



การแยกบริสุทธิ์และสมบัติชีวเคมีของแลคเคสจาก *Bacillus* sp.



โดย

นายชัยภัทร ฉัตรวรรณวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การแยกบริสุทธิ์และสมบัติชีวเคมีของแลคเคสจาก *Bacillus* sp.



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF LACCASE
FROM *BACILLUS* SP.



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department of BIOTECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2019
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ การแยกบริสุทธิ์และสมบัติชีวเคมีของแลคเคสจาก *Bacillus* sp.
โดย ชัยภัทร ฉัตรวรรณวงศ์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ดร. สินธุ์พนธ์ ฤทธิธรรม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ชนก จตุรพีริย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ดร.สินธุ์พนธ์ ฤทธิธรรม)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทยา หลิวเสรี)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ดร.ภาณุ พิมพ์วิริยะกุล)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อดิศักดิ์ จตุรพีริย์)

59401202 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

คำสำคัญ : แลคเคส, การแยกบริสุทธิ์, สมบัติชีวเคมี

นาย ชัยภัทร ฉัตรวรุณวงศ์: การแยกบริสุทธิ์และสมบัติชีวเคมีของแลคเคส จาก *Bacillus* sp. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ดร. สันธวัฒน์ ฤทธิธรรม

แลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ที่คัดแยกจากดิน ถูกนำมาแยกบริสุทธิ์ โดยผ่านการตกตะกอนด้วย 60%(v/v) acetone, Q-Sepharose ion exchange และ Sephacryl S-200 gel filtration chromatography หลังกระบวนการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์มีค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 34.09 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 11.84 เท่า เอนไซม์มีมวลโมเลกุลประมาณ 181 kDa โดย pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธิ์ที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แลคเคสมีความเสถียรที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไอออนของ Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} และ Hg^{+} มีผลกระตุ้นกัมมันตภาพแลคเคส ขณะที่ Co^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} และ Ca^{2+} สามารถยับยั้งกัมมันตภาพแลคเคส แลคเคสถูกยับยั้งโดย EDTA, Sodium azide และ 2-mercaptoethanol การศึกษาความเสถียรของแลคเคสในสารซักล้างและตัวทำละลายอินทรีย์พบว่าแลคเคสมีความเสถียรใน 1mM SDS และใน 50%(v/v) DMF, DMSO, Ethanol และ Acetone แลคเคสสามารถออกซิไดซ์สารตั้งต้นกลุ่มฟีนอลได้หลากหลาย ค่า K_m , V_{max} และ $k_{catalytic}$ เมื่อใช้ DMP เป็นสารตั้งต้นมีค่าเท่ากับ 0.722 mM, 0.414 mM.min⁻¹ และ 1830.36 min⁻¹ ตามลำดับ แลคเคสบริสุทธิ์สามารถลดความเข้มสี Congo red ได้ 73.23% ในเวลา 24 ชั่วโมง

59401202 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : Laccase, Purification, Characterization

MR. CHAIYAPAT CHATWARUNWONG : PURIFICATION AND
BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF LACCASE FROM *BACILLUS* SP. THESIS ADVISOR :
SINTHUWAT RITTHITHAM, Ph.D.

Laccase from *Bacillus* sp. strain P isolated from soil samples was purified by 60%(v/v) acetone precipitation, Q-Sepharose ion exchange and Sephacryl S-200 gel filtration chromatography. After purification, the specific activity of 34.09 U/mg proteins and the purification fold of 11.84 were obtained. The molecular weight estimated by Native PAGE and Gel filtration chromatography was 181 and 184 kDa, respectively. The optimum pH and temperature were 9.0 and 60 °C, respectively while the pH and temperature stability were found at pH 8.0 and 4 °C. The metal ions, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ and Hg⁺, enhanced the laccase activity while Co²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ and Ca²⁺ showed the inhibitory effect. Laccase was inhibited by EDTA, sodium azide and 2-mercaptoethanol. Laccase was stable in 1mM SDS and 50%(v/v) DMF, DMSO, ethanol and acetone. Laccases could oxidize a wide range of phenolic substrate. K_m , V_{max} and $k_{catalytic}$ for DMP were 0.722 mM, 0.414 mM.min⁻¹ and 1830.36 min⁻¹, respectively. The enzyme could decolorize 10 ppm congo red with a decolorization percentage of 73.23% in 24 hr

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เพราะความกรุณาอย่างยิ่งของ อาจารย์ ดร.สินธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทยา หลิวเสรี และ อาจารย์ ดร.ภาณุ พิมพ์วิริยะกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ อีกทั้ง รองศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ ประธานกรรมการ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อดิศักดิ์ จตุรพิริย์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษาและคำแนะนำเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา และข้อแนะนำอันเป็นประโยชน์ ต่อการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างมาก

ขอกราบขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และคำแนะนำตลอดการศึกษาวิจัยครั้งนี้ด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณพ่อธนกศักดิ์ ฉัตรวรรณวงศ์ คุณแม่รัชนี ฉัตรวรรณวงศ์ และคุณกฤษ เดชฤทธิ์ศักดิ์ที่สนับสนุนในด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจที่สำคัญซึ่งเป็นแรงผลักดันในการทำวิจัย รวมทั้งความช่วยเหลือ สนับสนุนในด้านต่างๆ ตลอดมา

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ชัยภัทร ฉัตรวรรณวงศ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3. ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 แลคเคส (Laccase).....	3
2.2 โครงสร้างแลคเคส (Structural of laccase).....	4
2.3 กลไกการเร่งปฏิกิริยาแลคเคส.....	5
2.4 แลคเคสในอุตสาหกรรม.....	6
2.4.1 อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ.....	6
2.4.2 การบำบัดน้ำทิ้งและการลดปริมาณสีข้อมในน้ำทิ้ง.....	7
2.4.3 อุตสาหกรรมสิ่งทอ.....	7
2.4.4 การบำบัดฟื้นฟูทางชีวภาพ (Bioremediation).....	7
2.4.5 อุตสาหกรรมอาหาร.....	7

2.5 แหล่งที่มาแลคเคส	8
2.6 การแยกบริสุทธิ์แลคเคส.....	8
2.7 ลักษณะบางประการของแลคเคสบริสุทธิ์	13
2.7.1 ค่า pH ที่เหมาะสม (optimum pH)	13
2.7.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature)	13
2.7.3 ความจำเพาะกับสารตั้งต้น (substrate)	13
2.7.4 ตัวยับยั้ง (inhibitor) และ ตัวกระตุ้น (activator)	14
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	17
3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา.....	17
3.2 โปรตีนมาตรฐาน (Standard Protein Marker)	17
3.3 สารเคมี (บริษัทผู้ผลิต).....	17
3.4 เครื่องมือ.....	19
3.5 การผลิตแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	20
3.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกัมมันตภาพของแลคเคส	20
3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	20
3.6.2 การวิเคราะห์กัมมันตภาพแลคเคส	20
3.7 การแยกบริสุทธิ์แลคเคส.....	28
3.7.1 การตกตะกอนโปรตีน	28
3.7.2 Ion- exchange Chromatography.....	28
3.7.3 Gel filtration chromatography	29
3.7.4 Gel filtration Standard.....	29
3.7.5 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโปรตีนเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์	30

3.7.6 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยเทคนิค SDS-PAGE (SDS-polyacrylamind Gel Electrophoresis) และ Native PAGE (Native polyacrylamind Gel Electrophoresis).....	31
3.8 ศึกษาสมบัติชีวเคมีของแลคเคสบริสุทธิ์.....	33
3.8.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์ และความเสถียรของแลคเคส.....	33
3.8.2 ศึกษาผลของไอออนโลหะ สารเคมี และตัวทำลายอินทรีย์ต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธิ์.....	34
3.8.3 ศึกษาความจำเพาะของสารตั้งต้น (substrate) ต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์ และศึกษาค่าพารามิตเตอร์จลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์.....	35
3.8.4 ศึกษาประสิทธิภาพการลดสีบนอาหารแข็งจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P และศึกษาประสิทธิภาพการลดสีของแลคเคสบริสุทธิ์.....	35
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	36
4.1 ผลิตแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P.....	36
4.2 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยวิธี 16s rDNA.....	37
4.3 การแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P.....	38
4.3.1 การผลิตแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P.....	38
4.3.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วย Acetone.....	38
4.3.3 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วย Fast Flow Protein Liquid Chromatography (FPLC).....	39
4.4 การวิเคราะห์การแยกบริสุทธิ์แลคเคส.....	41
4.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamind Gel Eletropholysis (SDS-PAGE) และ Native Polyacrylamind Gel Eletropholysis (Native PAGE).....	43
4.6 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS.....	45
4.7 การศึกษาสมบัติชีวเคมีของแลคเคสบริสุทธิ์.....	46

4.7.1	ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธ์และความเสถียรของแลคเคส บริสุทธ์.....	46
4.7.2	ศึกษาผลของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธ์	56
4.7.3	ศึกษาความจำเพาะของสารตั้งต้นและค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ต่อกัมมันตภาพ แลคเคสบริสุทธ์.....	59
4.7.4	ศึกษาผลของสารยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธ์.....	65
4.7.5	ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) และสารซักล้าง (detergent) ต่อความ เสถียรของแลคเคสบริสุทธ์.....	68
4.7.6	ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธ์	70
4.7.7	ศึกษาประสิทธิภาพการลดสีบนอาหารแข็งจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P และศึกษา ประสิทธิภาพการกำจัดสีของแลคเคสบริสุทธ์จาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	72
บทที่ 5	สรุปผลการศึกษา.....	78
ภาคผนวก.....		79
ภาคผนวก ก	อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์.....	80
ภาคผนวก ข	การเตรียมสารเคมี.....	81
ภาคผนวก ค	กราฟมาตรฐาน.....	84
ภาคผนวก ง	ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	92
ภาคผนวก จ	ข้อมูลดิบ	93
รายการอ้างอิง.....		109
ประวัติผู้เขียน.....		117

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 กระบวนการแยกบริสุทธิ์ และลักษณะบางประการของแลคเคสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ ต่างๆ.....	9
ตารางที่ 2 การแยกบริสุทธิ์แลคเคส จาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P.....	42
ตารางที่ 3 ผลของไอออนโลหะที่มีต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์จาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P....	57
ตารางที่ 4 ความจำเพาะของสารตั้งต้น (Substrate) ของแลคเคสบริสุทธิ์ จาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P	61
ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์จาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P	62
ตารางที่ 6 ผลการศึกษาของสารยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์จาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P	66
ตารางที่ 7 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium	80
ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงของ BSA ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร.....	84
ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า \log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_f	86
ตารางที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า \log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_f	88
ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า \log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรที่ถูกชะ ออกจากคอลัมน์	91
ตารางที่ 12 ค่ากัมมันตภาพแลคเคสแต่ละขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก Bacillus sp. สาย พันธุ์ P.....	93
ตารางที่ 13 ปริมาณโปรตีนแลคเคสแต่ละขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P	93
ตารางที่ 14 ผลการศึกษาการผลิตแลคเคสจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P	94
ตารางที่ 15 ผลของ pH ที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์จาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P.	95
ตารางที่ 16 ผลของ pH ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์จาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P	96

ตารางที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสซูทีจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P..... 100

ตารางที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของแลคเคสบริสซูทีจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P..... 101

ตารางที่ 19 ผลของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสซูทีจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P 104

ตารางที่ 20 ศึกษาความจำเพาะของสารตั้งต้นต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสซูทีจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P..... 105

ตารางที่ 21 ผลของสารยับยั้งต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสซูทีจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P .. 106

ตารางที่ 22 ผลของตัวทำลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสซูทีจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ P..... 108



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 กลไกการเกิดออกซิเดชันของแลคเคส	4
ภาพที่ 2 โครงสร้างตำแหน่งคอปเปอร์ของแลคเคสจาก <i>Bacillus subtilis</i>	5
ภาพที่ 3 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคส	6
ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน DMP โดยแลคเคส.....	21
ภาพที่ 5 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน guaiacol โดยแลคเคส.....	22
ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน veratryl alcohol โดยแลคเคส.....	23
ภาพที่ 7 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน syringaldazine โดยแลคเคส.....	24
ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน ABTS โดยแลคเคส.....	25
ภาพที่ 9 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน Tyrosine โดยแลคเคส.....	26
ภาพที่ 10 ลักษณะของ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P บน Production medium	36
ภาพที่ 11 ลักษณะของเซลล์ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning eletro micrograph)	36
ภาพที่ 12 ผลการศึกษาการผลิตแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P ในอาหาร Production medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน.....	37
ภาพที่ 13 แผนภูมิต้นไม้ทางไฟโลเจเนติก (Phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i> อื่นๆ	38
ภาพที่ 14 โครมาโตแกรมของแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P ผ่านเครื่อง FPLC โดยใช้คอลัมน์ XK26 ที่บรรจุ Q-Sepharose.....	39
ภาพที่ 15 โครมาโตแกรมแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P ผ่านเครื่อง FPLC โดยใช้คอลัมน์ XK16 ที่บรรจุ Sephacryl S-200	40
ภาพที่ 16 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Native PAGE	44
ภาพที่ 17 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC-MS.....	45

ภาพที่ 18 ผลของ pH ต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสซูทีจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	47
ภาพที่ 19 ผลของ pH ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสซูทีจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	49
ภาพที่ 20 ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของแลคเคสบริสซูทีที่เก็บรักษาใน pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	50
ภาพที่ 21 ผลของอุณหภูมิต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสซูทีจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	52
ภาพที่ 22 ผลการศึกษาของอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของแลคเคสบริสซูทีจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	54
ภาพที่ 23 ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของแลคเคสบริสซูทีที่เก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิต่างๆ ที่ pH 8.0	55
ภาพที่ 24 ผลของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสซูทีจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	58
ภาพที่ 25 โครงสร้างเคมีของสารตั้งต้นที่ใช้ในการศึกษา.....	61
ภาพที่ 26 จลศาสตร์ของแลคเคสบริสซูทีจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	64
ภาพที่ 27 ผลของสารยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสซูทีจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	67
ภาพที่ 28 ผลของสารลดแรงตึงผิวและสารซักล้างต่อความเสถียรของแลคเคสบริสซูทีจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	69
ภาพที่ 29 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสซูทีจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	71
ภาพที่ 30 การลดสีของ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P บนอาหารแข็ง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	72
ภาพที่ 31 ผลการสแกนค่าการดูดกลืนแสงเพื่อศึกษาการลดสีของแลคเคสบริสซูทีจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	75
ภาพที่ 32 ประสิทธิภาพการลดสี (%Decolorization) ของแลคเคสบริสซูทีจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P โดยปมที่ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นสีเริ่มต้น 50 ppm..	76
ภาพที่ 33 เปรียบเทียบสีก่อนและหลังการกำจัดสีของแลคเคสบริสซูทีจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ P	76
ภาพที่ 34 กลไกการย่อยสลายสี Congo red โดยแลคเคส.....	77
ภาพที่ 35 กราฟมาตรฐานของ BSA โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford method	85

ภาพที่ 36 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ใน 12 % SDS-PAGE 87

ภาพที่ 37 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ใน 12 % Native PAGE 89

ภาพที่ 38 โคโรมาโตแกรมของสารมาตรฐานโปรตีน gel filtration chromatography โดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200..... 90

ภาพที่ 39 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของ Bacillus sp. สายพันธุ์ P 92



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันทั่วโลกได้ให้ความสำคัญต่อการรักษาสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก ทำให้อุตสาหกรรมจำเป็นต้องมีระบบการกำจัดสารปนเปื้อนหรือของเสียต่างๆที่เกิดจากกระบวนการผลิต โดยเฉพาะสารปนเปื้อนหรือของเสียต่างๆ ที่เกิดจากอุตสาหกรรมที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทย เช่น อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมเครื่องหนัง และอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ เป็นต้น (Sirirat, 2010) สารปนเปื้อนหรือของเสียต่างๆ ที่พบได้บ่อยในอุตสาหกรรมดังกล่าว ได้แก่ สารกลุ่มฟีนอลิก ทั้งสารอินทรีย์ เช่น ลิกนิน และสารเคมี เช่น สีย้อม หรือสารกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น สิ่งปนเปื้อนเหล่านี้หากปล่อยลงสู่ธรรมชาติจะเป็นพิษทั้งต่อคน สัตว์ พืช และยังย่อยสลายได้ยากอีกด้วย กระบวนการย่อยสลายของอุตสาหกรรมสิ่งทอพบว่าการสูญเสียสีย้อมสูงถึง 30% ซึ่งถูกปล่อยออกพร้อมกับน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม ดังนั้นการศึกษากระบวนการที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีย้อมในน้ำทิ้งจึงได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากหากกระบวนการกำจัดไม่ดีพออาจส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศได้ (Pierce, 1999) วิธีการกำจัดสารเหล่านี้อาจทำได้โดย วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ ซึ่งวิธีทางกายภาพ และวิธีทางเคมีจะมีความสิ้นเปลืองและเกิดตะกอนจากกระบวนการบำบัดสูง ทั้งยังเป็นการเพิ่มสารเคมีเข้าสู่ระบบนิเวศ ซึ่งอาจก่อให้เกิดสารก่อมะเร็งและส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำได้ (Wanida, 2012) ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะนำวิธีทางชีวภาพมาใช้แทน ซึ่งในปัจจุบันวิธีทางชีวภาพได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะการใช้เอนไซม์และจุลินทรีย์ในการบำบัด เนื่องจากมีปฏิกิริยาไม่รุนแรงเหมือนปฏิกิริยาเคมีและไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

Laccases (benzenediol oxygen oxidoreductases, EC 1.10.3.2) เป็น multicopper oxidases (MCOs) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่มีความหลากหลาย โดยสามารถกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันสารตั้งต้นของสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) และไม่ใช่ฟีนอล (non phenolic compounds) โดยทั่วไปแลคเคสจะออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอล และ อะโรมาติกเอมีน เช่น methoxyphenols, phenols, polyphenols, anilines, hydroxyindols, benzenethiols รวมถึงสารประกอบไฮยาไนด์ เป็นต้น (Sondhi *et al.*, 2014) แลคเคสมีประโยชน์ในด้านการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอย่างมาก โดยพบว่ามีให้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ , การบำบัดทางชีวภาพ, การกำจัดสีย้อมผ้า, ไบโอดีเซล, อุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น (Shraddha *et al.*, 2011) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการแยกบริสุทธิ์และสมบัติชีวเคมีของแลคเคสที่ผลิตจาก

Bacillus sp. ซึ่งคัดแยกได้จากธรรมชาติเพื่ออาจจะนำไปเป็นตัวเลือกสำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษากระบวนการที่เหมาะสมสำหรับการแยกบริสุทธิ์แลคเคสที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P

1.2.2 เพื่อศึกษาสมบัติชีวเคมีของแลคเคสจาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์

1.3. ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 เพาะเลี้ยง *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P เพื่อผลิตแลคเคส

1.3.2 แยกบริสุทธิ์แลคเคสที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.3.2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วย 60% (v/v) Acetone

1.3.2.2 Anion- exchange Chromatography โดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Q-sepharose

1.3.2.3 Gel filtration chromatography โดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200

1.3.3 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยวิธี SDS – PAGE, Native PAGE และ LC/MS

1.3.4 ศึกษาสมบัติชีวเคมีของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P

1.3.4.1 ศึกษาสภาวะ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาและความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์

1.3.4.2 ศึกษาผลของไอออนโลหะ สารเคมีและตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์

1.3.4.3 ศึกษาความจำเพาะของสารตั้งต้น (substrate) ของแลคเคสบริสุทธิ์และศึกษาจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์

1.3.4.4 ศึกษาประสิทธิภาพการลดสีสังเคราะห์ของแลคเคสบริสุทธิ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

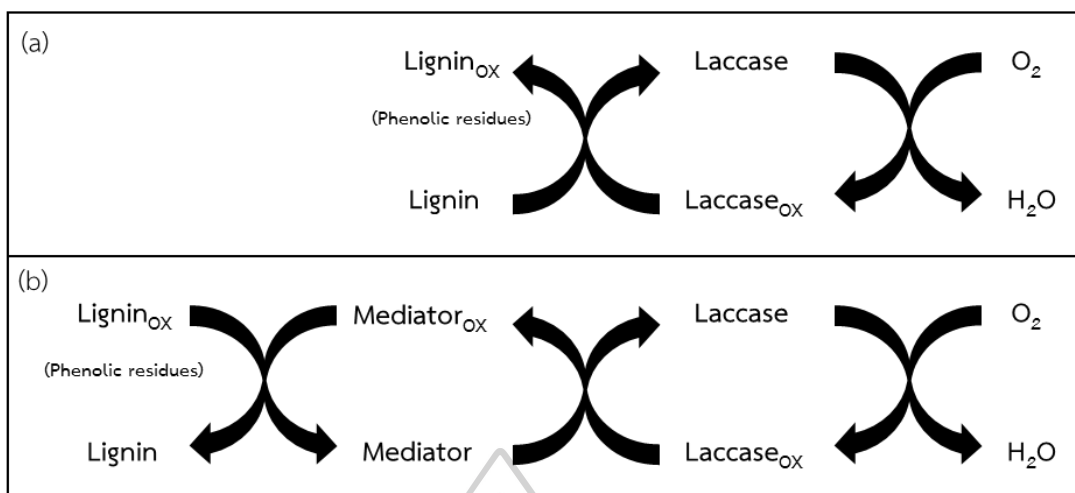
ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมสำหรับแยกบริสุทธิ์แลคเคสที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P และสามารถนำข้อมูลการศึกษาด้านชีวเคมีของแลคเคสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ และการลดความชื้นสี เป็นต้น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แลคเคส (Laccase)

แลคเคส (benzenediol oxygen oxidoreductases, EC 1.10.3.2) เป็น Multicopper oxidases (MCOs) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ แลคเคสถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1883 จากยางของต้น Lacquer (*Rhus vernicifera*) ในประเทศญี่ปุ่น ต่อมาได้ถูกค้นพบในแมลง แบคทีเรีย และถูกค้นพบมากในรา (Shraddha *et al.*, 2011) โดยแลคเคสทำหน้าที่ออกซิไดซ์ทั้งสารประกอบฟีนอล (phenolic) และสารประกอบที่ไม่ใช่ฟีนอล (non phenolic) เช่น กัวไอเอคอลล (guaiacol), DMP (2,6-dimethoxyphenol), เวอราทิลแอลกอฮอล์ (veratryl alcohol) และ ซิงริงกัลดาซีน (syringaldazine) เป็นต้น (Wu *et al.*, 2010) แลคเคสอาจทำปฏิกิริยาโดยตรงกับส่วนที่เป็นสารประกอบฟีนอลของลิกนินหรืออาจต้องการสารตัวกลาง (mediator) ซึ่งทำหน้าที่เป็น co-substrate โดยสารตัวกลางที่เป็นที่นิยม คือ ABTS (2,2'-azinobis-(3)-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (Morozova *et al.*, 2007) แลคเคสมีมวลโมเลกุลของ monomer ในช่วง 40 -130 kDa โดยมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตประมาณ 10-25% ในรา และ 20-45% ในพืช ซึ่งกลุ่มคาร์โบไฮเดรตมักประกอบด้วย mannose, N-acetylglucosamine และ galactose ทำให้เอนไซม์มีความเสถียรสูง (Prajapati and Minocheherhomji, 2018) โดยเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชัน (oxidation) หนึ่งอิเล็กตรอนของสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ 4 โมเลกุล ควบคู่กับการรีดักซ์ขึ้น (reduction) 4 อิเล็กตรอน ของออกซิเจนไปเป็นน้ำ (Breen and Singleton, 1999) กลไกการเกิดออกซิเดชันของแลคเคส ดังแสดงภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กลไกการเกิดออกซิเดชันของแลคเคส

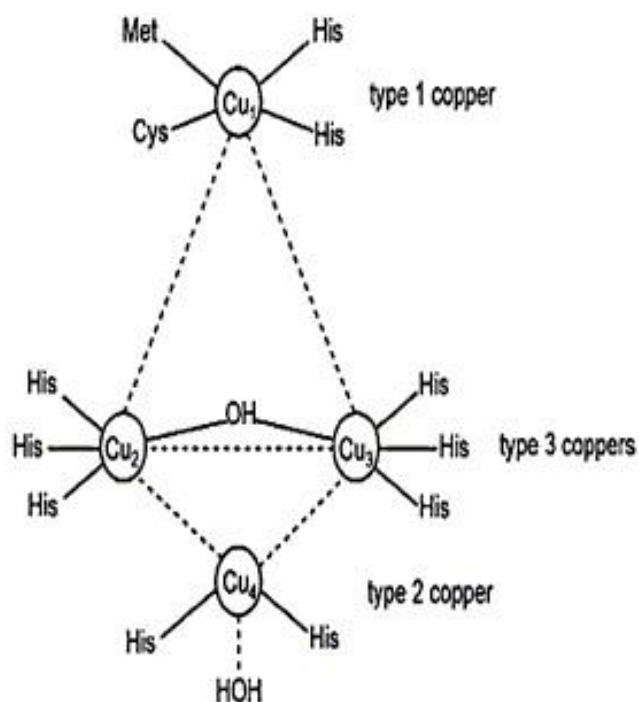
(a) กลไกการเกิดออกซิเดชันของแลคเคส

(b) กลไกการเกิดออกซิเดชันของแลคเคสที่มีตัวกลาง (OX = oxidized state)

ที่มา : (Breen and Singleton, 1999)

2.2 โครงสร้างแลคเคส (Structural of laccase)

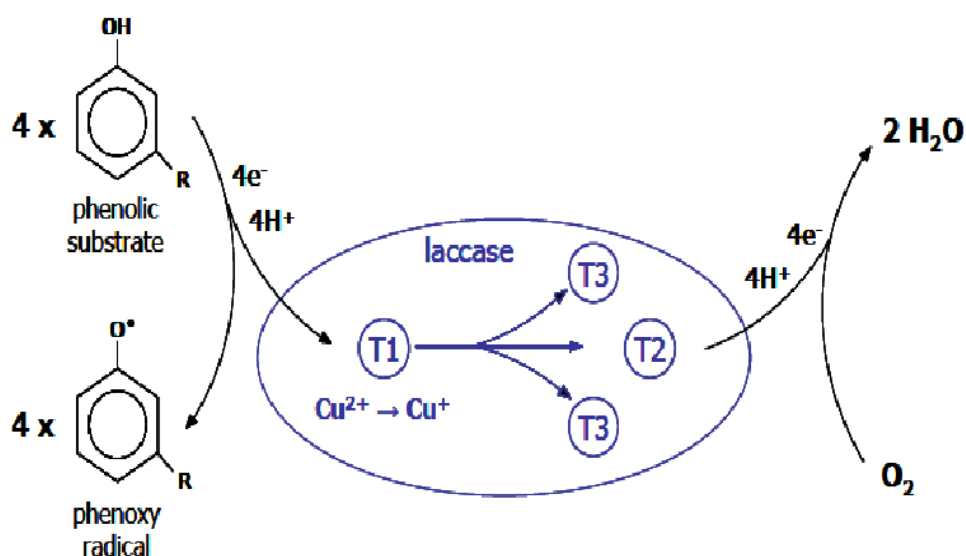
โครงสร้างโมเลกุลแลคเคสประกอบด้วยอะตอมคอปเปอร์ 4 อะตอมต่อหนึ่งโมโนเมอร์ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะการดูดกลืนและสเปกตรัมคลื่นแม่เหล็กของอิเล็กตรอน (Electron paramagnetic resonance: EPR) ได้แก่ 1.คอปเปอร์ T1 (Type-1-copper) เป็นคอปเปอร์สีน้ำเงิน มีการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 600- 610 นาโนเมตร ซึ่งเกิดจากพันธะโคเวเลนต์ระหว่างคอปเปอร์กับซิสเทอีน โดยคอปเปอร์ T1 จะมีการโคออร์ดิเนตสามตำแหน่งระหว่างฮิสทีดีน 2 โมเลกุล กับซิสเทอีน 1 โมเลกุล ซึ่งแลคเคสจากแบคทีเรียในแกนนี้จะเป็นเมไทโอนีน และในราจะเป็นลิวซีนหรือฟีนิลอะลานีน 2. คอปเปอร์ T2 (Type-2-copper) คอปเปอร์กลุ่มนี้จะดูดกลืนแสงได้เพียงเล็กน้อยในช่วง UV-visible แต่มีสัญญาณ EPR โดยคอปเปอร์ T2 จะมีการโคออร์ดิเนตระหว่างฮิสทีดีน 2 โมเลกุล และ 3. คอปเปอร์ T3 (Type-3-copper) คอปเปอร์กลุ่มนี้จะมีอะตอมอยู่กันเป็นคู่ (spin-coupled) ระหว่างคอปเปอร์กับคอปเปอร์ โดยจะดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร และมีการโคออร์ดิเนตของฮิสทีดีน 6 โมเลกุล โดยคอปเปอร์ T2 และ T3 จะเชื่อมต่อกันในรูปของ trinuclear center (Prajapati and Minocheherhomji, 2018) ตำแหน่งคอปเปอร์ของแลคเคสจาก *Bacillus subtilis* แสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างตำแหน่งคอปเปอร์ของแลคเคสจาก *Bacillus subtilis*
 ที่มา : (Claus, 2004)

2.3 กลไกการเร่งปฏิกิริยาแลคเคส

กลไกการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคส เริ่มจากสารตั้งต้นถูกรีดิวซ์ที่ตำแหน่งคอปเปอร์ T1 จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนไปยังบริเวณ trinuclear ของคอปเปอร์ T2/T3 ซึ่งคอปเปอร์ T2/T3 จะทำหน้าที่รีดิวซ์โมเลกุลออกซิเจนให้กลายเป็นน้ำ (Prajapati and Minocheherhomji, 2018)



ภาพที่ 3 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคส

ที่มา : (Prajapati and Minocheherhomji, 2018)

2.4 แลคเคสในอุตสาหกรรม

2.4.1 อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ

อุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษในขั้นตอนการเตรียม การแยก และการสลาย ลิกนินของเยื่อไม้ โดยทั่วไปจะใช้คลอรีนหรือสารออกซิแดนท์ที่ใช้ออกซิเจนเพื่อแยกและย่อยสลาย ลิกนินในเยื่อไม้ วิธีนี้ส่งผลให้เกิดสารประกอบแฮลิไฟด์และอะโรมาติกของคลอรีนที่มีความเป็นพิษ อย่างรุนแรงและเป็นสารก่อมะเร็ง แต่การใช้เอนไซม์ฟอกเยื่อกระดาษที่ปราศจากคลอรีนพบว่าเยื่อ กระดาษที่ผ่านกระบวนการฟอกมีปริมาณลิกนินต่ำและช่วยลดมลพิษที่เกิดจากสารประกอบอินทรีย์ที่มี คลอรีนเป็นองค์ประกอบ (chloroorganics) ดังนั้นการใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจึงเป็นทางเลือก ใหม่ในอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ (Muthukumar and Sevanan, 2014) จากรายงาน วิจัยในกระบวนการผลิตกระดาษพบว่ามีการใช้แลคเคสที่ผลิตจาก *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 ร่วมกับ ABTS และ HOBT (hydroxybenzotriazole) ซึ่งเป็นตัวกลาง รีดอกซ์ (redox mediator) ในกระบวนการฟอกขาวของยูคาลิปตัส (Arias *et al.*, 2003) นอกจากนี้ ยังนำแลคเคสจากราขาวไปใช้ในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษทางชีวภาพ เพื่อย่อยสลายลิกนิน และ ลดปริมาณ kappa number โดยวัดจากปริมาณลิกนินที่เหลืออยู่ (Camarero *et al.*, 2007)

2.4.2 การบำบัดน้ำทิ้งและการลดปริมาณสีย้อมในน้ำทิ้ง

การลดสีของน้ำทิ้งจากกระบวนการย้อมสีเป็นกระบวนการที่น่าสนใจและท้าทายต่ออุตสาหกรรมสิ่งทอ โดยศักยภาพของการลดสีที่ดีของจุลินทรีย์ผลิตแลคเคส ทำให้อุตสาหกรรมต่างๆ สนใจนำจุลินทรีย์ไปใช้เป็นเครื่องมือในกระบวนการลดสีได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีงานวิจัยการใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตแลคเคสจาก *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus niger* ในการการลดสีพบว่าสามารถลดสีได้ดีและมีประสิทธิภาพ โดยสามารถใช้ได้ทั้งเชื้อแบบเดี่ยวและแบบผสม (Hu *et al.*, 2011) และมีงานวิจัยพบว่าแลคเคสจากราฟูขาว (white rot) และแลคเคสจาก *Ganoderma cupreum* AG-1 ที่แยกได้จากไม้ผุสามารถกำจัดสีย้อมได้ดี (Gahlout *et al.*, 2013)

2.4.3 อุตสาหกรรมสิ่งทอ

แลคเคสได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์เพื่อปรับปรุงความขาวในการฟอกสีเดิมจากผ้าฝ้ายและยังมีการนำไปใช้งานด้านอื่นๆ เช่น การทำ Biostoning สำหรับผ้ายีนส์ โดยแลคเคสยังสามารถนำมาใช้กับสารสีย้อมเพื่อให้การย้อมสีผ้ามีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น และแลคเคสยังมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ด้านการทำความสะอาด เช่น ฝ้า และเป็นส่วนผสมในน้ำยาล้างจาน โดยแลคเคสอาจอยู่ในส่วนผสมของสูตรของสารทำความสะอาดเพื่อขจัดสิ่งสกปรกบนผ้า เช่น เสื้อผ้า ผ้าม่าน หรือพรม เป็นต้น (Madhavi and Lele, 2009)

2.4.4 การบำบัดฟื้นฟูทางชีวภาพ (Bioremediation)

การย่อยสลายทางชีวภาพเป็นกระบวนการกำจัดสารประกอบที่ละลายได้ยากออกจากสิ่งแวดล้อม ในวิธีการบำบัดทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์กำจัดสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนโดยการเผาผลาญให้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยในช่วงที่ผ่านมา มีงานวิจัย ที่ชี้ให้เห็นว่าแลคเคสจากราสามารถนำมาบำบัดน้ำเสียเพื่อกำจัดสารปนเปื้อนซึ่งเป็นสาเหตุของมลพิษในสิ่งแวดล้อมได้ดี (Prajapati and Minocheherhomji, 2018)

