บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์/ครุภัณฑ์	บริษัท/ประเทศ
ตู้เขี่ยเชื้อแบบ larminar flow รุ่น BV 123 และ B∀T 123	ISSCO, USA
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610	Sartorius, Germany
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC205	Denver Instrument Company, USA
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius, Germany
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น 8453	Hewlett Packard, USA
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น NovaSpec 4049	LKB Biochrom, England
กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200	Olympus, Japan
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (steam sterilizer/autoclave)	Ta Chang Medical Instrument Factory, Taiching, Taiwan
ตู้อบความร้อนสูง (hot air oven) รุ่น U50 790, 387	Memmert, Germany
ตู้อบ (oven)	Clayson, New Zealand
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น PP-50	Sartorius, Germany
Hot plate รุ่น 210T	Thermix, Fisher Scientific, USA
ปิเปตอัตโนมัติขนาด 5 - 50, 100 - 1,000 และ 1,000 - 5,000 ไมโครลิตร	Biohit, Finland
ชุดเครื่องแก้ว Pyrex	Pyrex, New York, USA
ชุดเครื่องแก้ว Duran Scott	Schott Duran, Germany

วัสดุอุปกรณ์/ครุภัณฑ์	บริษัท/ประเทศ
กระดาษกรอง Whatman No.1	Whatman International Ltd., England
ถุงไดอะไลซีส รุ่น Spectra 1 Por molecularporous membrane tubing	Spectrum Medical Industries, Inc., USA
ชุดกรอง Ultrafiltration รุ่น Viva science 250	Sartorius, Germany
Econo Pump รุ่น EP-1	Bio-Rad, USA
Econo UV monitor รุ่น EM-1	Bio-Rad, USA
Fraction Collector รุ่น Bio Frac TM	Bio-Rad, USA
Vertical electrophoresis system รุ่น VIO-CDC	Scie-Plas limited (SDE-PIAS), England
Power Pac 1000	Bio-Rad, USA
Microcentrifuge รุ่น Denville 260 D	Denville Scientific, USA
เครื่อง HPLC รุ่น Prostar	Varann, USA
Calum HPLC แบบ C_{18} Reverse-phase	Chromspser
เครื่อง Spectrophotometer UV 2008 UV/VIS	Unico Bangkok High Lab Co., Ltd.

สารเคมี

ชนิด	บริษัท/ประเทศ
วุ้นผงตรานางเงือก	พัฒนสินเอนเตอร์ไพรส์ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
Ethanol 95% (C_2H_5OH)	องค์การสุรา กรมสรรพสามิต จ. ฉะเชิงเทรา ประเทศไทย
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	USB Corporation, USA
Acetylacetone ($CH_3COCH_2COCH_3$) Copper sulphate ($CuSO_4$) Magnesium sulphate ($MgSO_4$) Potassium di-Chromate ($K_2Cr_2O_7$) Sodium carbonat (Na_2CO_3) Sulfuric acid (H_2SO_4)	Carlo Erba, Milan, Italy

ชนิด	บริษัท/ประเทศ
Citric acid ($C_6H_2O_7.2H_2O$) di-Sodium ethylendiaminetetraacetate (EDTA) dehydrate($CH_2N(CH_2COOH)CH_2COONa)_2.2H_2O$ Barium chloride ($BaCl_2$) Copper chloride ($CuCl_2$) Glycerol ($CH_2OHCHOHCH_2OH$)	Asia Pacific Specialty Chemicals Ltd, Australia
Acetylacetone ($CH_3COCH_2COCH_3$) Copper sulphate ($CuSO_4$) Magnesium sulphate ($MgSO_4$) Potassium di-Chromate ($K_2Cr_2O_7$) Sodium carbonat (Na_2CO_3) Sulfuric acid (H_2SO_4)	Carlo Erba, Milan, Italy
HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow β-mercaptoethanol TEMED (N, N, N' N'-tetramethylenediamine) Low Molecular Weight Gel filtration Sephacryl-S-200 HR	Amersham biosciences, Sweden
Acetylacetone ($CH_3COCH_2COCH_3$) Copper sulphate ($CuSO_4$) Magnesium sulphate ($MgSO_4$) Potassium di-Chromate ($K_2Cr_2O_7$) Sodium carbonat (Na_2CO_3) Sulfuric acid (H_2SO_4)	Carlo Erba, Milan, Italy
Acetylacetone ($CH_3COCH_2COCH_3$) Copper sulphate ($CuSO_4$) Magnesium sulphate ($MgSO_4$) Potassium di-Chromate ($K_2Cr_2O_7$) Sodium carbonat (Na_2CO_3) Sulfuric acid (H_2SO_4)	Carlo Erba, Milan, Italy

