รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกษม สร้อยทอง. 2537. **เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย**. สำนักพิมพ์ศิริธรรม ออฟเซ็ท. อุบลราชธานี.

กมลชัย ชะเอม. 2546. **การคัดแยกเห็ดที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์. 2539. **การบำบัดน้ำเสีย**. นนทบุรี: สำนักพิมพ์มิตรนราการพิมพ์.

จุลวรรณ์ จึงสุขวัฒนานนท์. 2452. **การลดลงของน้ำเสียจากโรงงานเยื่อกระดาษ ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ *PNANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์แบด**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มรกต ตันติเจริญ. 2544. เห็ดและราในประเทศไทย. **ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโลโลยีชีวภาพแห่งชาติสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ**.

เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. 2539. **แหล่งน้ำกับปัญหามลพิษ**. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร**. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ราชบัณฑิตยสถาน. **เห็ดในประเทศไทย**. กรุงเทพมหานคร. ทีฟิล์ม.

อนิวรรต เฉลิมพงษ์. 2541. **การจัดจำแนกชนิดพันธุ์เห็ดขนาดใหญ่ในระบบนิเวศป่าไม้**. กลุ่มวิจัยโรควิทยาและจุลชีววิทยาป่าไม้ กรมป่าไม้ กรุงเทพมหานคร.

ภาษาอังกฤษ

Archibald, F., Paice, M.G., and Jurasek, L. 1990. Decolorization of kraft bleaching effluent chromophores by *Coriolus versicolor*. **Enzyme Microbiology Technology**. 12: 846-853.

Arona, D.S., and Gill, P.K. 2000. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. **Bioresource Technology** 73: 283-285.

Bermek, H., Li, K., and Eriksson, K.E.L. 1998. Laccase less mutants of the white rot fungus Pycnoporus cinnabarinus cannot delignify kraft pulp. **Journal of Biotechnology** 66: 117-124.

Bungay, H.R. 1981. Fractionation and Pretreatment. **In Energy The Biomass Options**, pp. 185-201. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Buchanan, P.K. 2001. A taxonomic overview of the genus Ganoderma with special reference to species of medicinal and neutriceutical importance. **Proceeding International Symposium Ganoderma Sci Auckland** 27-29 April. 2001. pp. 1-8.

Cheetham, P.S.J., Blunt, K.W., and Buck, C. 1979. Phisical studied on cell immobilization using calcium aiginate gels. **Biotech and Bioeng** 21: 2155-2618.

Chairattanamanokorn, P., Imai, T., Kondo, R., Sekine, M., Higuchi, T., and Ukita, M. 2005. Decolorization of Alcohol Distillery Wastewater by Thermotolerant White rot Fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology** 41: 662-667.

Chibata, I. 1978. **Immobilized Enzymes (Research and development).** New York : John Wiley and Sons.

Couto, S.R. 2009. Dye removal by immobilized fungi. **Biotechnology Advances** 27: 227-235.

Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, A.T., Romero, J., Gutierrez, A., and Rio, J.C. 2007. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. **Enzyme and Microbial Technology** 40: 1264–1271.

Duran, N., Rosa, M.A., Annibale, A., and Gianfreda, L. 2002. Application of laccase and tyrosinase (phenoloxidase) immobilized on difference support. **Enzyme and Microbial Technology** 31: 907-931.

Eriksson, K., E.L., Blanchette, R.A., and Ander, P. 1990. **Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Component**. Germany: Spinger-Veriag.

Eugenia, J.O., Gloria, S., and Elizabeth, H. 2000. **Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses**. London: Taylor and Francis.

Galhaup, C., and Haltrich, D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Appl Microbiol Biotechnol** 56: 225-232.

Glazer, A. W., and Nikaido, H. 1995. **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. San Francisco: W. H. Freeman.

Held, P., and Hurley, J. 2001. Determination of total protein by lowry method using the bio Tek Instrument Elx808 Microplate Reader. **BioTek instruments**.

Herpoel, I., Moukha, S., Meessen, L.L., Sigoillot, J.C., and Asther, M. 2000. Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. **FEMS Microbiology Letters** 183: 301-306.

Hess, J., Leitner, C., Galhaup, C., Kulbe, K., Hinterstoisser, B., Steinwender, M., and Haltrich, D. 2002. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white rot fungus *Trametes mudicolor*. **Appl Biochem Biotech** 41: 98-100.

Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C., and Yan, B. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry** 39: 1415-1419.

Jang, Y.M., Ryu, W.R., and Cho, M.H. 2002. Laccase production from repeated bath cultures using free mycelia of *Trametes* sp.. **Enzyme and Microbial Technology** 30: 741-746.

Fraser, J.E., and Bickerstaff, G.F. 1997. Entrapment in Calcium Alginate. **Methods in Biotechnology** 4: 61-66.

Jordaan, J., Pletschke, B.I., and Leukes, W.D. 2004. Purification and characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. **Enzyme and Microbiology Technology** 34: 635-641.

Kahraman, S.S., and Gurdal, I.H. 2002. Effect of synthetic and culture media on laccase production by white rot fungi. **Bioresource Technology** 82: 215-217.

Matia, M.G., Machado, D.R., Matheus, V.L., and Bononi, R. 2005. Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. Brazilian Journal of Microbiology 36:

Kirk, T.K., and Farrell, R.L. 1997. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology** 41: 465-505.

Ko, E.M., Leem, Y.E., and Choi, H.T. 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 57: 98-102.

Kennes, C., and Lema, J.M. 1994. Simultaneous biodegradation of p-cresol and phenol by the basidiomycetes *Phenerochaete chrysosporium*. **Journal of Industrial Microbiology** 13: 311-314.

Kennedy, J.F., and Melo, E.H.M. 1990. Immobilized enzymes and cell. **Chemical Engineering Process** 86: 81-89.

Lara, M.A., Rodrigure-Malaver, A.J., Rojas, O.J., Holmquist, O., Genzalez, A.M., Bullon, J., Penaloza, N., and Araujo, E. 2003. Black liquor lignin biodegradation by *Trametes elegans*. **International Biodeterioration and Biodegradation** 52: 167-173.

Litthauer, D., Vuuren, J.M., Tonder, A., and Wolfaardt, F.W. 2007. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). **Enzyme and Microbial Technology** 40: 563–568.

Lu, Y., Yan, L., Wang, Y., Zhou, S., Fu, J., and Zhang, J. 2009. Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Hazardous Materials** 165: 1091-1097.

Lui, Z., Zhang, D., Hua, Z., Li, J., Du, G., and Chen, J. 2009. A newly isolated *Paecilomyces* sp. WSH-L7 for laccase enchancment by complex inducement. **J and microbial Biotechnol** 36: 1315-1321.

Luciana C, Germain G., and Spiros, A.N. 2003. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewater. ***Afr J Biotechnol*** 2: 620–630.

Machado, K.M.G., Matheus, D.R., and Bononi, V.L.R. 2005. Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Braz J Microbiol** doi: 10.1590/S15178382200500030008

Madhavi, S.R., and Lele, S.S. 2006. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus *WR-1*. **Process Biochemistry** 41: 581-588.

Maximo, C., and Ferreira, C.M. 2004. Decolourisation of reactive textile dyes by *Irpex lacteus* and lignin modifying enzymes. **Process Biochemistry** 39: 1475-1479.

Murugesan, K., Nam, I.N. Kim, Y.M., and Chang, Y.S. 2007. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. **Enzyme and Microbial Technology** 40: 1662-1672.

Negarathamma, R., Bajpai, P. 1999. Decolorization and detoxification of extraction stage effluent from chlorine bleaching of kraft pulp by *Rhizopus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology** 65: 1078-1082.

Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Imai, T., and Punnapayak, H. 2009. Decolourization of pulp mill wastewater using thermotolerant white rot fungi. **ScienceAsia** 35: 37-41.

Park, C., Lee, B., Han, E.J., Lee, J., and Kim, S. 2006. Decolorization of acid black 52 by fungus immobilization. **Enzyme and Microbial Technology** 39: 371-374.

Raghukumar, C., Monandass, C. Kamat, S., and Shailaja, M.S. 2004. Simultaneous detoxification and decolorization of molasses spent wast by the immobilized white rot fungus *Fravodon flavus* isolated from a marine habitat. **Enzyme Micro Technol**. 35: 197-203.

Raghukumar, C., Ticlo, S.D., and Verma, K.A. 2008. Treatment of Colored Effluents With Lignin Degrading Enzymes: An Emerging Role of Marine Derived Fungi. **Critical Reviews in Microbiology** 34: 189-206.

Rekuc, A., Jastrzembska, B., Liessiene, J., and Bryjak, J. 2009. Comparative studies on immobilized laccase behavior in packed-bed and batch reactors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 57: 216-223.

Reid, I.D. 1995. Biodegradation of lignin. **Canadain Journal of Botany** 73:S1011-S1018.

Re, V.D., Papinutti, L., Villalba, L., Forchiassin, F., and Levin, L. 2008. Preliminary studies on the biobleaching of loblolly pine Kraft pulp with *Trametese trogii* crude extracts. **Enzyme and Microbial Technology** 43: 164-168.

Salas, C., Lobos, S., and Larrian, J. 1995. Properties of laccase isoenzyme product by the basidiomycete *Ceriporiosis subvermispora*. **Biotechnol Appl Biochem** 21: 323-333.

Saha, B.C., and Bothast, R.J. 1997. Enzyme in lignocellulosic biomass conversion. In B. C. Saha and J. Woodward (ed.), **Fuel and Chemicals from Biomass,** ACS Symposium Series 666, pp. 46-56.

Schmidt, O. 2006. **Wood and Tree fungi Biology Damage Protection and Use.** Springer –Veriag.

Schliephaje, K., and Lonergan, G.T. 1996. Laccase variation during dye decolorization in a 200L packed-bad bioreactor. **Biotechnol Lett** 18: 881-886.

Silva, C.M.M.S., Melo, I.S., and Oliveira, P.R. 2005. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp.. **Enzyme and Microbial Technology** 37: 324-329.

Svobodova, K., Senholdt, M., Novotny, C., and Rehorek, A. 2007. Mechanism of Reactive Orange 16 begradation with the white rot fungus *Irpex lacteus*. **Process Biochemistry** 42: 1279-1284.

Tein, M. and Kirk, T.K. 1998. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **In Methods in enzymology** 161: 238-249.

Teerapatsakul, C., Bucke, C., Parra, R., Keshavarz, T., and Chiradon, L. 2008. Dye decolorisation by laccase entrapped in copper alginate. **World J Microbiol Biotechnology** 24: 1367-1374.

Trovaslet, M., Enaud, E., and Guiavarc, Y. 2007. Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. **Enzyme and Microbial Technology** 41: 368-376.

Waldner, R., Leisola, M.S.A., and Fiechter. 1988. Comparison of ligninolytic activities of selected white rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology** 29: 400-407.

Wolfenden, B.S., and Willson, R.L. 1982. Production information laccase from *Trametes versicolor*. **J Chem** 11: 805-812.

Wong, D.W.S. 2009. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Appl Biochem Biotechnol** 157: 174–209.

Wu, J., Xiao, Z.Y., and Yu, H.Q. 2005. Degradation if lignin in pulp mill wastewaters by white rot fungi on biofilm. **Bioresource Technology** 96: 1357-1363.

Yahaya, Y.A., Don, M.M., and Bhatai, S. 2009. Biosorption of copper (II) ion immobilized cells *Pycnoporus sanguineus* from aqueous solution: Equilibrium and kinetic studies. **Journal of Hazardous Materials** 161: 189-195.

Yee, D.C., Jahng, D., and Wood, T.K.n1996. Enhanced expression and hydrogen peroxide dependence of lignin peroxidase from *Streptromyces virisporus* T7A. **Biotechnology Progress** 12: 40-46.

Vikineswary, S., Abdullah, N., Renuvathani, M., Sekaran, M., Pandey, A., and Jones, E.B.G. 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology** 97: 171–177.

Zhang, F.M., Knapp, J.S.,and Tapley, K.N. 1999. Development of bioreactor system for decolorization of Orange II using white rot fungus. **Enzyme Microb Technol** 24: 48-53.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสูตร Potato Dextrose Agar

มันฝรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20 กรัม
วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่งและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ เป็นสีเหลี่ยมลูกเต๋า แล้วนำไปต้มกับน้ำกลั่นจนมันฝรั่งเปื่อย และกรองเอาแต่น้ำ หลังจากนั้นนำมาเติมน้ำตาลและผงวุ้น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิสูง 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตร Potato Dextrose Broth

มันฝรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับอาหารสูตร PDA แต่ไม่มีการเติมผงวุ้น แล้วนำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิสูง 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารสูตร Production medium

Glucose	4.0 กรัม
Yeast extract	0.5 กรัม
Peptone	0.5 กรัม
KH_2PO_4	0.04 กรัม
K_2HPO_4	0.1 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.05 กรัม

4. อาหารสูตร wastewater medium

Glucose	10 กรัม
NH_4Cl	1.2 กรัม
น้ำเสีย	1000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1.0 การเตรียมสารเคมีสำหรับการสกัด DNA

1.1 Tris-HCL Buffer (50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5)

TrisBase	6.1 กรัม
น้ำกรอง	800 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2 2X CTAB lysis buffer

CTAB	4	กรัม
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	8	มิลลิลิตร
NaCl	16.36	กรัม
2-mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.3 TE buffer (Tris-EDTA buffer)

Tris-Cl (pH 8) 1 M	10	มิลลิลิตร
EDTA (pH 8) 0.5 M	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เติมน้ำกลั่นลงในส่วนผสมของ Tris-Cl และ EDTA นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.4 สารละลาย MTT 5 mg/ml ใน PBS

MTT	50	มิลลิกรัม
PBS	10	มิลลิลิตร

ละลาย MTT ใน PBS กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดไมโครทิวป์ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร หุ้มแผ่นฟลอยด์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.5 สารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol

เติม HCl 0.331 มิลลิลิตร ลงใน 80 มิลลิลิตร isopropanol ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วย isopropanol เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.6 Washing buffer

PVP (Polyvinylpyrrolidone)	2	กรัม
Ascorbic acid	1.76	กรัม
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	4	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Autoclaved water) จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซียเซียส

1.7 Choloroform/isoamyl alcohol (24: 1 v/v)

Choloroform	192	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

1.8 Polyethylene glycol (PEG) 20%

โพลีเอธิลีนไกลคอน (Polyethylene glycol, PEG)	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	14.61	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ละลาย PEG และ NaCl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.0 สารเคมีในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) และ อิเลคโทรโฟเรซิส (Electrophoreses)

2.1 10X TBE buffer (10X Tris-boric acid EDTA)

ทริส-เบส (Tris-base)	54	กรัม
บอริก (H_2BO_3)	27.5	กรัม
EDTA	4.65	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.2 Ethidium bromind, 10 mg/ ml

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในเอทิเดียมโบรไมด์ ($C_{21}H_{20}BrN_3$) 0.2 กรัม ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 Agarose gel 1.5% (w/w)

อะกาโรส (agarose)	1.65	กรัม
TBE	110	มิลลิลิตร
เอทิเดียมโบรไมด์ ($C_{21}H_{20}BrN_3$)	4	ไมโครลิตร

3.0 การตรวจวัดค่ากิจกรรมของแลคเคส
มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม reaction mixture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบไปด้วย

30 mM ABTS	ปริมาตร	0.1	มิลลิลิตร
0.1 M Sodium acetate buffer	ปริมาตร	0.7	มิลลิลิตร
แลคเคส	ปริมาตร	0.2	มิลลิลิตร

2. นำ reaction mixture ซึ่งประกอบด้วยสารละลายในข้อ 1. มาผสมกันใน corvette แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความ

ยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที โดยมีแบลงค์เป็นสารละลายดังกล่าวที่ไม่มีการเติมแลคเคส

3. การคำนวณหา ค่าหน่วยของแลคเคส

1 หน่วยของแลคเคส คือ ปริมาณของแลคเคสที่สามารถ ออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมล ของ ABTS ใน 1 นาที เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร นำมาแทนค่าตามสูตร จากสูตร Volume Activity (U/ml) = $\frac{\Delta \text{ A/min} * \text{Volume reaction mixture} * 1000}{36{,}000 * 1 * \text{Volume enzyme solution}}$

ε 420 นาโนเมตร = 36,000 $M^{-1}.cm^{-1}$

4.0 สารละลายในการตรวจหาปริมาณโปรตีน

4.1 การเตรียมสารละลาย BSA มาตรฐาน เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปละลายด้วยน้ำกลั่น

4.2 การเตรียมสารละลาย ฟีนอล รีเอเจนท์ นำมาผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

4.3 การเตรียมรีเอเจนท์ในการหาปริมาณโปรตีน

4.3.1 1 มิลลิลิตร ของ 2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมโปรเตสเซียมทาร์เทรต

4.3.2 1 มิลลิลิตร ของ 1 เปอร์เซ็นต์ คอปเปอร์ซัลเฟต

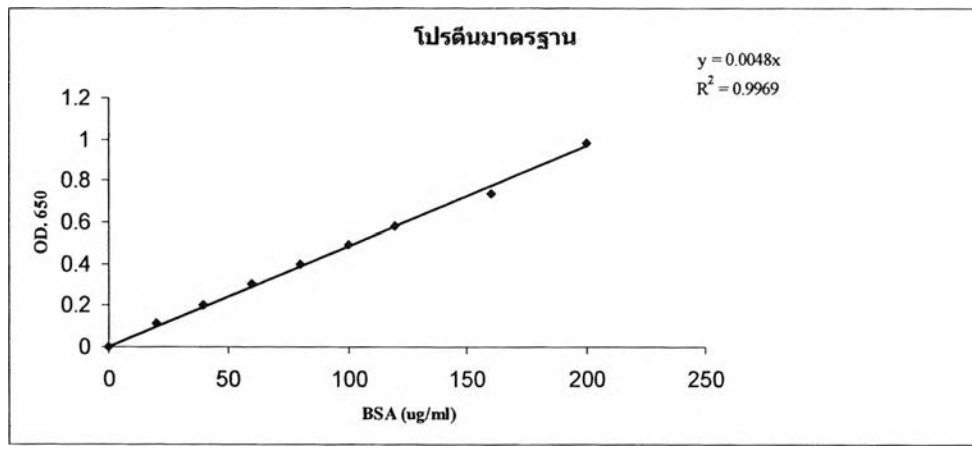
4.3.3 100 มิลลิลิตร ของ 2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอร์เนต ใน 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซม์

โดยทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งโดยนำสารละลายในข้อ 4.3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายในข้อ 4.3.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และหลังจากนั้นทำการผสมสารละลายในข้อ 4.3.3 ปริมาตร 98 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของปริมาณ BSA ที่ 10-100 ไมโครลิตร



ภาพที่ ค.1 กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน BSA

1. เตรียมสารละลายไบยูเรต ซึ่งประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ คอปเปอร์ซัลเฟต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมโปรเตสเซียมทาร์เทรต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต ใน 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 98 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางปริมาณโปรตีนให้ได้ 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการเจือจางในน้ำกลั่นดังตารางที่ ค. 1
3. นำสารละลายไบยูเรตปริมาตร 3 มิลลิลิตร ดูดลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดที่มีโปรตีน BSA อยู่ บ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

4. เตรียมสารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ โดยทำการเตรียมสารละลายโฟลินรีเอเจนต์ 1 ส่วน และน้ำกลั่น 1 ส่วน และใช้ทันทีปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองในข้อ 3 ครบเวลา 30 นาที โดยผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว และทำการบ่มต่ออีกเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร และ แบลงค์ (Blank) คือน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร แทน ปริมาณ BSA

ตารางที่ ค. 1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟโปรตีนมาตรฐานของ BSA ที่ 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณ BSA (มิลลิลิตร)	BSA ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	ปริมาตรของน้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
0	0	0.1
0.01	20	0.09
0.02	40	0.08
0.03	60	0.07
0.04	80	0.06
0.05	100	0.05
0.06	120	0.04
0.08	160	0.02
0.10	200	-

ตารางที่ ค. 2 แสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

Milligrams of solid ammonium sulfate to add to 1 ml of solution to achieve desired saturation at 0° C																	
Initial % saturation ammonium sulfate(s)	Final concentration of ammonium sulfate in solution																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	630	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	316	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	365	395	436	488	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	182	212	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทิฆัมพร ระย้า เกิดวันที่ 5 ตุลาคม พ.ศ. 2524 ที่อำเภอพิปูน จังหวัดนครศรีธรรมราช ระดับปริญญาตรีสำเร็จปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง เมื่อปีการศึกษา 2547 และระดับปริญญาโทเข้าศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2549 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2552

ทิฆัมพร ระย้า และคณะ, 2551. Optimization of laccase production from a tropical white rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. การประชุมวิชาการหัวข้อ TSB: 2008 Biotechnology for Global Care. โรงแรมดักสิลา จังหวัดมหาสารคาม วันที่ 14-17 ตุลาคม 2551 (นำเสนอผลงานแบบโพสเตอร์)

ทิฆัมพร ระย้า และคณะ, 2551. Screening of laccase-producing white rot fungi isolated from natures in Thailand. การประชุมวิชาการหัวข้อ "The Big Bang of Biological Science" (13TH BIOLOGICAL SCIENCE GRADUATE CONGRESS) National University of Singapore ณ. ประเทศสิงคโปร์ วันที่ 15-17 ธันวาคม 2551 (นำเสนอผลงานแบบโพสเตอร์)

ทิฆัมพร ระย้า และคณะ, 2552. Decolorization of pulp mill wastewater using a thermotolerant white rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. การประชุมวิชาการหัวข้อ "Go Green Grow Science Together" (14TH BIOLOGICAL SCIENCE GRADUATE CONGRESS) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วันที่ 12-14 ธันวาคม 2552 (นำเสนอผลงานแบบโพสเตอร์)