลส (Martinez et al.,

1994) รักษาค่าความเป็นกรดต่างในน้ำผลไม้และไวน์ และใช้ในการกำจัดสารประกอบจำพวกฟีนอล (Cantarelli et al., 1989, Giovanelli และ Ravasini 1993) ซึ่งสารเหล่านี้มักพบว่าเป็นสารที่ก่อภาวะกับสิ่งแวดล้อม ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 สารที่เป็นมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมที่ถูกออกซิไดซ์ได้โดยเชื้อราที่ย่อยสลายลิกนิน บางชนิด

สารที่เป็นมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมที่ถูกออกซิไดซ์ได้โดยเชื้อราที่ย่อยสลายลิกนินบางชนิด		เอกสารอ้างอิง
Chlorinated compounds	2,4-Dichlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, pentachlorophenol, 2,4-D, 2,4,5-T, DDT, lindane, 3,4-dichloroaniline, polychlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxines, polychlorinated biphenyls	Bumpus et al., 1985; Bollag et al., 1988; Valli and Gold, 1991; Valli et al., 1992; Field et al., 1992; Bollag et al., 1988; Call and Mücke, 1997.
Nitro-substituted compounds	2,4-Dinitrotoluene, TNT	Barr and Aust, 1994a.
Polycyclic aromatic hydrocarbons	Anthranthrene, phenanthrene, pyrene benzo(a)pyrene	Hammel, 1995; Field et al., 1992; Collins et al., 1996; Pickard et al., 1999.
Dyes	Polymeric dyes (poly R-481, poly B-411, poly Y606, remazol brilliant blue-R1) azodyes (sulfonated and non-sulfonated)	Field et al., 1992; Ollikka et al., 1993; Paszczynski and Crawford, 1991; Rodriguez et al., 1999.

แลกเคสถูกค้นพบครั้งแรกในยางของต้น *Rhus vernicifera* (พืชให้น้ำมันชนิดหนึ่งของประเทศญี่ปุ่น) โดย Yoshida ในปี 1883 โดยมีคุณสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการออกซิเดชัน urushiol จากนั้นก็มีการศึกษาเรื่อยมาเป็นระยะเวลาหลายปี และในปี ค.ศ. 1894 – 1896 Bertrand พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้พบได้ในพืชตระกูลน้ำมัน และในพวกเห็ดรา จากนั้นในปี 1896 Laborde ได้

ทำการศึกษาขั้นต้นพบว่าแลคเคสสามารถพบได้ในเห็ด โดยลักษณะแลคเคสทั่วไปนี้เป็นกลุ่มของ เอนไซม์ที่มี copper รวมอยู่ในองค์ประกอบด้วย (multicopper enzyme) หรือเรียกว่า blue-colored oxidase ซึ่งมีบริเวณที่ทำปฏิกิริยาในการเป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ถึง 4 ตำแหน่ง ในระหว่างการ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารตั้งต้นนั้น (reducing substatre) อิเล็กตรอนของสารตั้งต้นที่หลุด ออกมาจะไปจับกับแลคเคสโดยการจับนี้จะเกิดอย่างสุ่มในบริเวณที่มี copper ผลของปฏิกิริยาจะทำให้ไฮโดรเจนที่หลุดออกมารวมตัวกับออกซิเจนไปเป็นน้ำ แล้วสารตั้งต้นนี้ (reducing substatre) จะ เปลี่ยนไปเป็นสารที่เรียกว่า สารในสภาพเปลี่ยนหลังจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอิเล็กตรอน (reducing substrate after one electron oxidation) ซึ่งสารนี้จะมีโครงสร้างที่เอนไซม์ไม่สามารถเข้า ทำปฏิกิริยาได้ (Mester and Tien, 2000) ดังสมการ



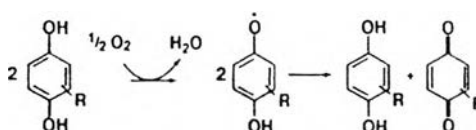
RH = reducing substrate

R* = reducing substrate after one electron oxidation

จากคุณสมบัติดังกล่าวนี้ จึงมีสารประกอบหลายชนิด เช่น monophenols *o*-diphenols และ *p*-diphenols methoxyphenols aminophenols arylamines และไอออนของสารเคมีบางชนิด สามารถเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาร่วมกับแลคเคสได้

