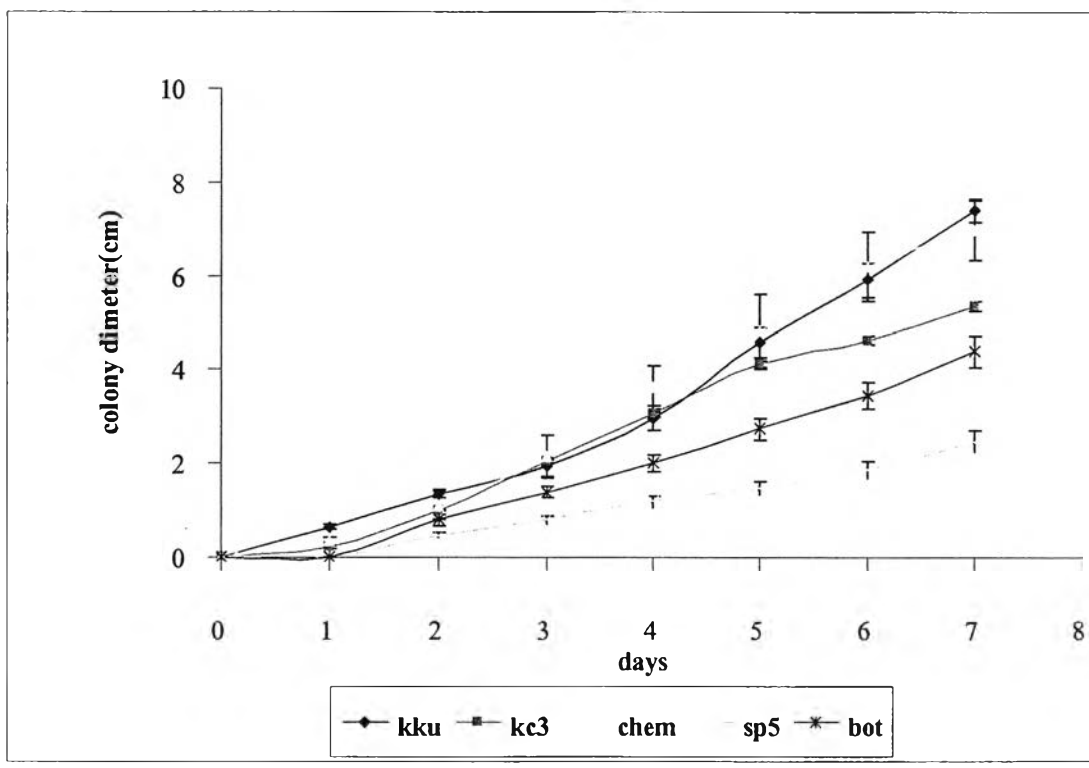
บทที่ 4

ผลการทดลอง

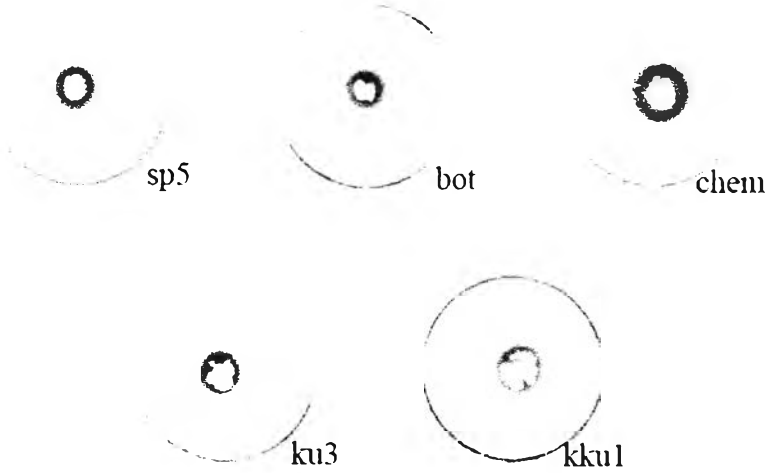
4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของ *G.lucidum* บนอาหารแข็งสูตร PDA ที่เติม Gallic acid 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* บนอาหารแข็งสูตร PDA ที่เติม Gallic acid 1 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า เชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ KKU1 มีการเจริญเติบโตบนอาหารแข็งได้ดีที่สุดโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในวันที่ 7 เท่ากับ 7.39 เซนติเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับสายพันธุ์ CHEM คือ มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6.98 เซนติเมตร รองลงมาเป็นสายพันธุ์ KC3, BOT และ SP5 มีเส้นผ่านศูนย์กลางในวันที่ 7 เท่ากับ 5.36, 4.39 และ2.48 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 13ภาพที่



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารสูตร PDA ที่เติม Gallic acid 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร

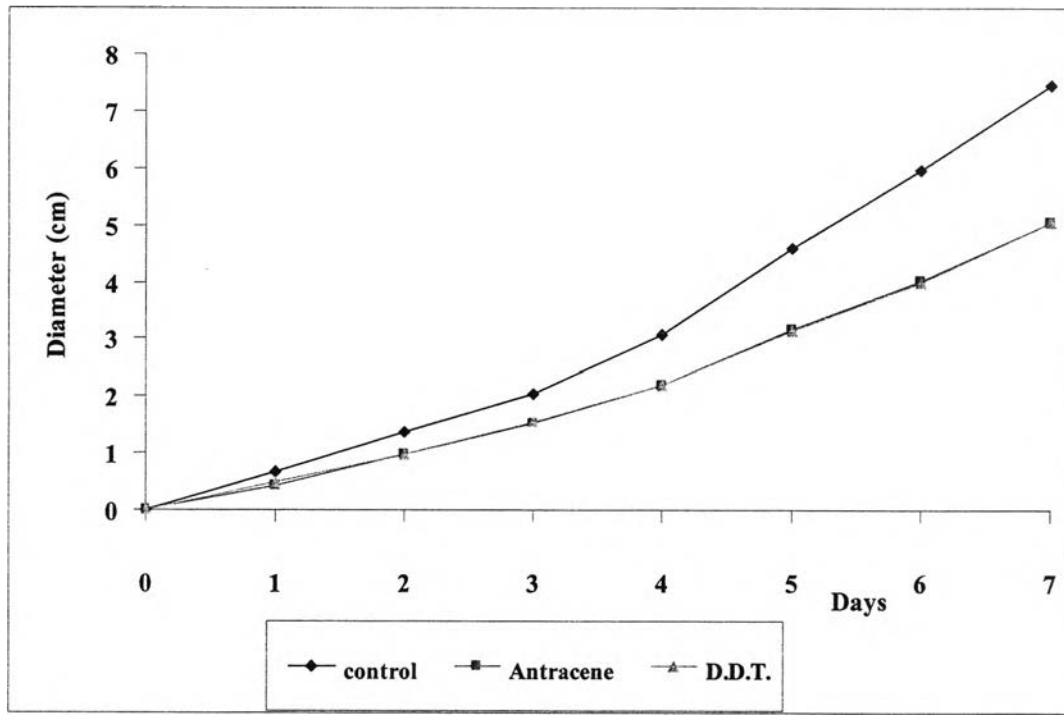
การตรวจสอบการเกิดสีรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อรา *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่ารอบ ๆ โคโลนีของเส้นใยเชื้อรามีสีน้ำตาลเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อรามีการผลิตแลคเคส ดังภาพที่ 14ภาพที่