ชนิด	บริษัท/ประเทศ
D-glucose L-Asparagine Monohydrate Guaiacol 2,2'-azino-bis(3 ethylbenz-thaizoline-6-sulfonic acid)	Sigma Chemical, St. Louis, MO. USA
Calcium hydrogen phosphate dehydrate ($CaHPO_4.2H_2O$) Methanol (CH_3OH) Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Scharlau, Chemic, Barcelona Spain
Acrylamide Ammonium persulfate Coomassie Blue R-250 N, N'-methylene bis acrylamide Prestained SDS-PAGE Standards Low Range Tris-glycine electrode buffer Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Bio-Rad, USA
Ferrous sulphate ($FeSO_4$) Zinc sulphate ($ZnSO_4$) Manganese sulphate ($MnSO_4$) Cobalt chloride ($CoCl_2$) Sodium bi-sulfite ($NaHSO_3$) Fumaric acid	May & Baker Ltd., Dagenham, England
Acetic acid (CH_3COOH) Ammonium sulphate $(NH_4)2SO_4$ Manganese sulphate ($MnSO_4$) Phenol (C_6H_5OH) Potassium permanganate ($KMnSO_4$) Sodium hydroxide (NaOH) Sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa.3H_2O$) Sodium chloride (NaCl)	Merck, Darmstadt, Germany

ชนิด	บริษัท/ประเทศ
Bovine serum albumin (BSA)	Fluka AG. Buch,
3, 5-Dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$)	Switzerland
D-Salicin ($C_{13}H_{18}O_7$)	
Folin-ciocalteu phenol reagent	
Piperzine	
N,N-Dimethylformamide	
4-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (p-NPG)	
Sodium Carbonate (Na_2CO_3)	
Tween 80	
tri-Sodium citrate dihydrate ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$)	

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อรา *Ganoderma lucidum* ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยมี 5 สายพันธุ์

3.1.1 *Ganoderma lucidum* สายพันธุ์ **KKU1**

3.1.2 *Ganoderma lucidum* สายพันธุ์ **BOT**

3.1.3 *Ganoderma lucidum* สายพันธุ์ **KC3**

3.1.4 *Ganoderma lucidum* สายพันธุ์ **CHEM**

3.1.5 *Ganoderma lucidum* สายพันธุ์ **SP5**

เชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์นี้ ได้รับจากห้องปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์ ชีวมวลพืช (Plant Biomass Utilization Research Unit) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งคัดแยกโดย กมลชัย ชะเอม (2546)

3.2 การศึกษาการผลิตแลคเคส บนอาหารแข็งสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติม 1% (W/V) Gallic acid

3.2.1 เตรียมอาหารแข็งชนิด PDA (ภาคผนวก ก) ที่เติม gallic acid 1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความเป็นกรดด่าง 5.5

3.2.2 เลี้ยงเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ พบอาหารแข็งสูตร PDA ความเป็นกรดด่าง 5.5 เป็นเวลา 5 – 7 วัน ใช้แท่งเจาะที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 เซนติเมตร เจาะเชื้อจากอาหารแข็งบริเวณปลายเส้นใย

3.2.3 วางเชื้อลงบนอาหารแข็งที่เตรียมในข้อ 1 บริเวณตรงกลางจานเพาะเชื้อ

3.2.4 วัดการเจริญเติบโตของเส้นใยเป็นระยะเวลา 7 วันและการเกิดสีรอบๆโคโลนี

3.3 การศึกษาการเจริญของ G. lucidum ที่เจริญบนอาหารแข็งชนิด PDA ที่เติม Anthacene 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ DDT 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดัดแปลงจาก B.R.M. Vyas,และคณะ 1994

3.3.1 เลี้ยงเชื้อ *G. lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์บนอาหารแข็งชนิด PDA ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 เป็นระยะเวลา 5 – 7 วัน ใช้แท่งเจาะที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 เซนติเมตร เจาะเชื้อบริเวณปลายเส้นใย