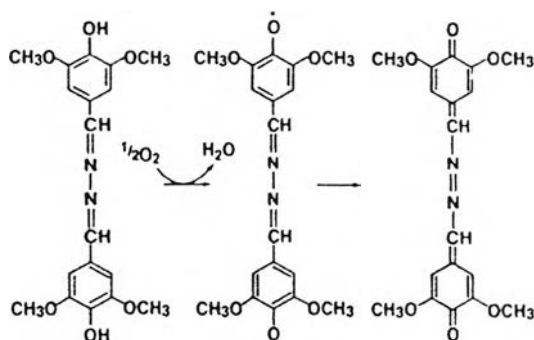
โดยทั่วไปแลคเคสสามารถออกซิไดซ์สารต่าง ๆ ได้หลายชนิด ซึ่งจากปฏิกิริยานี้จึงทำให้สามารถเรียกชื่อของแลคเคสไปตามปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้เช่น

- เมื่อแลคเคสออกซิไดซ์สารจำพวก *p*-diphenols ผลของปฏิกิริยาจะทำให้เกิดสาร จำพวก *p*-diquinones จะเรียกแลคเคสที่ทำปฏิกิริยากลุ่มนี้ว่า *p*-diphenols oxidase ดัง ภาพที่ 6



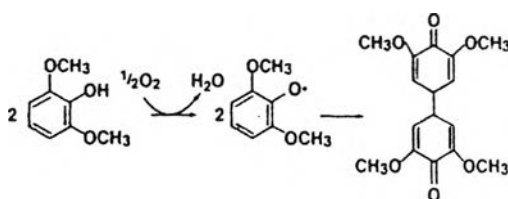
ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาแลคเคสออกซิเดชันในการเปลี่ยน *p*-diphenols ไปเป็น *p*-diquinones

- ในขณะที่การเกิดกระบวนการออกซิเดชันของสาร syringadazine กับแลคเคสนั้น จะไม่เกิดเป็นสารจำพวก quinone โดยตรง แต่จะถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางก่อน (free radical intermediate) ซึ่งแลคเคสที่ทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มนี้จะเรียกว่า syringadazine oxidase ดังภาพที่ 7



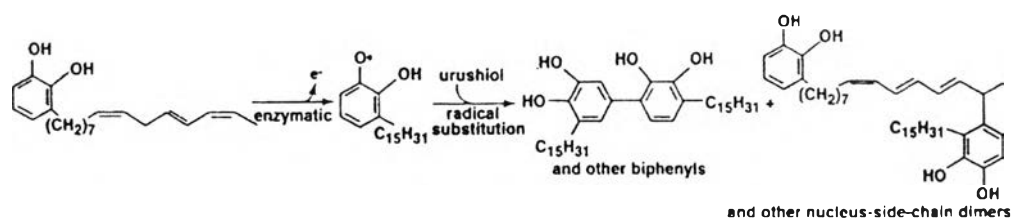
ภาพที่ 7 การเกิดกระบวนการออกซิเดชันของสาร syringadazine

- สารตัวกลาง free radical intermediate บางชนิด อาจถูกออกซิไดซ์โดยแลคเคส จนเกิดเป็นสารจำพวก semiquinone ได้ ซึ่งแลคเคสที่ทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มนี้จะเรียกว่า 2,6-dimethoxyphenol oxidase ดังภาพที่ 8



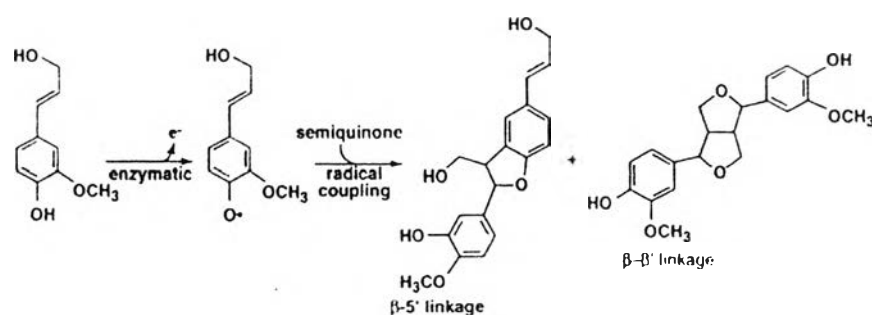
ภาพที่ 8 การเกิดปฏิกิริยา 2,6-dimethoxyphenol oxidase

ในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นบางชนิดนั้น สารตัวกลาง free radical intermediate ที่เกิดขึ้นสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาควบคู่ในการเกิด quinone ขึ้นได้ ยกตัวอย่างเช่น แลคเคสจากต้น *Rhus* สามารถทำปฏิกิริยากับ urushiol ควบคู่ไปกับการเกิดผลิตภัณฑ์ได้ ดังภาพที่ 9