2.4.5 อุตสาหกรรมอาหาร

ในอาหารและเครื่องดื่มต่างๆ มักมีคาร์โบไฮเดรต กรดไขมันไม่อิ่มตัว สารประกอบฟีนอลและโปรตีนที่มีหมู่ไทออล (thiol) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งส่วนใหญ่มักเป็นสารตั้งต้นของแลคเคส (Kirk *et al.*, 2002) ดังนั้นจึงทำให้แลคเคสเป็นที่สนใจและเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้ปรับปรุงคุณภาพอาหารและเครื่องดื่ม โดยกระบวนการผลิตไวน์อ่อนพบว่าไวน์จะมีปริมาณฟีนอลสูง ทำให้มีผลต่อสี กลิ่น และรสชาติของไวน์ ดังนั้นเมื่อนำแลคเคสมาปรับปรุงคุณภาพ ทำให้สามารถกำจัดฟีนอลและทำให้สีของไวน์มีความเสถียรมากขึ้น (Ribeiro *et al.*, 2010) นอกจากนี้ใน

กระบวนการผลิตไวน์ยังมีการปล่อยน้ำเสียออกสู่แหล่งน้ำซึ่งมีความเป็นพิษ โดยแลคเคสสามารถกำจัดความเป็นพิษที่เกิดขึ้นได้ (Muthukumar and Sevanan, 2014)

2.5 แหล่งที่มาแลคเคส

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ และมีการวิเคราะห์โครงสร้างของพืชซึ่งยืนยันได้ว่าแลคเคสในพืชมีหน้าที่ร่วมในขั้นตอนของการสร้างลิกนิน (lignification) โดยพืชที่ผลิตแลคเคสได้แก่ *Rhus vernicifera* (Reinhammar, 1970), *Pinus taeda* (O'Malley et al., 1993), *Acer pseudoplatanus* (Sterjiades et al., 1993) และ *Populus euramericana* (Ranocha et al., 1999) เป็นต้น

ราขาวที่อยู่ในเนื้อไม้และในดิน จัดเป็นแหล่งผลิตแลคเคสที่ดีที่สุด จากงานวิจัยที่ผ่านมาที่ผลิตแลคเคสได้ ได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium* (Kersten and Cullen, 2007), *Coriolus hirsutus* (Shin and Lee, 2000), *Pleurotus ostreatus* (El-Batal et al., 2015) และ *Trametes versicolor* (Han et al., 2006) เป็นต้น

แบคทีเรียผลิตแลคเคสที่พบรายงานได้แก่ *Bacillus subtilis* (Lei Wang et al., 2010), *Streptomyces lavendulae* (Suzuki et al., 2003) และ *Marinomonas mediterranea* (Sanchez-Amat et al., 2001) เป็นต้น ซึ่งแลคเคสจากแบคทีเรียอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ เช่น การออกซิเดชันของแมงกานีส การสร้างเม็ดสีของเซลล์ การผลิตเมลานิน และการสร้างสัญญาณวิทยา แลคเคสจากแบคทีเรียมักจะมีเสถียรที่อุณหภูมิ pH และความเข้มข้นเกลือที่สูง (Prajapati and Minocheherhomji, 2018)

2.6 การแยกบริสุทธิ์แลคเคส

เอนไซม์ที่ผลิตจากเซลล์จะประกอบด้วยสารประกอบอื่นๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ดังนั้นจึงต้องแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ที่ต้องการก่อนศึกษา เพื่อลดการรบกวนจากเอนไซม์อื่น การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ที่สนใจออกจากโปรตีนอื่นๆ ที่ปนเปื้อนจะอาศัยความแตกต่างของสมบัติทางกายภาพและทางเคมี รวมถึงลักษณะจำเพาะของเอนไซม์ซึ่งได้แก่ ความแตกต่างของขนาดโมเลกุล ประจุบนโมเลกุล เป็นต้น จากข้อมูลการรายงานผลการศึกษการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ สรุปได้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 กระบวนการแยกบริสุทธิ์ และลักษณะบางประการของแลคเคสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

แหล่งเอโนไซม์	ขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์	MW (kDa)	Optimum conditions		สารตั้งต้น (Substrate)	Yield (%)	Purification fold	เอกสารอ้างอิง
			Temperature (°C)	pH				
Fungal Laccase								
<i>Trametes versicolor</i>	80% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄							
	Precipitation							
	DEAE sepharose	97	50	3	ABTS	6.2	209.06	(Han et al., 2006)
	Phenyl sepharose Superdex G-100							
<i>Trichoderma harzianum</i>	Ultrafiltration							
	Sephadex G-100	79	35	4.5	ABTS	0.39	151.7	(Sadhasivam et al., 2008)
	Concanavalin-A							
<i>Aspergillus nidulans</i>	40% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄							
	Precipitation							
	DEAE sepharose	80	55	6.5	DMP	9	557.3	(Scherer and Fischer, 1998)
	Mono Q (pH 6) Mono S Mono Q (pH 5)							

ABTS หมายถึง 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)

DMP หมายถึง 2,6-dimethoxyphenol

ตารางที่ 1 (ต่อ) กระบวนการแยกบริสุทธิ์ และลักษณะบางประการของเอนไซม์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

แหล่งเอนไซม์	ขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์	MW (kDa)	Optimum conditions		สารตั้งต้น (Substrate)	Yield (%)	Purification fold	เอกสารอ้างอิง
			Temperature (°C)	pH				
Fungal Laccase								
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Ultrafiltration	81	50	4	ABTS	47	36	(Eggert et al., 1996)
	DEAE sepharose							
	Butyl toyopearl							
	Sephacryl S-400							
<i>Magnaporthe grisea</i>	Ultrafiltration	70	30	6	syringaldazine	11.9	282	(Iyer and Chattoo, 2003)
	QMA-Accell							
	Sephadex G-75							
<i>Scytalidium thermophilum</i>	70% (v/v) acetone	82	80	5	DMP	30	7.9	(Ben Younes and Sayadi, 2011)
	Precipitation							
	Sephacryl S-200							
	MonoQ							
	MonoQ HR							
Superdex 200								

ตารางที่ 1 (ต่อ) กระบวนการแยกบริสุทธิ์ และลักษณะบางประการของแลคเตสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

แหล่งเอนไซม์	ขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์	MW (kDa)	Optimum conditions		สารตั้งต้น (Substrate)	Yield (%)	Purification fold	เอกสารอ้างอิง
			Temperature (°C)	pH				
Bacterial laccases								
<i>Streptomyces lavendulae</i>	80% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄	73	50	4.5	catechol	9	261	(Suzuki et al., 2003)
	Precipitation							
	DEAE sepharose hydroxyapatite							
	Sephadex G-150							
<i>Bacillus vallismortis</i>	80% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄	55	80	5	ABTS	29.4	15.2	(Zhang et al., 2013)
	Precipitation							
	DEAE sephadex							
	Sephadex G-100							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50% (v/v) acetone	43	40	8	ABTS	43.26	2.51	(Thirunavukkarasu et al., 2014)
	Precipitation							
	Sephadex G-100							
	DEAE sephadex							

ตารางที่ 1 (ต่อ) กระบวนการแยกบริสุทธิ์ และลักษณะบางประการของแลคเคสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

แหล่งเอนไซม์	ขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์	MW (kDa)	Optimum conditions		สารตั้งต้น (Substrate)	Yield (%)	Purification fold	เอกสารอ้างอิง
			Temperature (°C)	pH				
Bacterial laccases								
<i>Bacillus vallismortis</i>	80% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄	55	85	4.8	ABTS	29.40	15.20	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
	Precipitation							
	DEAE-Sephadex A-50							
	Sephadex G-100							
<i>Bacillus tequilensis</i>	60% (v/v) acetone	32	85	8	DMP	28.46	13.34	(Sondhi <i>et al.</i> , 2014)
	Precipitation							
	Sephadex G-150							
	DEAE sepharose							
	Ultrafiltration							
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	DEAE sepharose	70	80	5.5	syringaldazine	19.5	81	(Pawlik <i>et al.</i> , 2016)
	Cu-Chelating sepharose							
	PBE-94 chromatofocusing							

2.7 ลักษณะบางประการของแลคเคสบริสุทธิ์

ลักษณะจำเพาะของเอนไซม์ (enzyme characterization) หมายถึง ลักษณะเฉพาะตัวของเอนไซม์ที่มีความจำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เพื่อเป็นข้อมูลการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสม และมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยจะศึกษาลักษณะ ดังนี้

2.7.1 ค่า pH ที่เหมาะสม (optimum pH)

การศึกษาค่า pH ที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงที่สุด ซึ่งในการศึกษาทำได้โดยละลายสารตั้งต้นของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ โดยค่า pH ที่ทำให้กัมมันตภาพของเอนไซม์มีค่าสูงสุด คือค่า pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อใช้ syringaldazine เป็นสารตั้งต้นแลคเคสจะมี pH ที่เหมาะสมในช่วง 3–8 (Cordi *et al.*, 2014) แลคเคสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* MTCC 2414 พบว่ามี pH ที่เหมาะสมในช่วง 5–7 (Mishra and Srivastava, 2016)

2.7.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature)

อุณหภูมิที่เหมาะสม คืออุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงที่สุด ซึ่งการศึกษาก็จะมีคล้ายกับการหาค่า pH ที่เหมาะสม โดยจะศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่มีค่า pH ที่เหมาะสม ซึ่งจะบ่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ โดยอุณหภูมิที่สามารถทำให้กัมมันตภาพของเอนไซม์มีค่าสูงสุด คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ มีรายงานวิจัยการศึกษาแลคเคสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 75 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และนอกจากนี้ยังมีรายงานแลคเคสที่ผลิตจาก *Marasmius quercophilus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 60 องศาเซลเซียส (Muthukumar and Sevanan, 2014)

2.7.3 ความจำเพาะกับสารตั้งต้น (substrate)

เอนไซม์แต่ละชนิด จะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) และโครงสร้างโมเลกุลของสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามพบการรายงานว่แลคเคสมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่หลากหลาย และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ โดยสารประกอบฟีนอล guaiacol และ 2,6-dimethoxyphenol (DMP) เป็นสารตั้งต้นที่ดีสำหรับแลคเคส และสารไดฟีนอล (diphenol) ก็ยังเป็นสารตั้งต้นที่ดีเช่นกัน ได้แก่ hydroquinone และ catechols เป็นต้น (Durán *et al.*, 2002)

2.7.4 ตัวยับยั้ง (inhibitor) และ ตัวกระตุ้น (activator)

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อาจถูกยับยั้ง โดยสารยับยั้งบางชนิดไม่ว่าจะเป็นโลหะหนัก หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายสารตั้งต้น (substrate analog) และสารบางชนิดสามารถกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้จากรายงานการศึกษาพบว่า azide, thioglycolic acid, dithyldithiocarbamic และ EDTA สามารถยับยั้งกัมมันตภาพแลคเคสได้ และยังพบว่าไอออนโลหะสามารถกระตุ้นหรือยับยั้งกัมมันตภาพแลคเคสได้เช่นกัน โดยมีรายงานการศึกษาแลคเคสจาก *Lentinula edodes* พบว่ากัมมันตภาพแลคเคสสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วย 10 mM Cu^{2+} แต่ถูกยับยั้งโดย 1 mM Ca^{2+} and Zn^{2+} (Palmieri *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาแลคเคสที่ผลิตจาก *Stenotrophomonas maltophilia* AAP56 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในดินโดยพบว่ากัมมันตภาพแลคเคสถูกกระตุ้นได้ด้วย 10 mM Cu^{2+} และถูกยับยั้งโดย 10 mM Fe^{2+} , Zn^{2+} และ 5 mM EDTA (Galai *et al.*, 2008)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Bacillus vallismortis* โดย ในกระบวนการแยกบริสุทธิ์จะผ่านการตกตะกอนด้วย 80% (w/v) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้ DEAE- Sephadex A-50 และวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีโดยใช้ Sephadex G-100 พบว่าแลคเคสที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 15.2 เท่า และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 55 kDa เอนไซม์ยังมีกัมมันตภาพเหลืออยู่มากกว่า 50% เมื่อปมที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 ชั่วโมง และยังมีควมเสถียรในช่วง pH ที่กว้าง นอกจากนี้ยังได้ศึกษาพลจลศาสตร์พบว่า ABTS เป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสม โดยมีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 22.7 μmol และ 3.32 $\mu\text{mol}/\text{min}$ ตามลำดับ (Zhang *et al.*, 2013)

แลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ WT ที่คัดแยกได้จากทะเลสาบ Urmia และ Hypersaline ในประเทศอิหร่าน โดยแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ WT มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 180 kDa ซึ่งผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอนด้วย 95% (w/v) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้ Q-Sepharose แลคเคสมีสารตั้งต้นที่เหมาะสมคือ syringaldazine และ 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) ซึ่ง มีสภาวะเหมาะสมที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และค่า pH เท่ากับ 5.0 และ 8.0 ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์ยังถูกกระตุ้นได้ด้วย 1 mM ของ Na^+ และ Ni^{2+} โดยมีกัมมันตภาพเพิ่มขึ้น 12 % และสามารถทนต่อสภาวะที่มี NaCl ความเข้มข้น 600-800 mM ได้ดี และแลคเคสถูกยับยั้งได้ด้วย

1mM L-Cysteine ผลจากการศึกษาค่า K_m ของเอนไซม์บริสุทธิ์เมื่อใช้ ABTS และ syringaldazine เป็นสารตั้งต้น พบว่ามีค่าเท่ากับ 132.7 และ 3.7 μM โดยมีค่า k_{cat} สำหรับ ABTS และ syringaldazine เท่ากับ 309 และ 51 s^{-1} ตามลำดับ (Siroosi *et al.*, 2016)

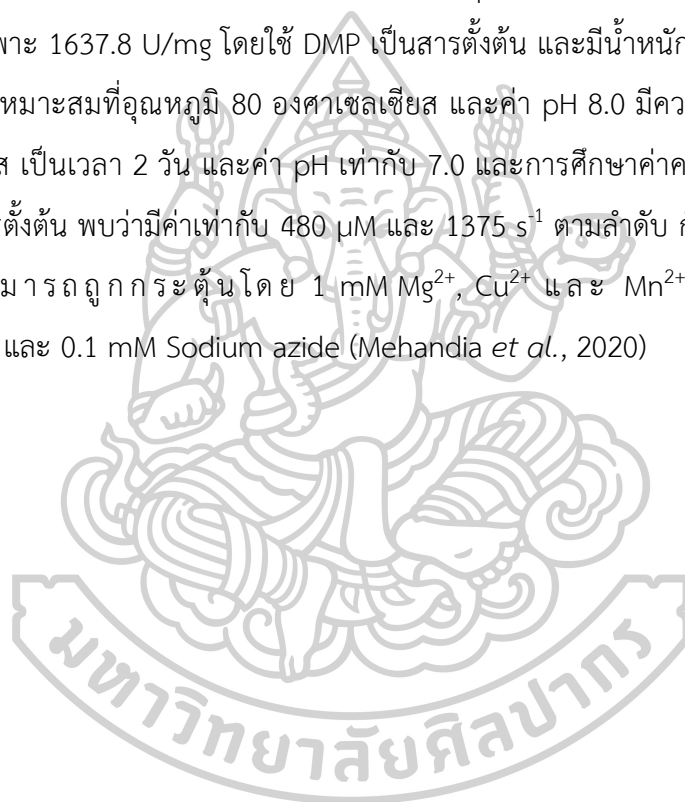
การแยกบริสุทธิ์แลคเคสที่ผลิตจาก *Fusarium solani* สายพันธุ์ MAS2 โดยผ่านคอลัมน์ HiTrap DEAE FF และ Sephacryl S-200 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าแลคเคสจาก *Fusarium solani* สายพันธุ์ MAS2 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 72 kDa โดยเอนไซม์มีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเร่งปฏิกิริยาที่ pH 3.0 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่ pH 3-11 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์มีกัมมันตภาพคงเหลือ 46.2–97.2% เมื่อบ่มใน 20 mM Pb^{2+} , Ni^{2+} และ Cr^{3+} ซึ่งกัมมันตภาพของเอนไซม์สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วย 20 mM Hg^{2+} นอกจากนี้เอนไซม์ยังคงมีกัมมันตภาพมากกว่า 50% ในสารละลาย 5% (v/v) acetone, acetonitrile, dimethyl sulphoxide (DMSO), ethanol จากคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้แลคเคสเหมาะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพและสิ่งแวดล้อม (Wu *et al.*, 2010)

การแยกบริสุทธิ์ manganese peroxidase (MnP) จาก *Schizophyllum commune* สายพันธุ์ IBL-06 และนำมาแยกบริสุทธิ์โดย วิธีตกตะกอนด้วย 30% (w/v) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีโดยใช้ Sephadex G-100 ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.8 เท่า มี yield 22% มีค่ากัมมันตภาพจำเพาะ 506 U/mg โดยเอนไซม์มีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเร่งปฏิกิริยาที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 40 kDa กัมมันตภาพของเอนไซม์บริสุทธิ์สามารถถูกกระตุ้นโดย 1-5 mM Cu^{2+} และ Mn^{2+} และถูกยับยั้งโดย 1-5 mM Ca^{2+} , EDTA, TEMED, β -mercaptoethanol, Ag^+ และ Pb^{2+} ซึ่งผลจากการศึกษา ค่าคงที่ K_m และ V_{max} เมื่อใช้ DMP เป็นสารตั้งต้น พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.4 mM และ 410 mM/min ตามลำดับ (Asgher *et al.*, 2013)

แลคเคสจาก *Bacillus tequilensis* สายพันธุ์ SN4 ที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง และทนต่อความเปลี่ยนแปลง โดยพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 32 kDa เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ทั้งในสภาวะที่มีสารประกอบฟีนอลและสารประกอบที่ไม่ใช่ฟีนอล เอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงสุด (k_{cat}/K_m) เมื่อใช้ 2,6-dimethoxyphenol (DMP) เป็นสารตั้งต้น โดยแลคเคสมีสภาวะเหมาะสมที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ซึ่งยังมีค่ากัมมันตภาพสูงถึง 80% ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และมีสภาวะเหมาะสมที่ pH 8.0 ซึ่งยังมีค่ากัมมันตภาพสูงถึง 75% ที่ pH 9.0 นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งกัมมันตภาพของแลคเคสถูกยับยั้งด้วย 1-5 mM Cysteine, Dithiothreitol และ β -mercaptoethanol

แลคเคสมีความเสถียรในสภาวะที่มีไอออนโลหะและสารลดแรงตึงผิว ซึ่งลักษณะที่มีความเสถียรภาพในสภาวะที่รุนแรง เช่น อุณหภูมิสูง pH ไอออนและสารลดแรงตึงผิว ทำให้แลคเคสจาก *Bacillus tequilensis* สายพันธุ์ SN4 มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (Sondhi *et al.*, 2014)

การแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Alcaligenes faecalis* สายพันธุ์ FX1 โดยผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอนด้วย 80% (w/v) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้ DEAE-Cellulose พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.8 เท่า มี yield 12% มีค่ากัมมันตภาพจำเพาะ 1637.8 U/mg โดยใช้ DMP เป็นสารตั้งต้น และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 71 kDa โดยมีสภาวะเหมาะสมที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และค่า pH 8.0 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน และค่า pH เท่ากับ 7.0 และการศึกษาค่าคงที่ K_m และ k_{cat} เมื่อใช้ DMP เป็นสารตั้งต้น พบว่ามีค่าเท่ากับ $480 \mu\text{M}$ และ 1375 s^{-1} ตามลำดับ กัมมันตภาพของเอนไซม์บริสุทธิ์สามารถถูกกระตุ้นโดย 1 mM Mg^{2+} , Cu^{2+} และ Mn^{2+} และถูกยับยั้งโดย 1 mM EDTA และ $0.1 \text{ mM Sodium azide}$ (Mehandia *et al.*, 2020)



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา

จุลินทรีย์ผลิตแลคเคสที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม (Supatra, 2017)

3.2 โปรตีนมาตรฐาน (Standard Protein Marker)

Protein Marker Broad Range 10-250 kDa (Bio-Rad, USA)

3.3 สารเคมี (บริษัทผู้ผลิต)

1. Guaiacol (Sigma-Alorich, China)
2. Peptone (Sisco Research Laboratories, India)
3. Glucose ($C_6H_{12}O_6$) (HiMedia Laboratories, India)
4. Monopotassium phosphate (KH_2PO_4) (RCI Labscan Limited)
5. Zinc sulphate ($ZnSO_4$) (RCI Labscan, Thailand)
6. K_2HPO_4 (Ajax Finechem, Australia)
7. KH_2PO_4 (RCI Labscan, Thailand)
8. Iron (II) sulfate heptahydrate ($FeSO_4$) (Sigma-Aldrich, USA)
9. Manganese (II) sulfate monohydrate ($MnSO_4$) (Ajax Finechem, Australia)
10. Magnesium sulfate ($MnSO_4$) (Sigma-Aldrich, Germany)
11. Agar (HiMedia Laboratories, India)
12. Yeast extract (HiMedia Laboratories, India)
13. Sodium hydrogen phosphate (NaH_2PO_4) (Ajax Finechem, Australia)
14. Sodium acetate (CH_3COONa) (HiMedia Laboratories, India)
15. Acetic acid (CH_3COOH) (V.S. Chem House, Thailand)
16. Hydrochloric acid (RCI Labscan Limited, Thailand)
17. 2,6-Dimrthoxyphenol (DMP) (Sigma-Aldrich, India)
18. Veratryl alcohol ($C_9H_{12}O_3$) (Sigma-Aldrich, USA)

19. Phenol red (Sigma-Aldrich, USA)
20. Syringaldazine (Chem-Imrex, USA)
21. 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) (Sigma-Aldrich, Canada)
22. *o*-Anisidine (Sigma-Aldrich, USA)
23. *p*-Anisidine (Sigma-Aldrich, USA)
24. Methyl orange
25. Congo red (Sigma-Aldrich, USA)
26. Bromocresol green (Sigma-Aldrich, USA)
27. Coomassie brilliant blue (Sigma-Aldrich, USA)
28. Tris (Amresco, USA)
29. Ammonium sulfate (Bio-Rad, USA)
30. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine) (Bio-Rad, USA)
31. CHAPS (Applichem GmbH, Spain)
32. Glycine (RCI Labscan Limited, Thailand)
33. Sodium hydroxide (Ajax Finechem, Australia)
34. Ethylene diamine tetra acetic acid disodium salt dehydrate (EDTA) (Central Drug House(P), India)
35. 2-mercaptoethanol (Bio-Rad, USA)
36. Sodium azide (Fluka Guarantee, USA)
37. Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) (Glentham Life sciences, UK)
38. Cysteine monohydrate (Bio-Rad, USA)
39. Triton x-100 (Amresco, USA)
40. Tween 80 (Amresco, USA)
41. Tween 20 (Omnipur, USA)
42. Sodium dodecyl sulfate(SDS) (Scharlab, Spain)
43. Methanol (RCI Labscan Limited, Thailand)
44. Ethanol (RCI Labscan Limited, Thailand)
45. Acetone (LKK polymer & Engineering, Thailand)

3.4 เครื่องมือ

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น ME2002E (METTLER TOLEDO, Thailand)
2. เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น ME204E (METTLER TOLEDO, Thailand)
3. Hot air oven Model ULM 500 (Mettmert, Germany)
4. Vortex รุ่น genie2 (Scientific Industries, USA)
5. ตู้ lamina flow รุ่น NU-425-300E (NuAire, USA)
6. Incubator รุ่น UN30 (Mettmert, Germany)
7. Spectrophotometer รุ่น Genesys 10s uv-vis (Thermo Fisher Scientific, USA)
8. Microcentrifuge รุ่น Microfuge16 (Beckman-Coulter, Germany)
9. Ultrasonic Cleaner รุ่น UA10MFD (WIGGENS, China)
10. Thermomixer รุ่น ThermoMixer (Eppendorf, Germany)
11. Shaking incubator รุ่น JSSI-300C (JS RESEARCH, Korea)
12. pH meter รุ่น FiveEasy (METTLER TOLEDO, Thailand)
13. Autoclave รุ่น Ss-325 (Tomy, Japan)
14. Autoclave รุ่น Ss-700 (Tomy, Japan)
15. เครื่องผลิตน้ำกลั่น รุ่น Maxima LS. Model (ELGA, UK)
16. Hot plate & Magnetic stirrer รุ่น MSH-20A (DAIHAN, Korea)
17. High speed centrifuge รุ่น Z36HK (Hermel, Germany)
18. Fast protein liquid chromatography (FPLC) รุ่น AKTAprime Plus (GE Healthcare, Sweden)
19. Microplate reader Infinite F50 (Tecan's, Austria)
20. Gel DocTM XR+ (Bio-Rad, USA)

3.5 การผลิตแลคเคสจาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P

เตรียมกล้าเชื้อโดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวของ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P บนอาหาร LB agar โดยเชื้อลงในอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และถ่ายกล้าเชื้อในชั้นแรกลงในอาหาร Production medium ที่มีองค์ประกอบดังนี้ 3.0 g/L peptone, 10 g/L glucose, 0.6 g/L KH₂PO₄, 0.4 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L Mg₂SO₄·7H₂O, 0.001 g/L ZnSO₄·7H₂O, 0.0005 g/L Fe₂SO₄·7H₂O, 0.005 g/L Mn₂SO₄·7H₂O และ 0.02% (v/v) กัวไอเอคอลล (guaiacol) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Viswanath *et al.*, 2010)

การเพาะเลี้ยง *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร โดยถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหาร Production medium ปริมาตร 450 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนและกัมมันตภาพแลคเคส

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกัมมันตภาพของแลคเคส

3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (Bradford, 1976)

การวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนโดยผสม Dye reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตรกับสารตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยคำนวณปริมาณโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA)

3.6.2 การวิเคราะห์กัมมันตภาพแลคเคส

การวิเคราะห์กัมมันตภาพแลคเคสโดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ กัวไอเอคอลล (guaiacol, Sigma), เวอราทิลแอลกอฮอล์ (veratryl alcohol, Sigma), DMP (2,6-dimethoxyphenol, Sigma), ไทโรซีน (Tyrosine, Sigma), ซิงริงกัลดาซีน (syringalgazine, Chem-Imrex), ABTS (2,2'-azino-bis (3ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), Sigma), (*o*-Anisidine, Sigma) และ (*p*-Anisidine, Sigma)

1. ไดเมทอกซีฟีนอล (2,6-dimethoxyphenol: DMP) ($\epsilon_{468} = 14,800 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$)
ดัดแปลงจาก (Wariishi *et al.*, 1992)

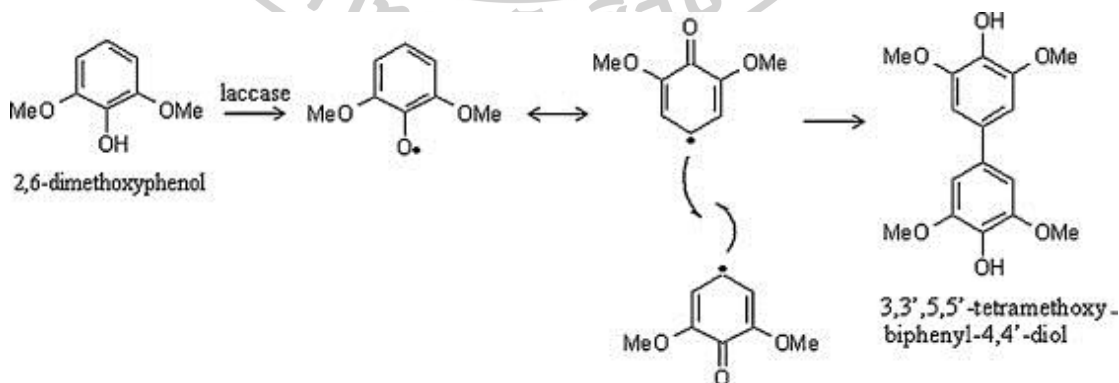
Reaction tube ประกอบด้วย 2 mM DMP ผสมกับ 10%(v/v) Absolute ethanol ใน 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน DMP โดยแลคเคสแสดงในภาพที่ 4

Inactive tube ประกอบด้วย 2 mM DMP ผสมกับ 10%(v/v) Absolute ethanol ใน 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาเติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

Blank tube ประกอบด้วย 2 mM DMP ผสมกับ 10%(v/v) Absolute ethanol ใน 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมกับ และ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/ml)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 200}{14,800 \times 1} \times \text{Dilution factor}$$

กำหนดให้ 1 หน่วยแลคเคส (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DMP 1 μmol ภายในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด



ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน DMP โดยแลคเคส
ที่มา : (Aljawish *et al.*, 2014)

2. กัวไอเอคอลล (guaiacol) ($\epsilon_{436} = 12,000 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$) ดัดแปลงจาก (Zhang *et al.*, 2013)

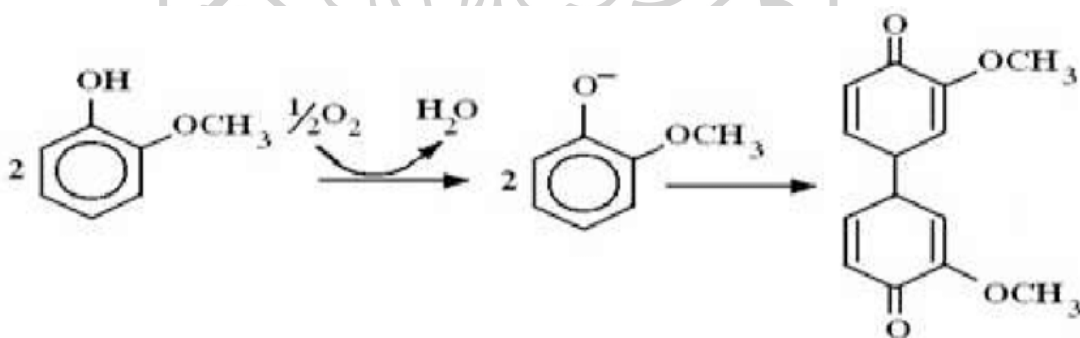
Reaction tube ประกอบด้วย 5 mM guaiacol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน guaiacol โดยแลคเคสแสดงในภาพที่ 5

Inactive tube ประกอบด้วย 5 mM guaiacol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมเอนไซม์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร

Blank tube ประกอบด้วย 5 mM guaiacol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/ml)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 200}{12,000 \times 1} \times \text{Dilution factor}$$

กำหนดให้ 1 หน่วยแลคเคส (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ guaiacol 1 μmol ภายในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด



ภาพที่ 5 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน guaiacol โดยแลคเค

ที่มา : (Shleev *et al.*, 2006)

3. เเวราทิลแอลกอฮอล์ (veratryl alcohol) ($\epsilon_{310} = 9,300 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$) ดัดแปลงจาก (Tien and Kirk, 1988)

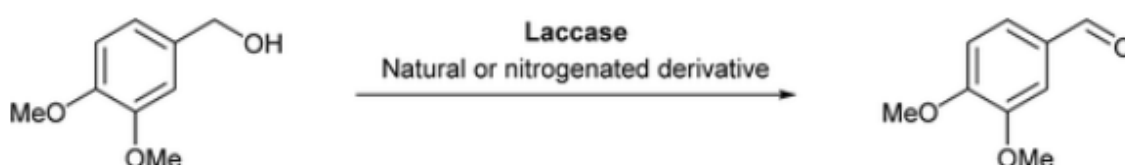
Reaction tube ประกอบด้วย 10 mM เเวราทิลแอลกอฮอล์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 2 mM) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ 2 mM H_2O_2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน veratryl alcohol โดยแลคเคส แสดงในภาพที่ 6

Inactive tube ประกอบด้วย 10 mM เเวราทิลแอลกอฮอล์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 2 mM) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ 2 mM H_2O_2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

Blank tube ประกอบด้วย 10 mM เเวราทิลแอลกอฮอล์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 2 mM) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ 2 mM H_2O_2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/ml)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 200}{9,300 \times 1} \times \text{Dilution factor}$$

กำหนดให้ 1 หน่วยแลคเคส (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ veratryl alcohol 1 μmol ภายในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด



ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน veratryl alcohol โดยแลคเคส

ที่มา : (Albarrán-Velo *et al.*, 2017)

4. ไซริงกัลดาซีน (syringaldazine : SGZ) ($\epsilon_{468} = 64,000 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$) ดัดแปลงจาก (Siroosi *et al.*, 2016)

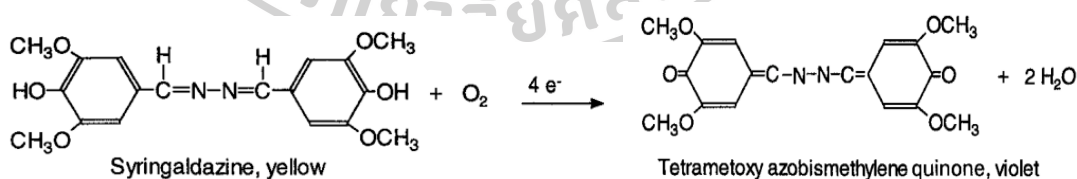
Reaction tube ประกอบด้วย 0.3 mM ไซริงกัลดาซีน ในสารละลาย DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม เอนไซม์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน syringaldazine โดยแลคเคส แสดงในภาพที่ 7

Inactive tube ประกอบด้วย 0.3 mM ไซริงกัลดาซีน ในสารละลาย DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ กับ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมเอนไซม์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

Blank tube ประกอบด้วย 0.3 mM ไซริงกัลดาซีน ในสารละลาย DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/ml)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 200}{64,000 \times 1} \times \text{Dilution factor}$$

กำหนดให้ 1 หน่วยแลคเคส (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ syringaldazine 1 μmol ภายในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด



ภาพที่ 7 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน syringaldazine โดยแลคเคส

ที่มา : (Holm *et al.*, 1998)

5. ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) ($\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$) ดัดแปลงจาก (Siroosi *et al.*, 2016)