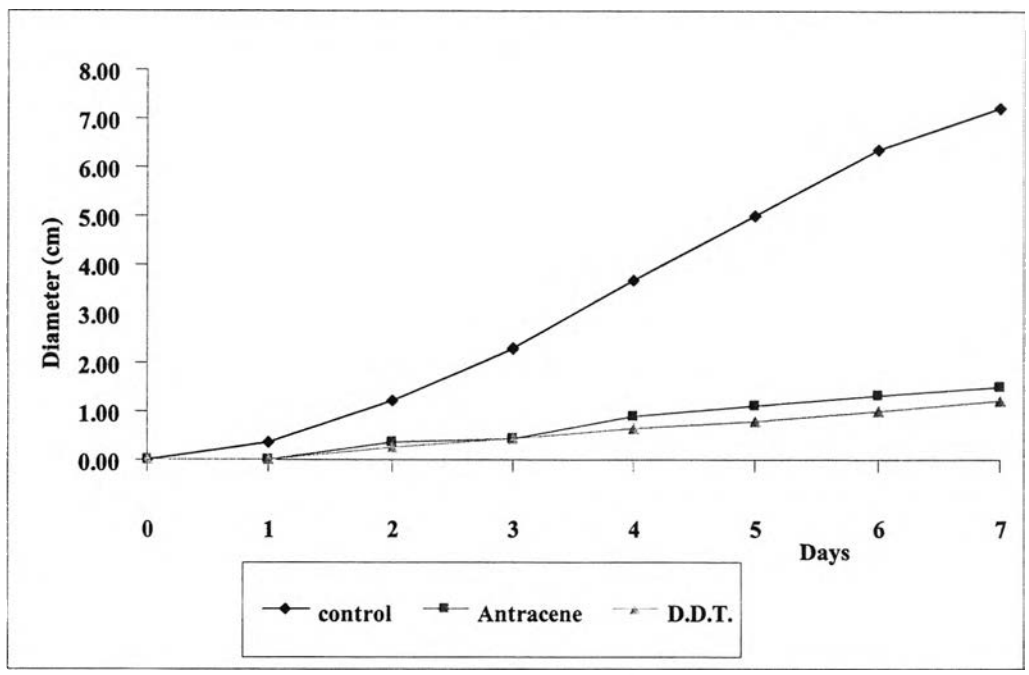
ภาพที่ 14 การเกิดวงสีน้ำตาลรอบโคโลนีของเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ บนอาหารสูตร PDA ที่เติม Gallic acid 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร

4.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของ *G.lucidum* ที่เจริญบนอาหารแข็งชนิด PDA ที่เติม anthracene 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ DDT 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

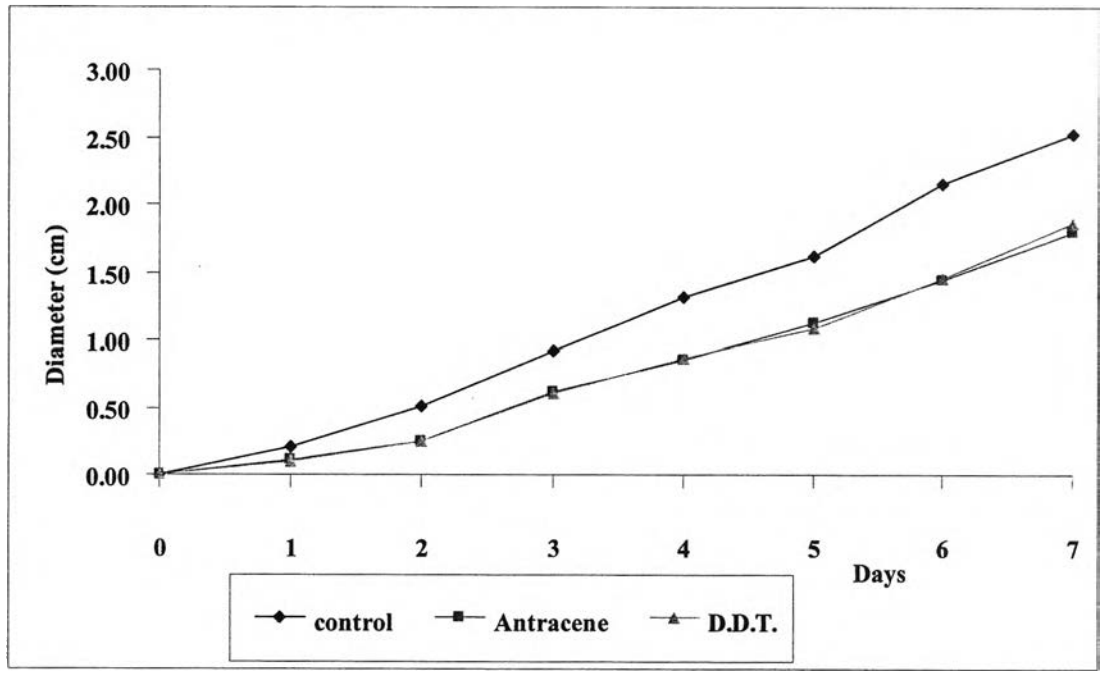
การศึกษาการเจริญเติบโตของ *G.lucidum* ที่เจริญบนอาหารแข็งชนิด PDA ที่เติม anthracene 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ DDT 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อราทำได้โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา พบว่า เชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารที่เติม anthracene หรือ DDT ซึ่งจะแตกต่างจากอาหารชุดควบคุมที่ไม่เติม anthracene หรือ DDT 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 15 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ KKU1 ภาพที่ 16 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ BOT ภาพที่ 17 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ KC3 ภาพที่ 18 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM ภาพที่ 19 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ SP5



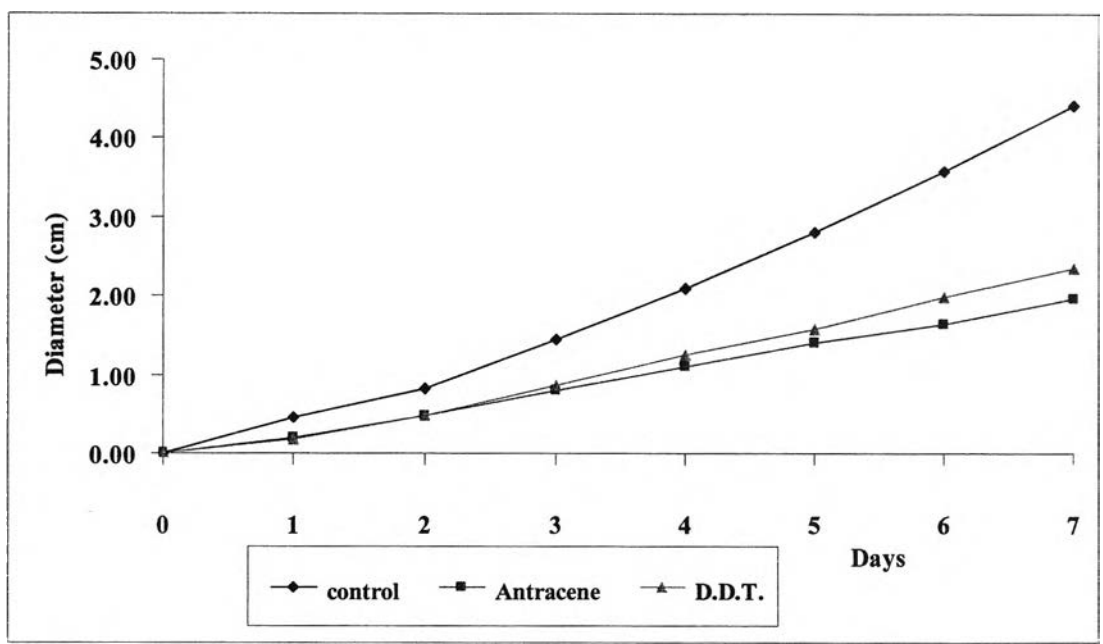
ภาพที่ 15 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ KKU1 บนอาหารสูตร PDA ที่มีการเติม anthracene หรือ DDT ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม



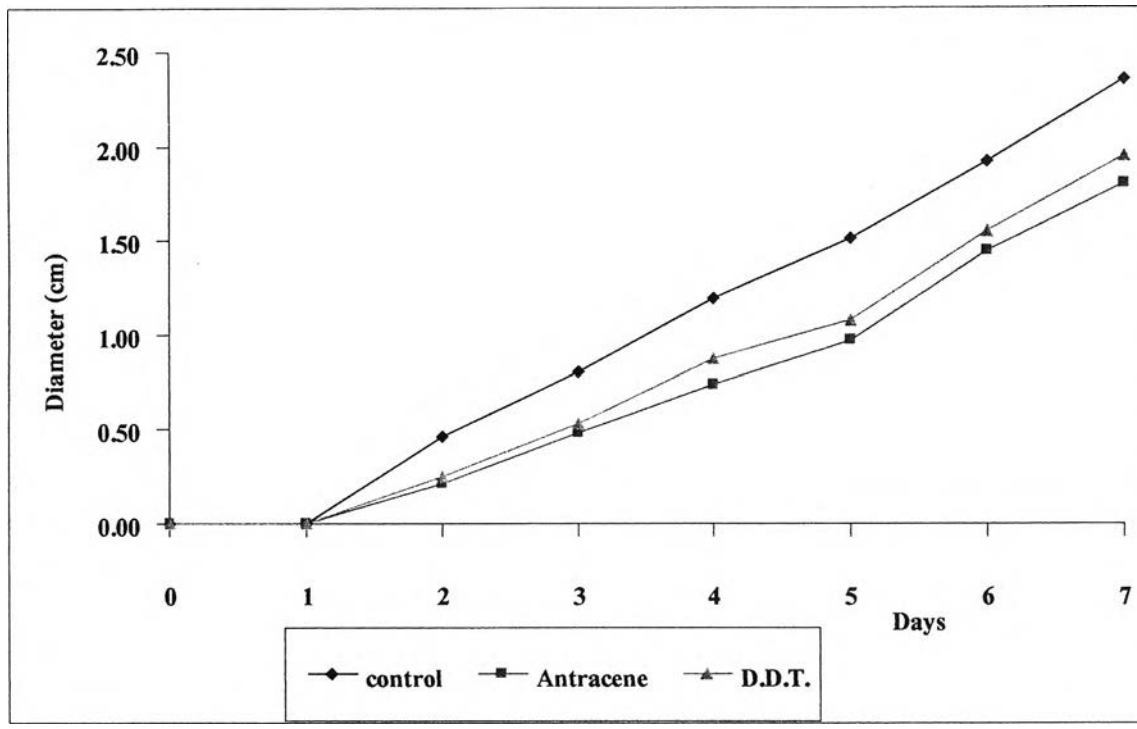
ภาพที่ 16 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ BOT บนอาหารสูตร PDA ที่มีการเติม anthracene หรือ DDT ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม



ภาพที่ 17 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ KC3 บนอาหารสูตร PDA ที่มีการเติม anthracene หรือ DDT ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม



ภาพที่ 18 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM บนอาหารสูตร PDA ที่มีการเติม anthracene หรือ DDT ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม



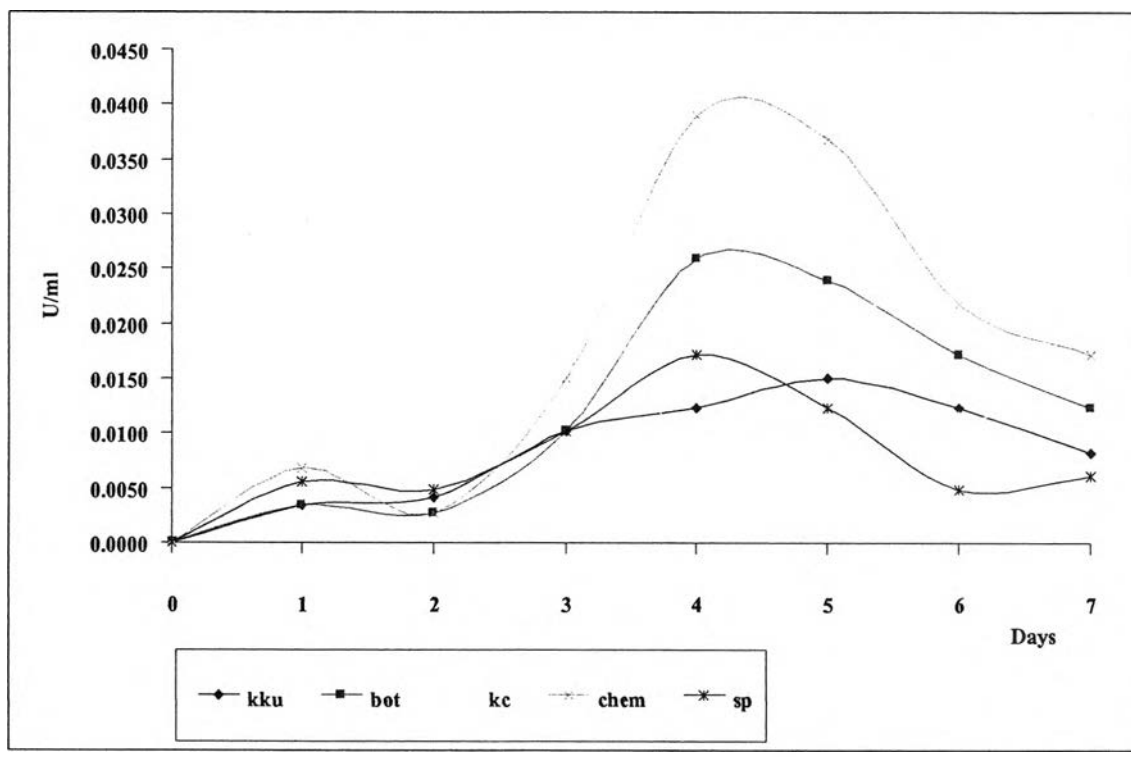
ภาพที่ 19 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ SP5 บนอาหารสูตร PDA ที่มีการเติม anthracene หรือ DDT ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

4.3 การศึกษาการผลิตแลคเคสของเชื้อรา *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารสูตร Production

การศึกษาการผลิตแลคเคสของเชื้อรา *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารสูตร Production ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 พบว่า เชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM มีการผลิตแลคเคสมากที่สุดในวันที่ 4 และวันที่ 5 เท่ากับ 0.0389 และ 0.0369 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 14 เชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ KKU1 พบว่า เชื้อรามีการผลิตแลคเคสมากที่สุดในวันที่ 5 เท่า 0.0150 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นวันที่ 4 และวันที่ 6 มีแอคติวิตีเท่ากันคือ 0.0123 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ BOT พบว่า มีแอคติวิตีมากที่สุดในวันที่ 4 เท่ากับ 0.0259 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือวันที่ 5 เท่ากับ 0.0239 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ KC3 พบว่า มีแอคติวิตีมากที่สุดในวันที่ 3 เท่ากับ 0.0164 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือวันที่ 2 เท่ากับ 0.0123 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเชื้อราตัวสุดท้ายคือเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ SP5 พบว่า มีแอคติวิตีมากที่สุดในวันที่ 4 เท่ากับ 0.0170 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือวันที่ 5 เท่ากับ 0.0123 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 14 แอคติวิตีของแลคเคสของเชื้อรา *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ตั้งแต่วันที่ 1-7

G.lucidum สายพันธุ์	แอคติวิตีของแลคเคส (U/ml)						
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
KKU1	0.0034	0.0041	0.0102	0.0123	0.0150	0.0123	0.0082
BOT	0.0034	0.0027	0.0102	0.0259	0.0239	0.0171	0.0123
KC3	0.0061	0.0123	0.0164	0.0102	0.0096	0.0116	0.0102
CHEM	0.0068	0.0027	0.0150	0.0389	0.0369	0.0218	0.0171
SP5	0.0055	0.0048	0.0102	0.0170	0.0123	0.0048	0.0061

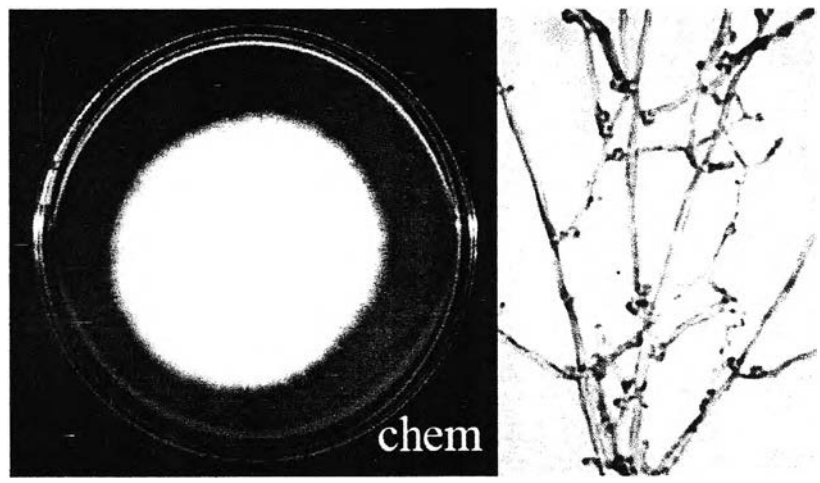


ภาพที่ 20 แอคติวิตีของแลคเคสของเชื้อรา *G.lucidum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ตั้งแต่วันที่ 1-7