3.3.2 วางเชื้อที่เจาะออกทาบนอาหารที่เติม Anthacene 5 µg 5 µg DDT 5 µg (ภาคผนวก)บริเวณตรงกลางจานเพาะเชื้อ โดยมีอาหารแข็งชนิดที่เติม *N,N* - Dimethylformamide เป็นชุดควบคุม

3.3.3 วางเชื้อที่เจาะออกทาบนอาหารที่เติม Anthacene 10 µg, DDT 10 µg บริเวณตรงกลางจานเพาะเชื้อ โดยมีอาหารแข็งชนิดที่เติม *N,N* - Dimethylformamide เป็นชุดควบคุม

3.3.4 วัดการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง นำมาเป็นค่าเฉลี่ยโดยวัดทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

3.3.5 นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาคิดค่าทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโต โดยค่าสถิติที่ใช้เป็นชนิด CRD

3.4 การศึกษาการผลิตแลคเคสของเชื้อ G.lucidum ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารสูตร Production

3.4.1 นำเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์มาเลี้ยงบบอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน

3.4.2 ใช้แท่งเจาะที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใย

3.4.3 นำเชื้อที่เจาะได้จำนวน 20 ชิ้นใส่ลงในอาหารเหลวสูตร Production ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.4 นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

3.4.5 เก็บสารละลายเพื่อนำไปวัดแอคติวิตีของแลคเคสเป็นระยะเวลา 7 วัน

3.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *G.lucidum* ในอาหารเหลวสูตร PDB

3.5.1 นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกมาศึกษาลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *G. lucidum* ในอาหารเหลวสูตร PDB

3.5.2.1 นำเชื้อที่ผ่านการคัดแยกได้จากข้อ 3 เลี้ยงบนอาหารแข็งชนิด PDA เป็นระยะเวลา 5 – 7 วัน

3.5.2.2 ใช้แท่งเจาะที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใย

3.5.2.3 นำเชื้อที่เจาะได้จำนวน 20 ชิ้นใส่ลงในอาหารเหลวชนิด PDB (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.5.2.4 นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนด้วยเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 150 รอบต่อนาที

3.5.2.5 นำเชื้อที่เลี้ยงกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1)ที่ผ่านการชั่งวัดน้ำหนักแห้งแล้ว โดยทำเป็นประจำทุกวัน

3.5.2.6 นำเชื้อที่กรองได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน นำไปชั่งน้ำหนักแห้ง

3.5.2.7 นำไปอบ และชั่งน้ำหนักแห้งเป็นประจำทุกวัน จนกว่าน้ำหนักแห้งจะคงที่

3.6 การศึกษาการผลิตแลกเคสของเชื้อ *G.lucidum* ในอาหารเหลวสูตร Production

3.6.1 นำเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 5 – 7 วัน ใช้แท่งเจาะที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใย

3.6.2 นำเชื้อราที่เจาะออกมาเปลี่ยนในอาหารเหลวสูตร PDB เป็นเวลา 4 วัน

3.6.3 ถ่ายเชื้อจากอาหารเหลวสูตร PDB ลงในอาหารสูตร Production (ภาคผนวก ก)

3.6.4 นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 150 รอบต่อนาที

3.6.5 ทำการเก็บน้ำเลี้ยงมาวัดแอคติวิตีของแลคเคสด้วยวิธีของ Wolfenden และ Wilson 1982 โดยนำเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร บ่มรวมกับ 1 มิลิโมลาร์ ABTS ที่ละลายในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 นำไปวัดแอคติวิตีในเวลา 1 นาที ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร (ค่า ε ที่ 436 นาโนเมตรของ ABTS เท่ากับ 29300 โมลาร์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) ติดต่อกันทุกวัน เป็นระยะเวลา 7 วัน นำน้ำเลี้ยงที่เก็บมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry และคณะ 1951

3.7 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ Cu^{2+} ต่อการผลิตแลคเคส

3.7.1 นำเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร PDB เป็นระยะเวลา 5 – 7 วัน ใช้แท่งเจาะที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใย

3.7.2 นำเชื้อราที่เจาะออกมาเปลี่ยนในอาหารเหลวสูตร PDB เป็นระยะเวลา 4 วัน

3.7.3 นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 150 รอบต่อนาที

3.7.4 เปลี่ยนถ่ายเชื้อจากอาหารเหลวสูตร PDB ลงในอาหารสูตร Production

3.7.5 ทำการเก็บน้ำเลี้ยงมาวัดปริมาณแลคเคสทุกวันเป็นระยะเวลา 2 วัน

3.7.6 เมื่อเก็บน้ำเลี้ยงในวันที่ 2 ทำการเติม Cu^{2+} ลงในอาหารให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลิโมลาร์เก็บน้ำเลี้ยงเพื่อทำการวัดแอคติวิตีของแลคเคส และวัดปริมาณโปรตีน ต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน

3.8 การศึกษาผลของการเติมตัวช่วยยึดเกาะต่อการผลิตแลคเคส

3.8.1 นำเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร PDB เป็นระยะเวลา 5-7 วัน ใช้แท่งเจาะที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใย

3.8.2 นำเชื้อราที่เจาะออกมาเปลี่ยนในอาหารเหลวสูตร PDB เป็นระยะเวลา 4 วัน

3.8.3 เปลี่ยนถ่ายเชื้อจากอาหารเหลวสูตร PDB ลงในอาหารสูตร productionที่เติมฟองน้ำเป็นตัวช่วยในการยึดเกาะของเชื้อราที่มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 50 ชิ้นต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

3.8.4 ทำการเก็บน้ำเลี้ยงมาวัดปริมาณแลคเคสทุกวันเป็นระยะเวลา 2 วัน

3.8.5 เมื่อเก็บน้ำเลี้ยงในวันที่ 2 แล้วทำการเติม Cu^{2+} ลงในอาหารให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแลคเคสตามผลการทดลองในข้อ 3.7

3.8.6 เก็บน้ำเลี้ยงเพื่อทำการวัดแอคติวิตีของแลคเคส และวัดปริมาณโปรตีน ต่อเป็นระยะเวลา 5 วัน

3.9 การผลิตเอนไซม์ในปริมาณ 3 ลิตร

3.9.1 ทำการผลิตเอนไซม์ โดยนำเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร PDA วางทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 5 – 7 วัน

3.9.2 ใช้แท่งเจาะที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใย ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร PDB จำนวน 20 ชิ้นต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 4 วัน

3.9.3 ย้ายลงบนอาหารเหลวสูตร Production ที่เติมตัวช่วยในการยึดเกาะที่เป็นฟองน้ำขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรจำนวน 50 ชิ้นหลังจากวันที่ 2 จากการย้ายเชื้อลงในอาหารสูตร Production ทำการเติม Cu^{2+} ให้มีความความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแลคเคส เลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 2 วัน

3.9.4 นำน้ำเลี้ยงทั้งหมดกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) เก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.10 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเครื่องอัลตราฟิลเตชัน

3.10.1 นำเอนไซม์ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) วัดปริมาตรของน้ำเลี้ยงที่ผ่านการกรอง

3.10.2 นำเอนไซม์กรองผ่านด้วยเครื่องอัลตราฟิวตชั่น Viva flow 25 ที่ membreane cut of 10,000 Da ที่ภายใต้ความดันของก๊าซไนโตรเจน 2 บาร์ นำมาวัดปริมาตรของน้ำเลี้ยงที่ผ่านการกรอง

3.10.3 นำน้ำเลี้ยงที่ผ่านการกรองมาวัดแอคติวิตีของแลคเคสด้วยวิธีของ Wolfenden และ Wilson (1982) พร้อมทั้งวัดโปรตีนด้วยวิธี Lowry

3.11 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation)

3.11.1 นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการกรองด้วยเครื่องอัลตราฟิลเตชัน มาวัดปริมาตรเพื่อคำนวณหาการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

3.11.2 นำแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด ค่อย ๆ เติมลงในสารละลายเอนไซม์ พร้อมทั้งปั่นกวนเบา ๆ โดยให้มีความเข้มข้นเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ในครั้งแรก ทิ้งไว้ให้สารละลายอิ่มตัว เป็นเวลา 2 – 4 ชั่วโมง