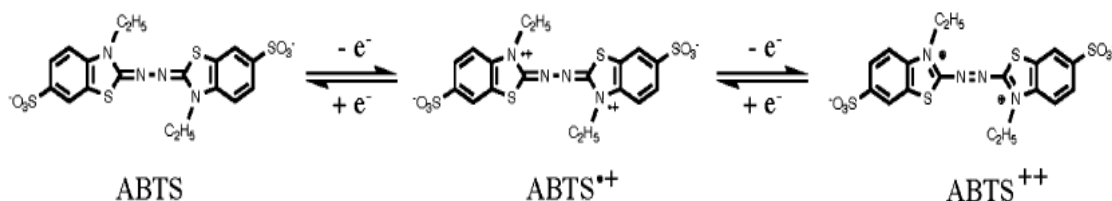
Reaction tube ประกอบด้วย 1 mM ABTS ใน 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ABTS โดยแลคเคส แสดงในภาพที่ 8

Inactive tube ประกอบด้วย 1 mM ABTS ใน 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

Blank tube ประกอบด้วย 1 mM ABTS ใน 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/ml)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 200}{36,000 \times 1} \times \text{Dilution factor}$$

กำหนดให้ 1 หน่วยแลคเคส (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ABTS 1 μmol ภายในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด



ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน ABTS โดยแลคเคส

ที่มา : (Chandra and Chowdhary, 2015)

6. ไทโรซีน (Tyrosine) ($\epsilon_{278} = 12,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ดัดแปลงจาก (Sondhi *et al.*, 2014)

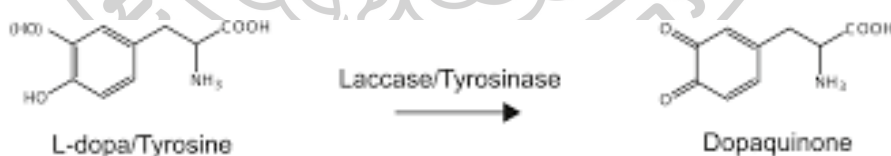
Reaction tube ประกอบด้วย 2 mM Tyrosine ละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน Tyrosine โดยแลคเคส แสดงในภาพที่ 8

Inactive tube ประกอบด้วย 2 mM Tyrosine ละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร

Blank tube ประกอบด้วย 2 mM Tyrosine ละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/ml)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 200}{12,000 \times 1} \times \text{Dilution factor}$$

กำหนดให้ 1 หน่วยแลคเคส (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Tyrosine 1 μmol ภายในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด



ภาพที่ 9 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน Tyrosine โดยแลคเคส

ที่มา : (Pombeiro-Sponchiado *et al.*, 2017)

7. *o*-Anisidine ($\epsilon_{542} = 11,300 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$) ดัดแปลงจาก (Li *et al.*, 2008)

Reaction tube ประกอบด้วย 2 mM *o*-Anisidine ละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 542 นาโนเมตร

Inactive tube ประกอบด้วย 2 mM *o*-Anisidine ละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 542 นาโนเมตร

Blank tube ประกอบด้วย 2 mM *o*-Anisidine ละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 542 นาโนเมตร

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/ml)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 200}{11,300 \times 1} \times \text{Dilution factor}$$

กำหนดให้ 1 หน่วยแลคเคส (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ *o*-Anisidine 1 μmol ภายในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

8. *p*-Anisidine ($\epsilon_{460} = 1,173 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$) ดัดแปลงจาก (Muñoz *et al.*, 1997)

Reaction tube ประกอบด้วย 2 mM *p*-Anisidine ละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

Inactive tube ประกอบด้วย 2 mM *p*-Anisidine ละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

Blank tube ประกอบด้วย 2 mM *p*-Anisidine ละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และ 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/ml)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 200}{1,173 \times 1} \times \text{Dilution factor}$$

กำหนดให้ 1 หน่วยแลคเคส (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ *p*-Anisidine 1 μmol ภายในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.7 การแยกบริสุทธิ์แลคเคส

3.7.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วย 60%(v/v) อะซิโตน(Acetone) ดัดแปลงจาก (Sondhi *et al.*, 2014)

1. คำนวณปริมาตรอะซิโตนที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน เริ่มตกตะกอนโปรตีนโดยแบ่งเติมอะซิโตนที่เย็นจัด (chilled acetone) เป็นจำนวน 4 รอบๆ ละเท่าๆ กัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งให้ตกตะกอน 1 ชั่วโมง

2. ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 15,000 $\times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสและตะกอนออกจากกัน

3. ละลายตะกอนด้วย 25 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และกัมมันตภาพแลคเคส โดยใช้ DMP เป็นสารตั้งต้น

3.7.2 Ion- exchange Chromatography
การแยกเอนไซม์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ Ion- exchange Chromatography ด้วยเครื่อง Fast Flow Protein Liquid Chromatography (FPLC) ผ่านคอลัมน์ XK26 ที่บรรจุ Q-Sephrose

1. ต่อสายคอลัมน์ XK26 ที่บรรจุ Q-Sephrose เข้าสู่เครื่อง FPLC
2. นำหัว pump A และ B ใส่ลงใน Buffer A (25 mM Tris-HCl buffer pH 7.0) และล้างเครื่องโดยการตั้งค่า pump wash โดยเลือก pump A และ B

3. ปรับสมดุลคอลัมน์ ประมาณ 2 bed volume ด้วย Buffer A อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที

4. โหลดสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 5 ml ละลายด้วย Buffer A โดยใช้อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บ fraction ละ 4 มิลลิลิตร

5. เปลี่ยนมาชะด้วย Buffer B (25 mM Tris-HCl buffer pH 7.0 + NaCl) โดยชะแบบ gradient ความเข้มข้นของ NaCl (0-1.0 M) ปริมาตร 150 ml เก็บ Fraction จนไม่ปรากฏ Peak ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

6. นำแต่ละ fraction มาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้ Buffer A เป็น blank

7. เพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบระเหิด (Freeze drier) จนเหลือปริมาตร ประมาณ 1-2 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน กัมมันตภาพของแลคเคส และนำไปแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลโครมาโตกราฟี

3.7.3 Gel filtration chromatography

การแยกโปรตีน ด้วยเจลโครมาโตกราฟี ด้วยเครื่อง Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ผ่านคอลัมน์ XK16 ที่บรรจุ Sephacryl S-200

1. ต่อสายคอลัมน์ XK16 ที่บรรจุ Sephacryl S-200 เข้าสู่เครื่อง FPLC
2. นำหัว pump A และ B ใส่ลงใน Buffer A (25 mM Tris-HCl buffer pH 7.0) และล้างเครื่องโดยการตั้งค่า pump wash โดยเลือก pump A
3. ปรับสมดุลคอลัมน์ ประมาณ 2 bed volume ด้วย Buffer A อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที
4. โหลดสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ชะโปรตีนด้วย Buffer A โดยใช้อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บ fraction ละ 3 มิลลิลิตร
5. นำแต่ละ fraction วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้ Buffer A เป็น blank นำ fraction ที่มีค่ากัมมันตภาพของแลคเคสมารวมกัน
6. เพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบระเหิด (Freeze drier) จนเหลือปริมาตร ประมาณ 2-3 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน กัมมันตภาพของแลคเคส

3.7.4 Gel filtration Standard

การแยกโปรตีน ด้วยเจลโครมาโตกราฟี ด้วยเครื่อง Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ผ่านคอลัมน์ XK16 ที่บรรจุ Sephacryl S-200

1. ต่อสายคอลัมน์ XK16 ที่บรรจุ Sephacryl S-200 เข้าสู่เครื่อง FPLC
2. นำหัว pump A และ B ใส่ลงใน Buffer A (25 mM Tris-HCl buffer pH 7.0) และล้างเครื่องโดยการตั้งค่า pump wash โดยเลือก pump A
3. ปรับสมดุลคอลัมน์ ประมาณ 2 bed volume ด้วย Buffer A อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที
4. โหลด Gel Filtration standard (BIO-RAD) ประกอบด้วย Thyroglobulin (bovine), γ -Globulin (bovine), Ovalbumin (Chicken), Myoglobin (horse) และ Vitamin B12 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และชะโปรตีนด้วย Buffer A โดยใช้อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บ fraction ละ 3 มิลลิลิตร

5. นำแต่ละ fraction วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้ Buffer A เป็น blank

7. นำไปพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรชะและหาน้ำหนักโมเลกุลของแลคเคสบริสุทธิ์จากกราฟ

3.7.5 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโปรตีนเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์

โดยวิธี Chloroform/Methanol Precipitation เพื่อเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนตัวอย่างและกำจัดสิ่งรบกวน เช่น เกลือ และสารลดแรงตึงผิวต่างๆ สำหรับนำไปใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis ดัดแปลงจาก (Wessel and Flügge, 1984)

1. ปิเปตสารละลายโปรตีนตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร
2. เติมเมทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง
3. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 g เป็นเวลา 1 นาที
5. ดูดส่วนบนทิ้งไป (โปรตีนตัวอย่างจะอยู่ระหว่างชั้นคลอโรฟอร์มกับเมทานอล)
6. เติมเมทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 xg เป็นเวลา 2 นาที

7. ดูดสารละลายส่วนบนออกให้เหลือเฉพาะตะกอน
8. เปิดฝาทิ้งไว้จนตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยหมดและเหลือเฉพาะตะกอนโปรตีน
9. ละลายตะกอนโปรตีนด้วย lysis buffer ที่มีองค์ประกอบ ดังนี้

1 M Tris-HCl	3	มิลลิลิตร
5 M NaCl	3	มิลลิลิตร
10% (w/v) CHAPS	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	84	มิลลิลิตร

10. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

3.7.6 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยเทคนิค SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis) และ Native PAGE (Native polyacrylamide Gel Electrophoresis) ดัดแปลงจาก (Sambrook *et al.*, 1989)

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของแลคเคส จะใช้ชุดอุปกรณ์ในการเตรียมแผ่นเจล คือ TGX Stain-Free™ Fastcast™ Acrylamide Kit (Bio-Rad, USA) โดยมีขั้นตอนวิธีทำ ดังนี้

1. เตรียมแผ่นกระจกโดยเช็ดแผ่นกระจกให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น
2. ทำการประกบกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกัน หลังจากนั้นเทสารละลายส่วน separating gel และ Stacking gel ตามลำดับ ลงในช่องว่างระหว่างกระจก 2 แผ่น

3. การเตรียม Separating gel สำหรับ 1 แผ่น โดยผสมสารละลาย ดังนี้

สารละลาย Resolver ส่วน A	3	มิลลิลิตร
สารละลาย Resolver ส่วน B	3	มิลลิลิตร
สารละลาย 10% (w/v) แอมโมเนียม เพอร์ซัลเฟต	30	ไมโครลิตร
TEMED	3	ไมโครลิตร

4. การเตรียม Stacking gel สำหรับ 1 แผ่น โดยผสมสารละลาย ดังนี้

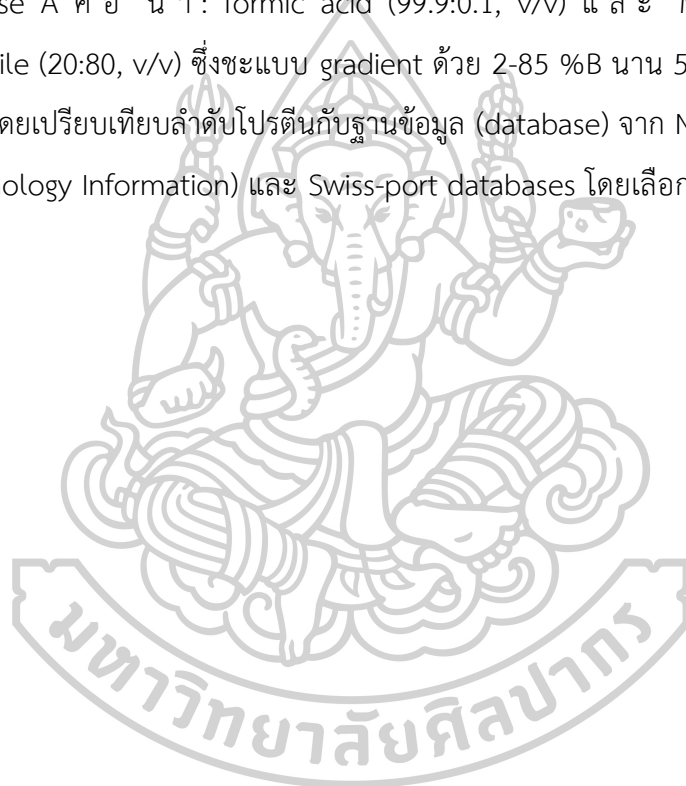
สารละลาย Stacker ส่วน A	1	มิลลิลิตร
สารละลาย Stacker ส่วน B	1	มิลลิลิตร
สารละลาย 10% (w/v) แอมโมเนียม เพอร์ซัลเฟต	10	ไมโครลิตร
TEMED	2	ไมโครลิตร

5. ใส่หวี (template comb) บนช่องว่างระหว่างกระจก ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีให้เจลแข็งตัว
6. นำแผ่นกระจกที่ได้ไปไว้ใน chamber และเติม running buffer ที่เตรียมไว้เทใน chamber

7. โหลดตัวอย่างลงในช่อง (well) โดยวิธี SDS PAGE จะผสมเอนไซม์ปริมาตร 15 ไมโครลิตรกับ 4X loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเทคนิค Native PAGE จะใช้ loading dye ที่ปราศจาก SDS และ 2-mercaptoethanol ผสมเอนไซม์ปริมาตร 15 ไมโครลิตรกับ 4X loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 30 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 45-60 นาที หลังจากนั้นย้อมแผ่นเจลด้วย coomassie brilliant blue R-250 ล้างออกด้วย destaining solution I และ destaining solution II จนแผ่นเจลใส และเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน

3.7.7 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค LC/MS

การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน (identify protein) โดยเทคนิคการ LC-MS/MS โดยศูนย์บริการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics Services Center) คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งใช้ trypsin ย่อยเอนไซม์ และวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Nano LC/MS QTOF Mass Spectrophotometer โดยระบบ LC จะทำงานร่วมกันระหว่าง captivespray ionization และ mass spectrometer (Model Q-ToF Compact II, Bruker, Germany) และใช้คอลัมน์ (Acclaim PepMap RSLC 75 $\mu\text{m}\times 15\text{ cm}$, nanoViper C18) โดย Mobile phase A คือ น้ำ : formic acid (99.9:0.1, v/v) และ Mobile phase B คือ น้ำ:acetonitrile (20:80, v/v) ซึ่งระบบ gradient ด้วย 2-85 %B นาน 50 นาที ที่อัตราการไหล 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ โดยเปรียบเทียบลำดับโปรตีนกับฐานข้อมูล (database) จาก NCBI (National Center for Biotechnology Information) และ Swiss-port databases โดยเลือกฐานข้อมูลของแลคเคส จาก *Bacillus*



3.8 ศึกษาสมบัติชีวเคมีของแลคเคสบริสุทธิ์

3.8.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์ และความเสถียรของแลคเคสที่ดัดแปลงจาก (Sondhi *et al.*, 2014)

1. ศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพ และความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์

การศึกษา pH ที่เหมาะสมที่ทำให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงโดยละลาย 2 mM DMP ผสมกับ 10%(v/v) Absolute ethanol ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่างๆ ดังนี้

ชนิดสารละลายบัฟเฟอร์	pH
25 mM Sodium acetate	3.0 - 6.0
25 mM Tris-HCl	7.0 - 9.0
25 mM glycine-NaOH	10.0 - 11.0

นำไปวัดกัมมันตภาพแลคเคส ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

การศึกษา pH ต่อความเสถียรของแลคเคสโดยบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ที่อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1:200 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน โดยวัดกัมมันตภาพแลคเคสที่เหลืออยู่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น

2. ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพและความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงที่สุดโดยละลาย 2 mM DMP ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ที่เหมาะสม ที่อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1:4 บ่มที่อุณหภูมิ 30 - 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพของแลคเคส

การศึกษาอุณหภูมิที่ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์ บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 - 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวัดกัมมันตภาพของแลคเคสที่เหลืออยู่ในช่วงเวลาต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่เวลาเริ่มต้น

3.8.2 ศึกษาผลของไอออนโลหะ สารเคมี และตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธิ ดัดแปลงจาก (Sondhi *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2010)

1. ศึกษาผลของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธิ

ศึกษาโดยเติมไอออนโลหะแต่ละชนิด (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^+ และ Ca^{2+}) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 และ 5 mM บ่มกับเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพของแลคเคสที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม(หลอดควบคุมใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนสารละลายไอออนโลหะ)

2. ศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์ต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธิ

ศึกษาโดยเติมสารยับยั้งชนิดต่างๆ คือ cysteine monohydrate , ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Sodium azide (NaN_3) และ 2-mercaptoethanol โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 และ 10 mM บ่มกับเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพของแลคเคสที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (หลอดควบคุมใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนสารยับยั้ง)

3. ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) และสารซักล้าง (detergent) ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ

ศึกษาโดยเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ ได้แก่ Triton X-100, Tween 20 และ Tween 80 และสารซักล้าง ได้แก่ SDS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 และ 10 mM บ่มกับเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพของแลคเคสที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (หลอดควบคุมใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนสารลดแรงตึงผิว และสารซักล้าง)

4. ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ

ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของเอนไซม์ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ Acetone, Dimethyl formamide (DMF), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Ethanol และ Methanol โดยบ่มเอนไซม์กับตัวทำละลายอินทรีย์ความเข้มข้น 25% และ 50% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพของแลคเคสที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (หลอดควบคุมใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนสารละลายอินทรีย์)

3.8.3 ศึกษาความจำเพาะของสารตั้งต้น (substrate) ต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธี และศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธี

ศึกษาความจำเพาะของสารตั้งต้น (substrate) ต่างๆ กัวไอเอคอล(guaiacol), เวนราทิลแอลกอฮอล์ (veratryl alcohol), DMP(2,6dimethoxyphenol), ไทโรซีน (Tyrosine), ไซริงกัลดาซีน (syringalazine), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)), p-Anisidine และ o-Anisidine โดยนำไปวัดกัมมันตภาพของแลคเคสที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสม

ในการศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคส โดยใช้สารตั้งต้น คือ 1-20 mM กัวไอเอคอล (guaiacol), 1-20 mM DMP (2,6dimethoxyphenol), 0.1-2 mM ไซริงกัลดาซีน (syringaldazine), 1-20 mM ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)), และ 1-20 mM p-Anisidine บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ของแลคเคสบริสุทธีจาก Lineweaver-Burk plot

3.8.4 ศึกษาประสิทธิภาพการลดสีบนอาหารแข็งจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P และศึกษาประสิทธิภาพการลดสีของแลคเคสบริสุทธี ดัดแปลงจาก (Bagewadi *et al.*, 2017)

ในการศึกษาประสิทธิภาพการลดสีสังเคราะห์บนอาหารแข็งของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดยสีสังเคราะห์ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ Methyl orange, Congo red, Bromocresol green และ Phenol red ความเข้มข้น 0.1 g/L (100 ppm) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบสีของอาหารแข็งที่ลดลง

ในการศึกษาประสิทธิภาพการลดสี โดยบ่มเอนไซม์กับสีสังเคราะห์ ได้แก่ Methyl orange ($\lambda_{max} = 465$ nm), Congo red ($\lambda_{max} = 490$ nm), Bromocresol green ($\lambda_{max} = 617$ nm) และ Phenol red ($\lambda_{max} = 559$ nm) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 mg/L บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดที่ความยาวคลื่นสูงสุดของสีย้อม โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดสีกับหลอดควบคุม (หลอดควบคุมใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์)

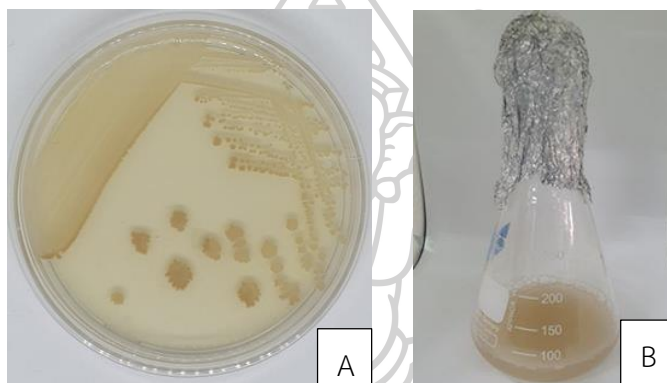
$$\text{เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี (\%)} = \frac{Ab^{\text{Control}} - Ab^{\text{Sample}}}{Ab^{\text{Control}}} \times 100$$

บทที่ 4

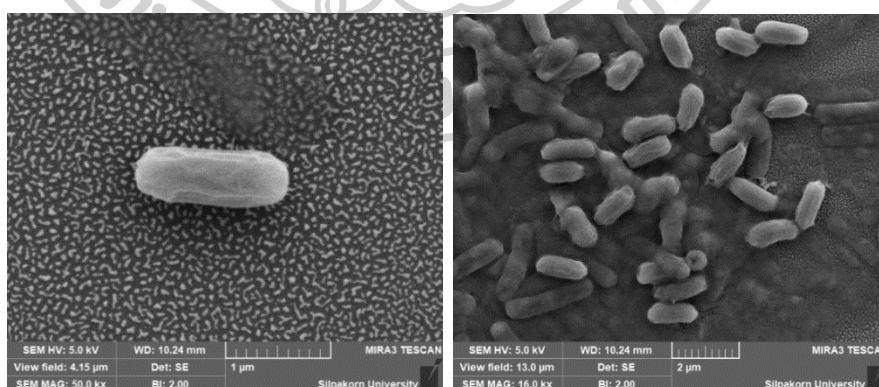
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลิตแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

แลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ที่แยกได้จากดินบริเวณพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม โดยเลี้ยงบนอาหาร Production medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อเจริญบนอาหารได้ดีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขมพูขุ่น (ภาพที่ 10) และจากการศึกษารูปร่างเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron micrograph) พบว่าเซลล์มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ขนาด 1.5 – 3 μm ดังแสดงในภาพที่ 11

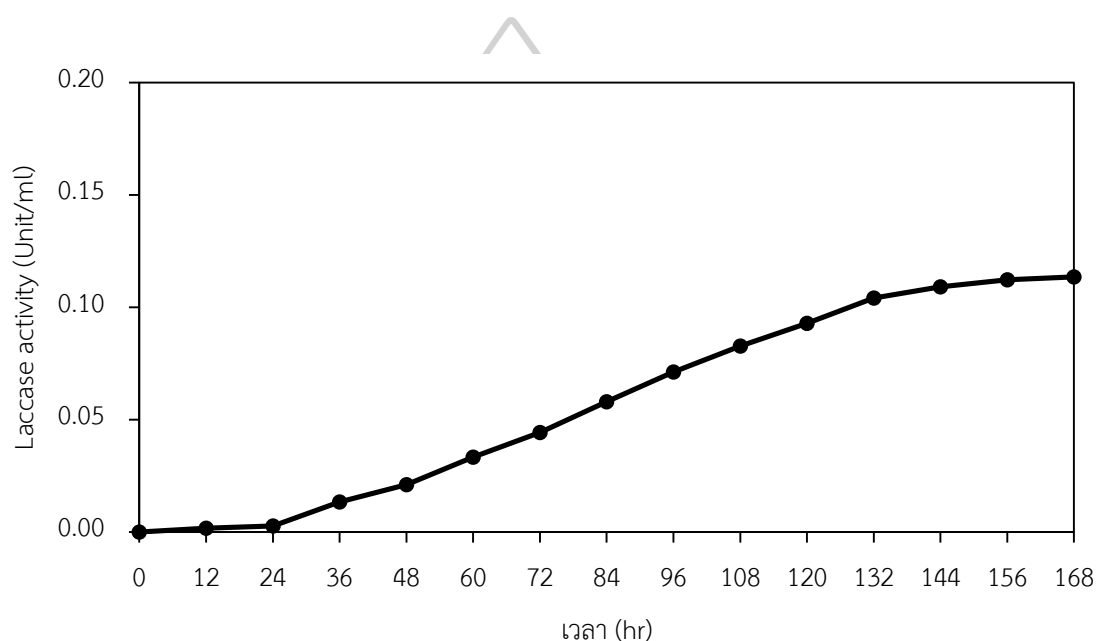


ภาพที่ 10 ลักษณะของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P บน Production medium ที่มี guaiacol เป็นสารตั้งต้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารแข็ง (A) และอาหารเหลว (B)



ภาพที่ 11 ลักษณะของเซลล์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron micrograph)

การผลิตแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ในอาหาร Production medium ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 12 โดยพบว่ามีการผลิตแลคเคสได้สูงสุดที่ 168 ชั่วโมง (7 วัน) โดยมีค่ากัมมันตภาพแลคเคสเท่ากับ 0.11 Unit/ml จากรายงานของ (Lei Wang *et al.*, 2010) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของการผลิตแลคเคสต่อการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ WD23 โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตแลคเคสได้สูงสุดในวันที่ 8 และเริ่มลดลงในวันที่ 9

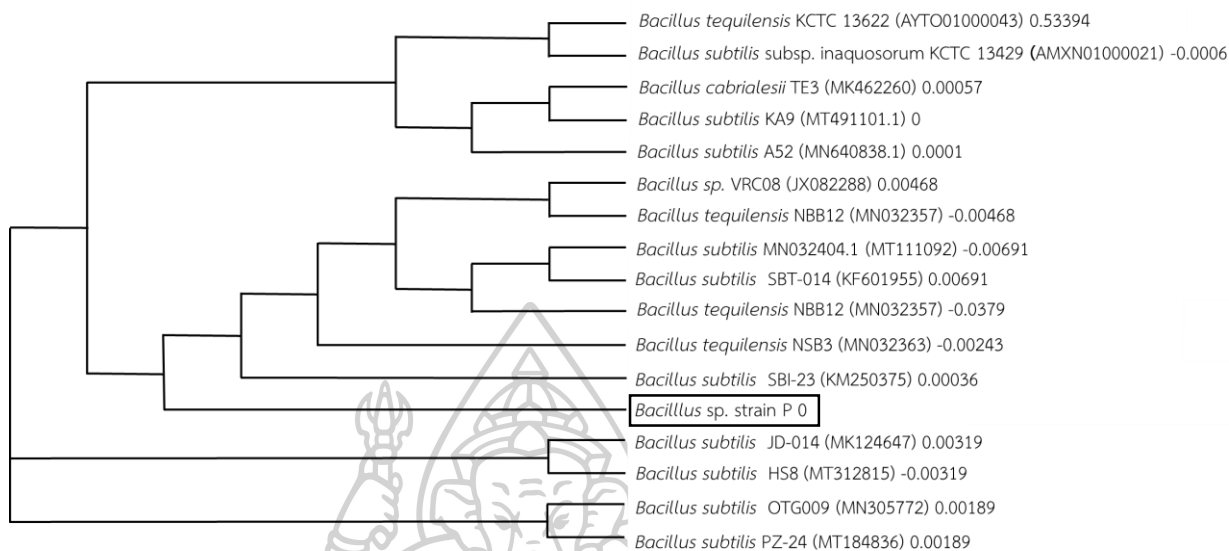


ภาพที่ 12 ผลการศึกษาการผลิตแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ในอาหาร Production medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

4.2 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยวิธี 16s rDNA

ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรีย โดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งการวิเคราะห์จะจำแนกโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA กับฐานข้อมูล ผลการวิเคราะห์พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P มีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรีย 2 สกุล ได้แก่ *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* มากที่สุด 99.93% ทำให้ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ไม่สามารถแยกความแตกต่างของแบคทีเรียทั้ง 3 สกุลออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงจัดอยู่ใน

กลุ่มของ *Bacillus* sp. โดยแผนภูมิต้นไม้ทางไฟโลเจเนติก (Phylogenetic tree) แสดงใน ภาพที่ 13



ภาพที่ 13 แผนภูมิต้นไม้ทางไฟโลเจเนติก (Phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสกุล *Bacillus* อื่นๆ

4.3 การแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

4.3.1 การผลิตแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

การผลิตแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดยเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 1 ลิตร จำนวน 4 พลาสติก ระยะเวลา 7 วัน พบว่า crude laccase มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 74 มิลลิกรัม และมีค่ากัมมันตภาพแลคเคสทั้งหมดเท่ากับ 213 U ซึ่งมีค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 2.88 U/mg protein

4.3.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วย Acetone

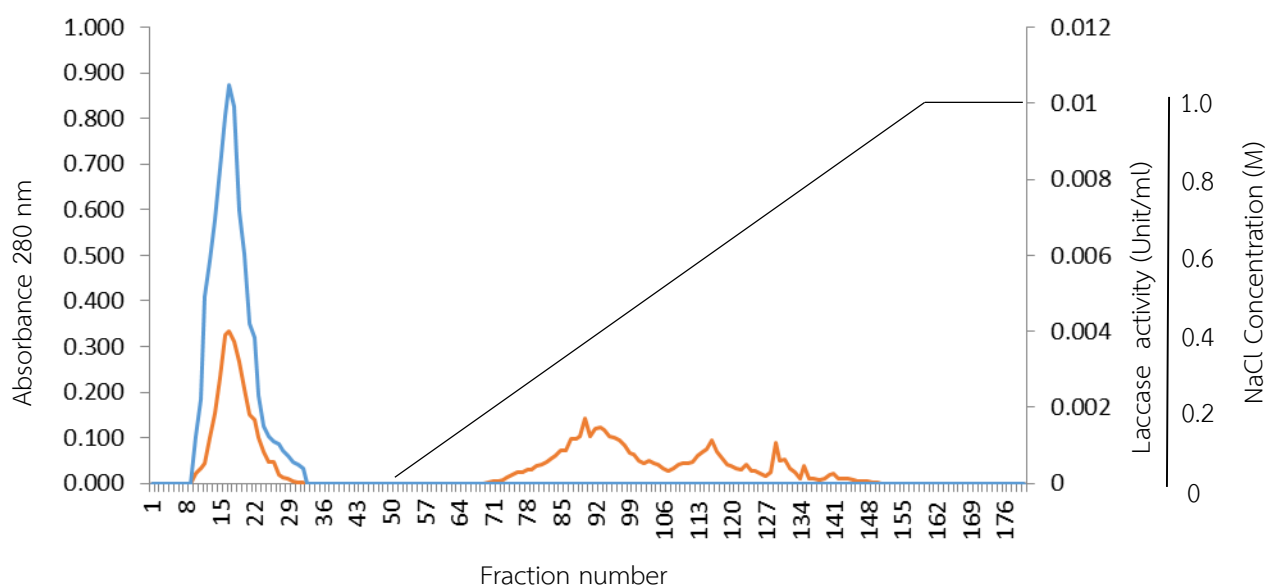
นำ crude laccase มาการตกตะกอนด้วย 60% (v/v) Acetone ในที่เย็นจัด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 20.29 มิลลิกรัม และมีค่ากัมมันตภาพทั้งหมดเท่ากับ 122.94 U มีค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 6.06 U/mg ซึ่งสูงกว่า crude laccase 2.1 เท่า

4.3.3 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วย Fast Flow Protein Liquid Chromatography (FFPLC)

4.3.3.1 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange Chromatography)

การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ Ion-exchange Chromatography โดยผ่านคอลัมน์ XK26 ที่บรรจุ Q-Sepharose ทำให้สมดุลด้วยสารละลาย 25mM Tris-HCl buffer pH 7.0 โหลดโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนด้วย 60% Acetone ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ชะ(elute) ด้วย 25mM Tris-HCl buffer pH 7.0 อัตราการไหลคงที่ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ fraction ละ 4 มิลลิลิตร และชะโปรตีนที่อยู่บนตัวกลางโดยเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ที่ละลายใน 25mM Tris-HCl buffer pH 7.0 แบบ gradient นำมาวัดค่ากัมมันตภาพแลคเคสและวัดโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm นำค่าที่ได้มาพลอตกราฟความสัมพันธ์ กับ fraction ต่างๆ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 14

จากภาพที่ 14 พบว่าใน fraction ที่ 8- 30 (Pooled1) มีกัมมันตภาพของแลคเคส โดยนำมารวมกันและเพิ่มความเข้มข้นด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dry) นำไปวัดค่ากัมมันตภาพทั้งหมดของเอนไซม์ได้เท่ากับ 18.31 U ซึ่งมีค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 30.14 U/mg และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.46 เท่า

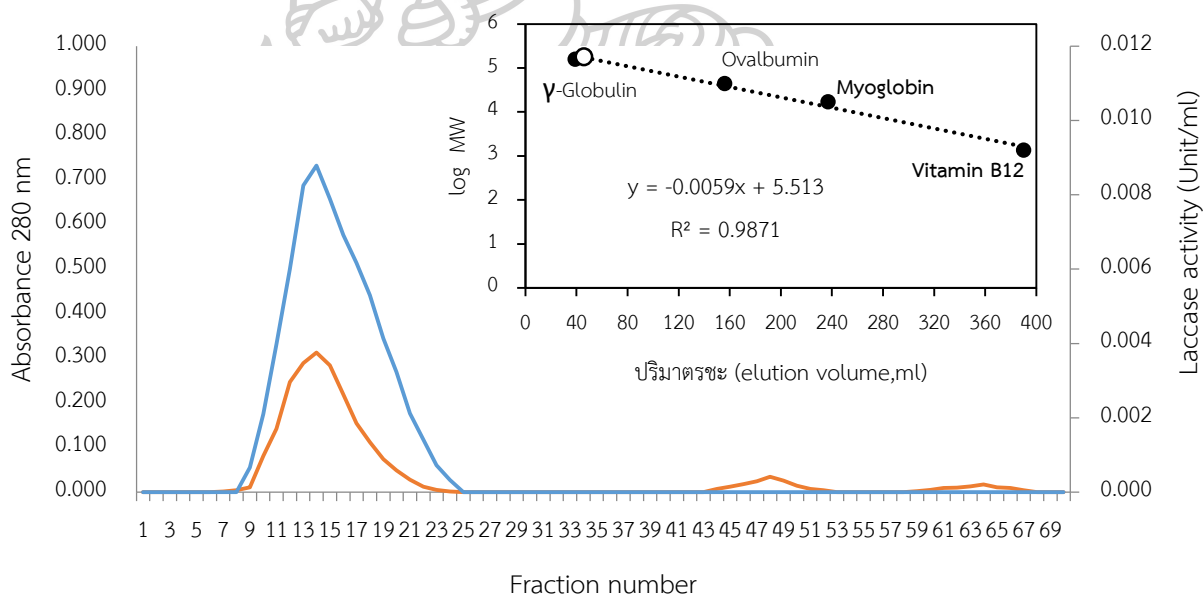


ภาพที่ 14 โครมาโตแกรมของแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ผ่านเครื่อง FPLC โดยใช้คอลัมน์ XK26 ที่บรรจุ Q-Sepharose ชะด้วยสารละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 7 แบบ gradient ที่มีความเข้มข้น 0 - 1.0 M NaCl ที่อัตราการไหล 2 ml/min เก็บ fraction ละ 4 ml (— Absorbance 280 nm, — Laccase activity (U/ml) และ — ความเข้มข้นของ NaCl (M))