จากภาพที่ 20 จะเห็นได้ว่าเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM มีการแอคติวิตีของแลคเคสมากกว่าเชื้อราในสายพันธุ์อื่น ๆ คือ 0.0389 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 รองลงมาเป็นเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ BOT ที่มีแอคติวิตีของแลคเคสเท่ากับ 0.0259 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จึงเลือกเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM นำมาทำการทดลองในขั้นต่อไป

4.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *G.lucidum* ในอาหารเหลวชนิด PDB

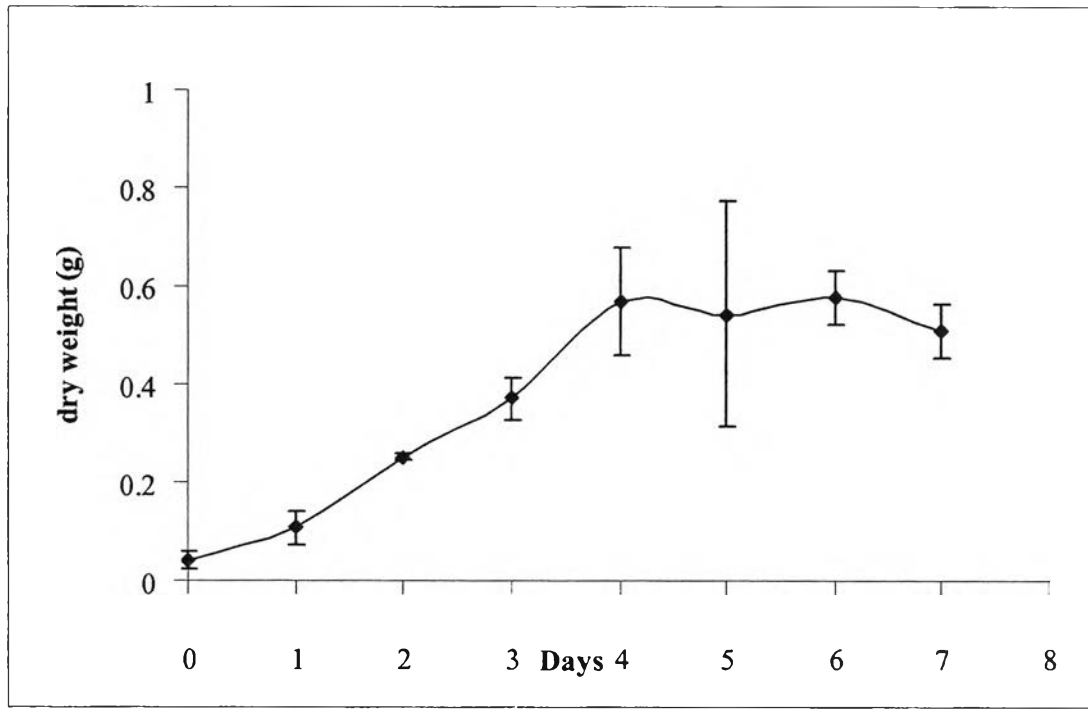
4.4.1. นำเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือก มาทำการศึกษาลักษณะของเส้นใยบนอาหารแข็งสูตร PDA เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 การเจริญเติบโตบนอาหารแข็งสูตร PDA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหารแข็งสูตร PDA จะเห็นได้ว่าโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว และมีระบบเส้นใยแบบ trimitic

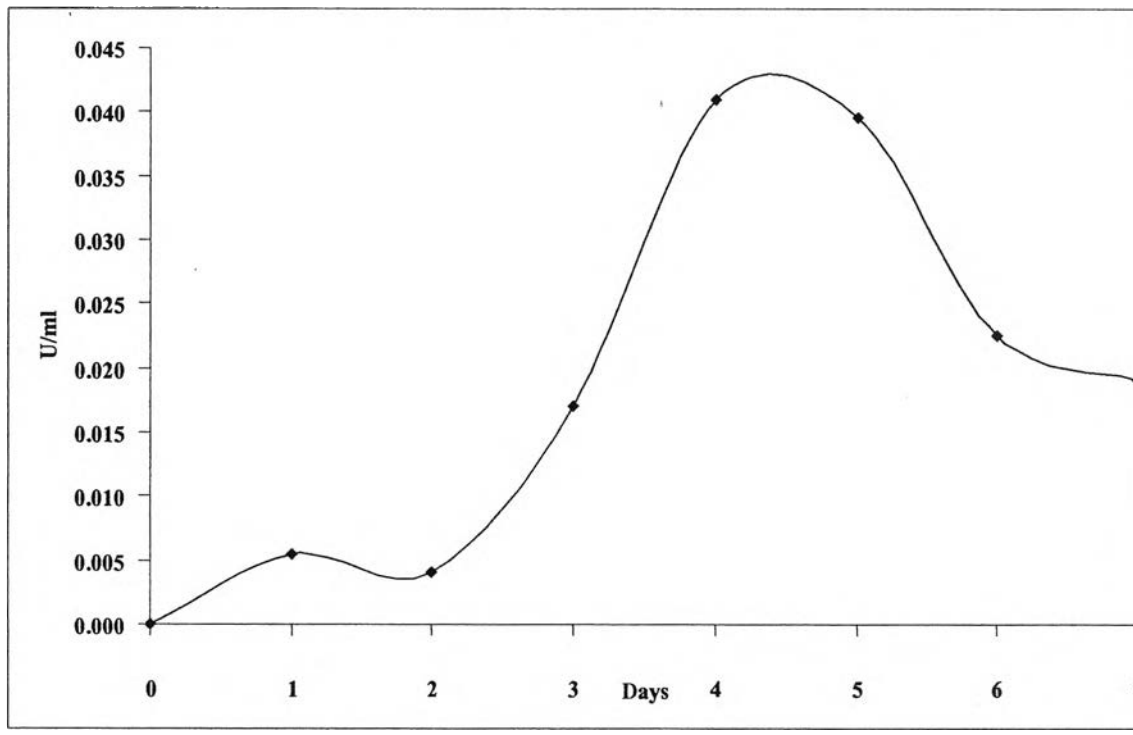
4.4.2. นำเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM ที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธีการวัดการเจริญเติบโตบนอาหารแข็งชนิด PDA ที่เติม anthracene หรือ DDT มาทำการทดลองต่อ โดยศึกษาการเจริญเติบโตในอาหารเหลวชนิด PDB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 นำไปเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที พบว่าตั้งแต่เริ่มถ่ายเชื้อราลงในอาหารเหลวสูตร PDB จนถึงวันที่ 1 เป็นช่วงที่เชื้อราทำการปรับตัว ส่วนในวันที่ 2-4 เป็นช่วงที่เชื้อรามีการเจริญเติบโต โดยดูจากน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้น และหลังจากวันที่ 4 เชื้อราเริ่มมีความคงที่ของน้ำหนักแห้งของเชื้อ *G.lucidum* แสดงให้เห็นว่าเชื้อรามีการเข้าสู่สภาวะคงที่ ดังภาพที่ 22 ภาพที่



ภาพที่ 22 น้ำหนักแห้งของเชื้อ *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM ในอาหารเหลวสูตร PDB ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7

4.5 การศึกษาการผลิตแลกเคสของเชื้อ *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM ในอาหารเหลวสูตร Production medium