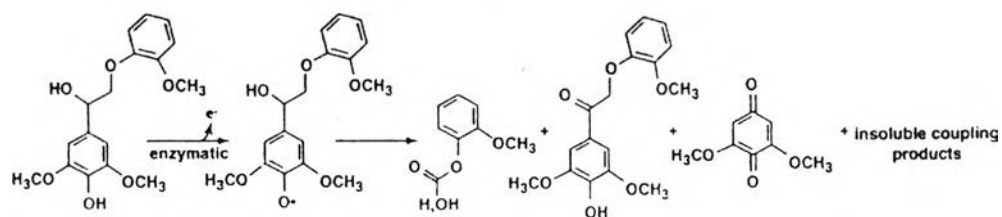
ภาพที่ 9 ปฏิกริยาของ *Rhus* Laccase

และพบอีกว่าแลคเคสจากพืชบางชนิดสามารถออกซิไดซ์ monolignols ไปเป็นในรูปของ dimers และ trimers ได้ ดังภาพที่ 10



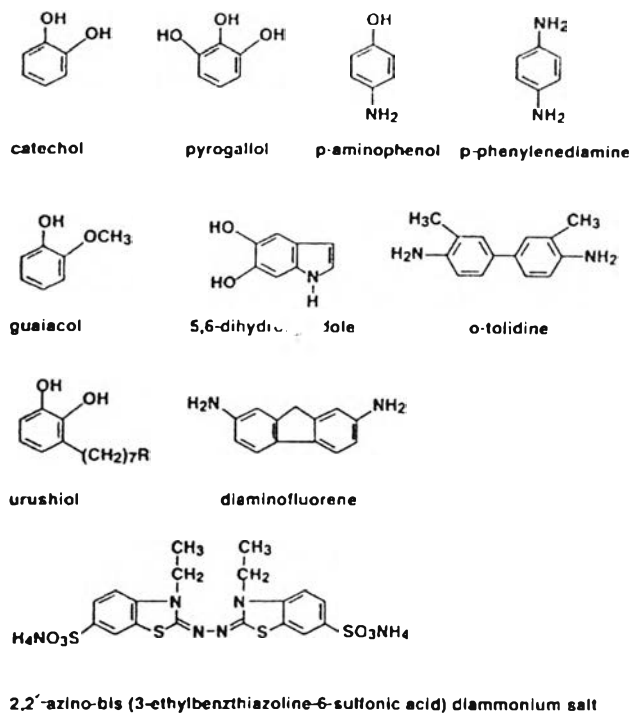
ภาพที่ 10 ปฏิกริยาของแลคเคสบางชนิดที่พบจากพืช

สำหรับแลคเคสจากเชื้อราพบว่าสามารถเปลี่ยนสารจำพวก syringylglycol guaiacol และอื่น ๆ ไปเป็นสารที่มีองค์ประกอบของ aldehyde carboxylic acid ester หรือกลุ่มของ quinone ได้ ดังภาพที่ 11 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นและแลคเคสที่ทำปฏิกิริยา รวมไปถึงผลิตภัณฑ์ที่จะเกิดขึ้นด้วย



ภาพที่ 11 ปฏิกริยาของแลคเคสบางชนิดที่พบจากเชื้อรา

โครงสร้างทางเคมีของสารตั้งต้นที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของแลคเคสนั้น ส่วนมากเป็นพวก di-phenols tri-phenols methoxy amino phenols phenylamine สารประกอบพวก phenylamine และสารประกอบ heterocyclic โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid: ABTS) ถูกพบว่าเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยากับแลคเคสได้ดี ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของสารตั้งต้นบางชนิดที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของแลคเคส

ในการจัดหมวดหมู่ของแลคเคสนั้น พบว่าอยู่ในกลุ่ม oxidoreductase (benzenediol: oxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.2) อย่างไรก็ตามก็ยังมีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับการจัดกลุ่มของแลคเคส เพราะว่ามีบางรายงานจัดให้อยู่ในกลุ่มของ *p*-diphenol:oxygen oxidoreductase EC 1.10.3.1 *p*-diphenol:oxygen oxidoreductase EC 1.14.18.1