4.3.3.2 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยวิธีเจลโครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography)

นำเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยผ่านคอลัมน์ XK26 ที่บรรจุ Q-Sepharose มาแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีเจลโครมาโตกราฟีโดยผ่านคอลัมน์ XK16 ที่บรรจุ Sephacryl S-200 ทำให้สมดุลด้วยสารละลาย 25mM Tris-HCl buffer pH 7.0 อัตราการไหลคงที่ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ fraction ละ 3 มิลลิลิตร นำมาวัดค่ากัมมันตภาพแลคเคสและวัดโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm นำค่าที่ได้มาพลอตกราฟความสัมพันธ์กับ fraction ต่างๆ โดยผลการทดลองแสดงในภาพที่ 15

จากภาพที่ 15 พบว่า fraction ที่ 9- 20 มีกัมมันตภาพแลคเคส โดยนำมารวมกัน และนำไปเพิ่มความเข้มข้นด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dry) นำไปวัดค่ากัมมันตภาพทั้งหมดของเอนไซม์ได้เท่ากับ 16.62 U ซึ่งมีค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 34.09 U/mg และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 11.84 เท่า และจากการทดลองพบว่าแลคเคสบริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Sephacryl S-200 โปรตีนจะถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ปริมาตรชะ 42 ml เมื่อนำไปคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของแลคเคสบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Gel filtration chromatography (ภาคผนวก ค) โดยเทียบกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับปริมาตรชะ พบว่าแลคเคสบริสุทธิ์มีมวลโมเลกุลประมาณ 184 kDa



ภาพที่ 15 โครมาโตแกรมแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ผ่านเครื่อง FPLC โดยใช้คอลัมน์ XK16 ที่บรรจุ Sephacryl S-200 ชะด้วยสารละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 7 ที่อัตราการไหล 0.3 ml/min เก็บ fraction ละ 3 ml (— Absorbance 280 nm และ — Laccase activity (U/ml)) โดย ● คือ โปรตีนมาตรฐาน และ ○ คือ แลคเคสบริสุทธิ์

4.4 การวิเคราะห์การแยกบริสุทธิ์แลคเคส

แลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P เมื่อผ่านกระบวนการแยกบริสุทธิ์ที่ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนด้วย 60% (v/v) Acetone แล้วนำไปแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Q-Sepharose จากนั้นนำไปแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลโครมาโตกราฟีโดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200 คำนวณกัมมันตภาพจำเพาะจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ (fold) และผลได้ของการแยกบริสุทธิ์ (yield) โดยแสดงผลในตารางที่ 2

จากตารางที่ 2 พบว่าหลังกระบวนการแยกบริสุทธิ์แลคเคส โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ และการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลโครมาโตกราฟีและถูกนำไปเพิ่มความเข้มข้นด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dry) ตามลำดับ แลคเคสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์พบว่ามีกัมมันตภาพแลคเคสทั้งหมดที่สูงขึ้น และมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดลดลง โดยพบว่าผลได้ (yield) ของขั้นตอนตกตะกอนด้วย 60%(v/v) Acetone พบว่า ลดลงเกือบครึ่งซึ่งมีค่าเท่ากับ 57.72% และแลคเคสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มีค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 34.09 U/mg มีค่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ (fold) เท่ากับ 11.84 เท่า และค่าผลได้ของการแยกบริสุทธิ์ (yield) เท่ากับ 7.80% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Bacillus tequilensis* SN4 (Sondhi *et al.*, 2014) จากรายงานพบว่าเมื่อแยกบริสุทธิ์ในขั้นตอนตกตะกอนด้วย 60%(v/v) Acetone จะมีผลได้ (yield) ใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ เท่ากับ 63.38% และพบว่าเมื่อผ่านการแยกบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายจะมีค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 299.04 U/mg ค่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์(fold) 28.46 เท่า และค่าผลได้ของการแยกบริสุทธิ์เท่ากับ 13.34% และจากรายงานวิจัยการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Bacillus vallismortis* fmb-103 (Zhang *et al.*, 2013) โดยมีขั้นตอนแยกบริสุทธิ์ 3 ขั้นตอน ได้แก่ วิธีแยกบริสุทธิ์ในขั้นตอนตกตะกอนด้วย 80%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต, DEAE-Sephadex A-50 และ Sephadex G-100ตามลำดับ พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (fold) เท่ากับ 15.2 เท่า ซึ่งมีค่าสูงกว่างานวิจัยนี้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์(fold) ของแลคเคสที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าสูงกว่างานวิจัยการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Pseudomonas aeruginosa* ADN04 (Thirunavukkarasu *et al.*, 2014) ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (fold) เท่ากับ 2.51 เท่า

ตารางที่ 2 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

Purification step	Volume (ml)	Activity (U/ml)	Total activity (U)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extraction	2,000.00	0.11	213.16	0.04	74.00	2.88	100.00	1.00
60%(v/v) Acetone precipitation	32.00	3.84	122.93	0.63	20.29	6.06	57.72	2.10
Q-Sepharose	7.50	2.44	18.31	0.08	0.61	30.14	8.60	10.46
Sephacryl S-200	7.50	2.22	16.62	0.07	0.49	34.09	7.80	11.84

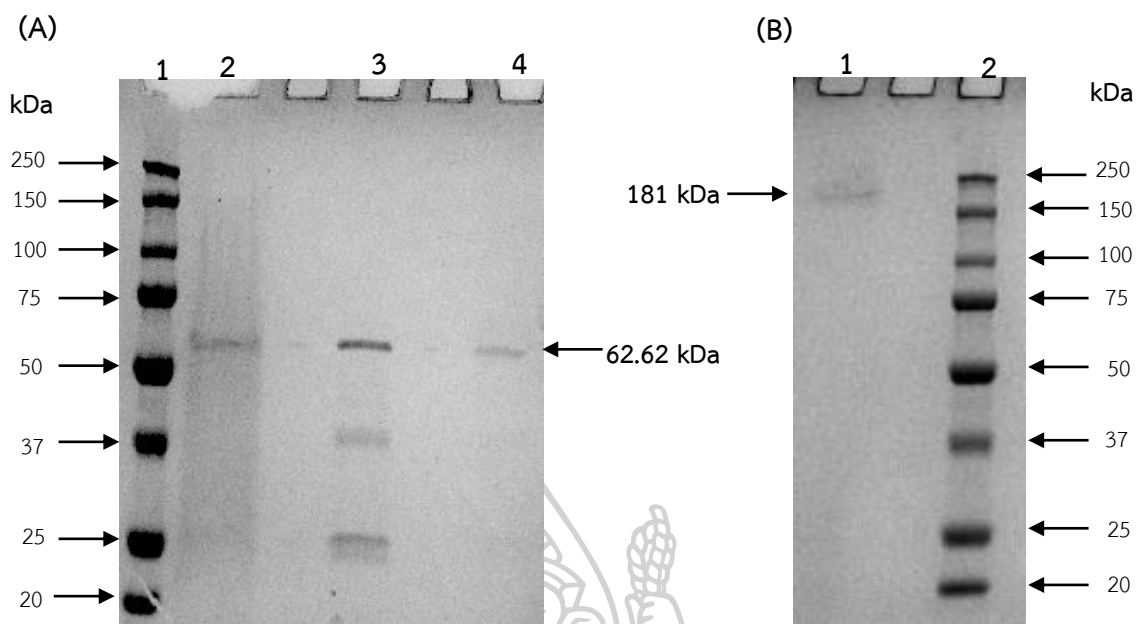
กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DMP ($E = 14,800 \text{ M}^{-1} \text{CM}^{-1}$) 1 μmol ภายในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

4.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamid Gel Eletropholysis (SDS-PAGE) และ Native Polyacrylamid Gel Eletropholysis (Native PAGE)

เมื่อนำแลคเคสที่ผ่านกระบวนการแยกบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Native PAGE ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 16

จากผลการทดลอง SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนในส่วนของ crude enzyme (แถวที่ 2) จะปรากฏแถบโปรตีนเป็นแนวยาวเนื่องจากมีโปรตีนอื่นๆปะปนอยู่มาก และเมื่อผ่านคอลัมน์ XK 26 ที่บรรจุ Q-Sepharose (แถวที่ 3) พบว่ามีขนาดแถบโปรตีนลดลง เมื่อนำไปผ่านคอลัมน์ XK 16 ที่บรรจุ Sephacryl S-200 (แถวที่ 4) พบว่าแถบโปรตีนปรากฏเพียงแถบเดียว เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (แถวที่ 1) พบว่าแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P มีมวลโมเลกุลประมาณ 62.62 kDa ซึ่งมวลโมเลกุลของแลคเคสที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะมีน้ำหนักโมเลกุล 40 -130 kDa (Prajapati and Minocheherhomji, 2018) ผลการทดลองพบว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. มีน้ำหนักมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับรายงานการวิจัยของ (Muthukumarasamy *et al.*, 2015) ซึ่งได้รายงานว่าแลคเคสจาก *Bacillus subtilis* MTCC 2414 มีน้ำหนักมวลโมเลกุลประมาณ 66.2 kDa และรายงานการวิจัยของ (Zhang *et al.*, 2013) พบว่าแลคเคสจาก *Bacillus vallismortis* fmb-103 มีน้ำหนักมวลโมเลกุลประมาณ 55 kDa

จากผลการทดลอง Native PAGE เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และจำนวนหน่วยย่อยของเอนไซม์ พบว่าโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ XK 16 ที่บรรจุ Sephacryl S-200 (แถวที่ 1B) จะปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (แถวที่ 2B) พบว่าแลคเคสบริสุทธิ์ มีมวลโมเลกุลประมาณ 181 kDa และเมื่อเทียบกับการประมาณค่ามวลโมเลกุลของแลคเคสบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Gel filtration chromatography (ภาคผนวก ค) พบว่าการประมาณค่ามวลโมเลกุลของทั้งสองวิธีมีค่าที่สอดคล้องกัน ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P มีจำนวนหน่วยย่อย (Subunit) ของเอนไซม์มากกว่า 1 หน่วย จากรายงานการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* พบว่าเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี Native PAGE มีน้ำหนักโมเลกุล 190 kDa และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE มีมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยเท่ากับ 60 kDa จึงแสดงให้เห็นได้ว่าแลคเคสมีหน่วยย่อยมากกว่า 1 หน่วย (Edens *et al.*, 1999)



ภาพที่ 16 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Native PAGE

โดย (A) SDS-PAGE

แฉวที่ 1 แฉวโปรตีนมาตรฐาน (BioRad,USA)

แฉวที่ 2 โปรตีนของ crude enzyme (60%(v/v) Acetone precipitation)

แฉวที่ 3 โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ XK 26 ที่บรรจุ Q-Sepharose Ion exchange

แฉวที่ 4 โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200

(B) Native PAGE

แฉวที่ 1 โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200

แฉวที่ 2 แฉวโปรตีนมาตรฐาน (BioRad,USA)

4.6 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS

จากการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน (identify protein) โดยเทคนิคการ LC/MS โดยศูนย์บริการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics Services Center) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยใช้เครื่อง Nano LC/MSS QTOF Mass Spectrophotometer พบว่าเมื่อเทียบกับฐานข้อมูล (database) จาก Uniprot โดยเลือกฐานข้อมูลของแลคเคสจาก *Bacillus* ซึ่งเมื่อเทียบลำดับโปรตีนพบว่ามีเหมือน 13% กับแลคเคสจาก *Bacillus velezensis* ซึ่งมีมวลโมเลกุล 58.31 kDa และมีค่า PI เท่ากับ 6.26 ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าโปรตีนที่ได้จากการศึกษานี้คือแลคเคส โดยผลการวิเคราะห์แสดงในภาพที่ 17

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: QBQ83040.1
laccase, partial [Bacillus velezensis]

Database: Laccase_bacteria_30102019
 Score: 0
 Nominal mass (M_r): 58306
 Calculated pI: 6.26

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of QBQ83040.1 against nr.](#)

Search parameters

MS data file: Fraction_I.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: **Carbamidomethyl (C)**
 Variable modifications: **Oxidation (M)**