3.11.3 นำสารละลายไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที

3.11.4 แยกตะกอนออกจากสารละลาย นำสารละลายที่ได้มาเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตให้เป็น 40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80 และ 81-100 เปอร์เซ็นต์

3.11.5 นำตะกอนที่ได้ในแต่ละส่วน มาเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ปริมาณ 50 มิลลิโมลาร์ ใส่ลงในถุงไดอะไลซิส (ภาคผนวก) ทำการไดอะไลซิสข้ามคืนด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์

3.11.6 วัดปริมาตรสุดท้ายหลังจากไดอะไลซิส นำสารละลายเอนไซม์มาวัดแอคติวิตีของเลคเคส พร้อมทั้งวัดปริมาณโปรตีน

3.12 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน โดยแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี

การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน โดยแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี นำเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมมิเนียมซัลเฟต มากรองด้วยเมมเบรนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการคัดกรองเท่ากับ 45 ไมโครเมตร

นำเอนไซม์ที่กรองแล้วมาผ่านคอลัมน์ HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow โดยปรับอัตราการไหลของสารละลายเป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้สารละลาย ไพพาราซีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เก็บสารละลายที่ได้เป็นลำดับส่วน ๆ ละ 3 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เก็บ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนไม่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรที่แสดงว่าไม่มีโปรตีนออกมาจากคอลัมน์แล้ว จึงเริ่มชะด้วยเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0 – 1 โมลาร์ นำลำดับส่วนหลังจากที่เริ่มชะด้วยเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ทำการวัดแอคติวิตีของแลคเคสและวัดปริมาณของโปรตีน

3.13 การศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคส

นำเอนไซม์ที่ผ่านการไดอะไลซิสจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียม-ซัลเฟต มาวัดแอคติวิตีของแลคเคสด้วยวิธีของ Wolfenden และ Wilson 1982 โดยเปลี่ยนชนิดของบัฟเฟอร์ ดังนี้

โซเดียมซิเตตบัฟเฟอร์ ควาเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 3, 4, 5 และ 6

โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ควาเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4, 4.5 และ 5

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ควาเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 6, 7 และ 8

ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ควาเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8 และ 9

3.14 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคส

นำโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ มาบ่มโดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิของบัฟเฟอร์คงที่ ทำการวัดแอคติวิตีของแลคเคสด้วยวิธีของ Wolfenden และ Wilson 1982 โดยทำซ้ำ 5 ครั้ง'

3.15 การศึกษาย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทางชีวภาพของแลคเคส

นำแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยวิธีแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี มาบ่มรวมกับ PAHs (16 U.S. EPA ดังตารางที่ 2) โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 อัตราส่วนของส่วนผสมที่ใช้บ่มร่วมกันในการศึกษาการทำปฏิกิริยากับ PAHs

	20 ppm total PAHs (EAP priority pollutant)	0.1 Na-Acetate-buffer pH=4.5	enzyme
control	20	480	0
laccase	20	100	330

เมื่อนำส่วนผสมทั้งหมดใส่ร่วมกันแล้ว จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน หยุดปฏิกิริยาด้วย Acetronitrile ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบปริมาณด้วยเครื่อง HPLC

3.16 การตรวจสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของแลคเคสด้วยเครื่อง HPLC

นำสารละลายที่ผ่านการบ่มเพื่อย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในข้อ 3.13 มาตรวจสอบการทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง HPLC (Varian รุ่น Prostar) ที่ใช้คอลัมชนิด C 18 Reversephase (chrome spher) ความยาว 250 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร โดยใช้ตัวตรวจวัดแบบ UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และต่อตัวตรวจสอบการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 190 ถึง 375 นาโนเมตร การชะนาทีที่ 0 ถึง 20 ใช้ อะซีโตไนไตรกับน้ำในอัตราส่วน 50 ต่อ 50 เปอร์เซนต์ นาทีที่ 20 ถึง 30 ใช้ อะซีโตไนไตรกับน้ำในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 เปอร์เซนต์ และนาทีที่ 30 เป็นต้นไปใช้อะซีโตไนไตรกับน้ำในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 เปอร์เซนต์ โดยปรับให้มีอัตราการชะเท่า 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที