สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
3. กล้องจุลทรรศน์
4. เครื่องเขย่าผสมสาร
5. เตาความร้อน (Hot plate)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
8. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง
9. ถุงไดอะไลซิส
10. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้
11. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิได้
12. ตู้อบความร้อนสูง
13. หม้อนึ่งความดันไอ
14. ตู้ถ่ายเชื้อ

3.2 เคมีภัณฑ์

1. น้ำตาลกลูโคส (Glucose)
2. น้ำตาลฟรุคโตส (Fructose)
3. น้ำตาลซูโครส (Sucrose)
4. แป้ง (Starch)
5. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
6. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
7. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)

8. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)
9. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl_2)
10. ยีสต์สกัด (yeast extract)
11. เปบโตน (peptone)
12. เคซีนไฮโดรไลซีส (casein hydrolysate)
13. (2, 2′- azinobis (3′-ethylbenz thiazoline-6-sulfonate)) (ABTS)
14. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_2$)
15. โซเดียมทาร์เทรต (Sodium tartrate)
16. กรดทาร์ทาริค (Tartaric acid)
17. โบไว เซรัม อัลบูมิล (Bovine Serum Albumin)
18. โซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$)
19. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
20. โซเดียมโปรเตสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate)
21. สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent)

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์และการจัดจำแนกเห็ดกลุ่มฟอกขาวจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย

3.3.1.1 การเก็บตัวอย่างเห็ด

ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดในกลุ่มราฟอกขาวจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทยโดยเริ่มทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2550 ถึงเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2550 จากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทยโดยทำการเก็บตัวอย่างจากภาคต่างๆ คือ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคใต้ วิธีการเก็บตัวอย่างคือ ทำการเก็บตัวอย่างดอกเห็ดที่ขึ้นตามสภาพธรรมชาติโดยเลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์ คือ เนื้อดอกเห็ดมีความสดและไม่มีการกัดแทะของแมลงนำตัวอย่างที่ได้ นำมาเก็บใส่ถุงกระดาษเพื่อรักษาความชื้นของดอกเห็ดก่อนที่จะนำมาทำการคัดแยกเส้นใยต่อไป

3.3.1.2 **การแยกเส้นใยเห็ดให้บริสุทธิ์**

นำตัวอย่างเห็ดในกลุ่มราฟอกขาว ที่ทำการเก็บจากสภาพธรรมชาติมาทำการฆ่าเชื้อด้วยการเช็ดผิวดอกเห็ดด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ใช้ใบมีดตัดชิ้นเนื้อด้านในของดอกเห็ดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1-2 มิลลิเมตร นำมาวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 วัน จะสังเกตเห็นเส้นใยของเห็ดเจริญมาจากชิ้นเนื้อเยื่อตัด เส้นใยบริสุทธิ์ที่ได้มาทำการเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA อีกครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าเส้นใยที่เจริญและแยกได้เป็นเส้นใยเห็ดจริงและหลังจากนั้นจึงถ่ายลงในอาหารแข็งเอียงเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเส้นใยในน้ำกลั่นที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อเก็บไว้ใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อนำไปใช้ครั้งต่อไป

3.3.1.2 **การจัดจำแนกเห็ด**

3.3.1.2.1 **การจัดจำแนกเห็ดโดยวิธีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา**

ทำการจัดจำแนกสายพันธุ์เห็ดโดยทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของดอกเห็ดคือ ดูจากลักษณะดอกเห็ด ลักษณะรูใต้ดอกเห็ด ดูจากสัณฐานวิทยาภายในโดยดูจากลักษณะสปอร์ ขนาดสปอร์ ลักษณะเส้นใย โดยนำมาตรวจสอบเพื่อหาชื่อวิทยาศาสตร์จากหนังสือที่ใช้ประกอบในการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ได้แก่ The Ganodermataceae in China, Bibliotheca Mycologica Band 132 , J. Cramer ปี 1989 เอกสารประกอบการตรวจชื่อวิทยาศาสตร์ของ Gilbertson และ Ryvarden ปี 1986 ประกอบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีของ อนิวรรต (2541)

3.3.1.2.2 **การจัดจำแนกโดยอาศัยวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล**

3.3.1.2.2.1 **การสกัดดีเอ็นเอ**

ทำการเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะลงที่ชิ้นวุ้นตรงบริเวณปลายที่มีเส้นใยเกาะอยู่จำนวน 10 ชิ้น ถ่ายเส้นใยเห็ดลงในอาหารสูตร Potato Dextrose Broth (PDB)ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250

มิลลิลิตร(ภาคผนวก ก) ทำการเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการกรองแยกเส้นใยและส่วนใสแยกออกจากกันด้วยกระดาษกรอง Whatman NO.1 นำเส้นใยที่ได้มาทำการสกัดแยกดีเอ็นเอ โดยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Zhou, et al., 1999) เริ่มจากนำเส้นใยมาบดให้ละเอียดโดยใช้โกร่ง เติมสารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงซ้ำ เพื่อล้างตัวอย่างจนของเหลวส่วนบนใส เติมสารละลาย 2X CTAB (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แตกเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24 : 1 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร เพื่อกำจัดโปรตีน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์หลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร อีกครั้งผสมให้เข้ากันปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย ไอโซโพรพานอล ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอเทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างตะกอนของดีเอ็นเอ เทส่วนใสทิ้งตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัด อาร์เอ็นเอ เติมสารละลาย PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน ดีเอ็นเอ เติมเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตรปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างตะกอน ดีเอ็นเอ ดูดสารละลายออก ทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในครั้งต่อไป

3.3.1.2.2.2 **การเพิ่มปริมาณยีนของ** ribosomal DNA (rDNA) **บริเวณตำแหน่ง** ITS (Internal Transcribed Spacer) **ด้วยเทคนิค** Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณยีน rDNA ตรงตำแหน่งของ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) และ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) โดยการเติมปริมาณสารสำหรับการทำ PCR ตามที่แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณของสารแต่ละชนิดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X PCR buffer without $MgCl_2$	1X	1.0
2 mM dNTP mixed	0.2 mM	1.0
Tag DNA polymerase	0.5 units/10 ul	0.1
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	1.0
20 uM Primer I (ITS1)	1.5 ul	0.5
20 uM primer II(ITS4)	1.5 ul	0.5
DNA template	-	1.0
Sterilized distilled water	-	4.9
ปริมาตรรวม		10

เมื่อได้ส่วนผสมทั้งหมดที่มีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่ง ITS ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (Authorized DNA thermal cycle)

ตารางที่ 2 ปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค PCR

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Initial denaturation Amplification	95	5 นาที
Denaturation	95	1.5
Annealing	55	2
Extension	72	2
Final Extension	72	10
Hold	4	-

โดยได้กำหนดภาวะดังตารางที่ 2 ในการทำปฏิกิริยา PCR จำนวนรวมทั้งหมด 35 รอบ หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเลคโทรโฟเรซีส (Electrophoresis) โดยการแยกชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ใน 0.5 X TBE buffer (ภาคผนวก ข) เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และใช้ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ มาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร และส่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ที่บริษัท Marcrogen จำกัด ประเทศญี่ปุ่น

3.3.2.1.3 **การวิเคราะห์ลำดับเบส**

นำชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ ITS ของเส้นใยเห็ดส่งไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับรายงานในฐานข้อมูล GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับเบสของ ITS ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST

3.3.2 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตแลคเคส

3.3.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตแลคเคสบนอาหารแข็ง

นำเชื้อราที่แยกให้บริสุทธิ์แล้วนั้นมาเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน และหลังจากนั้นทำการเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ตรงบริเวณปลายเส้นใยด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำชิ้นวุ้นที่เจาะมา 1 ชิ้น วางลงในอาหารสูตร PDA ที่ผสมกับ 2,2′- azinobis (3′-ethylbenz thiazoline-6-sulfonate) (ABTS) ปริมาณ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก) นำไปทดสอบความสามารถในการสร้างแลคเคสโดยทำการเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้องและติดตามผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงสีเขียวและเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเพื่อนำไปคำนวณหาอัตราส่วนในการคัดเลือกเชื้อรา ทำการติดตามผลโดยการวัดผลทุกวันเป็นเวลา 8 วัน ถ้าเชื้อรามีความสามารถในการผลิตแลคเคสจะเกิดวงสีเขียวบนอาหารรอบเส้นใย

3.3.2.2 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตแลคเคสในอาหารเหลว

นำเชื้อราที่ทำการทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตแลคเคสได้จากข้อ 3.2.1 มาทำการผลิตแลคเคสในอาหารเหลว โดยทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเส้นใยเจริญแล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเกาะอยู่ตรงบริเวณปลายเส้นใย 10 ชิ้น ถ่ายเส้นใยเชื้อราลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารสูตร production 100 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) หลังจากเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 2 วัน เติมสารละลาย 0.1 โมลาร์ คอปเปอร์ซัลเฟต ที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร (VertiPure NYLON Syringe filters,13 mm) และทำการติดตามผลทุกๆ 2 วันเป็นเวลา 12 วัน ทำการเก็บตัวอย่างแลคเคสนำมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเส้นใยออกและนำส่วนใสมาวัดค่ากิจกรรมของแลคเคส (ภาคผนวก ข) ทำการวัดค่ากิจกรรมของแลคเคสตามวิธีการ Wolfenden, B.S., Willson, R.L. (1982) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นที่ 420 นาโนเมตร แล้วนำผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ initial rate ไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ (unit of enzyme) (ภาคผนวก ข)

3.3.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส

นำเชื้อราที่ให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสสูงที่สุดมาทำเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำมาหาภาวะการผลิตแลคเคสที่เหมาะสม โดยการหาแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสม 4 ชนิด ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุคโตส และแป้ง โดยการหาความเข้มข้นที่เหมาะสม 3 ความเข้มข้นคือ 1.0 2.0 และ 4.0 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทราบแหล่งของคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วนั้น จึงนำไปหาแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด ประกอบด้วย เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยการหาความเข้มข้นที่เหมาะสม 3 ความเข้มข้นคือ 0.25 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทราบแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วนั้นทำการหาแหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสม 2 ชนิด ประกอบด้วย ยีสต์สกัดและเคซีน โดยการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.25 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทราบภาวะที่เหมาสมในการผลิตแลคเคสแล้วนั้นจะทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวชักนำ (inducer) คือ คอปเปอร์ซัลเฟต (Cu_2SO_4) ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1-1.0 มิลลิโมลาร์ การเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตแลคเคส การเก็บแลคเคสและการวัดค่ากิจกรรมของแลคเคสทำตามวิธีการข้อ 3.3.2.2

3.3.4 การทำแลคเคสให้บริสุทธิ์บางส่วน

3.3.4.1 การเตรียมแลคเคสเพื่อนำทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

เมื่อทราบภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคสแล้วนั้นทำการเลี้ยงเชื้อราตามหัวข้อ 3.3 โดยทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วันหลังจากนั้นทำการเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเกาะอยู่โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ถ่ายเชื้อราลงในอาหารสูตร production ที่ผ่านการหาสารอาหารและตัวชักนำที่เหมาะสมแล้วนั้นจำนวน 10 ชิ้น ถ่ายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร production ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บแลคเคสในวันที่ให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสสูงที่สุดและหลังจากนั้นทำการกรองแยกเส้นใยโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 กรองแยกเส้นใยและส่วนใส นำส่วนใยไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดส่วนของเส้นใยที่ยังเหลือทำการเก็บส่วนใสสำหรับการนำไปใช้ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.3.4.2 การทำให้แลคเคสบริสุทธิ์บางส่วน

โดยทำให้แลคเคสมีความเข้มข้นขึ้นด้วยวิธี อัลตราฟิลเตรชัน (Ultra filtration) โดยใช้เมมเบรนฟิลเตรชัน (Viva flow 25) โดยเลือกเมมแบรนขนาด cut off 10,000 ดาลตัน หลังจากทำแลคเคสให้เข้มข้นขึ้นแล้วนั้น นำส่วนสารละลายเอนไซม์มาทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยทำการตวงสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยทำการแช่บีกเกอร์ที่มีแลคเคสอยู่ลงในน้ำแข็งและค่อยๆ ทำการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทำการบดละเอียดโดยมีการกวนด้วยแท่งแม่เหล็กตลอดเวลาภายในภาชนะที่ปิด ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-20 20-40 40-60 60-80 และ 80-100 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) ตามลำดับหลังจากเติมเกลือจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการแล้วนั้นทำการกวนต่อไปเรื่อยๆ ประมาณ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใสไปตกตะกอนต่อที่ความเข้มข้นของเกลือที่สูงขึ้นส่วนตะกอนนำไปละลายด้วย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตสบัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer) จนตะกอนละลายหมดหลังจากนั้นนำไปทำการไดอะไลซิสในถุงไดอะไลซิส (Cello Sep,MWCO 12000-14000,Membrabe Filtration Products, Inc., Texas, USA) ด้วยบัฟเฟอร์เดิมในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าเกลือในถุงไดอะไลซิสไหลออกมาหมด หลังจากนั้นทำการเก็บโดยทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาตรทั้งหมดในแต่ละตัวอย่างเพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยการวัดหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's method (Held and Hurley, 2001) โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ค) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 นาโนเมตร

3.3.5 การลดสีน้ำเสียจากโรงงานเยื่อและกระดาษด้วยราฟอกขาว

3.3.5.1 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อและกระดาษ

ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อและกระดาษโดยการทดลองในครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสียจาก บริษัท สยามคราร์ฟ จำจัด อำเภอ ท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี โดยทำการทดลองในระดับขวดเขย่าเพื่อทดสอบการลดลงของสีน้ำเสีย จะทำการเก็บตัวอย่างน้ำ

เสียบริเวณบ่อรวบรวมน้ำเสียก่อนเข้าระบบบำบัด โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจะเก็บในปริมาณมาก และนำตัวอย่างมาเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำเสียเปลี่ยนแปลงคุณภาพก่อนนำไปใช้วิเคราะห์จะต้องเอามาวางทิ้งไว้และหลังจากนั้นทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและทำการกรองแยกตะกอนออกจากน้ำเสียก่อนที่จะนำไปใช้ต่อไป โดยจะต้องทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งก่อนทำการทดลองซึ่งพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์และวิธีการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 พารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์น้ำเสียก่อนและหลังการทดลอง

พารามิเตอร์	วิธีการวิเคราะห์
COD	Close reflux method (APHA, AWWA, and WEF., 18thed.1992)
BOD_5	Standard method (APHA, AWWA, and WEF., 18thed.1992)
pH	pH meter
Color	Spectrophotometer (NCASI standard, 1971)

3.3.5.2 **การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการลดสีน้ำเสียจากโรงงานเยื่อและกระดาษโดยใช้ราฟอกขาวในระดับขวดเขย่า**

3.3.5.2.1 **การเตรียมราฟอกขาวสำหรับการลดสีน้ำเสียโดยวิธีการใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปด้วยโซเดียมอัลจิเนต**

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข) ราดลงบนเส้นใยที่เจริญอยู่บนอาหารทำการขูดเส้นใยและนำเส้นใยที่ผ่านการขูดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายเส้นใยลงในอาหารสูตร production ที่มีปริมาตร 99 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยทำการเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้องในภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที หลังจากนั้นทำการกรองแยกเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ในภาวะปลอดเชื้อเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.5.2.2 **การทดสอบประสิทธิภาพการลดลงของสีน้ำเสียโดยราฟอกขาวอิสระในระดับขวดเขย่า**

ทำการชั่งเส้นใยเปียกหนัก 10 กรัม ถ่ายลงในน้ำเสียที่มีการเติม น้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและ 0.12 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) โดยทำการเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำเสียสูตร wastewater medium บรรจุอยู่ 50 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร เพื่อติดตามการลดลงของสีน้ำเสียและนำไปวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง

3.3.5.2.3 **การทดสอบประสิทธิภาพการลดลงของสีน้ำเสียโดยราฟอกขาวตรึงรูปในระดับขวดเขย่า**

ทำการเลี้ยงเชื้อราตามข้อ 3.5.2.1 และหลังจากนั้นทำการตรึงรูปด้วยโซเดียมอัลจิเนตในสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์โดยการผสมกับเซลล์ 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักเปียกต่อปริมาตร) กับสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ Peristatic pump เพื่อให้ต่อเนื่องและมีการกวนตลอดเวลาทำที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อทำเสร็จแล้วทำการกวนต่อไปอีกประมาณ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง แต่ถ้าทำเสร็จแล้วยังไม่ได้ทำการทดลองทันทีให้ทำการเก็บในแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป

เมื่อทำการเตรียมเซลล์ตรึงรูปเสร็จเรียบร้อยแล้วนั้นทำการชั่งเซลล์ตรึงรูปใส่ลงไปในน้ำเสียที่มีการเติม น้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและ 0.12 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) โดยทำการเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำเสียสูตร wastewater medium บรรจุอยู่ 50 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยการนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000

รอบต่อนาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการลดลงของสีน้ำเสียและการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อทำการทดลองครบ 24 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียและทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำเสียใหม่ โดยทำการล้างเซลล์ตรึงรูปด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วนั้น 2 ครั้ง เพื่อทำความสะอาดเซลล์ตรึงรูป หลังจากนั้นทำการถ่ายอาหารใหม่ลงไปในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยมีชุดควบคุมโดยทำการทดลองเหมือนกับเซลล์ตรึงรูปแต่ไม่มีเซลล์เป็นส่วนผสมในอัลจิเนตเพื่อใช้เป็นชุดควบคุมทำการทดลองซ้ำเหมือนเดิมจนกว่าน้ำเสียที่ทำการทดสอบไม่สามารถลดลงได้อีก

3.3.5.2.4 **การทดสอบประสิทธิภาพการลดลงของสีน้ำเสียโดยแลคเคสตรึงรูปในระดับขวดเขย่า**

ทำการเตรียมตัวอย่างแลคเคส ตามหัวข้อที่ 3.4.1 หลังจากนั้นทำการตรึงแลคเคสให้มีค่ากิจกรรมของแลคเคสความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยใช้โซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการหยดสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ผสมกับแลคเคสลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการหยดอย่างต่อเนื่องโดยใช้ Peristatic pump มีการกวนตลอดเวลาทำที่อุณหภูมิห้องและเมื่อทำเสร็จแล้วทำการกวนต่อไปอีกประมาณ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง แต่ถ้าทำเสร็จแล้วยังไม่ได้ทำการทดลองทันทีให้ทำการเก็บในแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป

ในการศึกษาประสิทธิภาพการลดลงของสีน้ำเสีย ทำการเปรียบเทียบกันระหว่างเมื่อมีการใช้และไม่มีการใช้แลคเคสตรึงรูป ทำการทดลองโดยนำแลคเคสตรึงรูป ปริมาณ 10 กรัม ถ่ายลงในน้ำเสียปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 150 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสารละลายที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง และหลังจากนั้นทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำเสียใหม่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่มีแลคเคสตรึงรูป โดยการล้างแลคเคสตรึงรูปด้วยน้ำกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง โดยนำตัวอย่างที่เก็บมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการลดลงของสีน้ำเสียและการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดด่างต่อไป โดยมีชุดควบคุมโดยทำการทดลองเหมือนกับแลคเคสตรึงรูปแต่ไม่มีแลคเคสเป็นส่วนผสมในอัลจิเนตเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม

3.3.5.3 **การทดสอบประสิทธิภาพการลดลงของสีในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ**

เมื่อทราบภาวะที่เหมาะสมแล้วนั้นจะทำการติดตามผลการลดลงของสีของน้ำเสียโดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างนำมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการติดตามผลการลดลงของสีน้ำเสียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร และนำไปคำนวณการลดลงของสีน้ำเสียจากสูตร

$$\text{Color reduction (\%)} = \frac{(A_{475} \text{ of wastewater} - A_{475} \text{ of decolorized wastewater}) \times 100}{A_{475} \text{ of wastewater}}$$