คุณลักษณะทั่วไปของแลคเคส

การตรวจสอบการผลิตแลคเคส

ในปี 1928 Bavendamm ใช้กรดแทนนิก (tannic acid) หรือกรดกาลิก (gallic acid) ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผสมลงในอาหาร เพื่อทดสอบการปล่อยเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจากเห็ดรา หากเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มนี้ จะเกิดเป็นวงสีน้ำตาลรอบ ๆ โคลนีย์ของเส้นใยเชื้อรา (Harkin และคณะ 1973) Nishida และคณะ (1989) ได้ทำการคัดแยกเห็ดราที่สามารถย่อยสลายลิกนิน โดยใช้ gallic acid guaiacol rhemazol-brilliant blue R (RBBR) ผสมในอาหารสูตร potato dextrose agar (PDA) เพื่อหาอัตราส่วนของการเกิดวงสีน้ำตาลรอบ ๆ โคลนีย์ และนำเห็ดราที่คัดแยกได้มาใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ และเห็ดราบางสายพันธุ์ที่ได้รับการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดย Eggert และคณะ (1996) ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ตัวอย่างสายพันธุ์เห็ดที่รื้อที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Eggert et al., 1996)

White-rot fungi	Lip	MnP	Lac
<i>Bjerkandera sp.</i>	-	+	+
<i>Bjerkandera adusta (Polyporus adustus)</i>	+	-	-
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	-	+	+
<i>Cyathus stercoreus</i>	-	+	+
<i>Ganoderma colossum</i>	-	+	+
<i>Ganoderma lucidum</i>	-	+	+
<i>Ganoderma volciciocum</i>	-	+	+
<i>Lentinus (Lentinula) edodes</i>	-	+	+
<i>Perenniporia medulla-panis</i>	-	+	-
<i>Phlebia brevispora</i>	+	+	+
<i>Phlebia radiata</i>	+	+	+
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	+	+	+
<i>Phanerochaete sordida</i>	-	+	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	+	+	+
<i>Pleurotus sapidus</i>	+	+	+
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	-	-	+
<i>Trametes cingulata</i>	+	+	+
<i>Trametes gignosa</i>	+	+	+
<i>Trametes hirsutua</i>	+	+	+
<i>Trametes versicolor</i>	+	+	+
<i>Trametes villosa</i>	-	+	+

หมายเหตุ + พบเอนไซม์
- ไม่พบเอนไซม์

น้ำหนักโมเลกุล

การหาน้ำหนักโมเลกุลของแลคเคสทั้งจากพืชและเชื้อรา นั้น หาได้หลายวิธี เช่น ultracentrifugation size exclusion electrophoresis และ gene sequence เป็นต้น ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จะมีความหลากหลายแตกต่างกันไปตามวิธีที่ใช้ แต่โดยทั่วไปแล้วจะมีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 40 – 100 kDa แต่มีรายงานพบมากกว่าจะมีค่าอยู่ในช่วง 60 – 80 kDa โครงสร้างที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยานั้นจะอยู่ในรูป monomeric subunits แต่ในบางกรณีอาจพบอยู่ในรูปของ dimeric และ multimeric ก็ได้

โครงสร้าง

จากการศึกษาลำดับของโปรตีน หรือ ดีเอ็นเอของแลคเคสนั้น พบว่าเป็นสายโพลีเปปไทด์ 1 สาย ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 500 – 550 ชนิด (Messerschmidt 1975 และ Thurston 1994) โครงสร้างจะประกอบด้วยตำแหน่งของ N- และ O-linked glycosylation sites ตำแหน่งที่ทำปฏิกิริยากับ copper 4 ตำแหน่ง (4 copper atoms site) และพันธะ disulfide 2 – 3 ตำแหน่ง สำหรับด้านที่เป็น N-terminal leader ของสายโพลีเปปไทด์ จะถูกแยกออกไปหลังจากกระบวนการ translation เมื่อศึกษาโครงสร้างด้วยวิธี x-ray crystallography ทำให้ทราบว่าแลคเคสไม่ได้ก่อรูปอยู่ในลักษณะที่เป็นกลุ่ม หรือผลึก ดังนั้น จึงยังไม่สามารถทราบโครงสร้างในระดับ secondary และ tertiary structures ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าแลคเคสมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายกับเอนไซม์ชนิดหนึ่งคือ ascorbate oxidase และ ceruloplasmin ยกเว้นที่ตำแหน่งของ copper-binding sites ดังนั้น สารทั้ง 2 ชนิดนี้ จึงใช้เป็นตัวแทนเพื่อศึกษาโครงสร้างทั้ง secondary และ tertiary structures ของแลคเคส

จากการใช้สาร ascorbate oxidase และ ceruloplasmin เป็นตัวอ้างอิงเพื่อศึกษาโครงสร้างของแลคเคสนั้น พบว่าลักษณะเด่นของโครงสร้างประกอบด้วย β -barrel/ β -strand โดยตำแหน่งแรกประกอบไปด้วย β -pleated sheets ซึ่งจะก่อรูปไปเป็น β -sandwich ในขณะที่ตำแหน่งที่ 2 ประกอบไปด้วย β -pleated sheets และส่วนที่ยื่นออกของ α -helices ส่วนตำแหน่งที่ 3 เกิดขึ้นจากการรวมตัวของ five- β -pleated sheets 2 โมเลกุลก่อรูปเป็น β -barrel และ α -helices stretches (Coll และคณะ 1994)