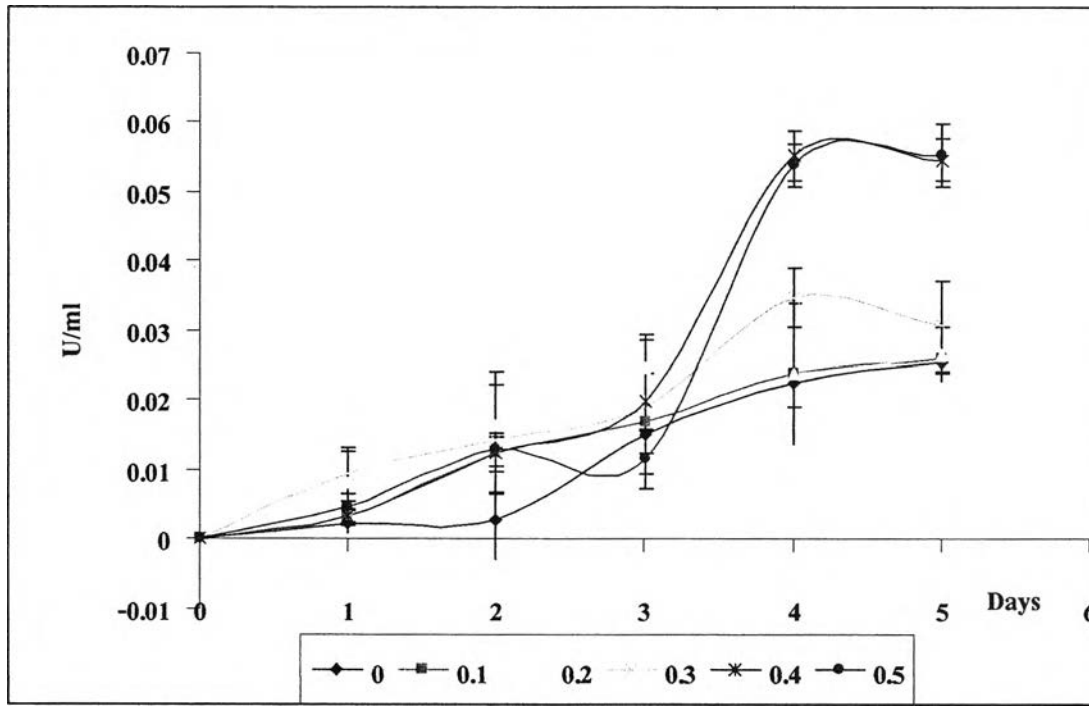
การศึกษาการผลิตแลกเคสของเชื้อ *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM ในอาหารเหลวสูตร Production ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำไปเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที พบว่า ในวันที่ 1 และ 2 เชื้อรามีการผลิตแลคเคส โดยวัดค่าแอคติวิตีของแลคเคสที่ได้ เท่ากับ 0.0005 และ 0.0004 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 23 วันที่ 3 มีการผลิตแลคเคสเพิ่มมากขึ้นเป็น 0.0016 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มมากขึ้นจากวันแรกที่ทำการวัดได้ วันที่ 4 เป็นวันที่มีการผลิตแลคเคสมากที่สุดเท่ากับ 0.0039 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับวันที่ 5 คือ 0.0038 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยหลังจากวันที่ 5 แล้ว พบว่า มีการผลิตแลคเคสลดลง คือ มีค่าเท่ากับ 0.0021 และ 0.0018 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ



ภาพที่ 23 การผลิตแลคเคสของเชื้อรา *G.lucidum* สายพันธุ์ CHEM ในอาหารสูตร Production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7

4.6 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ Cu^{2+} ต่อการผลิตแลคเคสของเชื้อ *G.lucidum*

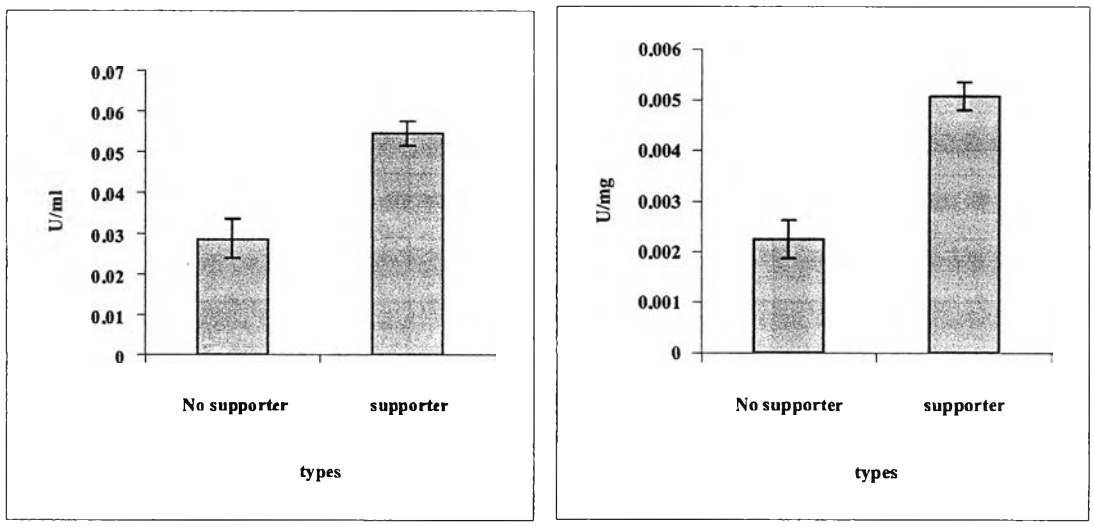
การศึกษาผลของการเติม Cu^{2+} ต่อการผลิตแลคเคส พบว่า ในอาหารสูตร Production มีการผลิตแลคเคสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเข้มข้นของ Cu^{2+} 0.4 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 4 และวันที่ 5 ดังภาพที่ 24 ส่วนที่ความเข้มข้นของ Cu^{2+} ที่ 0.1 0.2 และ0.3 มิลลิโมลาร์ มีการผลิตแลคเคสเพิ่มขึ้นจากอาหารสูตร Production ที่ไม่มีการเติม Cu^{2+} และมีการผลิตแลคเคสน้อยกว่าที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 24 ค่าแอคติวิตีของแลคเคสที่แปรผันกับความเข้มข้นของ Cu^{2+} ที่ 0.1 ถึง 0.5 มิลลิโมลาร์

4.7 การศึกษาผลของการเติมตัวช่วยยึดเกาะต่อการผลิตแลคเคส

การศึกษาผลของตัวช่วยยึดเกาะต่อการผลิตแลคเคส พบว่า การเติมตัวช่วยยึดเกาะที่เป็นฟองน้ำจำนวน 50 ชิ้น ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรในอาหารสูตร Production ที่มีการเติม Cu^{2+} ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ พบว่า มีการผลิตแลคเคสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ คือ มีค่าแอคติวิตีของแลคเคสที่ 0.05461 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือ ที่ 0.00507 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังภาพที่ 25 โดยในอาหารสูตร Production ที่เติม Cu^{2+} ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ ที่ไม่ได้เติมตัวช่วยยึดเกาะจะมีค่าแอคติวิตีของแลคเคสที่ 0.02867 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือที่ 0.00224 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน



ภาพที่ 25 แอคติวิตีของแลคเคสในอาหารที่เติมตัวช่วยยึดเกาะและไม่เติมตัวช่วยยึดเกาะ

4.8 การผลิตเอนไซม์ในปริมาณ 3 ลิตร และการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน โดยการใช้เครื่องอัลตราฟิลเตชัน

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้ มาคั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง และนำมากรองด้วยซ้ำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของแลคเคสได้เท่ากับ 0.070 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือ ที่ 0.007 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังตารางที่ 15 วัดปริมาตรของสารละลายทั้งหมดได้เท่ากับ 2,500 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์เข้าเครื่องอัลตราฟิลเตชัน เมื่อผ่านการอัลตราฟิลเตชัน ปริมาตรของสารละลายที่ได้ลดลงเหลือเพียง 500 มิลลิลิตร นำมาวัดแอคติวิตีได้เท่ากับ 0.220 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือที่ 0.019 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยสารละลายเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นเป็น 2.675 เท่า

