



การแยกบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1



โดย
นางสาวสิริรัตน์ สุขพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การแยกบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACCASE FROM *BACILLUS* SP.

FN1



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department of BIOTECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2021
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ การแยกบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของแลคเคสจาก *Bacillus*
sp. FN1

โดย นางสาวสิริรัตน์ สุขพันธ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิ้นธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ
รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิ้นธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศักดิ์ จตุรพิริย์)

61401204 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

คำสำคัญ : แลคเคส, การแยกบริสุทธิ์, สมบัติชีวเคมี

นางสาว สิริรัตน์ สุขพันธ์: การแยกบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันธวัฒน์ ฤทธิธรรม

แลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 ถูกนำมาแยกบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย 60% (v/v) อะซิโตน Sephacryl S-200 gel filtration chromatography และ Q-Sepharose ion exchange chromatography เมื่อผ่านกระบวนการแยกบริสุทธิ์แล้ว แลคเคสที่ได้มีค่ากัมมันตภาพจำเพาะ 1.18 U/mg มีความบริสุทธิ์ 4.67 เท่า และเมื่อตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Sephacryl S-200 gel filtration chromatography พบว่าแลคเคสบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32.99 และ 115.08 kDa ตามลำดับ โดย pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคส คือ 9.0 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แลคเคสมีความเสถียรที่ pH 5.0-9.0 และอุณหภูมิ 4 °C เมื่อศึกษาจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์พบว่ากัมมันตภาพแลคเคสมีค่าสูงสุดเมื่อใช้ 2,6-Dimethoxyphenol (2,6-DMP) เป็นสับสเตรท มีค่า K_m , V_{max} และ K_{cat} เท่ากับ 0.806 mM, 20.243 mM.min⁻¹ และ 2985.69 sec⁻¹ ตามลำดับ ผลกระทบของไอออนโลหะพบว่าที่ความเข้มข้น 1.0 mM ไอออนของ Co²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺ และ Zn²⁺ สามารถเพิ่มกัมมันตภาพแลคเคสได้ และที่ความเข้มข้น 5.0 mM มีเพียงไอออนของ Co²⁺ เท่านั้นที่สามารถเพิ่มกัมมันตภาพแลคเคสได้ แลคเคสถูกยับยั้งโดย EDTA, L-cysteine และ β -mercaptoethanol ผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์และสารลดแรงตึงผิวพบว่าแลคเคสจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 50% (v/v) Dimethyl formamide (DMF) และ Dimethoxy sulfoxide (DMSO) และที่ความเข้มข้น 5.0 mM Triton x-100 และแลคเคสบริสุทธิ์สามารถกลดสี Congo red ได้สูงสุด 27.20% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

61401204 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : Laccase, Purification, Characterization

MISS SIRIRAT SUKPHAN : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACCASE FROM *BACILLUS* SP. FN1 THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR SINTHUWAT RITTHITHAM

Laccase produced by *Bacillus* sp. FN1 was homogeneously purified by 60% (v/v) acetone precipitation, Sephacryl S-200 gel filtration chromatography and Q-Sepharose ion exchange chromatography. The purified laccase showed specific activity of 1.18 U/mg with the purification fold of 4.67. The molecular weight of purified laccase estimated by SDS-PAGE and Sephacryl S-200 gel filtration chromatography were 32.99 and 115.08 kDa, respectively. The optimum pH and temperature were 9.0 and 60 °C, while the pH and temperature stability were found at pH 5.0-9.0 and 4 °C. A kinetic study revealed that 2,6-Dimethoxyphenol was the best substrate with K_m 0.806 mM, V_{max} 20.243 mM.min⁻¹ and K_{cat} 2985.69 sec⁻¹. The effect of metal ion at the concentration of 1.0 mM of Co²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺ and Zn²⁺ and Co²⁺ at the concentration of 5.0 mM, it greatly enhanced laccase activity. Laccase was inhibited by EDTA, L-cysteine and β -mercaptoethanol. Organic solvents and surfactants as follows 50% (v/v) Dimethyl formamide (DMF) and Dimethoxy sulfoxide (DMSO) and 5.0 mM Triton x-100 showed inhibition of laccase activity. The purified enzyme could decolorize 25 ppm congo red with a decolorization percentage of 27.20% in 24 h