Protein sequence coverage: 13%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MALEKFADEL PIETLQPK KSDGSTYYEV TMKECFHKLH RDLPPTRLWG
51 YNGLFPGPTI DVNQDENVYI KMMNDLPDKH FLFPVDHTIHH SESGHQEPDV
101 KTVVHLHGGA TFPDSDGYPE AWFTKDFKET GPYFEREVYH YPNKQRGALL
151 WYHDHAMAIT RLVNYAGLAG MYIIBERKEK QLKLPSEYD VPLMILDRTL
201 NDDGSLSYPS GPANPSETLP DPSIVPFPCG NTILVNGKAW PYMEVEPRTY
251 RFRILNASNT RTFSLSLNNG GKFIQIGSDG GLLPRSVKTQ SISLAPAERY
301 DVLIDFSAPD GEHIILTNGT GCGGDADPDT DANVMQFRVT KPLKGADTSR
351 KPKYLSTMPN VTSKRIHNIR TLKLTNTQDK YGRFVLTLNN KRWHDPVTEA
401 PKLGTTEIWS IINPMGGTHP IHLHLVSFQI LDRRPFDLER YNKFGDIVYT
451 GPAVPPPPSE KGWKDTVOAH SGEVIRIAAT FAPYSGRYVW HCHILEHEDY
501 DMHRPMDVTD KQ
  
```

Unformatted sequence string: **512 residues** (for pasting into other applications).

ภาพที่ 17 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC-MS โดยย่อยโปรตีนด้วย Trypsin โดยระบบ LC จะใช้คอลัมน์ Acclaim PepMap RSLC โดย Mobile phase A คือ น้ำ: formic acid (99.9:0.1, v/v) และ Mobile phase B คือ น้ำ:acetonitrile (20:80, v/v) ซึ่งจะแบบ gradient ด้วย 2-85 %B นาน 50 นาที ที่อัตราการไหล 0.3 µl/min

4.7 การศึกษาสมบัติชีวเคมีของแลคเคสบริสุทธิ์

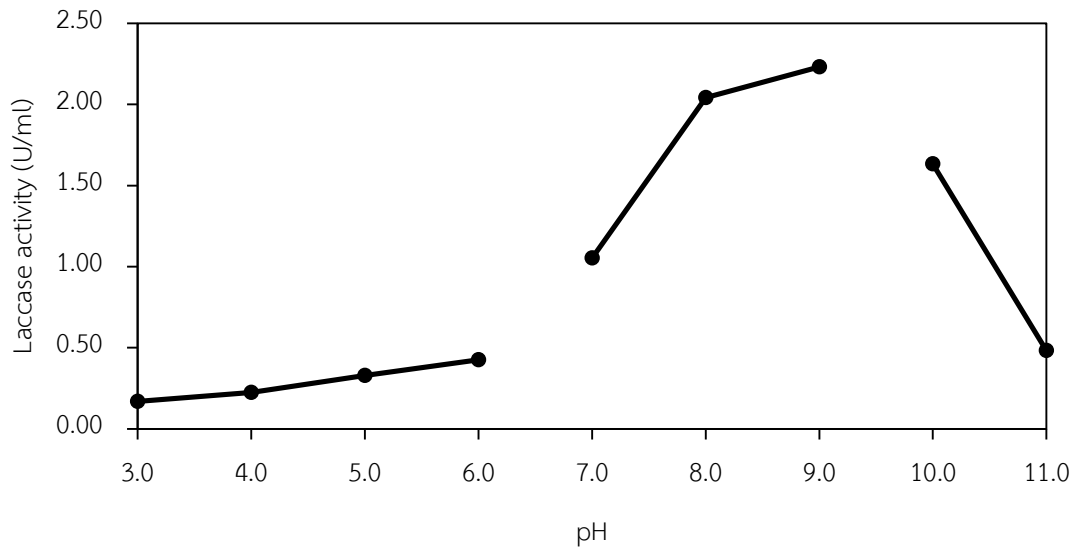
4.7.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์และความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์

4.7.1.1 ศึกษาผลของ pH ต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์ (Optimum pH)

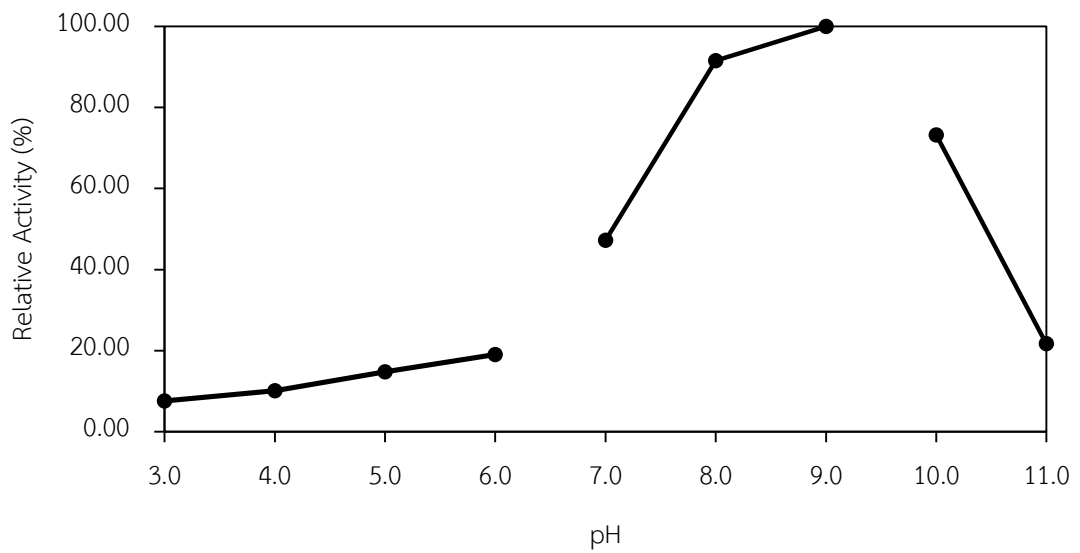
ศึกษาผลของ pH ต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200 โดยศึกษา pH ที่เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดโดยใช้ 2 mM DMP ผสมกับ 10%(v/v) Absolute ethanol ที่ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ ได้แก่ 25 mM Sodium acetate pH 3.0-6.0, 25 mM Tris-HCl pH 7.0-9.0 และ 25 mM glycine-NaOH pH 10.0-11.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพแลคเคส แสดงผลการทดลองในภาพที่ 18

จากการทดลองพบว่า pH มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ในช่วง pH 8.0-10.0 มีค่า Relative Activity อยู่ในช่วง 70- 100 % ค่า pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสสูงสุดคือ pH 9.0 มีค่ากัมมันตภาพแลคเคสเท่ากับ 2.23 U/ml แสดงให้เห็นว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P เป็น Alkaline Laccase ที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH ที่เป็นด่าง จากรายงานของ (Sondhi *et al.*, 2014) ได้ศึกษาการแยกบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะแลคเคสจาก *Bacillus tequilensis* SN4 พบว่ามีค่า pH ที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสโดยใช้ DMP เป็นสารตั้งต้น พบว่าเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดี ช่วง pH ที่เป็นด่าง และสูงสุดที่ pH 8.0 และจากรายงานของ (Zhang *et al.*, 2013) ได้ศึกษาการแยกบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะแลคเคสจาก *Bacillus vallismortis* fmb-103 พบว่าเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 4.8 โดยใช้ ABTS เป็นสารตั้งต้น และการศึกษาการแยกบริสุทธิ์และลักษณะแลคเคสจาก *Bacillus subtilis* MTCC 2414 พบว่ามีค่า pH ที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสในช่วง pH ที่เป็นด่างเช่นเดียวกัน และสูงสุดที่ pH 9.0 โดยใช้ DMP เป็นสารตั้งต้น (Muthukumarasamy *et al.*, 2015)

(A)



(B)



ภาพที่ 18 ผลของ pH ต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยแสดงผล (A) Laccase activity และ (B) Relative activity

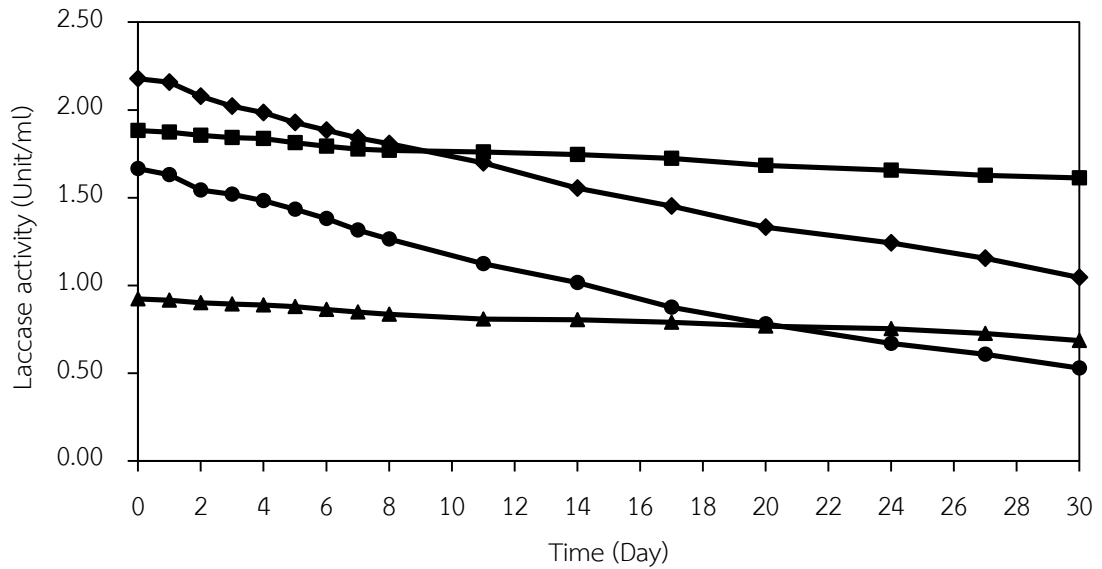
4.7.1.2 ศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธี (pH stability)

ศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200 โดยเจือจางเอนไซม์ 200 เท่า ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และวัดกัมมันตภาพแลคเคสที่เหลืออยู่ในช่วงเวลาต่างๆที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยเปรียบเทียบกับกัมมันตภาพเวลาเริ่มต้น แสดงผลการทดลองในภาพที่ 19 และ 20

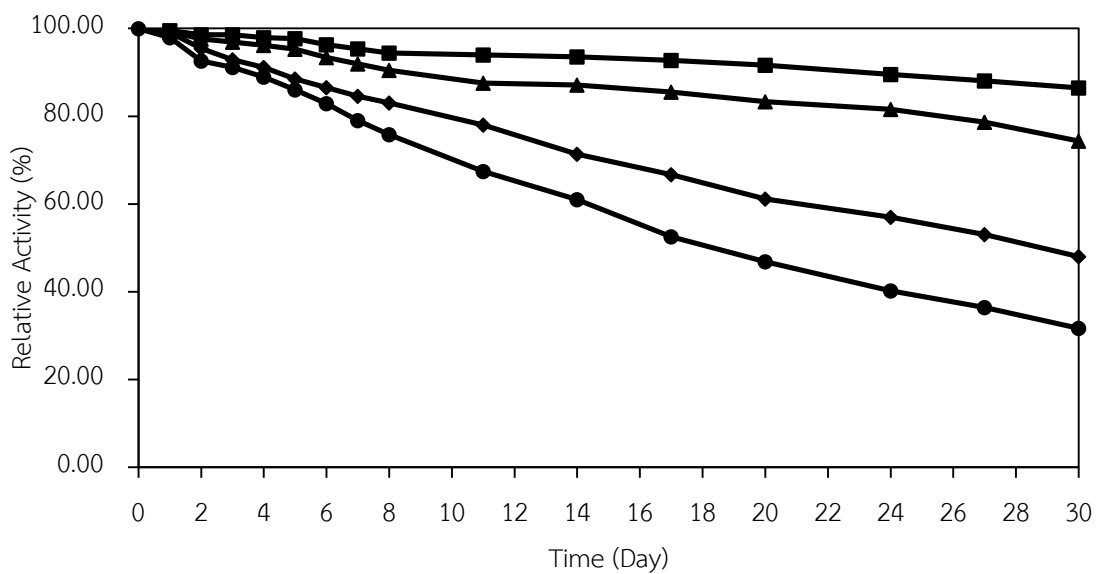
ผลทดลองพบว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P พบว่ามีความเสถียรได้ดีที่ pH 7.0 และ 8.0 โดยมีค่า Relative Activity ใน 30 วัน เท่ากับ 74.38 และ 86.45% ตามลำดับ และจากผลการทดลองพบว่าเมื่อบ่มเอนไซม์ที่ pH 9.0 และ 10.0 กัมมันตภาพแลคเคสจะลดลงครั้งหนึ่งในเวลา 28 และ 20 วัน ตามลำดับ (ภาพที่ 14) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (Sondhi *et al.*, 2014) ได้ศึกษาการแยกบริสุทธีและคุณลักษณะของแลคเคสจาก *Bacillus tequilensis* SN4 พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่ pH 9.0 นาน 24 ชั่วโมง มีค่า Relative Activity คงเหลือ 75% และจากรายงาน (Zhang *et al.*, 2013) ที่ได้ศึกษาการแยกบริสุทธีและลักษณะของแลคเคสจาก *Bacillus vallismortis* fmb-103 ซึ่งพบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่ pH 7.0 และ 8.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในเวลา 10 วัน โดยมีค่า Relative Activity อยู่ในช่วง 80% และ 85% ตามลำดับ และจากรายงานการศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Sinorhizobium meliloti* พบว่าเมื่อบ่มเอนไซม์ที่ pH 7.0 และ 8.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 21 วัน จะคงเหลือค่า Relative Activity เท่ากับ 55.8 และ 55.1% ตามลำดับ (Pawlik *et al.*, 2016)



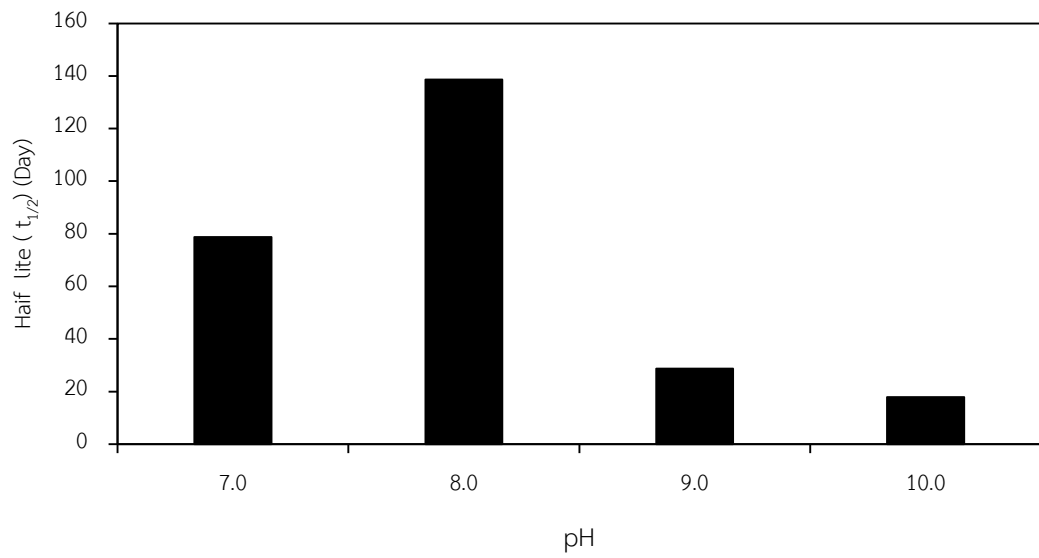
(A)



(B)



ภาพที่ 19 ผลของ pH ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดยปมที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน แสดงผล (A) Laccase activity และ (B) Relative activity โดย (▲) pH 7.0, (■) pH 8.0, (◆) pH 9.0 และ (●) pH 10.0



ภาพที่ 20 ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของแลคเคสบริสุทธิ์ที่เก็บรักษาใน pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

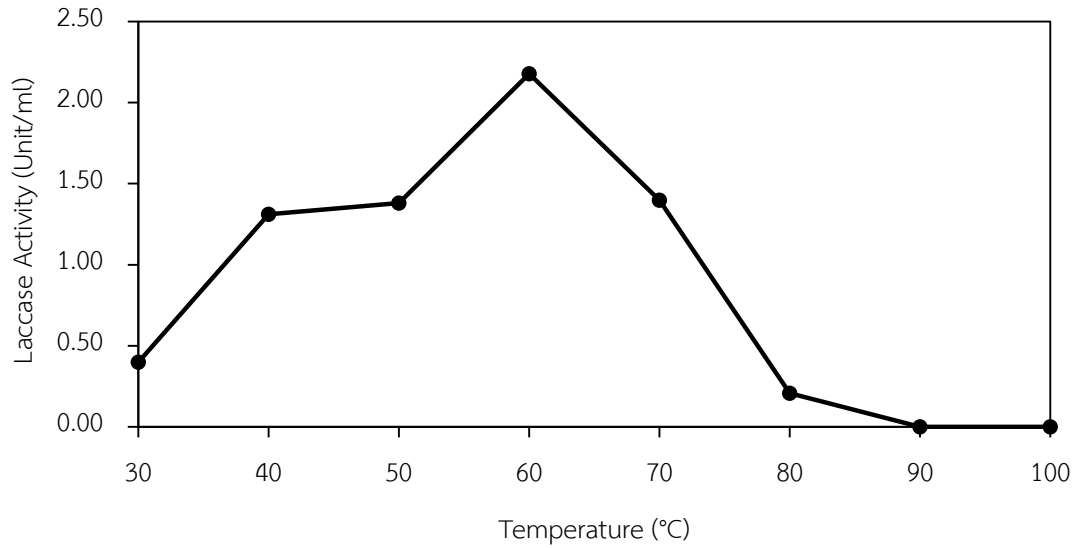


4.7.1.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์ (Optimum Temperature)

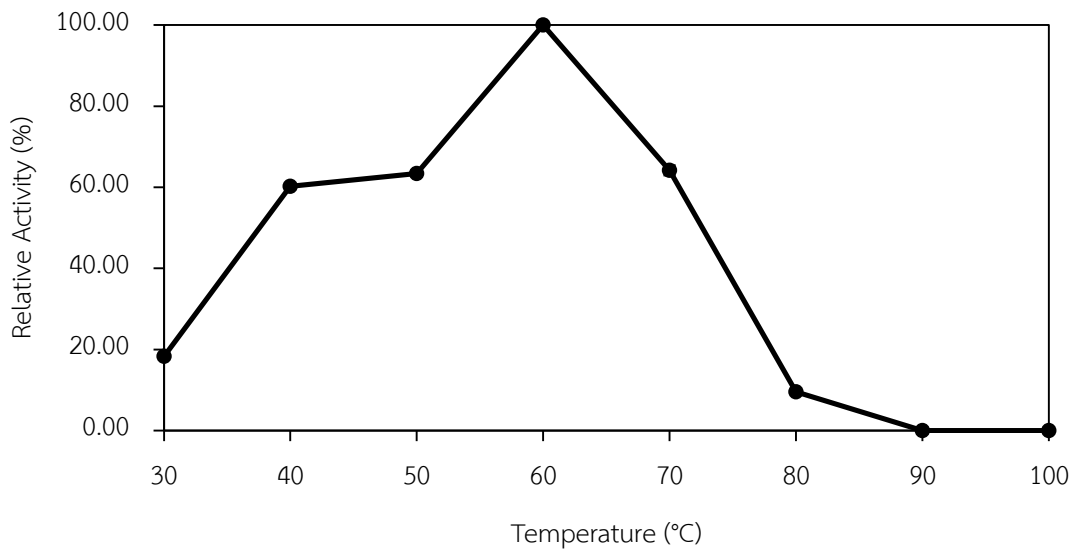
ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200 โดยศึกษาอุณหภูมิที่เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดโดยละลาย 2 mM DMP ผสมกับ 10%(v/v) Absolute ethanol ในสารละลาย 25 mM Tris-HCl pH 9.0 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 – 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพแลคเคส แสดงผลการทดลองในภาพที่ 21

ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิมิผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 40 – 70 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่ากัมมันตภาพแลคเคสเท่ากับ 2.17 U/ml และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นมากกว่า 70 องศาเซลเซียส มีผลทำให้กัมมันตภาพแลคเคสลดลงอย่างรวดเร็ว เพราะเอนไซม์อาจกลายสภาพ (denature) เนื่องจากความร้อน จากรายงานของ (Zhang *et al.*, 2013) ได้ศึกษาการแยกบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะแลคเคสจาก *Bacillus vallismortis* fmb-103 พบว่าเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และจากรายงานของ (Muthukumarasamy *et al.*, 2015) ได้ศึกษาการแยกบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะแลคเคสจาก *Bacillus subtilis* MTCC 2414 พบว่าเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ 70 องศาเซลเซียส และจากรายงานของ (Sondhi *et al.*, 2014) ได้ศึกษาการแยกบริสุทธิ์และคุณลักษณะของแลคเคสจาก *Bacillus tequilensis* SN4 พบว่าเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 65 -95 องศาเซลเซียส โดยมีค่า relative activity อยู่ในช่วง 60- 100% ซึ่งสูงกว่าแลคเคสในงานวิจัยนี้ แต่จากรายงานการศึกษาการแยกบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะแลคเคสจาก *Streptomyces lavendulae* พบว่าเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 – 70 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส ทำให้กัมมันตภาพแลคเคสลดลงอย่างรวดเร็ว (Suzuki *et al.*, 2003)

(A)



(B)



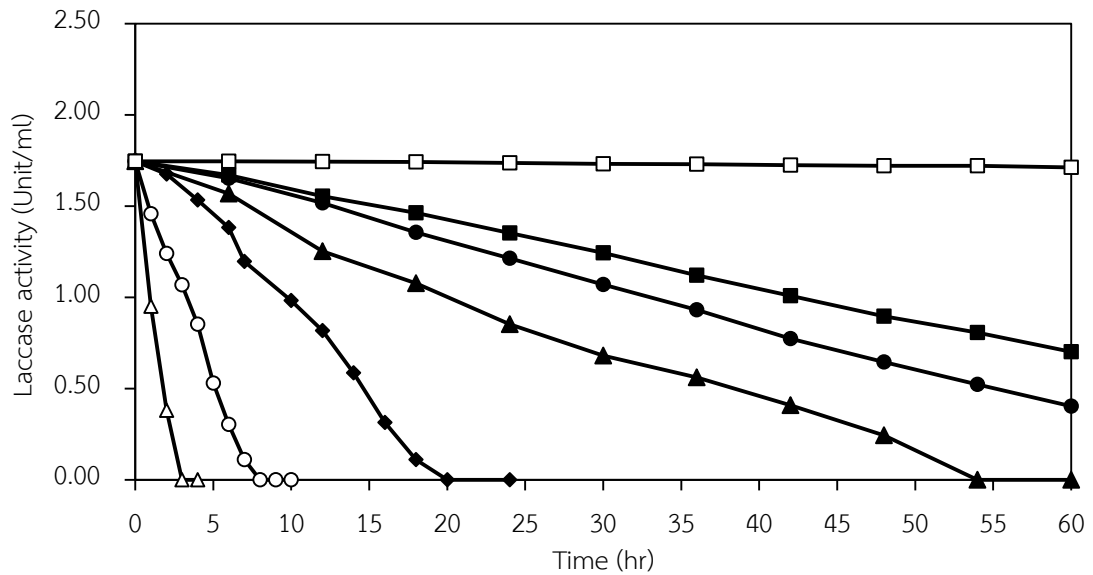
ภาพที่ 21 ผลของอุณหภูมิต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ที่ pH 9.0 โดยแสดงผล (A) Laccase activity และ (B) Relative activity

4.7.1.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์ (Temperature stability)

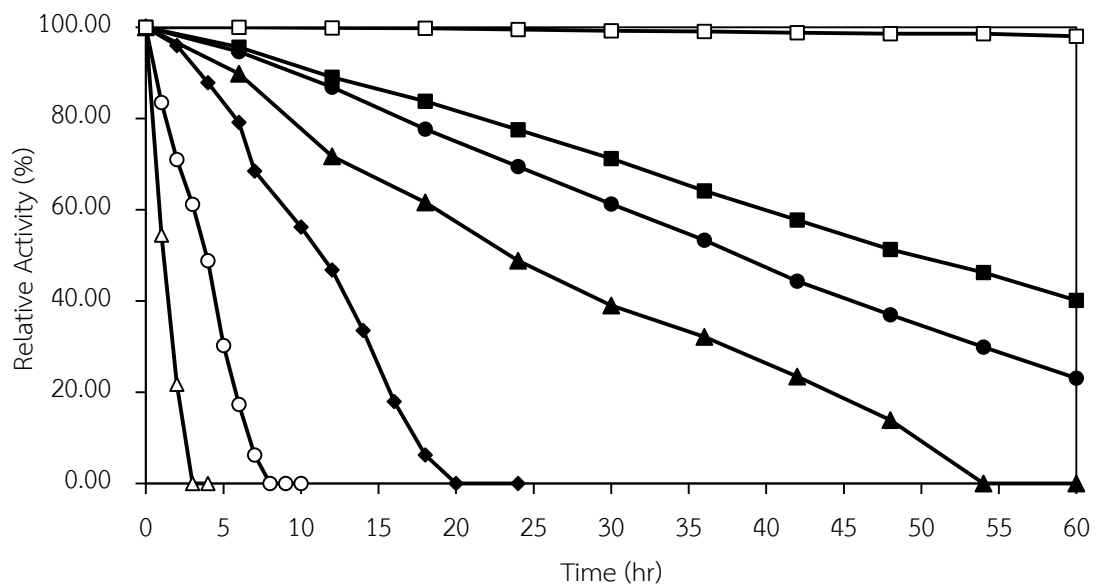
การศึกษาค่าผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200 โดยบ่มเอนไซม์ในสารละลาย 25 mM Tris-HCl pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 4 - 80 องศาเซลเซียส เก็บผลทุก 2-4 ชั่วโมง จนครบ 60 ชั่วโมง และวัดกัมมันตภาพแลคเคสที่เหลืออยู่ โดยเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น แสดงผลการทดลองในภาพที่ 22 และ 23

จากการศึกษาค่าผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของแลคเคสที่แสดงในภาพที่ 16 พบว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P มีความเสถียรได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยกัมมันตภาพแลคเคสจะลดลงครึ่งหนึ่งในเวลา 2310 ชั่วโมง และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง จะมีค่า Relative Activity เท่ากับ 40.17% และ 23.14% ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่ากัมมันตภาพแลคเคสจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อบ่มเอนไซม์ที่ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส โดยกัมมันตภาพแลคเคสจะลดลงครึ่งหนึ่งในเวลา 10.9, 3.84 และ 1.38 ชั่วโมงตามลำดับ (ภาพที่ 17) จากรายงานการศึกษาของ (Zhang *et al.*, 2013) ที่ได้ศึกษาการแยกบริสุทธิ์และลักษณะของแลคเคสจาก *Bacillus vallismortis* fmb-103 พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส โดยกัมมันตภาพแลคเคสจะลดลงครึ่งหนึ่งที่เวลา 10 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับในงานวิจัยนี้จะพบว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงได้ต่ำกว่ามาก แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าแลคเคสที่ผลิตจากรา โดยจากรายงานการศึกษาของ (Han *et al.*, 2006) ที่ศึกษาการแยกบริสุทธิ์และคุณลักษณะของแลคเคสจาก *Trametes versicolor* พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กัมมันตภาพแลคเคสจะลดลงครึ่งหนึ่งในเวลา 1 ชั่วโมง

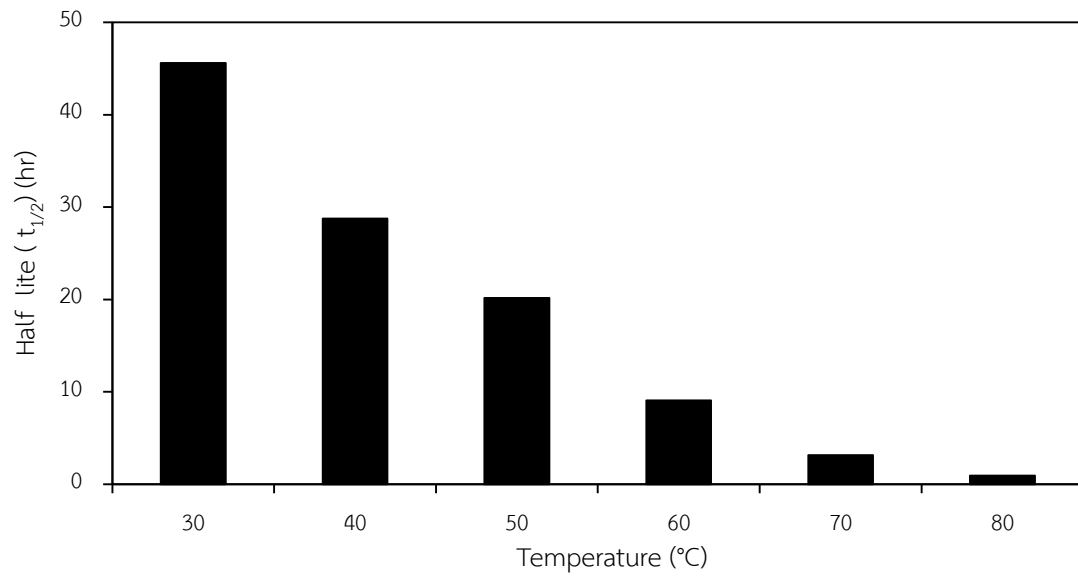
(A)



(B)



ภาพที่ 22 ผลการศึกษาของอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ที่ pH 9.0 โดยแสดงผล (A) Laccase activity และ (B) Relative activity โดย (—□—) 4°C, (—■—) 30°C, (—●—) 40°C, (—▲—) 50°C, (—◆—) 60°C, (—○—) 70°C และ (—△—) 80°C



ภาพที่ 23 ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของแลคเคสบริสฟูทีที่เก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิต่างๆ ที่ pH 8.0



4.7.2 ศึกษาผลของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ

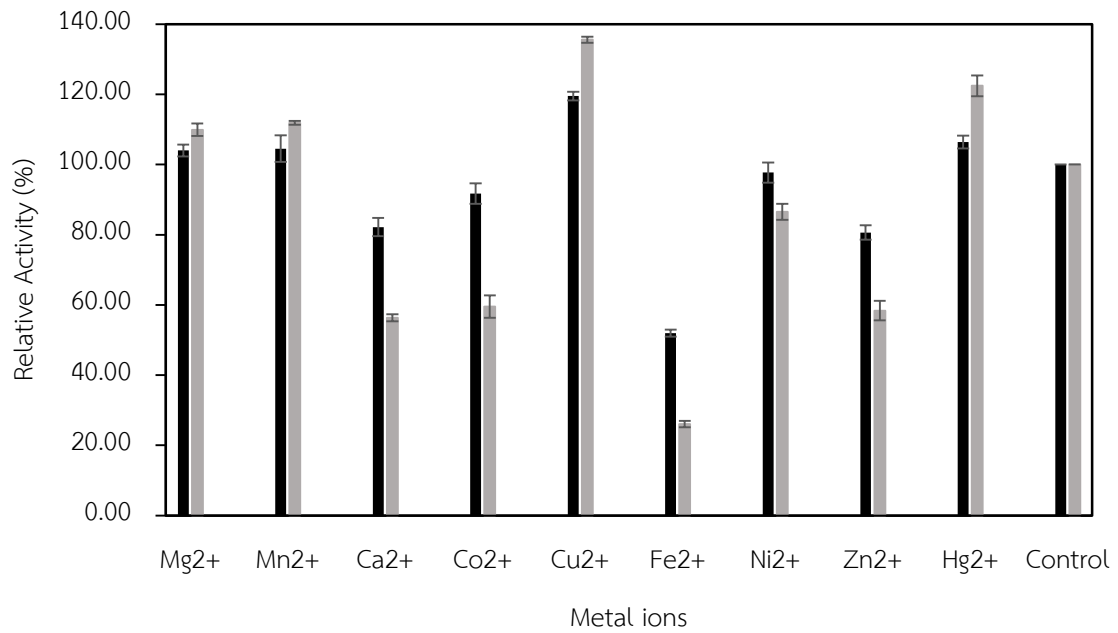
การศึกษาผลของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดยบ่มเอนไซม์กับไอออนโลหะ (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} และ Ca^{2+}) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 และ 5 mM ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพแลคเคสโดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (เติมบัฟเฟอร์แทนไอออนโลหะ) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 24

จากการศึกษาผลของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิที่แสดงในตารางที่ 3 พบว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ถูกกระตุ้นได้เพียงเล็กน้อยด้วย Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} และ Hg^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 mM ทำให้ค่า Relative Activity สูงกว่า 100% โดยมีค่าเท่ากับ 104.04, 105.59, 119.58 และ 106.11% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่เติมไอออนโลหะ และพบว่าที่ความเข้มข้น 5 mM Cu^{2+} สามารถกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้นโดยมีค่า Relative Activity เท่ากับ 135.65% และที่ความเข้มข้น 1 mM ของ Co^{2+} , Ni^{2+} และ Ca^{2+} แลคเคสจะถูกยับยั้งได้เล็กน้อย โดยมีค่า Relative Activity เท่ากับ 92.65, 97.72 และ 81.79% ตามลำดับ และถูกยับยั้งอย่างมากด้วย Fe^{2+} , Ca^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 mM โดยมีค่า Relative Activity เท่ากับ 26.05, 57.35 และ 59.42% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Zhang *et al.*, 2013) ได้ศึกษาผลของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus vallismortis* fmb-103 โดยพบว่า Mg^{2+} , Mn^{2+} และ Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 mM สามารถกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาได้โดยมีค่า Relative Activity เท่ากับ 106.8, 108.7 และ 158.7% ตามลำดับ และเอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วย Fe^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 mM โดยมีค่า Relative Activity เท่ากับ 41.47 และ 61.47% ตามลำดับ เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ (Sondhi *et al.*, 2014) ได้ศึกษาผลของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus tequilensis* SN4 โดยจากการศึกษาพบว่า Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 mM สามารถกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาได้โดยมีค่า Relative Activity เท่ากับ 126.09% ผลการศึกษาจะเห็นได้ว่า Cu^{2+} มีผลต่อการกระตุ้นในการเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากในระหว่างการแยกบริสุทธิ์ อาจมีการสูญเสีย Cu^{2+} ในตำแหน่งของคอปเปอร์ T2 (Type-2-copper) ในระหว่างกระบวนการ จึงทำให้กัมมันตภาพของแลคเคสลดลง ดังนั้นการเติม Cu^{2+} ในตำแหน่งของคอปเปอร์ T2 จึงทำให้สามารถกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น (Nagai *et al.*, 2002) ขณะที่เอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วย Fe^{2+} เนื่องจากมีผลต่อปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนในแลคเคส ผลการทดลองพบว่าแลคเคสบริสุทธิจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยไอออนโลหะที่หลากหลายทำ

ให้มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้ เช่น อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ, การบำบัดน้ำเสียที่มีโลหะหนัก เป็นต้น (Pierce, 1999)

ตารางที่ 3 ผลของไอออนโลหะที่มีต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

Metal ions	Concentration (mM)	Laccase activity (Unit/ml)	Relative Activity (%)
Mg ²⁺	1	1.132 ± 0.012	104.04 ± 1.68
	5	1.196 ± 0.012	109.94 ± 1.74
Mn ²⁺	1	1.148 ± 0.024	105.59 ± 3.80
	5	1.215 ± 0.014	111.70 ± 0.54
Ca ²⁺	1	0.890 ± 0.017	81.79 ± 2.60
	5	0.624 ± 0.016	57.35 ± 1.01
Co ²⁺	1	1.008 ± 0.019	92.65 ± 2.93
	5	0.659 ± 0.027	60.56 ± 3.20
Cu ²⁺	1	1.300 ± 0.023	119.58 ± 3.33
	5	1.476 ± 0.032	135.65 ± 3.66
Fe ²⁺	1	0.565 ± 0.015	51.96 ± 0.97
	5	0.283 ± 0.003	26.05 ± 0.62
Ni ²⁺	1	1.063 ± 0.017	97.72 ± 2.87
	5	0.953 ± 0.022	87.58 ± 2.32
Zn ²⁺	1	0.866 ± 0.017	79.60 ± 2.08
	5	0.646 ± 0.022	59.42 ± 2.80
Hg ²⁺	1	1.154 ± 0.016	106.11 ± 1.84
	5	1.335 ± 0.015	122.67 ± 2.96
Control (without Metal ion)	-	1.088 ± 0.014	100.00 ± 0.01



ภาพที่ 24 ผลของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดย (■) 1mM และ (▒) 5mM



4.7.3 ศึกษาความจำเพาะของสารตั้งต้นและค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ

ศึกษาความจำเพาะของสารตั้งต้นต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P แลคเคสสามารถออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอลและสารประกอบที่ไม่ใช่ฟีนอลได้หลายชนิด ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสารตั้งต้นหลายชนิดในกลุ่ม Phenolic acid ได้แก่ กัวไอเอคอล (guaiacol), เวอร์ราทิลแอลกอฮอล์ (veratryl alcohol), DMP(2,6dimethoxyphenol), ไทโรซีน (Tyrosine), ซิงริงกัลดาซีน (syringaldazine), *o*-Anisidine, *p*-Anisidine และ ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) (โครงสร้างเคมีของสารตั้งต้นแสดงในภาพที่ 25) ทำปฏิกิริยาที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพของแลคเคส ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4

จากการศึกษาความจำเพาะของสารตั้งต้น (Substrate) ต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิที่แสดงในตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P สามารถออกซิไดซ์สารตั้งต้นได้หลากหลาย โดยสามารถออกซิไดซ์ DMP ได้ดีที่สุดตามด้วย guaiacol, *p*-Anisidine, *o*-Anisidine, ABTS และ syringaldazine ตามลำดับ แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์ Tyrosine และ veratryl alcohol ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Bagewadi *et al.*, 2017) พบว่าแลคเคสจาก *Trichoderma harzianum* HZN10 สามารถออกซิไดซ์สารตั้งต้นได้ ดังนี้ DMP, guaiacol, ABTS, Catechol, Ferulic acid และ syringaldazine และจากงานวิจัยของ (Sondhi *et al.*, 2014) พบว่าแลคเคสจาก *Bacillus tequilensis* SN4 สามารถออกซิไดซ์ DMP, guaiacol, ABTS, L-DOPA, Catechol, PPD (*p*-phenols) และ syringaldazine โดยสามารถออกซิไดซ์ DMP ได้ดีที่สุด แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์สารตั้งต้น Tyrosine ซึ่งความสามารถของแลคเคสที่สามารถออกซิไดซ์ DMP, ABTS และ syringaldazine ได้แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์ Tyrosine จึงจัดได้ว่าเป็นกัมมันตภาพแลคเคสที่แท้จริง (true laccase activity) (Brijwani *et al.*, 2010)

ศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ โดยใช้สารตั้งต้นที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 1-20 mM กัวไอเอคอล (guaiacol), 1-20 mM DMP (2,6dimethoxyphenol), 0.1-2 mM ซิงริงกัลดาซีน (syringaldazine), 1-20 mM ABTS (2,2'-azino-bis (3ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) และ 1-20 mM *p*-Anisidine โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ

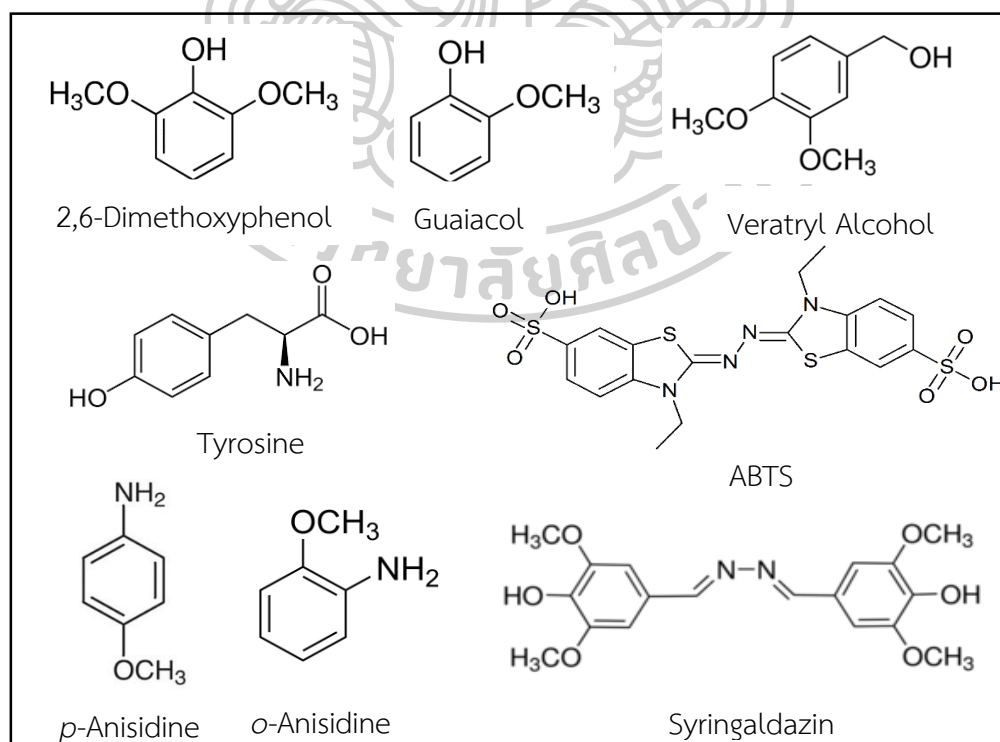
คำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ของแลคเคสบริสุทธ์จาก Lineweaver-Burk plot โดยแสดงผลค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ในตารางที่ 5 และกราฟระหว่าง $1/[S]$ กับ $1/V$ แสดงผลในภาพที่ 26

จากการศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P เปรียบเทียบสารตั้งต้นคือ DMP, ABTS, syringaldazine, guaiacol และ *p*-Anisidine พบว่าอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา V_{max} เท่ากับ 0.414, 0.034, 0.0088, 0.240 และ 0.30 mM/min ตามลำดับ และมีค่าคงที่ Michaelis-Menten (K_m) เท่ากับ 0.722, 2.135, 0.269, 0.524 และ 0.684 mM ตามลำดับ โดย DMP มีค่า $k_{catalytic}$ เท่ากับ 1830.36 min^{-1} และพบว่า DMP มีค่า V_{max} และ $k_{catalytic}$ สูงและมีค่า K_m ที่ต่ำแสดงให้เห็นว่า DMP เป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P จากรายงานวิจัยของ (Sondhi *et al.*, 2014) ได้ศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสจาก *Bacillus tequilensis* SN4 โดยใช้ DMP เป็นสารตั้งต้นพบว่าเอนไซม์มีค่า K_m และ $k_{catalytic}$ เท่ากับ 0.8 mM และ 73.15 s^{-1} ตามลำดับ และจากรายงานวิจัยของ (Ben Younes and Sayadi, 2011) ได้ศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสจาก *Scytalidium thermophilum* โดยใช้ DMP เป็นสารตั้งต้นพบว่ามีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 0.36 mM และ $1.298 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$ และจากรายงานวิจัยของ (Pawlik *et al.*, 2016) ได้ศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสจาก *Sinorhizobium meliloti* โดยใช้ DMP เป็นสารตั้งต้นพบว่าเอนไซม์มีค่า K_m และ $k_{catalytic}$ เท่ากับ 0.342 mM และ 48.7 s^{-1} ซึ่งประสิทธิภาพของเอนไซม์สามารถพิจารณาได้จากค่า V_{max} และ k_{cat} หากมีค่ามาก และมีค่า K_m น้อยแสดงว่าเอนไซม์นั้นมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาได้ดี

ตารางที่ 4 ความจำเพาะของสารตั้งต้น (Substrate) ของแลคเคสบริสุทธิ์ จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ที่อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสม

Substrate	λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1}CM^{-1}$)	Laccase activity (Unit/ml)	Relative Activity (%)
DMP	468	14,800	1.4081 ± 0.004	100.00 ± 0.01
ABTS	420	36,000	0.0804 ± 0.002	5.71 ± 0.2
Syringaldazine	468	64,000	0.0217 ± 0.001	1.54 ± 0.090
Guaiacol	436	12,000	1.1844 ± 0.029	84.12 ± 2.74
<i>o</i> -Anisidine	542	11,300	0.2383 ± 0.007	10.91 ± 0.63
<i>p</i> -Anisidine	460	1,173	0.989 ± 0.037	45.28 ± 2.55
Veratryl Alcohol	310	9,300	0	0
Tyrosine	278	12,000	0	0

กำหนดให้ 1 หน่วยแลคเคส (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของสารตั้งต้น 1 μ mol ภายในเวลา 30 นาที ที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

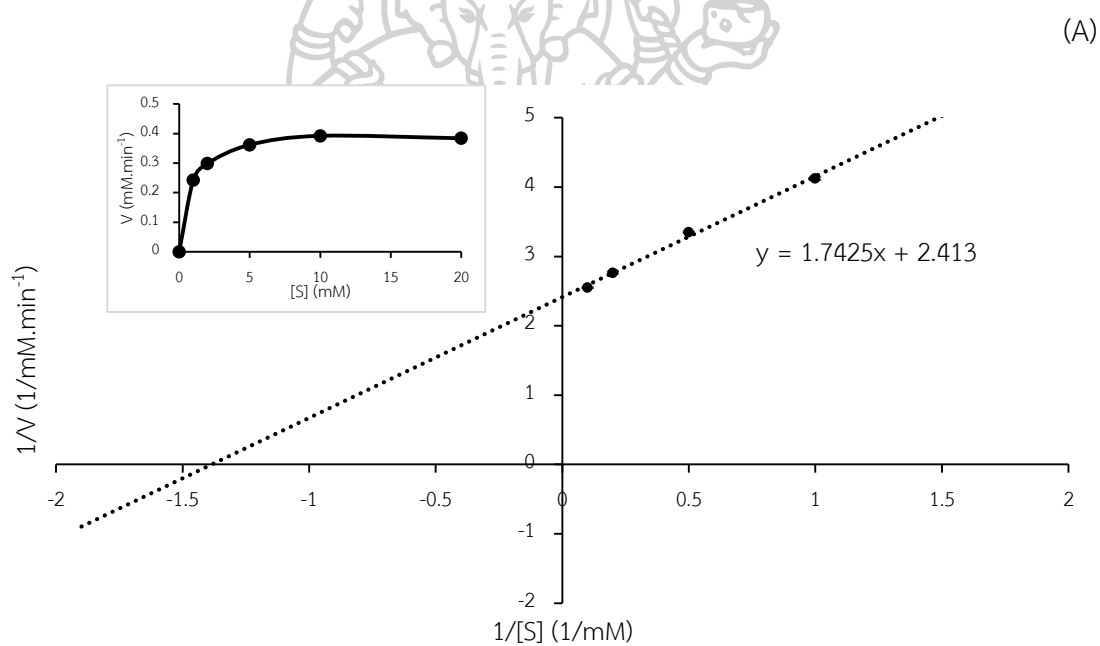


ภาพที่ 25 โครงสร้างเคมีของสารตั้งต้นที่ใช้ในการศึกษา

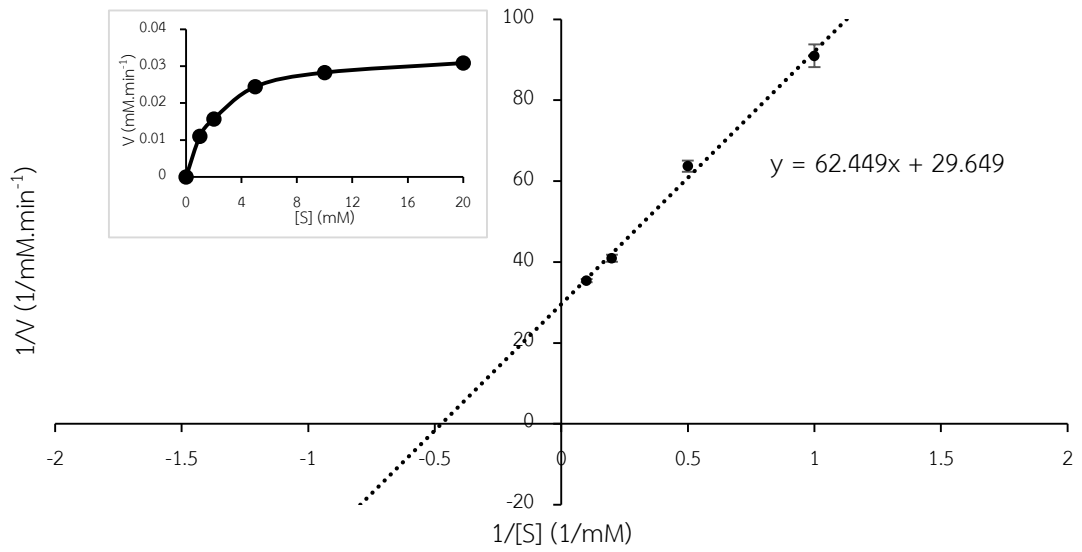
ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

Substrates	K_m (mM)	V_{max} (mM.min ⁻¹)	$k_{catalytic}$ (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)
DMP	0.722	0.414	1,830.36	2,534.12
ABTS	2.135	0.034	150.86	70.66
syringalgazine	0.269	0.0088	37.76	140.37
guaiacol	0.524	0.240	1,077.17	2,055.66
<i>p</i> -Anisidine	0.684	0.30	1,335.86	1,953.91

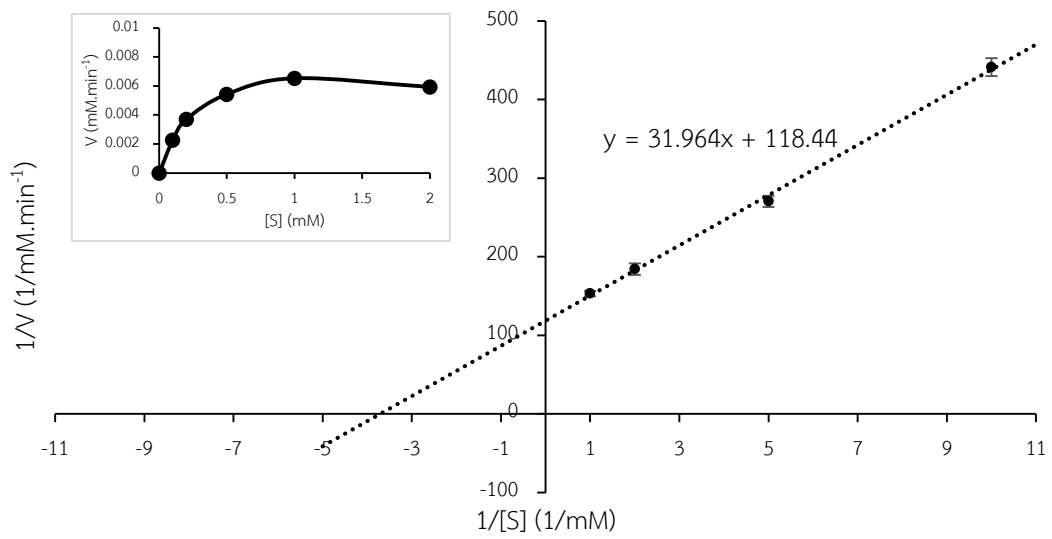
โดยความเข้มข้นเอนไซม์เท่ากับ 0.014 mg/ml และแลคเคสมีมวลโมกุลเท่ากับ 62.62 kDa



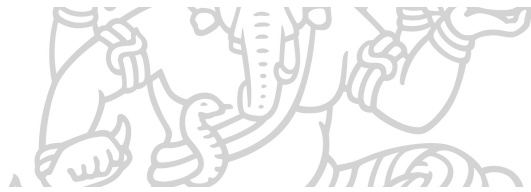
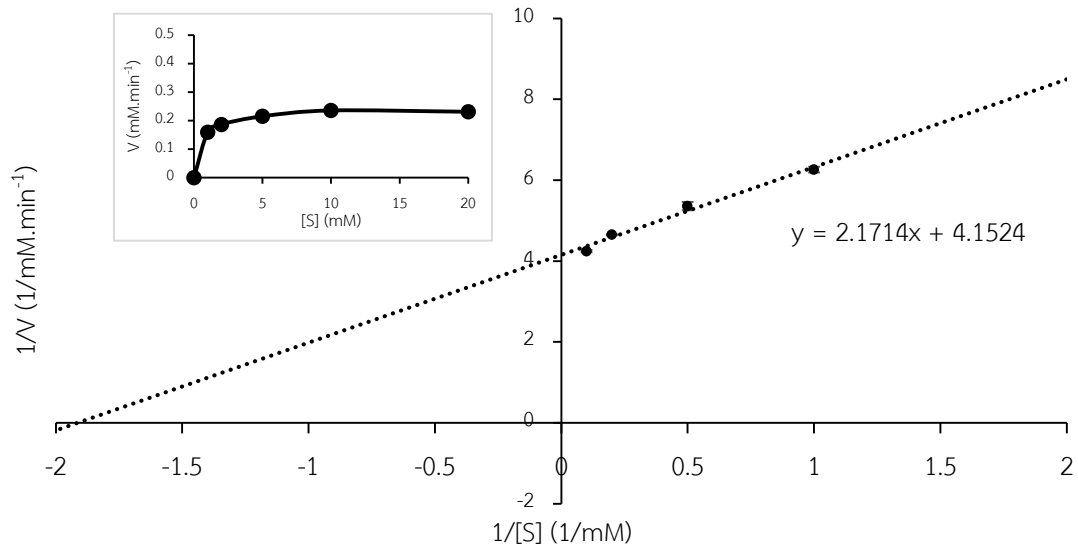
(B)



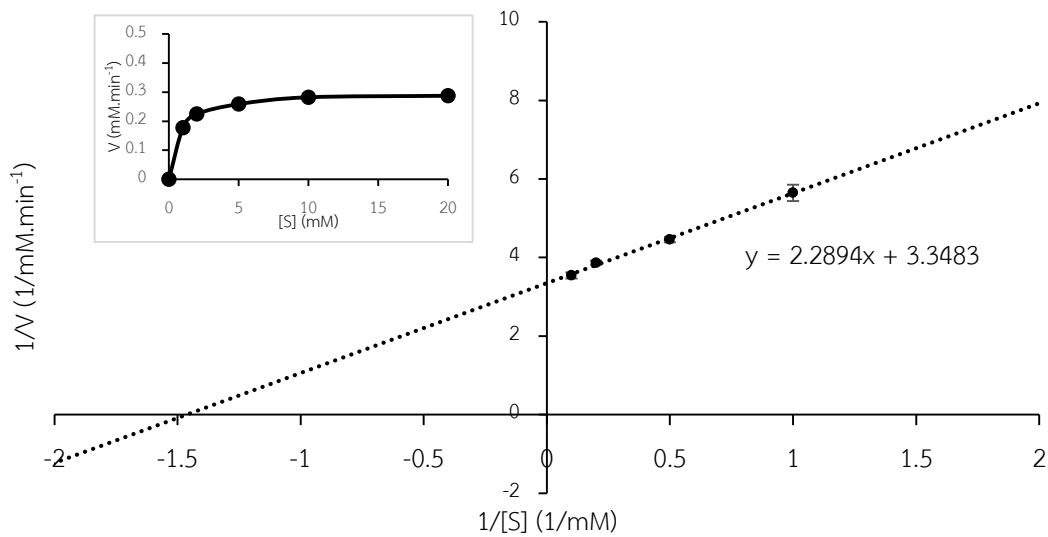
(C)



(D)



(E)



ภาพที่ 26 จลศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธ์ีจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดยสารตั้งต้น (A) DMP, (B) ABTS, (C) syringaldazine, (D) guaiacol และ (E) *p*-Anisidine

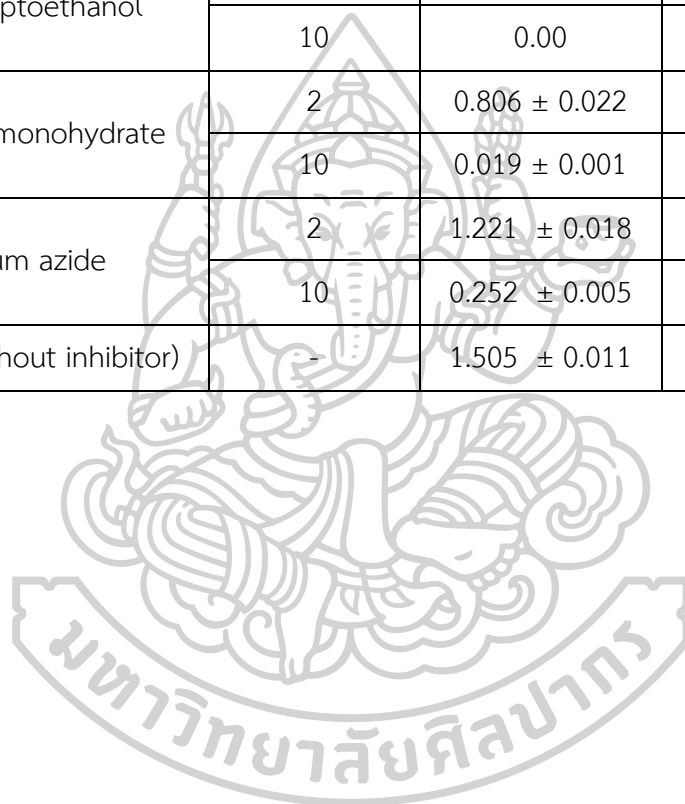
4.7.4 ศึกษาผลของสารยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์

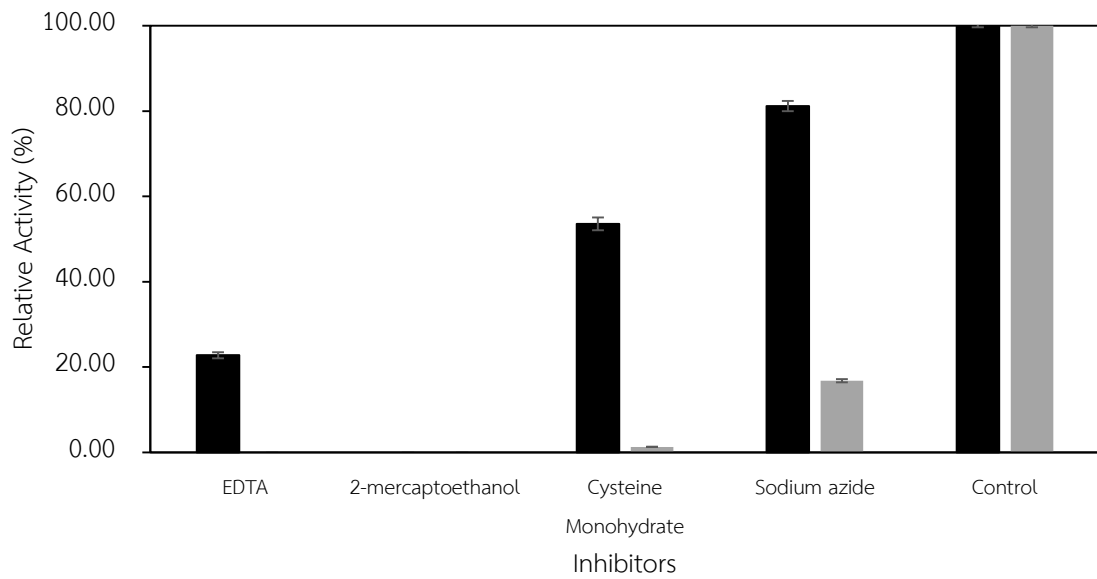
การศึกษาผลของสารยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดยบ่มเอนไซม์กับสารยับยั้งชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ cysteine monohydrate, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Sodium azide (NaN_3) และ 2-mercaptoethanol โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 และ 10 mM ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพแลคเคสโดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (เติมสารละลาย 25mM Tris-HCl pH 8.0 แทนสารยับยั้ง) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 27

ผลการศึกษาสารยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์ พบว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ยังคงเร่งปฏิกิริยาได้เมื่อบ่มกับ cysteine monohydrate, Sodium azide (NaN_3) และ EDTA ที่ความเข้มข้น 2 mM โดยมีค่า Relative Activity เท่ากับ 53.56, 81.09 และ 22.77% ตามลำดับ และการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์กับสารยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 mM โดยมีค่า Relative Activity เท่ากับ 1.26, 16.77 และ 0% ตามลำดับ และแลคเคสจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อบ่มกับ 2 mM 2-mercaptoethanol ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Sondhi *et al.*, 2014) ได้ศึกษาผลของสารยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus tequilensis* SN4 โดยจากการศึกษาการบ่มเอนไซม์กับ cysteine monohydrate, EDTA, Sodium azide (NaN_3) และ 2-mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 5 mM สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาได้ โดยมีค่า Relative Activity เท่ากับ 1.84, 27, 53 และ 0% ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าสารยับยั้งนี้สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสได้ดีเนื่องจาก EDTA, Sodium azide (NaN_3) สามารถจับอะตอมคอปเปอร์ในโครงสร้างของแลคเคสได้ (chelating agent) ทำให้บริเวณเร่งของแลคเคสเกิดการเปลี่ยนแปลงจึงทำให้กัมมันตภาพของแลคเคสลดลงอย่างมาก และสารยับยั้ง cysteine monohydrate และ 2-mercaptoethanol สามารถยับยั้งกัมมันตภาพของแลคเคสได้เนื่องจากหมู่ซัลไฟด์ไฮดริล (sulfhydryl groups) ของสารยับยั้งจะไปลดการออกซิไดซ์ของแลคเคสทำให้กัมมันตภาพแลคเคสลดลง ((Iyer and Chattoo, 2003) และ (Sondhi *et al.*, 2014))

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาของสารยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

inhibitors	Concentration (mM)	Laccase activity (Unit/ml)	Relative activity (%)
EDTA	2	0.342 ± 0.001	22.77 ± 0.07
	10	0.00	0.00
2-mercaptoethanol	2	0.00	0.00
	10	0.00	0.00
Cysteine monohydrate	2	0.806 ± 0.022	53.56 ± 1.48
	10	0.019 ± 0.001	1.26 ± 0.04
Sodium azide	2	1.221 ± 0.018	81.09 ± 1.19
	10	0.252 ± 0.005	16.77 ± 0.40
Control (without inhibitor)	-	1.505 ± 0.011	100 ± 0.73





ภาพที่ 27 ผลของสารยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

โดย (■) 2 mM และ (■) 10mM

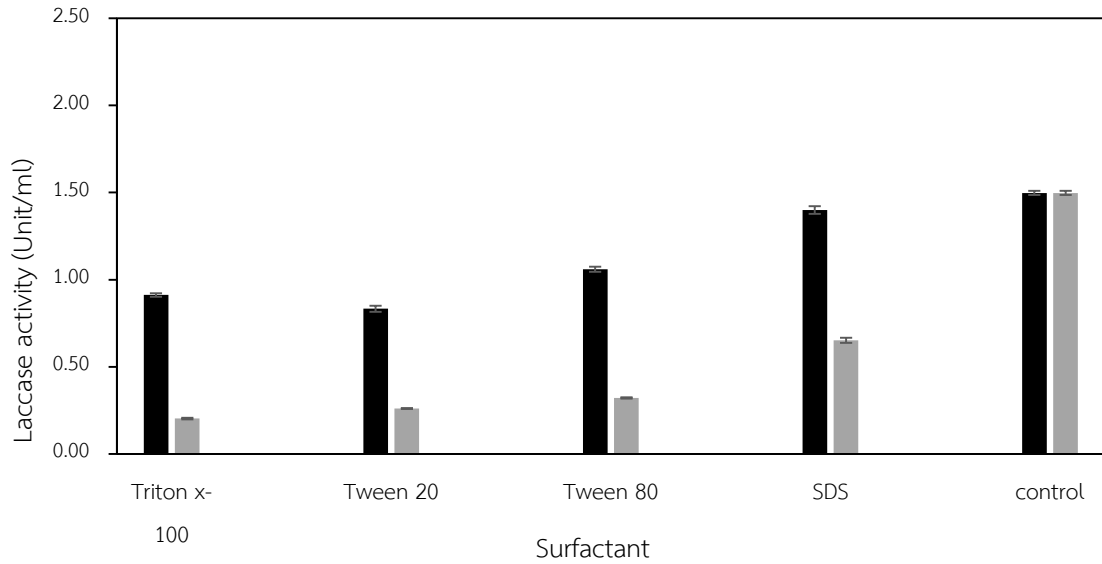


4.7.5 ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) และสารซักล้าง (detergent) ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์

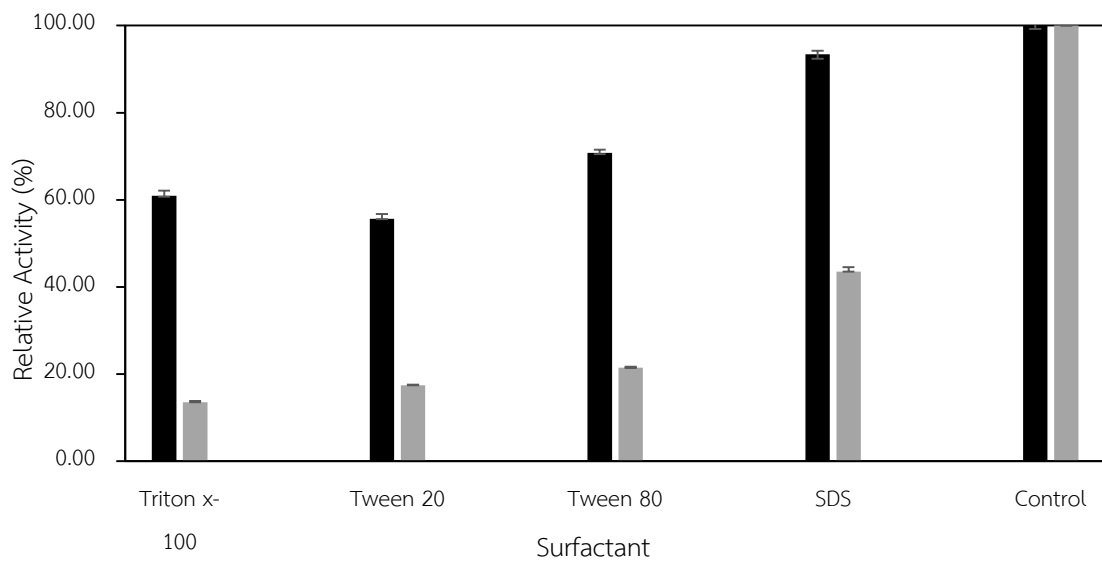
การศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P โดยบ่มเอนไซม์กับสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ ได้แก่ Triton X-100, Tween 20 และ Tween 80 และสารซักล้าง (detergent) ได้แก่ SDS ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 และ 10 mM ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพของแลคเคสโดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (เติมสารละลาย 25mM Tris-HCl pH 8.0 แทนสารลดแรงตึงผิว) ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 28

จากการศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวและสารซักล้างที่มีผลต่อความเสถียรของแลคเคสที่บริสุทธิ์ได้แสดงในภาพที่ 28 พบว่าสารลดแรงตึงผิวและสารซักล้างมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยา โดยเมื่อนำเอนไซม์บ่มกับ Triton X-100, Tween 20, Tween 80 และ SDS ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที พบว่าที่ความเข้มข้น 1 mM มีผลทำให้กัมมันตภาพของแลคเคสลดลงเหลือ 60.95, 55.66, 70.76 และ 93.44% ตามลำดับ และกัมมันตภาพของแลคเคสจะลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อบ่มเอนไซม์กับสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้น 10 mM ซึ่งแลคเคสจาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P สามารถคงตัวได้ดีที่ 1 mM SDS สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ (Zhang *et al.*, 2013) ได้ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวต่อความเสถียรของแลคเคสจาก *Bacillus vallismortis* fmb-103 โดยจากการศึกษาพบว่าเมื่อนำเอนไซม์บ่มกับ 1 mM ของ Triton X-100, Tween 20 Tween 80 และ SDS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะมีกัมมันตภาพของแลคเคสคงเหลือเท่ากับ 72.85, 76.85, 84.54% และ 105% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความคงตัวของแลคเคสในเมื่อบ่มเอนไซม์กับ 1 mM SDS พบว่าแลคเคสจาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P มีความคงตัวได้ดีกว่าแลคเคสผลิตจากแบคทีเรียและราบางสายพันธุ์ เช่น *Bacillus sp.* WT (Siroosi *et al.*, 2016), *Coriolus hirsutus* (Shin and Lee, 2000) เป็นต้น

(A)



(B)



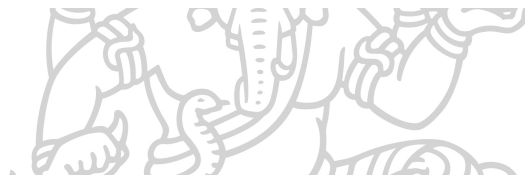
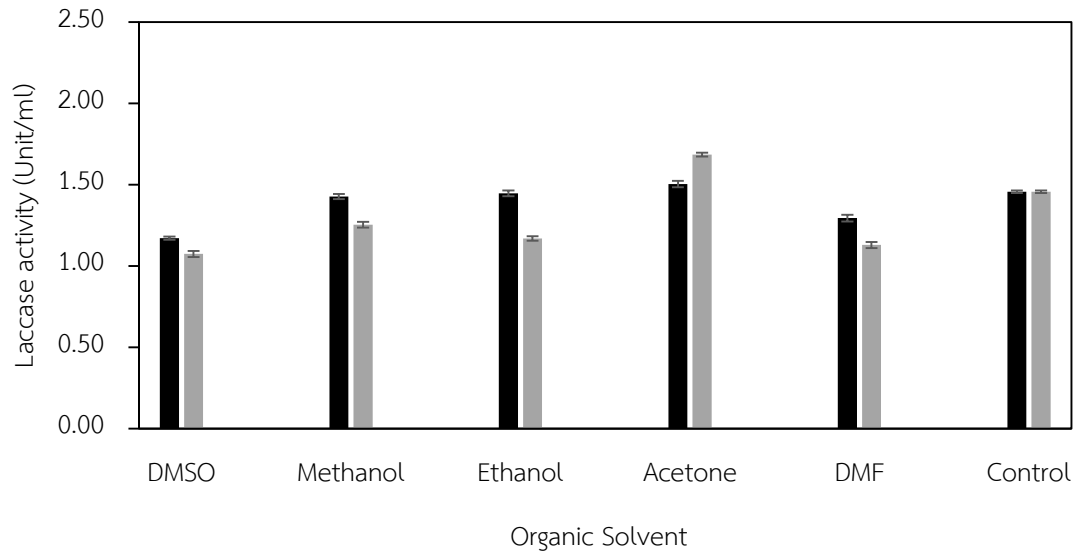
ภาพที่ 28 ผลของสารลดแรงตึงผิวและสารซักล้างต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดยแสดงผล (A) Laccase activity และ (B) Relative activity โดย (■) 1 mM และ (■) 10mM

4.7.6 ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์

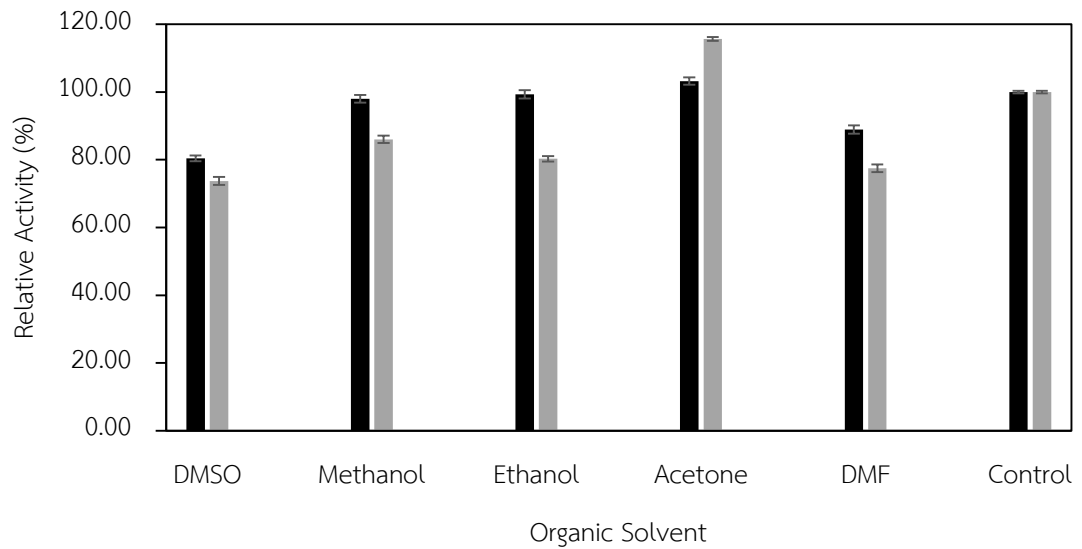
การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดยบ่มเอนไซม์กับตัวทำละลายอินทรีย์กลุ่ม hydrophilic organic solvent ได้แก่ Acetone (log P = -0.16), Dimethyl formamide (DMF) (log P = -1.01), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (log P = -1.35), Ethanol (log P = -0.30) และ Methanol (log P = -0.74) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25% และ 50% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพของแลคเคสโดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมควบคุม (เติมสารละลาย 25mM Tris-HCl pH 8.0 แทนตัวทำละลายอินทรีย์) แสดงผลการทดลองในภาพที่ 29

จากการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์ได้แสดงในภาพที่ 29 พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์มีผลต่อความเสถียรของแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P ซึ่งเมื่อนำเอนไซม์มาบ่มกับ Dimethyl formamide (DMF), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Ethanol และ methanol ความเข้มข้น 25%(v/v) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรได้ดีโดยมีค่า Relative Activity เท่ากับ 88, 80, 99 และ 97% ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นตัวทำละลายอินทรีย์เป็น 50%(v/v) พบว่าเอนไซม์ยังคงมีความเสถียรได้ดีโดยมี Relative Activity สูงกว่า 70% เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Trichoderma harzianum* HZN10 โดยจากการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มเอนไซม์กับ Acetone ,Ethanol และ Methanol ที่ความเข้มข้น 20%(v/v) จะมีค่า Relative Activity เท่ากับ 58, 85 และ 80% ตามลำดับ (Bagewadi *et al.*, 2017)

(A)



(B)

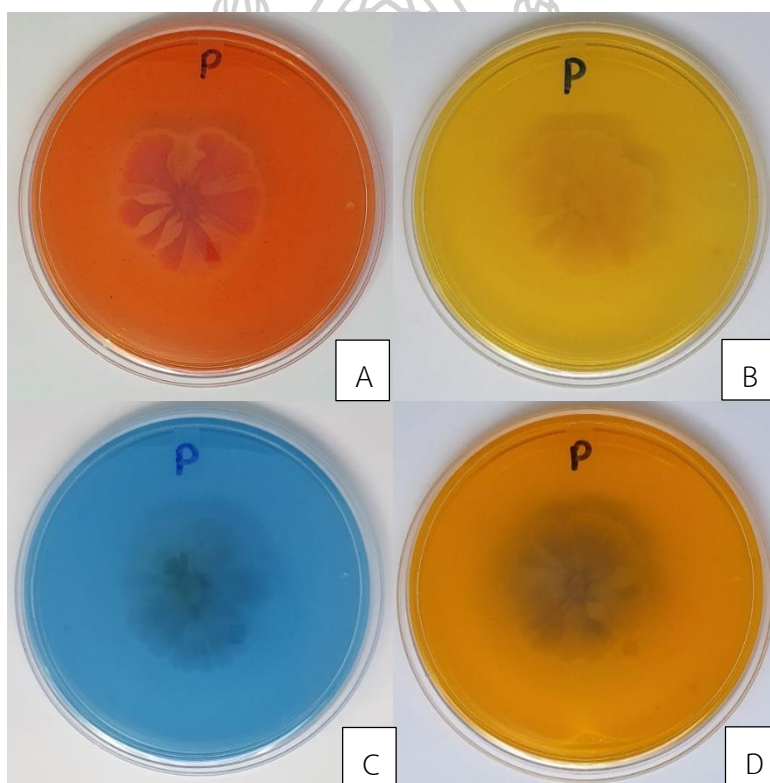


ภาพที่ 29 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดยแสดงผล (A) Laccase activity และ (B) Relative activity โดย (■) 25%(v/v) และ (■) 50%(v/v)

4.7.7 ศึกษาประสิทธิภาพการลดสีบนอาหารแข็งจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P และศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

การศึกษาประสิทธิภาพการลดสีสังเคราะห์บนอาหารแข็งของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดยสีสังเคราะห์ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ Methyl orange, Congo red, Bromocresol green และ Phenol red ความเข้มข้น 0.1 g/L (100 ppm) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 30

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการลดสีบนอาหารแข็งของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P พบว่า จุลินทรีย์สามารถลดสี Congo red บนอาหารแข็งได้ โดยสังเกตเห็นลักษณะวงใสรอบโคโลนี

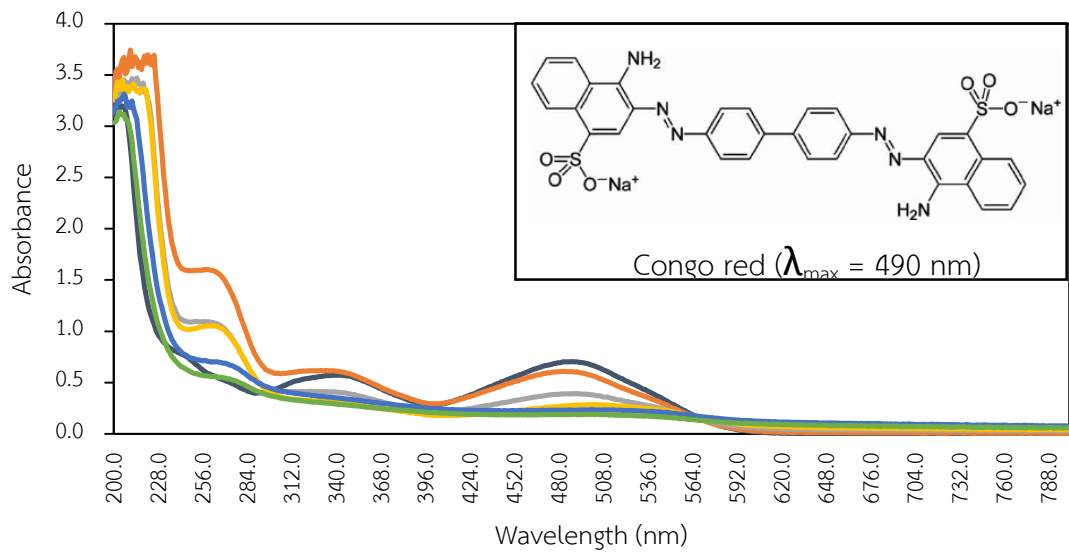


ภาพที่ 30 การลดสีของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P บนอาหารแข็ง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดย (A) 10 ppm Congo red, (B) 10 ppm Phenol red, (C) 10 ppm Bromocresol green และ (D) 10 ppm Methyl orange

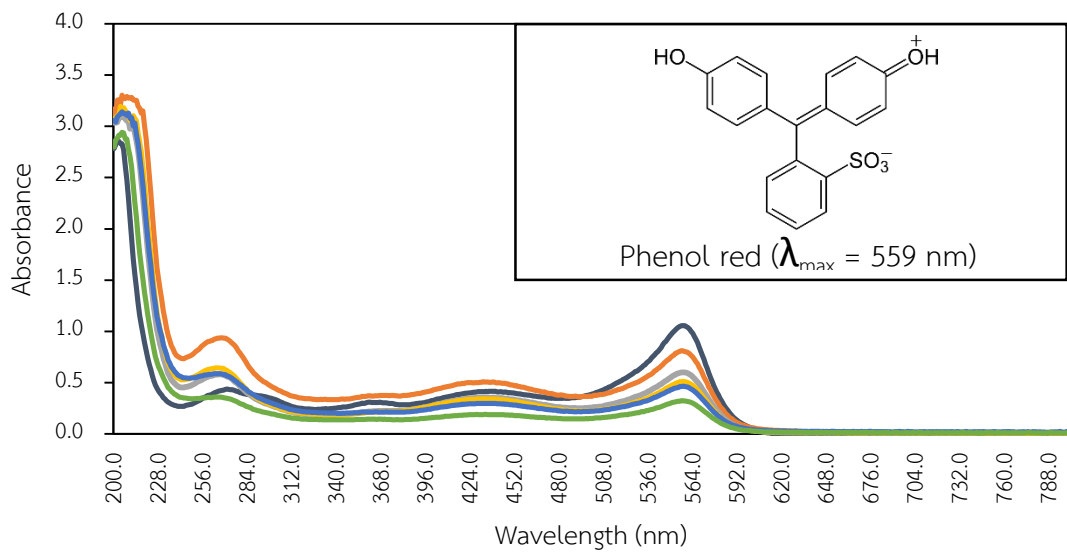
การศึกษาประสิทธิภาพการลดสีของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดยบ่มแลคเคสบริสุทธิ์ที่มีกัมมันตภาพแลคเคสเริ่มต้น 1.2 Unit/ml มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.07 mg/ml กับสีสังเคราะห์ ได้แก่ Methyl orange, Congo red, Bromocresol green และ Phenol red ที่ความเข้มข้น 0.05 g/L (50 ppm) ที่ละลายใน 25 mM Tris-HCl pH 8.0 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปสแกนค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดสีกับชุดควบคุม (หลอดควบคุม(control) คือ หลอดที่เติมบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์) โดยผลการสแกนค่าการดูดกลืนแสงของการกำจัดสีแสดงในภาพที่ 31 และผลประสิทธิภาพการกำจัด (%Decolorization) แสดงในภาพที่ 32

ผลการประเมินประสิทธิภาพการลดสีของแลคเคสบริสุทธิ์โดยผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงในภาพที่ 31 เมื่อบ่มเอนไซม์กับสีสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์สามารถลดสี Congo red, Phenol red, Bromocresol green และ Methyl orange ได้ดี โดยมีค่า Decolorization(%) ที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 73.23, 69.48, 69.33 และ 56.66% ตามลำดับ (ภาพที่ 31) และมีกัมมันตภาพแลคเคสคงเหลืออยู่ 0.45 U/ml โดยเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นก่อนและหลังบ่มกับเอนไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสีในหลอดปฏิกิริยาจางลง (ภาพที่ 33) จากภาพที่ 31A พบว่า Congo red มี λ_{max} ที่ 490 nm และค่าดูดกลืนแสงจะลดลงตามเวลาโดยที่จะลดลงในช่วง λ 260-560 nm และจากภาพที่ 31B พบว่า Phenol มี λ_{max} ที่ 559 nm และค่าดูดกลืนแสงจะลดลงตามเวลาโดยที่จะลดลงในช่วง λ 230-590 nm และจากภาพที่ 31C พบว่า Bromocresol green มี λ_{max} ที่ 617 nm และค่าดูดกลืนแสงจะลดลงตามเวลาโดยที่จะลดลงในช่วง λ 220-670 nm และจากภาพที่ 31D พบว่า Methyl orange มี λ_{max} ที่ 465 nm และค่าดูดกลืนแสงจะลดลงตามเวลาโดยที่จะลดลงในช่วง λ 230-280 nm และ 370-530 nm ซึ่งความสามารถในการกำจัดสีของเอนไซม์ขึ้นกับอุณหภูมิ pH ความเข้มข้นสี และโครงสร้างเคมีของสี เป็นต้น จากรายงานวิจัยการศึกษาผลประสิทธิภาพการลดสีของแลคเคสจาก *Trichoderma harzianum* HZN10 พบว่าเมื่อบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์กับ Malachite green, Methylene blue และ Congo red ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะมีค่า Decolorization(%) เท่ากับ 54, 46 และ 26% ตามลำดับ (Bagewadi *et al.*, 2017) เมื่อเปรียบเทียบการกำจัดสี Congo red พบว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P สามารถกำจัดสี Congo red ได้ดีกว่า โดยกลไกการย่อยสลายสี Congo red โดยแลคเคส (Telke *et al.*, 2010) แสดงในภาพที่ 34

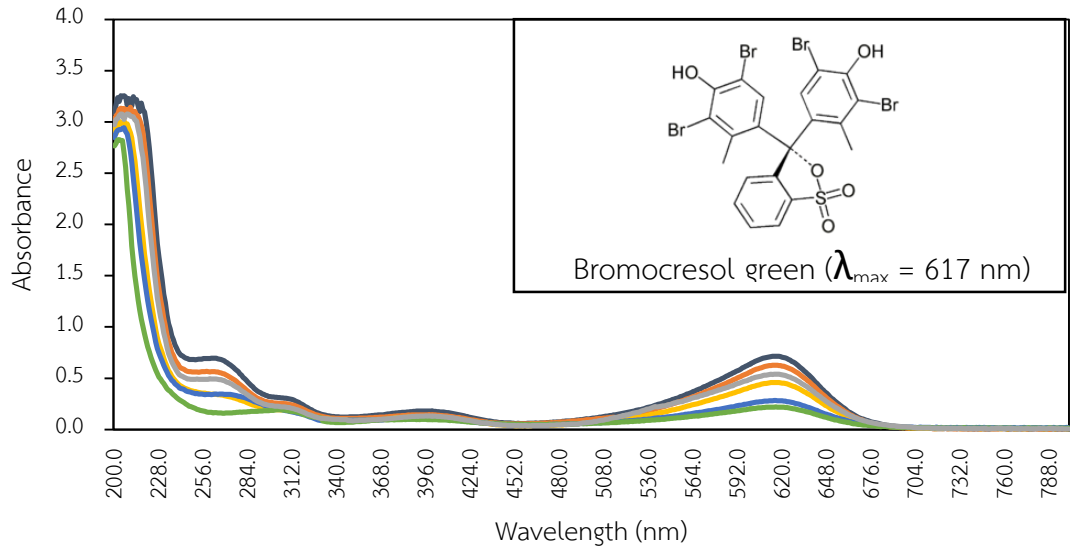
(A)



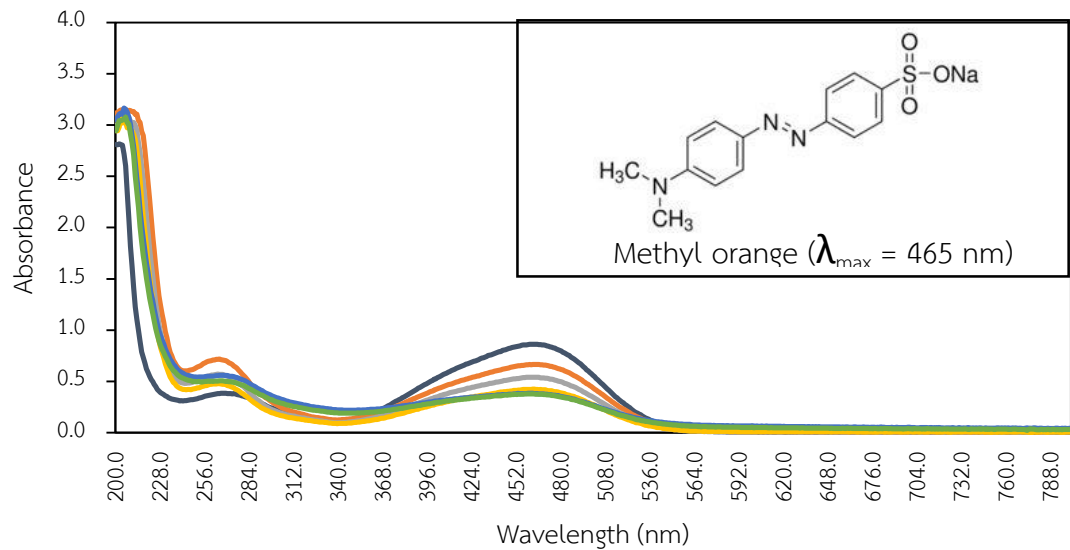
(B)



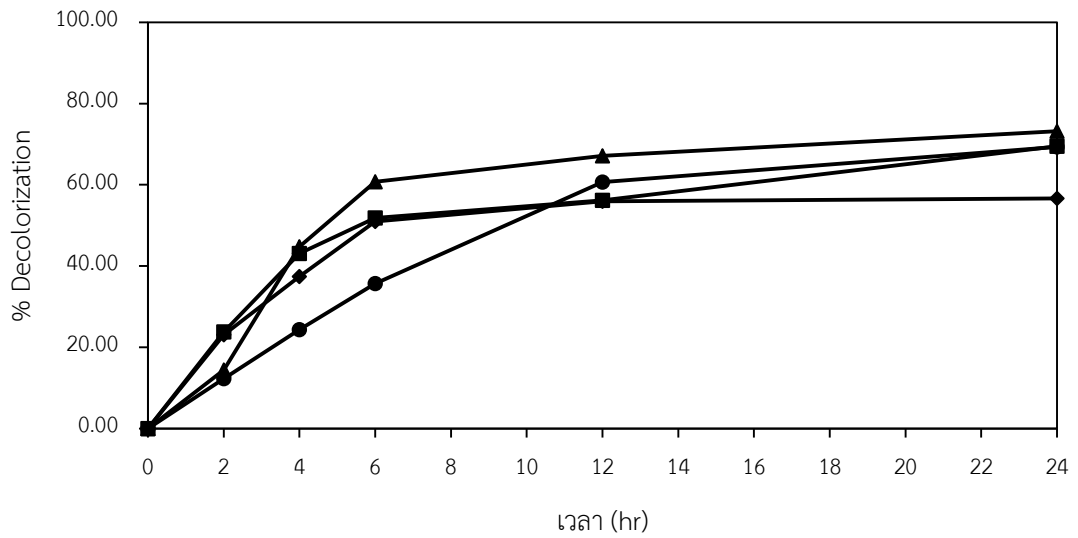
(C)



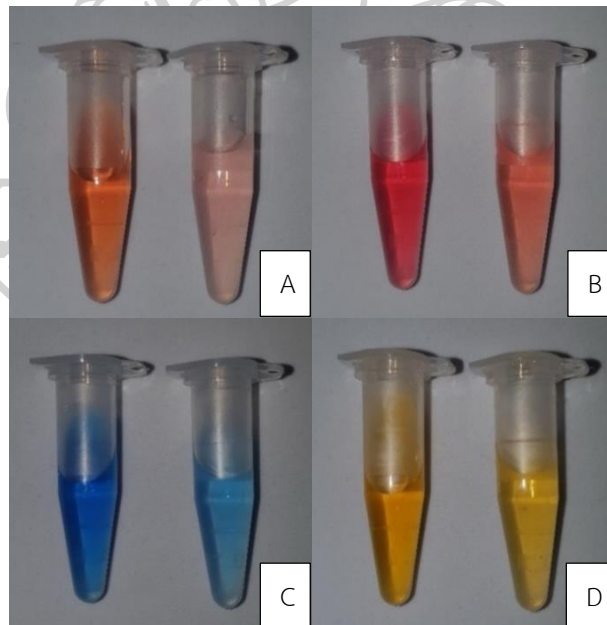
(D)



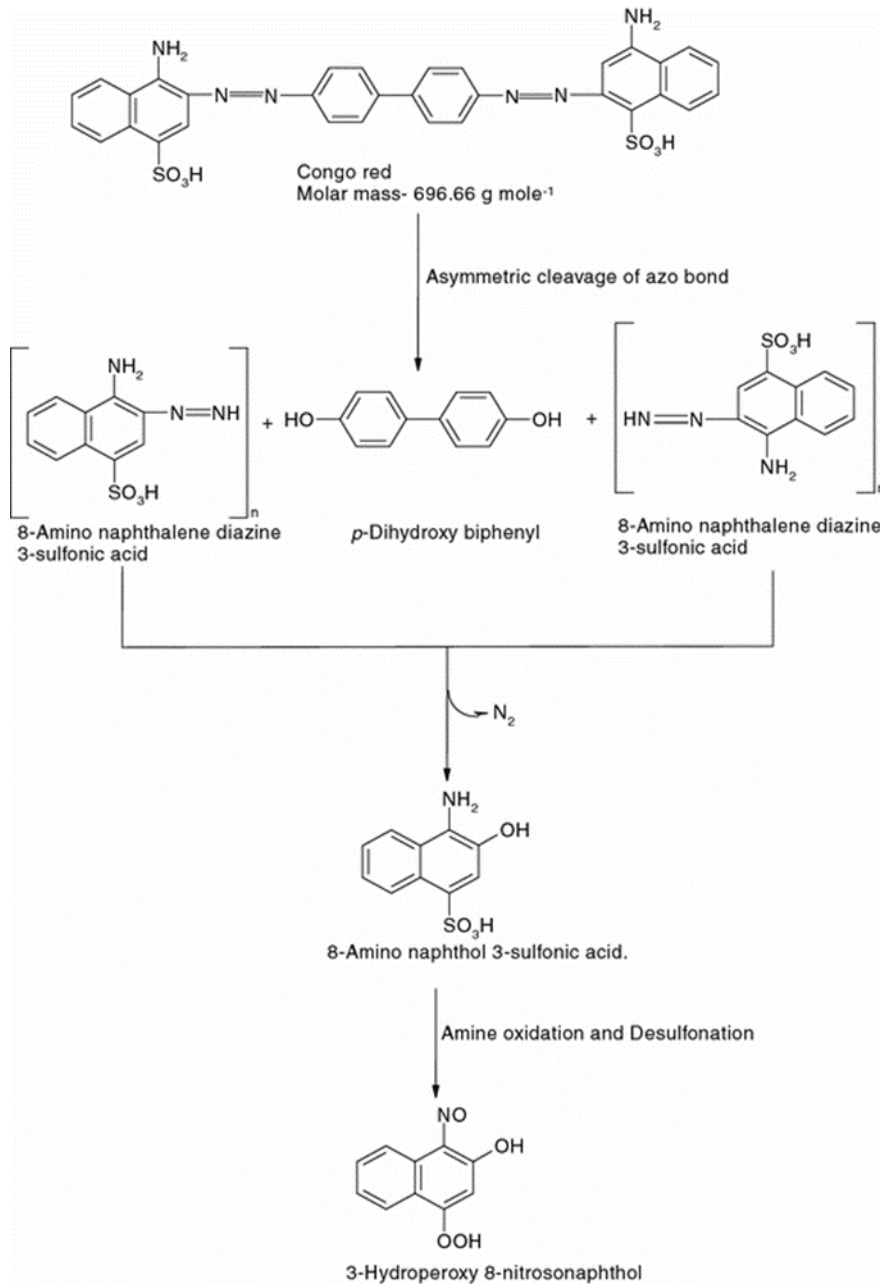
ภาพที่ 31 ผลการสังเกตการดูดกลืนแสงเพื่อศึกษาการลดสีของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P โดยปมที่ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย (A) Congo red, (B) Phenol red และ (C) Bromocresol green และ (D) Methyl orange โดย (—) Control, (—) 2 hr, (—) 4 hr, (—) 6 hr, (—) 12 hr และ (—) 24 hr



ภาพที่ 32 ประสิทธิภาพการลดสี (%Decolorization) ของแลคเคสบริสุทธ์จาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P โดยปมที่ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นสีเริ่มต้น 50 ppm โดย (▲) Congo red, (■) Phenol red, (◆) Methyl orange และ (●) Bromocresol green



ภาพที่ 33 เปรียบเทียบสีก่อนและหลังการกำจัดสีของแลคเคสบริสุทธ์จาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P ที่ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 โดยเปรียบเทียบชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 24 โดย (A) Congo red, (B) Phenol red, (C) Bromocresol green และ (D) Methyl orange โดยปฏิบัติการประกอบด้วย อัตราส่วนของ แลคเคส : 100 ppm สีสังเคราะห์ เท่ากับ 1:1



ภาพที่ 34 กลไกการย่อยสลายสี Congo red โดยแลคเคส

ที่มา : (Telke *et al.*, 2010)

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้ศึกษากระบวนการแยกบริสุทธิ์และสมบัติชีวเคมีของแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P โดยแยกแลคเคสบริสุทธิ์ได้ จากการผ่านกระบวนการแยก 3 ขั้นตอน คือ ตกตะกอนด้วย 60%(v/v) Acetone, Q-Sepharose ion exchange และ Sephacryl S-200 gel filtration chromatography ตามลำดับ หลังผ่านกระบวนการแยกบริสุทธิ์แลคเคสมีค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 34.09 U/mg มีจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ (fold) เพิ่มขึ้น 11.84 เท่า และค่าผลได้ของการแยกบริสุทธิ์เท่ากับ 7.80% แลคเคสบริสุทธิ์มีมวลโมเลกุลประมาณ 181 kDa

การศึกษาสสมบัติชีวเคมีของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P พบว่าแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P มีค่ากัมมันตภาพสูงสุดที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P คือ DMP ซึ่งมีค่า K_m , V_{max} และ $K_{catalytic}$ เท่ากับ 0.722 mM, 0.414 mM.min⁻¹ และ 1830.36 min⁻¹ ตามลำดับ แลคเคสสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยไอออนโลหะ ดังนี้ Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ และ Hg⁺ ขณะที่ Co²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ และ Ca²⁺ สามารถยับยั้งกัมมันตภาพแลคเคสได้ กัมมันตภาพแลคเคสลดลงเมื่อบ่มเอนไซม์กับ 2mM cysteine monohydrate, EDTA, Sodium azide และ 2-mercaptoethanol และแลคเคสมีความเสถียรในสารซักล้าง 1mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ความเข้มข้น 25-50%(v/v) DMF, DMSO, Ethanol และ Acetone เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการลดสีของแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P พบว่าเมื่อบ่มเอนไซม์กับสีสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดสี Congo red ได้ดีที่สุดโดยมีค่า Decolorization(%) เท่ากับ 73.23%



ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium

เตรียมอาหาร Production medium ซึ่งอาหารโดยคำนวณปริมาณตามต้องการโดยยังไม่ต้องเติม Guaiacol ซึ่งความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะแสดงในตารางที่ 7 ในกรณีเตรียมอาหารชนิดแข็งจะต้องเติม 2 g/L Agar แล้วละลายด้วยน้ำกลั่นจนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที หลังจากนั้นเติมจึงเติม Guaiacol ลงอาหารเลี้ยงในขั้นตอนสุดท้าย

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความเข้มข้น
Peptone	3.0 g/L
Glucose	10.0 g/L
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.60 g/L
diPotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.40 g/L
Magnesium sulfate heptahydrate ($\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.50 g/L
Zinc Sulphate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.001 g/L
Iron(II) sulfate heptahydrate ($\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.0005 g/L
Manganese(II) sulfate heptahydrate ($\text{Mn}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.005 g/L
Guaiacol	0.02% (v/v)

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย 0.1 M Sodium acetate buffer pH 3.0

ชั่ง Sodium Acetate 0.40 กรัม และเติม acetic acid ปริมาตร 5.9 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) เป็น 100 มิลลิลิตร

2. สารละลาย 0.1 M Sodium acetate buffer pH 4.0

ชั่ง Sodium Acetate 1.86 กรัม และเติม acetic acid ปริมาตร 4.6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) เป็น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลาย 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0

ชั่ง Sodium Acetate 5.52 กรัม และเติม acetic acid ปริมาตร 2.06 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) เป็น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลาย 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 6.0

ชั่ง Sodium phosphate monobasic 11.91 กรัม และ Sodium phosphate dibasic 3.67 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) เป็น 100 มิลลิลิตร

5. สารละลาย 1 M Tris-HCl buffer pH 7.0

ชั่ง Tris base 12.11 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) ปริมาตร 50 ml และปรับพีเอชด้วยกรด HCl จนกระทั่งสารละลายมีพีเอชเท่ากับ 7.0 และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) เป็น 100 มิลลิลิตร

6. สารละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.0

ตวง 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.0 มา 25 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) เป็น 1000 มิลลิลิตร ก่อนการใช้งานทุกครั้งต้องไล่อากาศออก

7. สารละลาย 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.0 + 1 M NaCl

ซึ่ง NaCl 58.44 กรัมด้วย 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.0 และปรับปริมาตรด้วย 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.0 เป็น 1000 มิลลิลิตร

8. สารละลาย 1 M Tris-HCl buffer pH 8.0

ซึ่ง Tris base 12.11 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) ปริมาตร 50 ml ปรับพีเอชด้วยกรด HCl จนกระทั่งสารละลายมีพีเอชเท่ากับ 8.0 และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) เป็น 100 มิลลิลิตร

9. สารละลาย 1 M Tris-HCl buffer pH 9.0

ซึ่ง Tris base 12.11 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) ปริมาตร 50 ml ปรับพีเอชด้วยกรด HCl จนกระทั่งสารละลายมีพีเอชเท่ากับ 9.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) เป็น 100 มิลลิลิตร

10. สารละลาย 0.1 M Glycine-NaOH buffer pH 10.0

ซึ่ง Glycine 0.7507 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) ปริมาตร 50 ml ปรับพีเอชด้วย 2mM NaOH จนกระทั่งสารละลายมีพีเอชเท่ากับ 10.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) เป็น 100 มิลลิลิตร

11. สารละลาย 0.1 M Glycine-NaOH buffer pH 11.0

ซึ่ง Glycine 0.7507 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) ปริมาตร 50 ml ปรับพีเอชด้วย 2mM NaOH จนกระทั่งสารละลายมีพีเอชเท่ากับ 11.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (distilled water) เป็น 100 มิลลิลิตร

12. สารละลาย 2mM DMP in 10% EtOH in 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0

ซึ่ง 2,6-dimethoxyphenol (DMP) 0.0155 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 เป็น 50 มิลลิลิตร

13. สารละลายสำหรับย้อมสีโปรตีน (Staining Solution)

เตรียมสารเคมีดังต่อไปนี้

Coomassie brilliant Blue R-250	0.5	กรัม
Methanol	200	มิลลิลิตร
Acetic acid	50	มิลลิลิตร

นำสารเคมีทั้งหมดผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

14. สารละลายสำหรับล้างสี Destain solution I

Methanol	500	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร

นำสารเคมีทั้งหมดผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

15. สารละลายสำหรับล้างสี Destain solution II

Methanol	50	มิลลิลิตร
Acetic acid	70	มิลลิลิตร

นำสารเคมีทั้งหมดผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

16. สารละลาย lysis buffer

Tris	18.1	มิลลิกรัม
Thiourea	0.76	กรัม
Urea	2.1	กรัม
CHAPS	0.2	กรัม

นำสารเคมีทั้งหมดผสมให้เข้ากันแล้วปรับพีเอชด้วยกรด HCl จนกระทั่งสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.5 ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน และนำมากรองผ่านแผ่นกรองสารละลาย เก็บสารละลายใน microtube ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

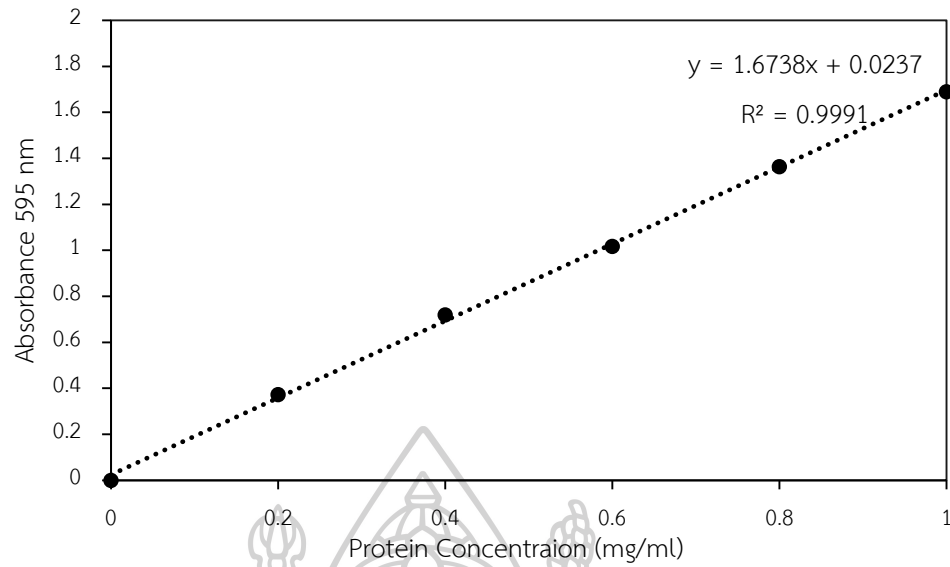
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน (Bovine Serum Albumin)

- 1.1 เตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0.1- 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น
- 1.2 ปิเปตสารละลาย BSA ในแต่ละความเข้มข้นใส่ 96 well plate หลุมละ 10 ไมโครลิตร และเติม Bradford dye reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ในที่มืด
- 1.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แสดงผลการทดลอง ดังตารางที่ 8 และนำมา plot กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโปรตีน ดังภาพที่ 35

ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงของ BSA ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

BSA(mg/ml)	Absorbance 595 nm			Dilution	Average	SD
	1	2	3			
0	0.000	0.000	0.000	10	0	0
0.2	0.039	0.030	0.043	10	0.373	0.0067
0.4	0.061	0.072	0.083	10	0.720	0.0110
0.6	0.099	0.105	0.101	10	1.017	0.0031
0.8	0.136	0.134	0.139	10	1.363	0.0025
1	0.172	0.167	0.168	10	1.690	0.0026



ภาพที่ 35 กราฟมาตรฐานของ BSA โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford method
การหาปริมาณโปรตีน

จากกราฟมาตรฐานของโปรตีน จะได้สมการ $y = 1.6738x + 0.0237$

โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

สามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนได้ดังนี้

$$\text{Protein (mg/ml)} = \frac{A_{595} - 0.0237}{1.6738} \times \text{Dilution factor}$$

2. กราฟโปรตีนมาตรฐานของ SDS-PAGE

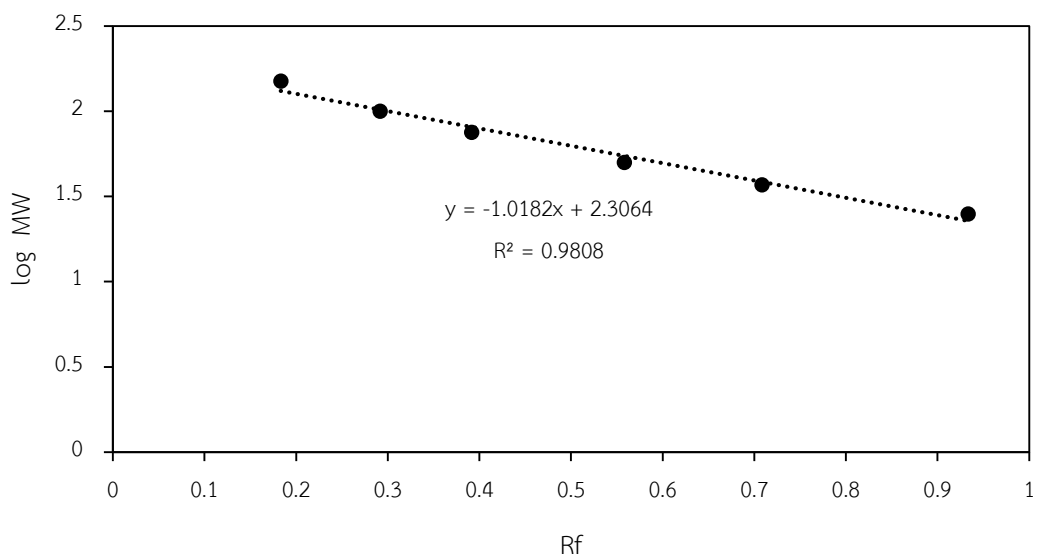
จากผลการทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE สามารถวัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด และระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye เพื่อหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของ}}$$

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_f โดยใช้ ตารางที่ 9 เพื่อใช้คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีน

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_f

MW (kDa)	Log MW	ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน (cm)	ระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye	R_f
150	2.176	1.1	6.0	0.183
100	2.000	1.75	6.0	0.292
75	1.875	2.35	6.0	0.392
50	1.699	3.35	6.0	0.558
37	1.568	4.25	6.0	0.708
25	1.398	5.6	6.0	0.933



ภาพที่ 36 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ใน 12 % SDS-PAGE

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ที่แสดงในภาพที่ 36 จะได้สมการ ดังนี้ $y = -1.0182x + 2.3064$

โดย y คือ ค่า log Molecular weight

x คือ ค่า R_f

วัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ได้ 2.95 เซนติเมตรและวัดระยะการเคลื่อนที่ของ loading dry ได้ 6.0 เซนติเมตร

$$R_f = \frac{3.00 \text{ cm}}{6.0 \text{ cm}} = 0.5$$

ค่า R_f ของแถบโปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์เท่ากับ 0.5

คำนวณหาค่า MW จากสมการจะได้ $y = -1.0182x + 2.3064$

$$\text{โดย } \log MW = -1.0182(0.5) + 2.3064$$

$$MW = 10^{1.7967}$$

$$MW = 62.62 \text{ kDa}$$

ดังนั้น โปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 62.62 kDa

3. กราฟโปรตีนมาตรฐานของ Native PAGE

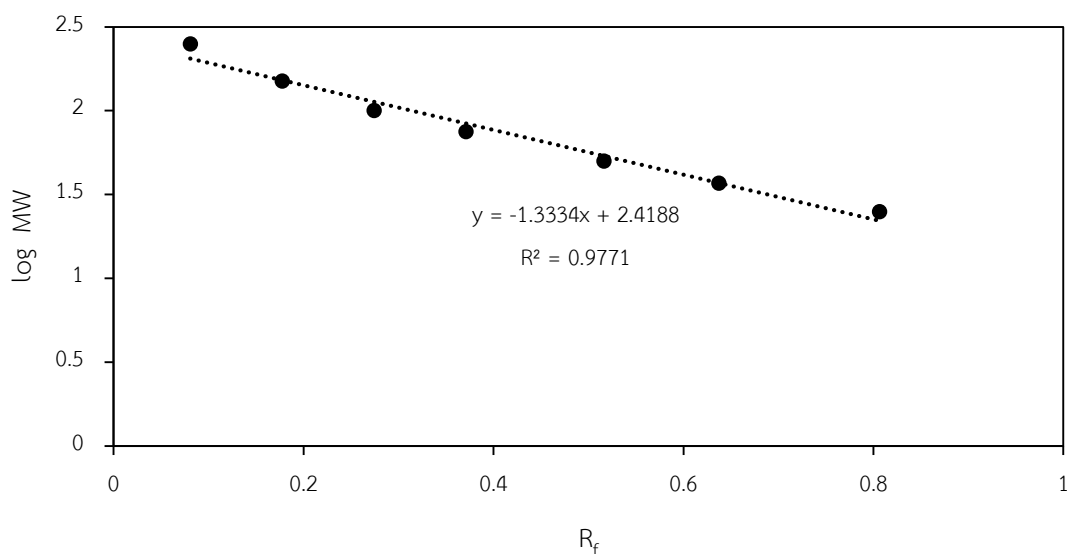
จากผลการทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Native PAGE สามารถวัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด และระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye เพื่อหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของ}}$$

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง \log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_f โดยใช้ ตารางที่ 10 เพื่อใช้คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีน

ตารางที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า \log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_f

MW (kDa)	Log MW	ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน (cm)	ระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye	R_f
250	2.398	0.5	6.2	0.0806
150	2.176	1.1	6.2	0.1774
100	2	1.7	6.2	0.2741
75	1.875	2.3	6.2	0.3709
50	1.699	3.2	6.2	0.5161
37	1.568	3.95	6.2	0.6371
25	1.398	5	6.2	0.8065



ภาพที่ 37 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ใน 12 % Native PAGE

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ที่แสดงในภาพที่ 37 จะได้สมการ ดังนี้ $y = -1.3334x + 2.4188$

โดย y คือ ค่า log Molecular weight

x คือ ค่า R_f

วัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ได้ 0.75 เซนติเมตรและวัดระยะการเคลื่อนที่ของ loading dry ได้ 6.2 เซนติเมตร

$$R_f = \frac{0.75 \text{ cm}}{6.2 \text{ cm}} = 0.120968$$

ค่า R_f ของแถบโปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์เท่ากับ 0.129032

คำนวณหาค่า MW จากสมการจะได้ $y = -1.303x + 2.4003$

$$\text{โดย } \log MW = -1.3334(0.120968) + 2.4188$$

$$MW = 10^{2.257502}$$

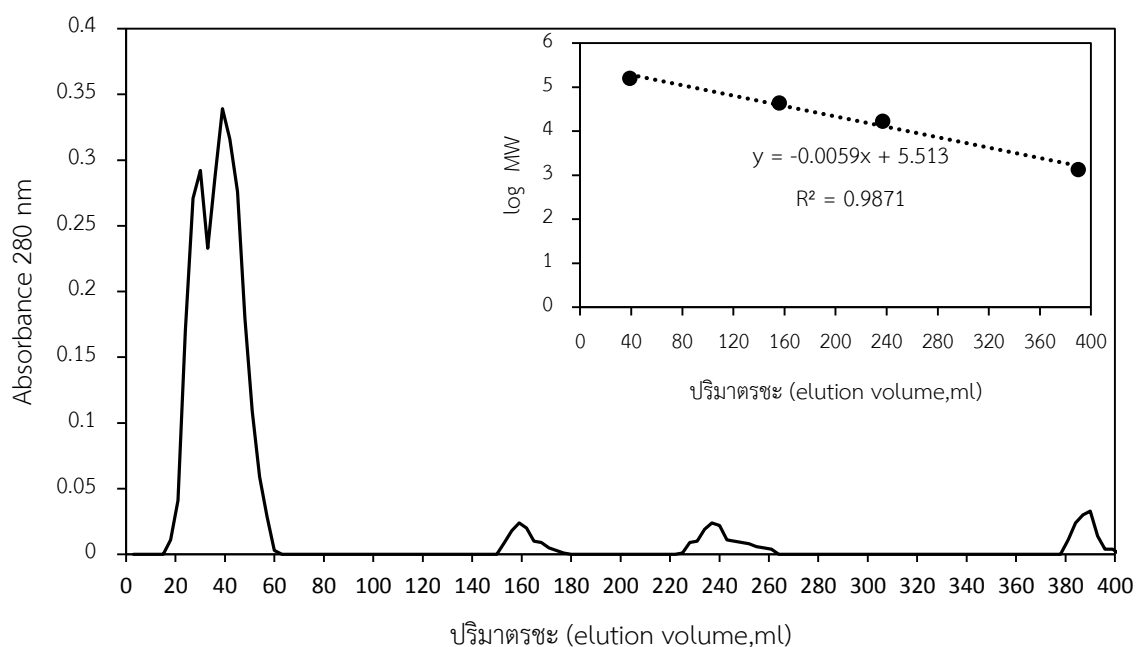
$$MW = 181 \text{ kDa}$$

ดังนั้น โปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 181 kDa

4. กราฟมาตรฐานเจลฟิเตรชันโครมาโตกราฟี

1. โปรตีนที่ใช้ คือ Gel Filtration standard (BIO-RAD) ประกอบด้วย Thyroglobulin (bovine), γ -Globulin (bovine), Ovalbumin (Chicken), Myoglobin (horse) และ Vitamin B12

2. วิเคราะห์ผ่าน gel filtration chromatography ที่ภายในคอลัมน์บรรจุ Sephacryl S-200 โดยชะด้วย 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.0 โดยใช้อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บ fraction ละ 3 มิลลิลิตร โดยโครมาโตแกรมแสดงภาพที่ 38



ภาพที่ 38 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานโปรตีน gel filtration chromatography โดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200

ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรที่ถูกชะออกจากคอลัมน์

Protein standard	MW	log MW	elution volume (ml)
Thyroglobulin (bovine)	670,000	5.8	30
γ -Globulin (bovine)	158,000	5.199	42
Ovalbumin (Chicken)	44,000	4.643	219
Myoglobin (horse)	17,000	4.23	303
Vitamin B12	1,350	3.13	378

จากกราฟมาตรฐานของโปรตีน จะได้สมการ ดังนี้ $y = -0.0059x + 5.513$

โดย y คือ ค่า log Molecular weight

x คือ elution volume (ml)

พบว่าโปรตีนที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ มีค่า เท่ากับ 42 ml

คำนวณหาค่า MW จากสมการจะได้ $y = -0.0059x + 5.513$

$$\log MW = -0.0059x + 5.513$$

$$MW = 10^{5.262}$$

$$MW = 184 \text{ kDa}$$

ดังนั้น โปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 184 kDa

ภาคผนวก ง
ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรีย โดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งการวิเคราะห์จะจำแนกโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA กับฐานข้อมูล ผลการวิเคราะห์พบว่า *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P มีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรีย 2 สกุล ได้แก่ *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* มากที่สุด 99.93% โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P แสดงในภาพที่ 39

ลำดับนิวคลีโอไทด์ Nucleotide sequence(s)			
ลำดับที่ No.	รหัสตัวอย่าง Sample No.	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ Nucleotide region of	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3') Nucleotide sequence (5' -> 3')
1	P	16S rDNA	>P CTCAGGACGAAACGCTGGGGGCTGCCTAATACATGCAAGTGCAGCGGACAGATGGGAGCTTGGCTCCCTGATGTTAGCGGGG ACGGGTGAGTAACACGCTGGGTAACTGCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATAACGGATGTTGTTTG AACCCATGTTCAAAATAAAAGGCTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCGGGGCAATTAGCTAGTTGGTGAAGTA ACGGCTCACCAAGGCAAGGATGCTGAGCGACTGAGAGGGTGGATGGCCCAACTGGGATGAGACAGGGCCGAGACTCCTA CGGAGGCGAGCTAGGGAACTTCCCGCAATCGACGAACTGTACCGGACCAACCGCCGCTGATGAAAGGTTTCGCAAT CGTAAAGCTCTGTTGTAGGGAGAAACAAGTACCGTTCCGATAGGGGCGTACCTTGACGCTACCTAACGAAAGCCACGGC TAACTAGCTGCCAGCAGCGCGGTAAATAGCTAGGTGGCAAGCGTGTCCGGAATTATTGGGCTAAAGGGCTCCGAGCGGT TTCTAAGCTGTGATGTGAAAGCCCGCCGCTCAACCGGGGAGGCTCATGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAGAGAGAG TGGAAATCCACGCTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACTGGGGAAGGCACTGTGGCTGTAACTGA CGCTGAGGAGCGAAAGCTGGGGAGGGAACAGGATTAGATCCCTGGTAGTCCACGCCATAACGATGAGTGTAACTGTA GGGGTTTTCCGGCCCTTAGTGTGCGAGCTAACGCTTAAGCACTCCGGCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGACTGAAACTCAAG GAATTGACGGGGCCCGACAAAGCGGTGAGCATGTTGTTAATCGAAGCAACGGAAGAACTTACAGTCTTGACATC CTCTGACAACTCTAGAGATAGGACGTCCCGCTGGGGGCGAGAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTCTGAGTCTGTGCA GATGTGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCGCTGATCTAGTTGCCAGTTCAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCGG GTGACAAACCGGAGGAAAGTGGGATGACGTCAAATCATCTAGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGCTGCAATGGACA GAACAAAGGGCAGGAAACCGGAGTTAAGCCAAATCCCAAAATCTGTTCTAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTGCACTG CGTAAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCGCGGGGGAATACGTTCCGGGGCTTGTACACACCGCCGCTCA CACACGAGAGTTTGTAAACCCGAACTCGGTGAGTAACTTTTAGGAGCCAGCCCGGAAAGTGGGACAGATGATGGGG Ga

ภาพที่ 39 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ P

ภาคผนวก จ

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ 12 ค่ากัมมันตภาพแลคเคสแต่ละขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

Purification step	Dilution	Volume (ml)	Absorbance 468 nm					Laccase activity (U/ml)	Total activity (U)
			1	2	3	เฉลี่ย	Control		
Crude extraction	20	2000.00	0.402	0.410	0.395	0.402	0.008	0.11	213.16
60%(v/v) Acetone precipitation	400	32.00	0.717	0.714	0.707	0.713	0.002	3.84	122.93
Q-sepharose	200	7.50	0.898	0.911	0.907	0.905	0.002	2.44	18.31
Sephacryl S-200	200	7.50	0.826	0.822	0.815	0.821	0.001	2.22	16.62

ตารางที่ 13 ปริมาณโปรตีนแลคเคสแต่ละขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

Purification step	Dilution	Volume (ml)	Absorbance 595 nm				protein (mg/ml)	Total protein (mg)
			1	2	3	เฉลี่ย		
Crude extraction	1	2000.00	0.090	0.096	0.086	0.0907	0.04	74
60% Acetone precipitation	5	32.00	0.215	0.221	0.211	0.2157	0.63	20.29
Q-sepharose	1	7.50	0.158	0.162	0.153	0.1577	0.08	0.61
Sephacryl S-200	1	7.50	0.144	0.141	0.137	0.1407	0.07	0.49

ตารางที่ 14 ผลการศึกษาการผลิตแลคเคสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

Time (hr)	Dilution	Absorbance 468 nm					Laccase activity (U/ml)
		1	2	3	เฉลี่ย	control	
0	1	0.000	0.000	0.000	0.0000	0	0.0000
12	1	0.121	0.117	0.120	0.1193	0	0.0016
24	1	0.201	0.196	0.193	0.1967	0.001	0.0026
36	2	0.491	0.496	0.493	0.4933	0.001	0.0133
48	2	0.778	0.779	0.773	0.7767	0.000	0.0210
60	5	0.491	0.494	0.499	0.4947	0.001	0.0334
72	10	0.331	0.329	0.326	0.3287	0.001	0.0443
84	10	0.421	0.434	0.436	0.4303	0.002	0.0579
96	10	0.523	0.531	0.530	0.5280	0.001	0.0712
108	10	0.613	0.611	0.616	0.6133	0.001	0.0828
120	10	0.688	0.681	0.694	0.6877	0.001	0.0928
132	20	0.386	0.389	0.383	0.3860	0.001	0.1041
144	20	0.406	0.409	0.401	0.4053	0.002	0.1090
156	20	0.419	0.413	0.417	0.4163	0.001	0.1123
168	20	0.421	0.419	0.426	0.4220	0.002	0.11352

การศึกษาสมบัติชีวเคมีของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

ตารางที่ 15 ผลของ pH ที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

pH	Dilution	Absorbance 468 nm					Laccase activity (U/ml)	Relative activity (%)
		1	2	3	เฉลี่ย	control		
3	50	0.248	0.255	0.251	0.2513	0.001	0.169 ± 0.002	7.58 ± 0.08
4	50	0.343	0.331	0.329	0.3343	0.001	0.225 ± 0.005	10.09 ± 0.24
5	100	0.241	0.244	0.249	0.2447	0.001	0.329 ± 0.005	14.76 ± 0.26
6	100	0.311	0.315	0.318	0.3147	0	0.425 ± 0.004	19.06 ± 0.23
7	200	0.388	0.389	0.395	0.3907	0.001	1.053 ± 0.010	47.21 ± 0.58
8	200	0.757	0.756	0.759	0.7573	0.002	2.041 ± 0.004	91.51 ± 0.52
9	200	0.826	0.831	0.825	0.8273	0.002	2.230 ± 0.009	100.00 ± 0.01
10	200	0.602	0.606	0.608	0.6053	0.001	1.633 ± 0.008	73.22 ± 0.46
11	100	0.353	0.358	0.366	0.359	0.001	0.483 ± 0.009	21.69 ± 0.42



ตารางที่ 16 ผลของ pH ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธุ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

pH	Time (Day)	Dilution	Absorbance 468 nm				Laccase activity (U/ml)	Relative activity (%)
			1	2	เฉลี่ย	control		
pH 7	0	200	0.344	0.341	0.3425	0.001	0.923 ± 0.005	100.00 ± 0.30
	0.5	200	0.343	0.339	0.341	0.001	0.918 ± 0.007	99.56 ± 0.41
	1	200	0.341	0.339	0.34	0.001	0.916 ± 0.004	99.27 ± 0.02
	1.5	200	0.337	0.338	0.3375	0.000	0.912 ± 0.002	98.83 ± 0.10
	2	200	0.334	0.335	0.3345	0.001	0.901 ± 0.002	97.66 ± 0.10
	3	200	0.332	0.334	0.333	0.002	0.895 ± 0.004	96.93 ± 0.20
	4	200	0.327	0.334	0.3305	0.002	0.888 ± 0.013	96.19 ± 0.71
	5	200	0.328	0.325	0.3265	0.001	0.880 ± 0.006	95.31 ± 0.30
	6	200	0.321	0.319	0.32	0.001	0.862 ± 0.004	93.41 ± 0.20
	7	200	0.318	0.314	0.316	0.002	0.848 ± 0.008	91.95 ± 0.41
	8	200	0.309	0.313	0.311	0.002	0.835 ± 0.008	90.48 ± 0.41
	11	200	0.301	0.303	0.302	0.003	0.808 ± 0.004	87.56 ± 0.20
	14	200	0.298	0.301	0.2995	0.002	0.804 ± 0.006	87.12 ± 0.31
	17	200	0.295	0.293	0.294	0.002	0.789 ± 0.004	85.51 ± 0.20
	20	200	0.289	0.284	0.2865	0.002	0.769 ± 0.009	83.31 ± 0.51
	23	200	0.274	0.283	0.2785	0	0.753 ± 0.017	81.55 ± 0.91
27	200	0.267	0.272	0.2695	0.001	0.725 ± 0.010	78.62 ± 0.51	
30	200	0.252	0.258	0.255	0.001	0.687 ± 0.011	74.38 ± 0.61	

ตารางที่ 14 (ต่อ)ผลของ pH ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

pH	Time (Day)	Dilution	Absorbance 468 nm				Laccase activity (U/ml)	Relative Activity (%)
			1	2	เฉลี่ย	control		
pH8	0	250	0.559	0.555	0.557	0.000	1.881 ± 0.010	100.00 ± 0.51
	0.5	250	0.556	0.558	0.557	0.001	1.88 ± 0.005	99.82 ± 0.25
	1	250	0.555	0.556	0.5555	0.001	1.873 ± 0.003	99.55 ± 0.12
	1.5	250	0.553	0.552	0.5525	0.002	1.860 ± 0.002	98.83 ± 0.13
	2	250	0.551	0.549	0.55	0.001	1.855 ± 0.005	98.57 ± 0.25
	3	250	0.545	0.548	0.5465	0.001	1.843 ± 0.007	97.94 ± 0.38
	4	250	0.544	0.548	0.546	0.002	1.838 ± 0.01	97.67 ± 0.51
	5	250	0.534	0.541	0.5375	0.001	1.813 ± 0.02	96.32 ± 0.89
	6	250	0.531	0.533	0.532	0.001	1.794 ± 0.005	95.33 ± 0.25
	7	250	0.527	0.529	0.528	0.002	1.778 ± 0.005	94.44 ± 0.25
	8	250	0.521	0.526	0.5235	0.000	1.77 ± 0.012	93.99 ± 0.63
	11	250	0.519	0.527	0.523	0.002	1.76 ± 0.020	93.54 ± 1.01
	14	250	0.517	0.518	0.5175	0.001	1.745 ± 0.002	92.73 ± 0.13
	17	250	0.513	0.516	0.5145	0.004	1.725 ± 0.007	91.65 ± 0.40
	20	250	0.501	0.498	0.4995	0.001	1.684 ± 0.007	89.50 ± 0.39
	23	250	0.494	0.489	0.4915	0.001	1.657 ± 0.012	88.06 ± 0.63
27	250	0.485	0.482	0.4835	0.002	1.627 ± 0.008	86.45 ± 0.38	
30	250	0.478	0.477	0.4775	0.000	1.613 ± 0.002	85.73 ± 0.13	

ตารางที่ 14 (ต่อ)ผลของ pH ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

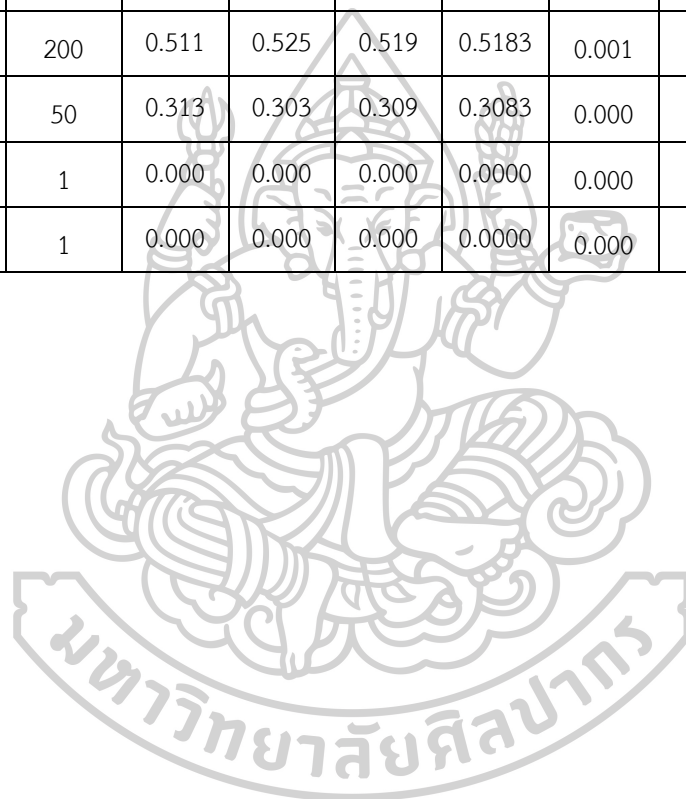
pH	Time (Day)	Dilution	Absorbance 468 nm				Laccase activity (U/ml)	Relative Activity (%)
			1	2	เฉลี่ย	control		
pH9	0	250	0.647	0.646	0.6465	0.002	2.177 ± 0.002	100.00 ± 0.12
	0.5	250	0.644	0.645	0.6445	0.001	2.174 ± 0.002	99.85 ± 0.12
	1	250	0.642	0.639	0.6405	0.002	2.157 ± 0.007	99.07 ± 0.38
	1.5	250	0.624	0.627	0.6255	0.002	2.106 ± 0.007	96.74 ± 0.38
	2	250	0.617	0.615	0.616	0.001	2.078 ± 0.004	95.42 ± 0.25
	3	250	0.605	0.594	0.5995	0.001	2.022 ± 0.026	92.86 ± 1.39
	4	250	0.585	0.59	0.5875	0.000	1.98 ± 0.012	91.16 ± 0.63
	5	250	0.577	0.568	0.5725	0.002	1.927 ± 0.02	88.52 ± 1.14
	6	250	0.558	0.559	0.5585	0.001	1.884 ± 0.002	86.50 ± 0.12
	7	250	0.547	0.545	0.546	0.001	1.84 ± 0.005	84.56 ± 0.25
	8	250	0.539	0.535	0.537	0.002	1.807 ± 0.005	83.01 ± 0.51
	11	250	0.503	0.508	0.5055	0.003	1.698 ± 0.012	77.97 ± 0.63
	14	250	0.463	0.459	0.461	0.001	1.554 ± 0.009	71.37 ± 0.51
	17	250	0.435	0.431	0.433	0.003	1.453 ± 0.009	66.72 ± 0.51
	20	250	0.398	0.394	0.396	0.002	1.331 ± 0.010	61.13 ± 0.51
	23	250	0.366	0.371	0.3685	0.001	1.242 ± 0.012	57.02 ± 0.63
27	250	0.345	0.341	0.343	0.001	1.155 ± 0.009	53.07 ± 0.51	
30	250	0.314	0.309	0.3115	0.002	1.046 ± 0.012	48.02 ± 0.63	

ตารางที่ 14 (ต่อ)ผลของ pH ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

pH	Time (Day)	Dilution	Absorbance 468 nm				Laccase activity (U/ml)	Relative Activity (%)
			1	2	เฉลี่ย	control		
pH10	0	200	0.622	0.617	0.6195	0.003	1.666 ± 0.010	100.00 ± 0.51
	0.5	200	0.611	0.615	0.613	0.003	1.649 ± 0.007	98.94 ± 0.41
	1	200	0.602	0.607	0.6045	0.001	1.631 ± 0.010	97.89 ± 0.51
	1.5	200	0.587	0.58	0.5835	0.002	1.572 ± 0.013	94.32 ± 0.71
	2	200	0.572	0.578	0.575	0.004	1.543 ± 0.011	92.62 ± 0.71
	3	200	0.561	0.565	0.563	0.001	1.519 ± 0.007	91.16 ± 0.41
	4	200	0.553	0.55	0.5515	0.003	1.482 ± 0.005	88.96 ± 0.30
	5	200	0.538	0.531	0.5345	0.004	1.434 ± 0.013	86.05 ± 0.72
	6	200	0.514	0.512	0.513	0.002	1.381 ± 0.004	82.89 ± 0.2
	7	200	0.494	0.488	0.491	0.004	1.316 ± 0.012	78.99 ± 0.60
	8	200	0.465	0.472	0.4685	0.001	1.264 ± 0.013	75.83 ± 0.72
	11	200	0.419	0.418	0.4185	0.003	1.123 ± 0.0019	67.40 ± 0.10
	14	200	0.381	0.375	0.378	0.002	1.016 ± 0.011	60.99 ± 0.61
	17	200	0.321	0.331	0.326	0.002	0.876 ± 0.019	52.55 ± 1.02
	20	200	0.291	0.289	0.29	0.001	0.781 ± 0.004	46.88 ± 0.20
	24	200	0.253	0.245	0.249	0.001	0.670 ± 0.015	40.23 ± 0.81
27	200	0.225	0.224	0.2245	0.000	0.607 ± 0.002	36.41 ± 0.10	
30	200	0.198	0.195	0.1965	0.001	0.528 ± 0.005	31.71 ± 0.30	

ตารางที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อกัมมันตภาพแลคเคสปริสุทธ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

Temperature (°C)	Dilution	Absorbance 468 nm					Lacase activity (U/ml)	Relative activity (%)
		1	2	3	เฉลี่ย	control		
30	200	0.147	0.155	0.144	0.1487	0.001	0.399 ± 0.015	18.33 ± 0.78
40	200	0.484	0.489	0.486	0.4863	0.001	1.311 ± 0.004	60.24 ± 0.56
50	200	0.511	0.514	0.511	0.5120	0.001	1.381 ± 0.005	63.42 ± 0.58
60	200	0.811	0.801	0.805	0.8057	0.000	2.178 ± 0.014	100.00 ± 0.00
70	200	0.511	0.525	0.519	0.5183	0.001	1.398 ± 0.018	64.21 ± 1.27
80	50	0.313	0.303	0.309	0.3083	0.000	0.208 ± 0.003	9.57 ± 0.10
90	1	0.000	0.000	0.000	0.0000	0.000	0.000	0.00
100	1	0.000	0.000	0.000	0.0000	0.000	0.000	0.00



ตารางที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทซ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

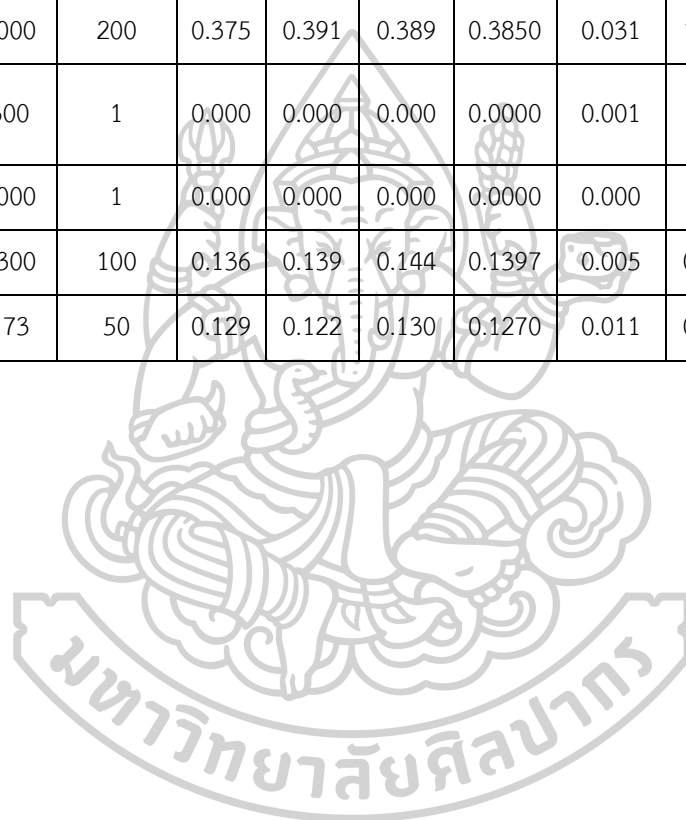
Temperature (°C)	Time (hr)	Dilution	Absorbance 468 nm				Laccase activity (U/ml)	Relative activity (%)
			1	2	เฉลี่ย	control		
4	0	250	0.514	0.521	0.518	0.001	1.745 ± 0.017	100.00 ± 0.96
	6	250	0.519	0.516	0.518	0.001	1.745 ± 0.007	100.00 ± 0.41