จากการศึกษาข้างต้น ทำให้ทราบว่าตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 3 ของเอนไซม์ จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ disulfide เมื่อดูโครงสร้างโดยรวมแล้ว พบว่าส่วนมากจะประกอบไปด้วย β -pleated sheets มากกว่าโครงสร้างแบบ α -helices และมีการหมุนของโครงสร้างได้หลายแบบ โดยทั่วไป

แล้วแลคเคสมีโครงสร้างคล้ายกับ ascorbate oxidase มากกว่า ceruloplasmin, plastocyanin หรือ azurin (Messerschmidt 1975 และ Thurston 1994)

Isoforms

โครงสร้าง Isoforms ของแลคเคสนี้พบได้ทั้งในพืชและเชื้อรา ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปตามชนิด ประจุ และคุณสมบัติทางจุลชีววิทยา บาง Isoforms นี้อาจสร้างจากยีนหลาย ๆ ยีนที่ใช้สำหรับสร้างแลคเคส (Mansur และคณะ 1997) เนื่องจากแลคเคสเป็นไกลโคโปรตีน จึงทำให้โครงสร้างของ Isoforms นี้แตกต่างกันไปตามชนิดของคาร์โบไฮเดรต ปริมาณ ตำแหน่ง และการเชื่อมต่อกับของคาร์โบไฮเดรตกับโครงสร้างของสายโพลีเปปไทด์ (Perry และคณะ 1993)

ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น

เนื่องจากมีสารตั้งต้นหลายชนิดที่สามารถเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในการถูกออกซิไดซ์โดยแลคเคสได้ ดังนั้นการหาความจำเพาะของสารตั้งต้นต่อแลคเคสนั้นจึงหาในรูปของ k_{cat}/K_m แลคเคสจากเชื้อราและพืช พบว่ามีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นต่ำ คือมีค่า K_m มาก นอกจากนี้ค่า k_{cat}/K_m นี้จะขึ้นอยู่กับความสามารถในการออกซิเดชันกับสารตั้งต้นแต่ละชนิดด้วย (Solomon และคณะ 1996) ชนิดของสารตั้งต้นที่สามารถทำปฏิกิริยากับแลคเคสได้แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สารที่มีความสามารถในการตรวจสอบการทำงานของแลคเคส

Mediator		
t-butylcatechol	4-methoxy- α -naphthol	<i>o</i> - and <i>p</i> -aminophenols
catechol	4-methoxycatechol	<i>o</i> - and <i>p</i> -anisidines
caffeic acid	α -naphthol	4-amino-N,N-diethylaniline
chlorogenic acid	protocatechuic acid	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline -6-sulfonic acid: ABTS)
coniferyl alcohol	phloroglucinol	benzidine
<i>p</i> -coumaric acid	pyrogallol	3,3'-diaminobenzidine
Coumaryl alcohol	resveratrol	2,7-diaminofluorene
<i>p</i> -cresol	resorcinol	n,n-dimethylaniline
2,6-dimethoxyphenol	quercetin	3,3'-dimethylbenzidine
dopa	toluquinol	<i>p</i> -phenylenediamine
gallic acid	urushiol	5,6-dihydroxyindole
hydroquinone	guaiacol	1,8-dihydroxynaphthalene
ferulic acid	vanillic acid	6-hydroxydopamine
hydroxycinnamic acid	sinapyl alcohol	phenylhydrazine
veratryl alcohol	sinapic acid	syringaldazine
quinol	eugenol	<i>o</i> -tolidine
ferrocyanide	ascorbic acid	1,2,4,5-tetramethoxybenzene

ค่า K_m ของสารตั้งต้นที่ทำปฏิกิริยากับแลคเคสนั้นอยู่ในช่วง 0.1 – 10 มิลลิโมลาร์ โดยขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นที่เข้าทำปฏิกิริยา (Solomon และคณะ 1996) สารจำพวก hydroxyindole บางชนิด เช่น 5, 6-dihydroxyindole เมื่อทำปฏิกิริยากับแลคเคสจะให้ค่า K_m น้อยกว่า 0.1 มิลลิโมลาร์ (Solomon และคณะ 1996) เมื่อพิจารณาถึงชนิดของแลคเคสและสารตั้งต้นที่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน พบว่าค่า K_{cat} จะอยู่ในช่วง 70 – 2,000 s^{-1} (Solomon และคณะ 1996) หรือ 100 – 3,600 min^{-1} (Bao, 1993)