ตารางที่ 15 ปริมาตรและแอคติวิตีของแลคเคสก่อนและหลังการอัลตราฟิลเตชัน

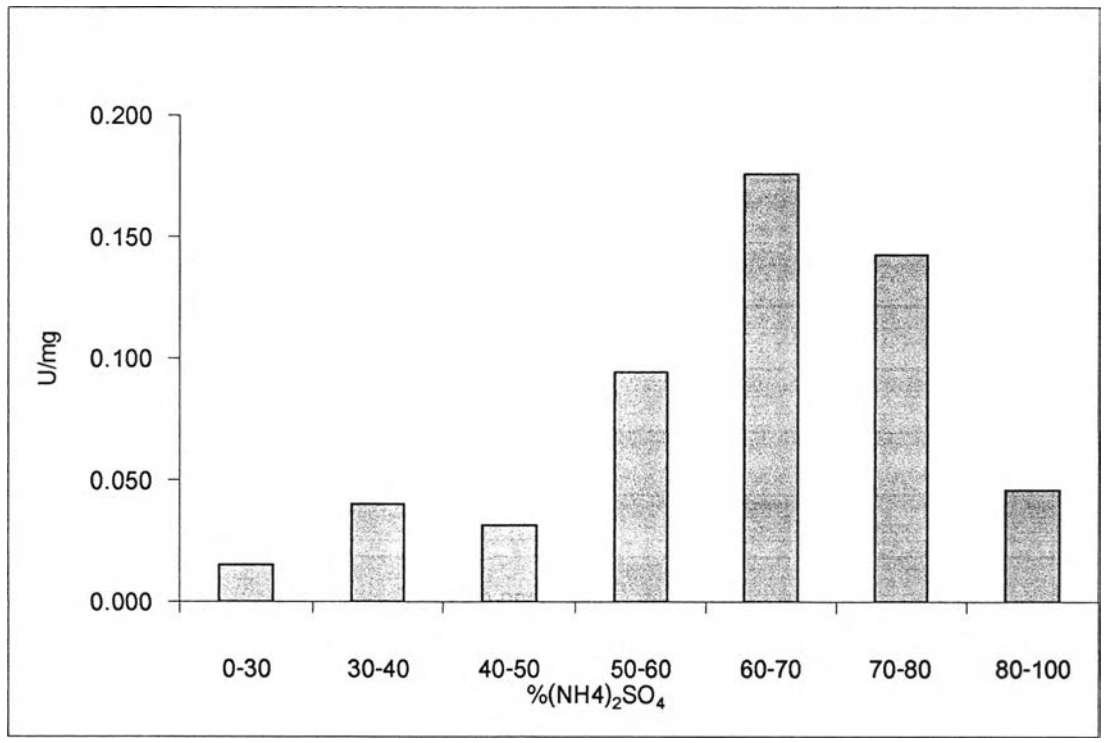
Enzyme	U/ml	U/mg protein	Protein (mg/ml)	Total volume (ml)
Crude	0.0696252	0.007	10.001	2,500
Ultrafiltration	0.2197972	0.019	11.739	500

4.9 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation)

จากการทำให้ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0 – 30 30 – 40 40 – 50 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า มีแอคติวิตีของเลคเคสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น คือ เท่ากับ 0.040 0.045 และ 0.035 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังตารางที่ 16 ตามลำดับ มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 0.378 0.891 และ 0.905 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อช่วงเปอร์เซนต์แอมโมเนียมซัลเฟตอยู่ที่ 50 – 60 เปอร์เซนต์ พบว่ามีแอคติวิตีของแลคเคสเพิ่มขึ้นเป็น 0.052 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.803 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อช่วงการตกตะกอนอยู่ที่ 60 – 70 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า มีแอคติวิตีของแลคเคสเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.115 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.532 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่ 70 – 80 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมซัลเฟต มีแอคติวิตีของแลคเคส เท่ากับ 0.118 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ปริมาณของโปรตีน เท่ากับ 1.212 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในช่วงเปอร์เซนต์แอมโมเนียมซัลเฟตอยู่ที่ 80 – 100 เปอร์เซนต์ พบว่า แอคติวิตีของแลคเคสลดลง เท่ากับ0.036 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ปริมาณของโปรตีนเท่ากับ 1.256 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงรวมสารละลายเอนไซม์ ที่อยู่ในช่วง 50 – 80 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของแลคเคสอีกครั้ง ได้เท่ากับ 0.091 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีปริมาณโปรตีน 1.511 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 26

ตารางที่ 16 ขั้นตอนการทำแลคเคสให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอน

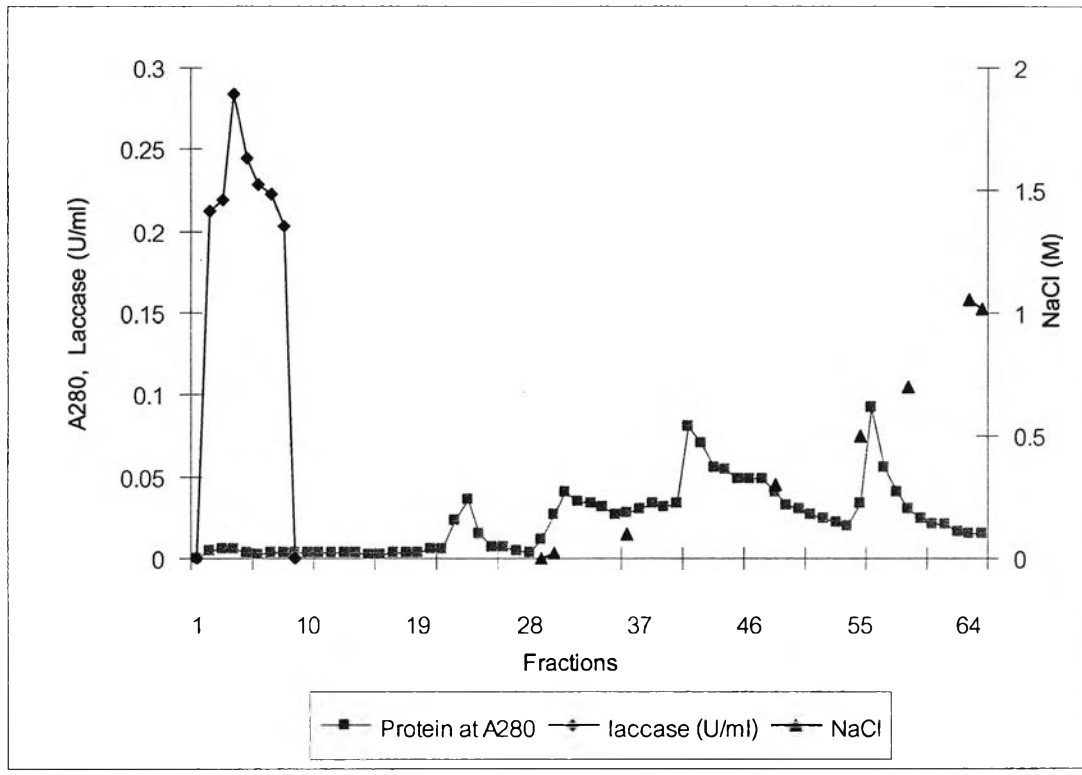
$\%(NH4)_2SO_4$ ที่ใช้	Total activity (U)	Total protein (mg)	U/ml	U/mg	%activity
Crude ที่ผ่าน ultrafiltration	109.899	5866.500	0.220	0.019	100
0-30	0.601	15.110	0.015	0.040	0.547
30-40	1.611	35.638	0.040	0.045	1.466
40-50	1.256	36.208	0.031	0.035	1.143
50-60	3.768	72.131	0.094	0.052	3.429
60-70	7.044	61.297	0.176	0.115	6.410
70-80	5.707	48.468	0.143	0.118	5.193
80-100	1.829	60.442	0.046	0.030	1.665



ภาพที่ 26 แอคติวิตีของแลคเคสที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีน ตั้งแต่ 0 – 100 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมซัลเฟต

4.10 การทำให้บริสุทธิ์ด้วยแอนไอออนเอกซ์เชนจ์ โครมาโทกราฟี

นำโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นที่ 50-80 เปอร์เซนต์ ผ่านคอลัมน์ HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow ซึ่งเป็นตัวกลางการแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange) โดยใช้สารละลาย Piperazine-HCl ความเข้มข้น0.02 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เป็นตัวชะโปรตีน พบว่า มีโปรตีนถูกชะออกมา 1 พีค ดังภาพที่ 27 ซึ่งพีคนี้โปรตีนจะไม่จับกับคอลัมน์ จึงถูกชะออกมาก่อน (หลอดที่ 21-25) นำมาวัดแอคติวิตีของแลคเคสแต่ไม่พบแอคติวิตี จากนั้น เริ่มทำการชะด้วยเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ 0-1.0 โมลาร์ พบว่า มีพีคออกมาทั้งหมด 3 พีค ได้แก่ พีคที่ 2 หลอดทดลองที่ 29-35 พีคที่ 3 หลอดทดลองที่ 41-48 พีคที่ 4 หลอดทดลองที่ 55-62 แล้วนำแต่ละพีคมาวัดแอคติวิตีของแลคเคสพบว่าพีคที่ 2 เท่านั้นที่มีแอคติวิตีของแลคเคสเท่ากับ 0.231 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 0.144 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังตารางที่ 17



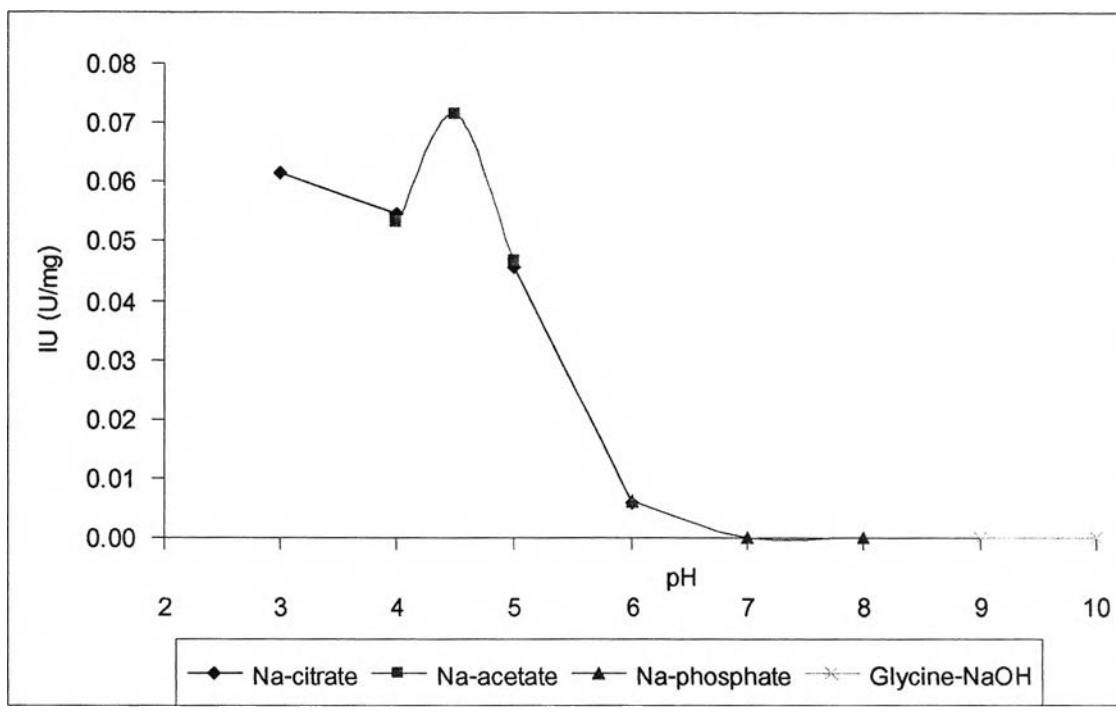
ภาพที่ 27 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แอคติวิตีของแลคเคส และปริมาณของเกลือโซเดียมคลอไรด์

ตารางที่ 17 ขั้นตอนการทำแลคเคสให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์	volumn (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	U/ml	U/mg	%activity	Purification fold
Crude enzyme	2500	174.063	25003.000	0.070	0.007	100	1
Ultrafiltration	500	109.899	5869.565	0.220	0.019	63.137	2.675
50-80% (NH4)2SO4	120	16.560	194.155	0.138	0.085	9.514	12.185
Ion-exchange	21	4.851	33.678	0.231	0.144	2.787	20.574

4.11 การศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคส

จากการศึกษาความเป็นกรดเป็นด่างตั้งแต่ที่ 3-7 เพื่อหาความเหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคส โดยใช้โซเดียมซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นด่างที่ 3 4 5 และ6 พบว่า ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3 เป็นค่าที่แลคเคสทำงานได้ดีที่สุดในบัฟเฟอร์ชนิดนี้ ซึ่งมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.062 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังภาพที่ 28 รองลงมาเป็นค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ4, 5 และ6 ตามลำดับซึ่งมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.054, 0.046 และ 0.006 ตามลำดับ ในบัฟเฟอร์ชนิดโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4 4.5 และ 5 โดยที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 เป็นค่าที่แลคเคสมีแอคติวิตีดีที่สุดในบัฟเฟอร์ชนิดนี้มีค่าเท่ากับ 0.071 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาเป็นค่าความเป็นกรดด่างที่ 4 และ5 โดยมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.053 และ 0.047 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ในบัฟเฟอร์ชนิดโซเดียมฟอตเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6, 7 และ8 มีค่าความเป็นกรดด่างเพียงค่าเดียวเท่านั้นที่มีแอคติวิตี คือที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 โดยมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.006 ในบัฟเฟอร์ชนิดสุดท้ายคือไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่คาความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9 และ10 ไม่มีแอคติวิตีเลย

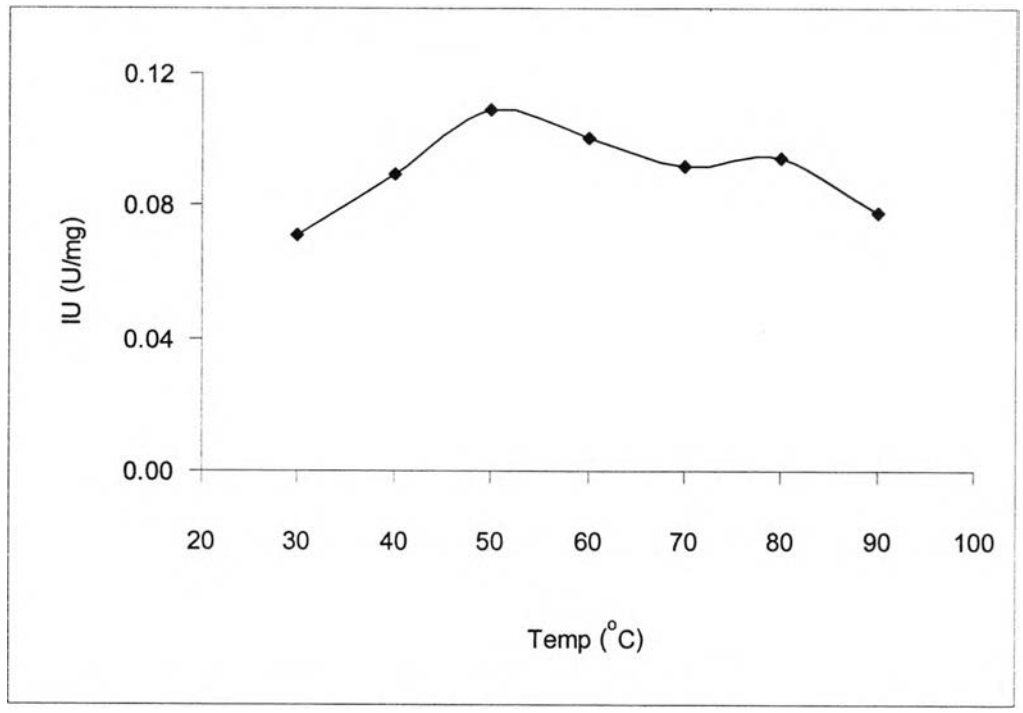


ภาพที่ 28 แอคติวิตีของแลคเคสเมื่อแปรผันกับชนิดของบัฟเฟอร์ และค่าความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ที่ 3-7

จากการศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคส พบว่า บัฟเฟอร์ชนิดโซเดียมอะซิเตต ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 พบว่า มีค่าแอคติวีตีเท่ากับ 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