	12	250	0.518	0.516	0.517	0.001	1.743 ± 0.004	99.90 ± 0.27
	18	250	0.516	0.517	0.517	0.001	1.742 ± 0.002	99.81 ± 0.13
	24	250	0.512	0.516	0.514	0.000	1.736 ± 0.009	99.52 ± 0.55
	30	250	0.515	0.512	0.514	0.001	1.731 ± 0.007	99.22 ± 0.410
	36	250	0.512	0.514	0.513	0.001	1.729 ± 0.004	99.13 ± 0.27
	42	250	0.512	0.509	0.511	0.000	1.725 ± 0.007	98.84 ± 0.41
	48	250	0.508	0.513	0.511	0.001	1.721 ± 0.012	98.64 ± 0.68
	54	250	0.508	0.511	0.510	0.000	1.721 ± 0.007	98.64 ± 0.41
	60	250	0.508	0.507	0.508	0.001	1.711 ± 0.002	98.06 ± 0.14
30	0	250	0.514	0.521	0.518	0.001	1.744 ± 0.016	100.00 ± 0.96
	6	250	0.492	0.496	0.494	0.000	1.669 ± 0.009	95.64 ± 0.55
	12	250	0.461	0.463	0.462	0.002	1.554 ± 0.004	89.06 ± 0.27
	18	250	0.431	0.437	0.434	0.001	1.463 ± 0.014	83.83 ± 0.82
	24	250	0.398	0.407	0.403	0.002	1.353 ± 0.021	77.54 ± 1.23
	30	250	0.374	0.364	0.369	0.001	1.243 ± 0.024	71.25 ± 1.37
	36	250	0.334	0.333	0.334	0.002	1.120 ± 0.002	64.18 ± 0.14
	42	250	0.297	0.302	0.300	0.001	1.008 ± 0.019	57.79 ± 0.68
	48	250	0.267	0.265	0.266	0.001	0.895 ± 0.004	51.31 ± 0.27
	54	250	0.243	0.237	0.240	0.001	0.807 ± 0.014	46.27 ± 0.82
	60	250	0.213	0.206	0.210	0.002	0.701 ± 0.016	40.17 ± 0.96

ตารางที่ 19 ผลของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

Metal ions	Concentration (mM)	Dilution	Absorbance 468 nm					Laccase activity (U/ml)	Relative activity (%)
			1	2	3	เฉลี่ย	control		
Mg ²⁺	1	250	0.337	0.339	0.344	0.340	0.005	1.132 ± 0.12	104.04 ± 1.68
	5	250	0.367	0.369	0.374	0.370	0.016	1.196 ± 0.012	109.94 ± 1.74
Mn ²⁺	1	250	0.344	0.358	0.348	0.350	0.010	1.148 ± 0.24	105.58 ± 3.68
	5	250	0.387	0.381	0.389	0.386	0.026	1.215 ± 0.014	111.69 ± 0.54
Ca ²⁺	1	250	0.273	0.283	0.279	0.278	0.015	0.889 ± 0.017	81.78 ± 2.59
	5	250	0.215	0.206	0.208	0.210	0.025	0.623 ± 0.015	57.35 ± 1.01
Co ²⁺	1	250	0.308	0.319	0.313	0.313	0.015	1.008 ± 0.018	92.65 ± 2.93
	5	250	0.226	0.234	0.218	0.226	0.031	0.658 ± 0.027	60.56 ± 3.20
Cu ²⁺	1	250	0.485	0.473	0.476	0.478	0.093	1.300 ± 0.021	119.56 ± 1.23
	5	250	0.684	0.677	0.681	0.681	0.244	1.475 ± 0.011	135.61 ± 0.88
Fe ²⁺	1	250	0.171	0.167	0.176	0.171	0.004	0.565 ± 0.015	51.97 ± 0.97
	5	250	0.088	0.085	0.082	0.085	0.001	0.284 ± 0.010	26.08 ± 0.95
Ni ²⁺	1	250	0.371	0.381	0.375	0.376	0.061	1.063 ± 0.017	97.72 ± 2.87
	5	250	0.410	0.415	0.423	0.416	0.134	0.953 ± 0.022	87.58 ± 2.32
Zn ²⁺	1	250	0.261	0.267	0.271	0.266	0.010	0.866 ± 0.017	79.60 ± 2.08
	5	250	0.201	0.214	0.207	0.207	0.016	0.646 ± 0.021	59.42 ± 2.8
Hg ²⁺	1	250	0.423	0.425	0.432	0.427	0.085	1.154 ± 0.016	106.12 ± 1.84
	5	250	0.506	0.515	0.512	0.511	0.116	1.334 ± 0.015	122.67 ± 2.96
Control (without Metal ion)	-	250	0.327	0.319	0.326	0.324	0.002	1.087 ± 0.014	100.00 ± 0.01

ตารางที่ 20 ศึกษาความจำเพาะของสารตั้งต้นต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

Substrate	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	Dilution	Absorbance					Laccase activity (U/ml)	Relative activity (%)
			1	2	3	เฉลี่ย	control		
DMP	14,800	200	0.527	0.520	0.519	0.5220	0.001	1.408 \pm 0.004	100.00 \pm 0.01
ABTS	36,000	100	0.141	0.149	0.146	0.1453	0.001	0.080 \pm 0.002	5.69 \pm 0.20
SGZ	64,000	100	0.077	0.069	0.075	0.0737	0.005	0.021 \pm 0.001	1.52 \pm 0.09
Guaiacol	12,000	200	0.375	0.391	0.389	0.3850	0.031	1.180 \pm 0.029	83.80 \pm 2.74
Veratryl Alcohol	9,300	1	0.000	0.000	0.000	0.0000	0.001	0.000	0.00
Phenol red	22,000	1	0.000	0.000	0.000	0.0000	0.000	0.000	0.00
<i>o</i> -Anisidine	11,300	100	0.136	0.139	0.144	0.1397	0.005	0.238 \pm 0.007	10.91 \pm 0.63
<i>p</i> -Anisidine	1,173	50	0.129	0.122	0.130	0.1270	0.011	0.989 \pm 0.037	45.28 \pm 2.55



ตารางที่ 21 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

Inhibitors	Concentration (mM)	Dilution	Absorbance 468 nm					Laccase activity (U/ml)	Relative activity (%)
			1	2	3	เฉลี่ย	control		
EDTA	2	50	0.532	0.534	0.531	0.532	0.025	0.342 ± 0.001	22.77 ± 0.07
	10	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2-mercapto ethanol	2	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	10	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Cysteine Monohydrate	2	200	0.311	0.296	0.309	0.305	0.007	0.806 ± 0.022	53.56 ± 1.48
	10	10	0.143	0.136	0.144	0.141	0.001	0.019 ± 0.001	1.26 ± 0.04
Sodium azide	2	200	0.445	0.452	0.458	0.452	0.000	1.221 ± 0.018	81.09 ± 1.19
	10	50	0.401	0.396	0.384	0.394	0.020	0.252 ± 0.005	16.77 ± 0.04
Control (without inhibitor)	-	200	0.555	0.559	0.563	0.559	0.002	1.505 ± 0.011	100.00 ± 0.73



ตารางที่ 20 ผลของสารลดแรงตึงผิวและสารซักล้างต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์

P

Reagents	Concentration (mM)	Dilution	Absorbance 468 nm					Laccase activity (U/ml)	Relative activity (%)
			1	2	3	เฉลี่ย	control		
Triton X-100	1	200	0.346	0.340	0.339	0.342	0.004	0.913 ± 0.010	60.95 ± 0.01
	10	50	0.307	0.322	0.316	0.315	0.015	0.203 ± 0.005	13.54 ± 0.01
Tween 20	1	200	0.318	0.305	0.311	0.311	0.003	0.833 ± 0.018	55.66 ± 0.02
	10	50	0.397	0.401	0.397	0.398	0.012	0.261 ± 0.002	17.43 ± 0.00
Tween 80	1	200	0.389	0.399	0.391	0.393	0.001	1.060 ± 0.014	70.76 ± 0.01
	10	100	0.243	0.241	0.246	0.243	0.006	0.321 ± 0.003	21.42 ± 0.25
SDS	1	200	0.511	0.521	0.527	0.520	0.002	1.399 ± 0.022	93.44 ± 0.77
	10	200	0.245	0.252	0.241	0.246	0.005	0.651 ± 0.015	43.50 ± 1.04
Control (without Reagents)	-	200	0.552	0.559	0.560	0.557	0.003	1.497 ± 0.012	100.00 ± 0.79



ตารางที่ 22 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ P

Organic Solvent	Concentration (v/v)	Dilution	Absorbance 468 nm					Laccase activity (U/ml)	Relative activity (%)
			1	2	3	เฉลี่ย	control		
DMSO	25	200	0.441	0.434	0.435	0.437	0.003	1.172 ± 0.010	80.41 ± 0.87
	50	200	0.402	0.411	0.398	0.404	0.006	1.075 ± 0.018	73.73 ± 1.21
Methanol	25	200	0.531	0.539	0.527	0.532	0.004	1.428 ± 0.017	97.96 ± 1.11
	50	200	0.466	0.474	0.479	0.473	0.009	1.254 ± 0.018	86.03 ± 1.05
Ethanol	25	200	0.537	0.546	0.533	0.539	0.003	1.448 ± 0.018	99.32 ± 1.21
	50	200	0.431	0.441	0.436	0.436	0.003	1.170 ± 0.014	80.28 ± 0.78
Acetone	25	200	0.552	0.566	0.561	0.560	0.003	1.505 ± 0.019	103.21 ± 1.11
	50	200	0.623	0.631	0.626	0.627	0.003	1.686 ± 0.011	115.64 ± 0.56
DMF	25	200	0.474	0.481	0.489	0.481	0.002	1.296 ± 0.020	88.88 ± 1.24
	50	200	0.415	0.429	0.422	0.422	0.004	1.130 ± 0.019	77.50 ± 1.16
Control (without solvent)	-	200	0.537	0.543	0.541	0.540	0.001	1.458 ± 0.008	100.00 ± 0.37



รายการอ้างอิง

- Albarrán-Velo, J., López-Iglesias, M., Gotor, V., Gotor-Fernández, V. and Lavandera, I. (2017). Synthesis of nitrogenated lignin-derived compounds and reactivity with laccases. Study of their application in mild chemoenzymatic oxidative processes. *RSC Advances*, 7(80), 50459-50471.
- Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Revol-Junelles, A.-M., Scher, J. and Muniglia, L. (2014). Laccase-catalysed functionalisation of chitosan by ferulic acid and ethyl ferulate: Evaluation of physicochemical and biofunctional properties. *Food chemistry*, 161, 279-287.
- Arias, M. E., Arenas, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Ball, A. S. and Hernández, M. (2003). Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1953-1958.
- Asgher, M., Irshad, M. and Iqbal, H. (2013). Purification and characterization of novel manganese peroxidase from *Schizophyllum commune* IBL-06. *Agriculture and Biology*, 15(4), 749-754.
- Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I. and Ninnekar, H. Z. (2017). Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 139-150.
- Ben Younes, S. and Sayadi, S. (2011). Purification and characterization of a novel trimeric and thermotolerant laccase produced from the ascomycete *Scytalidium thermophilum* strain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 73(1), 35-42.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Breen, A. and Singleton, F. L. (1999). Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(3), 252-258.

- Brijwani, K., Rigdon, A. and Vadlani, P. V. (2010). Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. *Enzyme Research*, 2010, 149748.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, Á. T., Romero, J., Gutiérrez, A. and del Río, J. C. (2007). Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1264-1271.
- Chandra, R. and Chowdhary, P. (2015). Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(2), 326-342.
- Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35(1), 93-96.
- Cordi, L., Minussi, R. C., Freire, R. and Duran, N. (2014). Fungal laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. *African Journal of Biotechnology*, 6(10), 1255-1259.
- Durán, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A. and Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 907-931.
- Edens, W. A., Goins, T. Q., Dooley, D. and Henson, J. M. (1999). Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3071-3074.
- Eggert, C., Temp, U. and Eriksson, K. E. L. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1151-1158.
- El-Batal, A. I., ElKenawy, N. M., Yassin, A. S. and Amin, M. A. (2015). Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. *Biotechnology Reports*, 5, 31-39.
- Gahlout, M., Gupte, S. and Gupte, A. (2013). Optimization of culture condition for enhanced decolorization and degradation of azo dye reactive violet 1 with concomitant production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma cupreum* AG-1. *3 Biotech*, 3(2), 143-152. doi:10.1007/s13205-012-0079-z
- Galai, S., Limam, F. and Marzouki, M. N. (2008). A new *Stenotrophomonas maltophilia* strain producing laccase. Use in decolorization of synthetics dyes. *Appl Biochem*

- Biotechnol*, 158, 416-431.
- Han, M.-J., Han, M.-J., Choi, H. and Song, H.-G. (2006). Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Microbiology*, 43, 555-560.
- Holm, K., Nielsen, D. and Eriksen, J. (1998). Automated colorimetric determination of recombinant fungal laccase activity in fermentation samples using syringaldazine as chromogenic substrate. *The Journal of automatic chemistry*, 20, 199-203.
- Hu, H. L., van den Brink, J., Gruben, B. S., Wösten, H. A. B., Gu, J. D. and de Vries, R. P. (2011). Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 248-252.
- Iyer, G. and Chattoo, B. B. (2003). Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters*, 227(1), 121-126.
- Kersten, P. and Cullen, D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics and Biology*, 44(2), 77-87.
- Kirk, O., Borchert, T. and Fuglsang, C. (2002). Industrial enzyme applications. *Journal of Biotechnology*, 13, 345-351.
- Lei Wang, C., Zhao, M., Bin Li, D., Zong Cui, D., Yi Yang, H., Lu, L. and Dong Wei, X. (2010). Isolation and characterization of a novel *Bacillus subtilis* WD23 exhibiting laccase activity from forest soil. *African Journal of Biotechnology*, 9(34), 725-729.
- Li, A., Zhu, Y., Xu, L., Zhu, W. and Tian, X. (2008). Comparative study on the determination of assay for laccase of *Trametes* sp. *African Journal of Biochemistry Research*, 2, 181-183.
- Madhavi, V. and Lele, S. S. (2009). Laccase: Properties and applications. *Bioresources*, 4(4), 1694-1717.
- Mehandia, S., Sharma, S. C. and Arya, S. K. (2020). Isolation and characterization of an alkali and thermostable laccase from a novel *Alcaligenes faecalis* and its application in decolorization of synthetic dyes. *Biotechnology Reports*, 25, e00413.

- Mishra, S. and Srivastava, S. (2016). Production of extracellular laccase from bacterial strain *Bacillus subtilis* MTCC 1039 using different parameter. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 13(3), 1645-1650.
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V. and Yaropolov, Y. I. (2007). Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5), 523-535.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A. T. and Martínez, M. J. (1997). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2166-2174.
- Muthukumar, N. P. and Sevanan, M. (2014). Production, purification and application of bacterial laccase: A review. *Journal of Biotechnology*, 13(5), 196-205.
- Muthukumarasamy, N. P., Jackson, B., Joseph Raj, A. and Sevanan, M. (2015). Production of Extracellular Laccase from *Bacillus subtilis* MTCC 2414 Using Agroresidues as a Potential Substrate. *Biochemistry Research International*, 2015, 765190. doi:10.1155/2015/765190
- Nagai, M., Sato, T., H, W., K, S., M, K. and H, E. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 327-335.
- O'Malley, D. M., Whetten, R., Bao, W., Chen, C.-L. and Sederoff, R. (1993). The role of laccase in lignification. *The plant journal*, 4, 751-757.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. and Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 920-924.
- Pawlik, A., Wójcik, M., Rutka, K., Motyl-Gorzel, K., Osieńska-Jaroszuk, M., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., Skorupska, A., Rogalski, J. and Janusz, G. (2016). Purification and characterization of laccase from *Sinorhizobium meliloti* and analysis of the lacc gene. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 138-147.
- Pierce, J. (1999). Colour in textile effluents - the origins of the problem. *Society of Dyers*

and Colourists, 110, 131-133.

- Pombeiro-Sponchiado, S. R., Sousa, G. S., Andrade, J. C. R., Lisboa, H. F. and Gonçalves, R. C. R. (2017). Production of Melanin Pigment by Fungi and Its Biotechnological Applications *Melanin* (Vol. 47-64). INTECH open, London: INTECH open science.
- Prajapati, H. V. and Minocheherhomji, F. P. (2018). Laccase - A wonder molecule : A review of its properties and applications. *Pure & Applied Bioscience*, 6(1), 766-773.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Steijiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes, M. M., Boudet, A. M. and Goffaer, D. (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases-a divergent gene family-in poplar. *Journal of Biochemistry*, 259, 485-495.
- Reinhammar, B. (1970). Purification and properties of laccase and stellacyanin from *Rhus vernicifera*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 205(1), 35-47.
- Ribeiro, D. S., Henrique, S. M. B., SOliveira, L. S., Macedo, G. and Fleuri, L. F. (2010). Enzymes in juice processing: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 635-641.
- Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. and Lin, F.-H. (2008). Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry*, 43(7), 736-742.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (Vol. 61). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Amat, A., Lucas-Elío, P., Fernández, E., García-Borrón, J. C. and Solano, F. (2001). Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1547(1), 104-116.
- Scherer, M. and Fischer, R. (1998). Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. *Archives of Microbiology*, 170(2), 78-84.
- Shin, K.-S. and Lee, Y.-J. (2000). Purification and characterization of a new member of

- the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384(1), 109-115.
- Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T. and Gorton, L. (2006). Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 841-847.
- Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M. and Kumar, A. (2011). Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Research*, 2011, 1-11.
- Sirirat, S. (2010). Enzyme technology in the pulp and paper industry. *Technology Promotion*, 37(213), 69-73.
- Siroosi, M., Amoozegar, M. A. and Khajeh, K. (2016). Purification and characterization of an alkaline chloride-tolerant laccase from a halotolerant bacterium, *Bacillus* sp. strain WT. *Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 134, 89-97.
- Sondhi, S., Sharma, P., Saini, S., Puri, N. and Gupta, N. (2014). Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali-stable, metal tolerant laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. *PLOS ONE*, 9(5), e96951.
- Sterjiades, R., Dean, J. F. D., Gamble, G., Himmelsbach, D. S. and Eriksson, K.-E. L. (1993). Extracellular laccases and peroxidases from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell-suspension cultures. *Planta*, 190(1), 75-87.
- Supatra, K. (2017). *Screening of the laccase production microorganisms*. (Bachelor), Silpakorn University.
- Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K. and Inamori, Y. (2003). A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(10), 2167-2175.
- Telke, A. A., Joshi, S. M., Jadhav, S. U., Tamboli, D. P. and Govindwar, S. P. (2010). Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SU-EBT. *Biodegradation*, 21(2), 283-296.
- Thirunavukkarasu, A., Anand, A. and Gopakumaran, N. (2014). Production and partial purification of laccase from *Pseudomonas aeruginosa* ADN04. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8, 727-731.

- Tien, M. and Kirk, T. K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology* (Vol. 161, pp. 238-249): Academic Press.
- Viswanath, B., Chandra, M., Pallavi, H. and Rajasekhar Reddy, B. (2010). Screening and assessment of lacasse producing fungi isolated from different environment samples. *Journal of Biotechnology*, 7(8), 1129-1133.
- Wanida, C. (2012). Color removal technology in industrial waste water. *Burapha Science*, 17(1), 181-191.
- Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 23688-23596.
- Wessel, D. and Flüggé, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, 138(1), 141-143.
- Wu, Y.-R., Luo, Z.-H., Kwok-Kei Chow, R. and Vrijmoed, L. L. P. (2010). Purification and characterization of an extracellular laccase from the anthracene-degrading fungus *Fusarium solani* MAS2. *Bioresource Technology*, 101(24), 9772-9777.
- Zhang, C., Zhang, S., Diao, H., Zhao, H., Zhu, X., Lu, F. and Lu, Z. (2013). Purification and characterization of a temperature and pH-stable laccase from the spores of *Bacillus vallismortis* fmb-103 and its application in the degradation of malachite green. *Agricultural food chemistry*, 61, 5468-5473.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ชัยภัทร ฉัตรวรอุณหวงศ์
วัน เดือน ปี เกิด	20 สิงหาคม 2536
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลหัวเฉียว จังหวัด กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2554 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาปลายจาก โรงเรียนทวีธาภิเศก จังหวัด กรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2558 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัด นครปฐม พ.ศ. 2559 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัด นครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	4/149 The idol 1 ถนน เลียบคลองทวีวัฒนา แขวง บางแคเหนือ เขต บางแค กทม. 10160
ผลงานตีพิมพ์	Chaiyapat Chatwarunwong and Sinthuwat Ritthitham. Decolorization of congo red by Laccase from isolated Bacillus sp. B1. The Pure and Applied Chemistry International Conference 2020, 13-14 February 2020 (Poster presentation)