ค่าความเป็นกรดค่าและอุณหภูมิต่อการทำงานของแลคเคส

แลคเคสส่วนมากทำงานได้ดีในภาวะที่เป็นกรด (ค่าความเป็นกรดค่า 3 – 6) บางชนิดอาจทำงานได้ในภาวะที่เป็นค่า แสดงดังตารางที่ 10 สำหรับแลคเคสจากเชื้อรา นั้น พบว่า ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยานั้น จะมีค่าความเป็นกรดค่าที่ต่ำกว่าแลคเคสจากพืช นอกจากนี้ภาวะความเป็นกรดค่าที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยานั้น จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์การทำงานของแลคเคสด้วย สำหรับการเกิดผลิตภัณฑ์นั้น ชนิดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดค่า และชนิดของสารตั้งต้นด้วย ยกตัวอย่างเช่น เมื่อใช้แลคเคสทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ syringic acid ถ้าภาวะที่ทำปฏิกิริยามีค่าความเป็นกรดค่า 3.5 ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานี้จะมี 2 ชนิด แต่ถ้าค่าความเป็นกรดค่าเพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมี 4 ชนิด เป็นต้น (Sariaslani, 1989) สำหรับความเสถียรของแลคเคสนั้น พบว่ามีช่วงความเสถียรค่อนข้างกว้าง คือ เสถียรที่ค่าความเป็นกรดค่า 3 – 7 แต่แลคเคสจากเชื้อรา หรือ พืชบางชนิด อาจมีช่วงของค่าความเสถียรที่แตกต่างออกไป

แลคเคสส่วนมากมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง (35 – 80 องศาเซลเซียส) โดยอุณหภูมิที่จำเพาะต่อการทำปฏิกิริยานี้ จะขึ้นอยู่กับชนิดของแลคเคสด้วย แต่จะค่อนข้างสูง คือมากกว่า 50 องศาเซลเซียส แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิต่อการทำงานของแลคเคส

Laccase source	pH optimum	pH stability	Temperature optimum (°C)	Temperature stability (°C)
Fungal				
<i>Coriolus hirsutus</i>	3.5 – 4.5			
<i>Schizophyllum commune</i>	5.4 – 6.0			
<i>Rhizoctonia praticola</i>	6 – 7			
<i>Coriolus versicolor</i>	4 – 5			
<i>Agaricus bisporus</i>	3.6, 5.6			$t_{1/2}$ 40 min @ 60
<i>Pleurotus eryngii</i> I	4	5 – 7	65	$t_{1/2}$ 30 min @ 50
<i>Pleurotus eryngii</i> II	3.5	8 – 12	55	$t_{1/2}$ 25 min @ 55
Basidiomycete PM1	4.5	3 – 9	80	60 min @ 60
<i>Trametes villosa</i> 1,2,3	5 – 5.5			
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXC		$t_{1/2}$ 30 min @ pH 3	50 – 60	$t_{1/2}$ 30 min @ 60
POXA1		$t_{1/2}$ 24 h @ pH 3	45 – 65	$t_{1/2}$ 200 min @ 60
POXA2		$t_{1/2}$ 2 h @ pH 3	25 – 35	$t_{1/2}$ 10 min @ 60
<i>Monocillium indicum</i>	3.0, 5.0	2 – 6	60	$t_{1/2}$ 10 min @ 70
<i>Cerrena unicolor</i>	5.0 – 5.6	6 – 8	60	
Plant				
<i>Schinus molle</i>	6.2			
<i>Acer pseudoplatanus</i>	6, 6.8	4 – 10		

การยับยั้งการทำงานของแลคเคส

แลคเคสสามารถถูกยับยั้งได้โดยสารประกอบหลายชนิด ซึ่งโดยทั่วไปแล้วมักอยู่ในกลุ่มของสารประกอบจำพวก copper chelators reducing agents detergents และ free readical scavengers ตัวอย่างของ copper chelators เช่น EDTA CN^- sodium azide และ diethyldithiocarbamic acid Cetyltrimethyl-ammonium bromide (CTAB)

ตัวอย่างของสารประกอบบางชนิดที่สามารถยับยั้งการทำงานของแลคเตส

สารประกอบที่เป็นประจุบวกบางชนิดจะสามารถยับยั้งการทำงานของแลคเตสได้ โดยการยับยั้งนี้เป็นแบบแข่งขัน (competitive) หรือ แบบไม่แข่งขัน (noncompetitive) (Walker, 1980)

กรดคาร์บอกซิลิกบางชนิดถูกรายงานพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของแลคเตสได้ (Kreuter, 1991)

สารประกอบ Halides เช่น F^- สามารถยับยั้งการทำงานของแลคเตสได้ (Xu, 1996) เช่น เมื่อใช้ F^- ความเข้มข้น 0.02 – 0.5 มิลลิโมลาร์ หรือ Cl^- 0.05 – 600 มิลลิโมลาร์ สามารถทำให้การทำงานของแลคเตสลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์

N-Hydroxyglycine สามารถยับยั้งการทำงานของแลคเตสได้ รายงานโดย Murao และคณะ (1992)

การทำงานของแลคเตส

ภายในโครงสร้างโมเลกุลของแลคเตสจะมีโมเลกุลของ copper มาจับ เกิดเป็นโครงสร้าง 3 บริเวณที่เรียกว่า

Type 1 copper center

Type 2 copper center

Type 3 copper center

Type 1 copper center (T1) สามารถดูดกลืนแสงในช่วง 600 นาโนเมตรได้ จึงมีปฏิกิริยาจำเพาะต่อสีฟ้าของโปรตีน ที่ตำแหน่งนี้เกี่ยวข้องกับก๊าซออกซิเดชันของ $1e^-$ ของสารตั้งต้น และสามารถตรวจสอบได้ โดยดูการแสดงผลของ electron paramagnetic spectrum (EPR) สำหรับ Type 2 copper center (T2) หรือ normal copper center จะไม่ดูดกลืนช่วงคลื่นแสงที่มองเห็นได้ แต่สามารถตรวจสอบได้โดยดูการแสดงผลของ EPR ในบริเวณที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Cu (Cu complexes) ในขณะที่ Type 3 copper center (T3) นั้น ประกอบไปด้วย Cu^+ 2 โมเลกุล ซึ่งไม่แสดงผลของ EPR แต่จะสามารถดูดกลืนคลื่นแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตได้ (330 นาโนเมตร) นอกจากนี้ Type 2 copper center และ Type 3 copper center สามารถมารวมกันเป็นกลุ่มเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า trinuclear copper cluster ที่มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาในการรับ $4e^-$ ของออกซิเจนไปเป็นน้ำ

จากการศึกษาของ Solomon และคณะ (1996) พบว่าเมื่อแลคเตสทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นนั้นจะมีการส่งอิเล็กตรอนไปยังบริเวณ Type 1 copper center site และจะมีการส่งต่อไปยังบริเวณ

T2-T3 copper center site ส่วนปฏิกิริยา reduction ของกลุ่ม copper center site ทั้ง 3 บริเวณ เกิดขึ้นได้ทั้ง 3 บริเวณของแต่ละ copper center site ในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกันไปในแต่ละ mediator ซึ่งแต่ละ mediator ก็เข้าทำปฏิกิริยาในแต่ละตำแหน่งของ copper center site (Yarpolov, 1997) ที่แตกต่างกัน

การวิเคราะห์แอกติวิตีของแลคเคส

สำหรับการวิเคราะห์แอกติวิตีของแลคเคสนั้น เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี spectrophotometric มักใช้ปริมาณของสารที่ทำปฏิกิริยารวมทั้งหมด 1 – 3 มิลลิลิตร แต่ถ้าใช้วิธี oxygen consumption assays จะใช้สารที่ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 3 – 4 มิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามค่าแอกติวิตีของแลคเคสจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสารตั้งต้น ค่าความเป็นกรดค่า หรือ ชนิดของแลคเคส เป็นต้น

สำหรับสารตั้งต้นที่ใช้มากในการวัดแอกติวิตีของแลคเคส คือ 2, 6 dimethoxyphenol (DMP; สีน้ำตาล) ABTS (สีเขียวแกมน้ำเงิน) syringaldazine (SYR; สีชมพู) และ *o*-tolidine (TOL; สีน้ำเงิน) แสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 สารตั้งต้น และค่า molar extinction coefficient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

ชนิดของสารตั้งต้น	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (นาโนเมตร)	ค่า molar extinction coefficient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
DMP	468	14,800
ABTS	420	36,800
syringaldazine	525	65,000

การทำให้แลคเคสบริสุทธิ์

ในกระบวนการทำให้แลคเคสบริสุทธิ์นั้น ไม่มีวิธีใดที่ดีที่สุด เนื่องจากแลคเคสมีโครงสร้างหลายแบบที่แตกต่างกัน สำหรับแลคเคสจากเชื้อราสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้หลายวิธี เช่น การอัลตราฟิลเตรชัน การตกตะกอนด้วยเอธานอล แอมโมเนียมซัลเฟต หรืออะซีโตน หรือการทำไอออนเอ็กซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี ซึ่งจะได้คอลลอยด์ออกมาเป็นแบบ DEAE cellulose QAE และ mono Q columns สามารถชะออกมาด้วยการแลกเปลี่ยนประจุ โดยการเติมความเข้มข้นของเกลือ NaCl 0 – 0.5 โมลาร์ นอกจากนี้ยังสามารถทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยกระบวนการ size exclusion

chromatography หรือ gel filtration chromatography โดยใช้คอลัมน์เป็นแบบ Superpose-12 Superdex 75 Sephadex G-100 และ Sephacyl S-200 เช่น

การทำให้แลคเคสจาก *Trametes villosa* บริสุทธิ์ สามารถทำได้โดยการนำไปปั่นด้วยเครื่อง เซนติฟิวเดชัน ที่ความเร็วรอบสูง ๆ จากนั้นนำสารละลายมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน โดยแผ่นกรองของบริษัท Amicon S1Y100 ultrafiltration จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยวิธี ไอออนเอ็กซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี ซึ่งได้คอลัมน์เป็น Q-Sepharose (Pharmacia) และ 10 มิลลิโมลาร์ Tris ความเป็นกรดค่า 7.7 เป็นบัฟเฟอร์

แลคเคสบางชนิดไม่จับกับคอลัมน์ของไอออนเอ็กซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี ทำให้สามารถถูก แยกออกมาก่อนได้พร้อมกับบัฟเฟอร์ ส่วนแลคเคสที่เหลือ (2 พิค) จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยการ เพิ่มความเข้มข้นของ NaCl (0 – 0.5 โมลาร์) จากนั้นเมื่อนำแลคเคสทั้ง 3 พิคมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ด้วยวิธี size exclusion chromatography โดยใช้คอลัมน์แบบ Superdex 75 (Pharmacia) และ Tris บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ NaCl 150 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดค่า 8 เป็นตัวชะ พบว่า สามารถแยกแลคเคสได้เป็น 3 ชนิด คือ neutral form neutral acidic form และ acidic form ตามลำดับ ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 การทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

Sample	Volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	Specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1}/\text{mg protein}$)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture filtrate	1,500	11,000	1,800	0.16	1	100
conc. Bulture filtrate	280	460	1,500	3.3	21	83
Q-Sepharose						
<i>neutral form</i>	0.40	5.1	270	53	330	15
<i>neutral-acidic form</i>	0.42	9.6	108	11	69	6
<i>acidic form</i>	0.2	14.0	430	31	190	24
Superdex-75						
<i>neutral form</i>	4.0	1.7	122	72	450	6.8
<i>neutral-acidic form</i>	7.0	4.1	117	29	180	6.5
<i>acidic form</i>	4.5	2.0	131	66	410	7.3

เมื่อศึกษาน้ำหนักของโมเลกุล โดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีค่าประมาณ 60 – 70 kDa แต่เมื่อวัดด้วยวิธี size exclusion chromatography พบว่ามีค่าประมาณ 130 kDa neutral form มีค่า pI เท่ากับ 6.2 6.5 และ 6.8 neutral acidic form มีค่า pI หลายค่า คือ 5 6 6.2 6.5 และ 6.8 acidic form มีค่า pI เท่ากับ 3.5

การนำแลคเคสไปใช้ประโยชน์

ในอุตสาหกรรมกระดาษ

แลคเคสใช้ในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษ เพื่อกำจัดสีของกระดาษ หรือ สีของน้ำเสียที่มีสารจำพวกอะโรมาติกเป็นองค์ประกอบ (Eaton และคณะ 1982)

ในอุตสาหกรรมอาหาร

เนื่องจากพบว่าแลคเคสสามารถออกซิไดซ์สารประกอบจำพวกฟีนอลได้ ซึ่งปฏิกิริยาของสารจำพวกนี้มักมีผลทำให้ผัก และผลไม้ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อวางทิ้งไว้ ทำให้มูลค่าของการขายและความต้องการของผู้บริโภคลดลง แลคเคสจึงถูกนำมาใช้เพื่อลดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังกล่าว

การกำจัดของเสียในอุตสาหกรรม

ของเสีย หรือ สารประกอบจำพวกอะโรมาติกบางชนิด เช่น PA Hs จะมีความเป็นพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิต และสิ่งแวดล้อม ดังนั้น จึงได้มีผู้ศึกษาถึงการเปลี่ยนโครงสร้างของสารชนิดนี้ให้มีพิษน้อยลง ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง วิธีทางชีวภาพ โดยการใช้เอนไซม์แลคเคสที่ผลิตจากเชื้อราในกลุ่มไวท์รอต