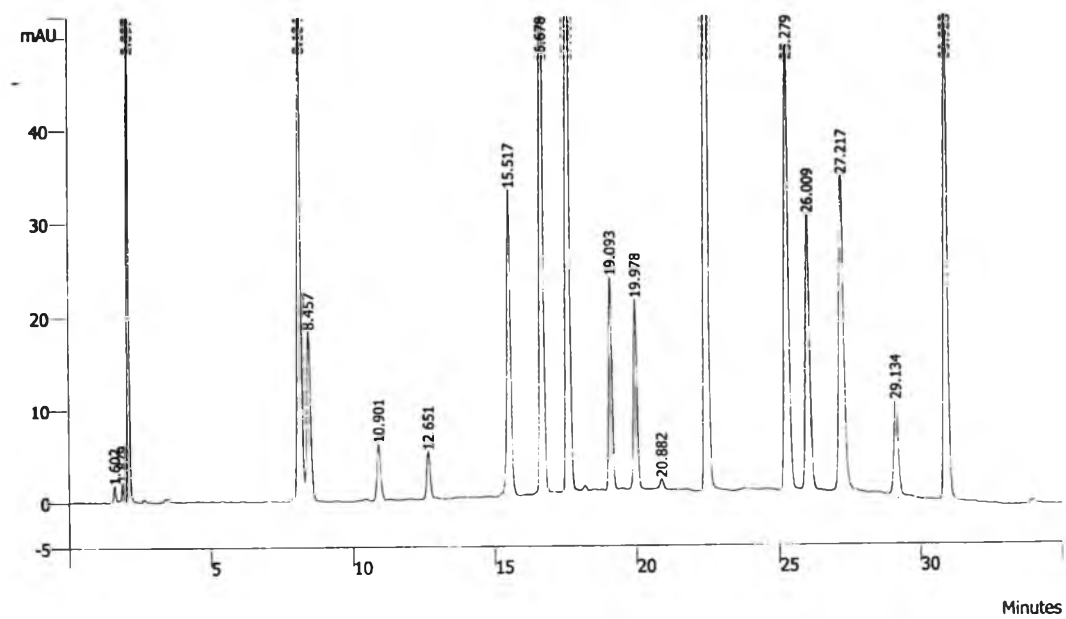
4.12 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแลคเคส

เมื่อนำแลคเคสบ่มร่วมกับบัฟเฟอร์ชนิดโซเดียมอะซิแตต ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีของแลคเคสเท่ากับ 0.1154 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 0.071 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีของแลคเคส เท่ากับ 0.1477 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 0.089 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีของแลคเคสดีที่สุด 0.1768 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 0.109 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีของแลคเคสดีรองลงมาจากที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.1625 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 0.100 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีของแลคเคสใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.1488 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 0.092 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีของแลคเคส เท่ากับ 0.1522 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 0.094 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีของแลคเคส เท่ากับ 0.1263 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 0.078 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 29

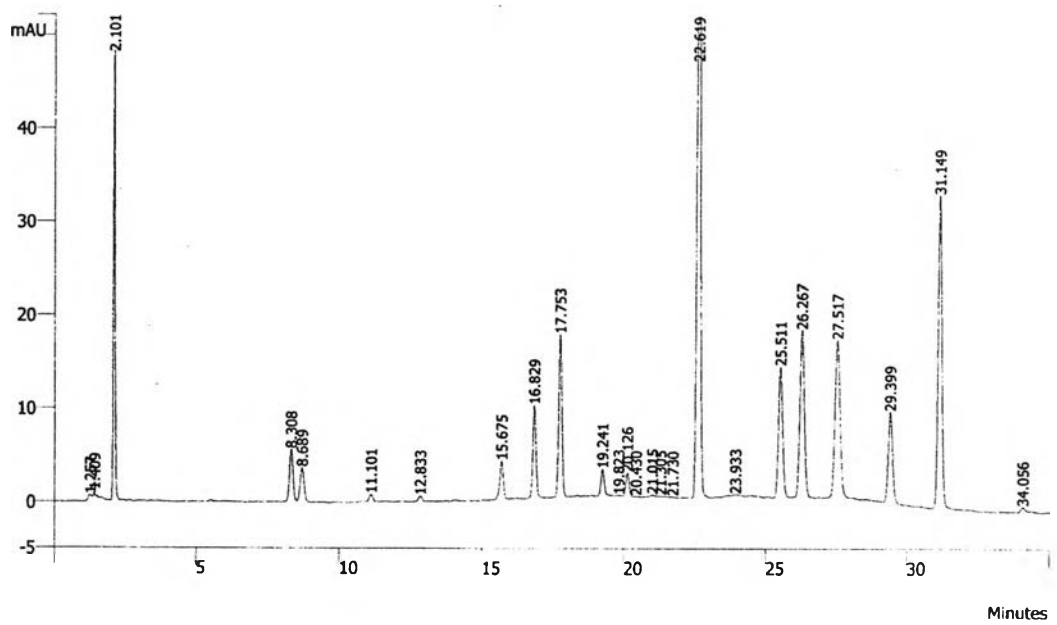


ภาพที่ 29 ค่าแอคติวิตีของแลคเคสในโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ที่แปรผันอุณหภูมิ ตั้งแต่ 30-90 องศาเซลเซียส

4.13 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทางชีวภาพของแลคเคสด้วยเครื่อง HPLC



ภาพที่ 30 โครมาโทแกรมของชุดควบคุม



ภาพที่ 31 โครมาโทแกรมของ laccase

เมื่อนำแลคเคสจากเชื้อรา *Ganderma lucidum* สายพันธุ์ CHEM มาศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เป็นระยะเวลา 3 วัน ในที่มืด ดังแสดงในภาพที่ 30 และภาพที่ 31 เมื่อนำมาเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การย่อยสลายสารประกอบ PAHs พบว่า PAH ที่มีวงอะโรมาติก 2 ถึง 3 วง ได้แก่ naphthalene acenaphthene acenaphthylene flourene phenanthrene และ anthracene ถูกย่อยสลายคิดเป็นเปอร์เซนต์ได้ 89.10 84.38 88.67 84.57 85.38 และ77.77 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ PAH ที่มีวงอะโรมาติก 4 วงได้แก่ fluoranthene pyrene และ dibenzo[a]anthracene ถูกย่อยสลายคิดเป็นเปอร์เซนต์ได้ 78.88 94.93 และ 37.94 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ PAH ที่มีวงอะโรมาติก 5 วงได้แก่ benzo[*b*]fluoranthene benzo[*k*]fluoranthene และ benzo[*a*]pyrene ถูกย่อยสลายคิดเป็นเปอร์เซนต์ได้ 67.95 32.79 และ 45.07 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ PAH ที่มีวงอะโรมาติก 6 วงได้แก่ dibenzo[*a,h*]anthracene และ indeno[1,2,3-*cd*]pyrene ถูกย่อยสลายคิดเป็นเปอร์เซนต์ได้ 7.88 และ 42.12 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จะได้เปอร์เซนต์การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยรวมลดลงถึง 62.34 เปอร์เซนต์ ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 เปอร์เซนต์การย่อยสลายสารประกอบ PAH

PAH	Ret.Time (min)	control	laccase	% Degradation
		Area (counts)	Area (counts)	
naphthalene	8.134	4645254	506162	89.10
acenaphthene	10.901	599691	93686	84.38
acenaphthylene	12.651	487056	55193	88.67
flourene	15.517	3089760	476612	84.57
phenanthrene	16.678	6549165	957163	85.38
anthracene	17.602	8029223	1784858	77.77
fluoranthene	19.093	2057089	434477	78.88
pyrene	19.978	1936324	98112	94.93
benzo[*a*]anthracene	22.463	11477384	7122749	37.94
benzo[*b*]fluoranthene	25.279	4928910	1579651	67.95
benzo[*k*]fluoranthene	26.009	3244321	2180467	32.79
benzo[*a*]pyrene	27.217	4199573	2306716	45.07
dibenzo[*a,h*]anthracene	29.134	1113379	1025596	7.88
indeno[1,2,3-*cd*]pyrene	30.923	5399712	3125431	42.12
Total		57756841	21746873	62.34