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเพราะความกรุณาอย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิ้นธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา วัฒนการุณ และ รองศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ อีกทั้ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข ประธานกรรมการ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อดิศักดิ์ จตุรพิริย์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่านที่ให้คำปรึกษา และข้อแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างมาก

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่สนับสนุนในด้านการศึกษา และเป็นกำลังใจที่สำคัญซึ่งเป็นแรงผลักดันในการทำวิจัย รวมทั้งความช่วยเหลือ สนับสนุนในด้านต่าง ๆ ตลอดมา

ขอบคุณเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

นางสาว สิริรัตน์ สุขพันธ์

สารบัญ

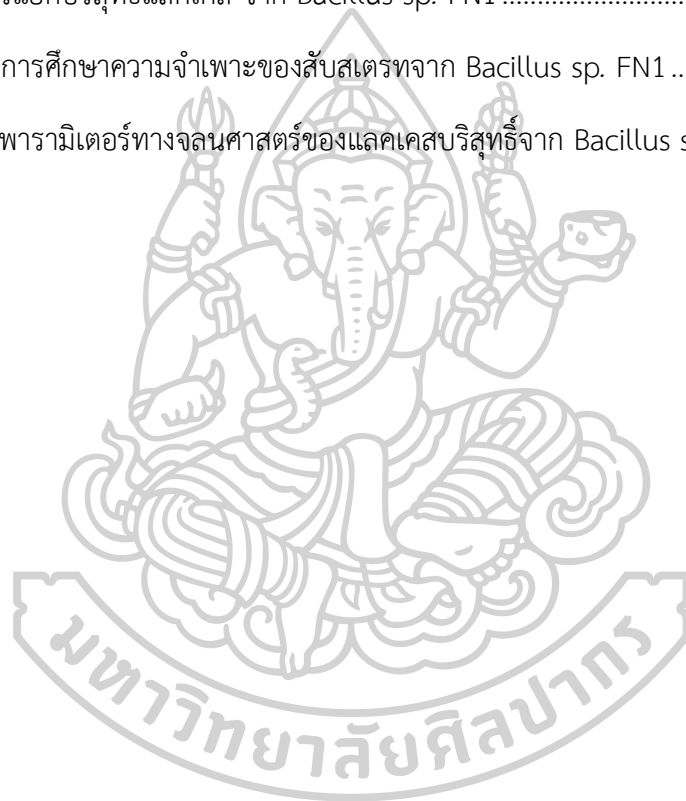
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 แลคเคส	4
2.2 สมบัติโมเลกุลแลคเคส.....	5
2.3 โครงสร้างผลึกของแลคเคส	6
2.4 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคส.....	8
2.5 สีย้อม.....	9
2.6 กลไกการกำจัดสีโดยจุลินทรีย์	9
2.6.1 กลไกการดูดซับ.....	9
2.6.2 กลไกการกำจัดสีด้วยเอนไซม์.....	10
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	10

บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการดำเนินงานวิจัย	14
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี	14
3.1.1 เครื่องมือ	14
3.1.2 อุปกรณ์	14
3.1.3 สารเคมี.....	15
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	17
3.2.1 จุลินทรีย์.....	17
3.2.2 การเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. FN1 เพื่อผลิตแลคเคส	17
3.2.3 การแยกบริสุทธิ์แลคเคส	17
3.2.3.1 การเตรียม crude laccase.....	17
3.2.3.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอะซีโตน (C_3H_6O).....	18
3.2.3.3 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี.....	18
3.2.3.4 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ.....	19
3.2.3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยวิธี SDS-PAGE	19
3.2.3.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยวิธี Native-PAGE.....	21
3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford.....	22
3.2.5 การศึกษาคูณสมบัติของแลคเคส.....	22
3.2.5.1 การศึกษาความจำเพาะของสับสเตรทต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์.....	22
3.2.5.2 การวิเคราะห์กัมมันตภาพแลคเคส.....	22
3.2.5.3 การศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์.....	28
3.2.5.4 การศึกษา pH ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์กัมมันตภาพแลคเคส.....	28
3.2.5.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกัมมันตภาพแลคเคส.....	28
3.2.5.6 การศึกษาความเสถียรของ pH	29
3.2.5.7 การศึกษาความเสถียรของอุณหภูมิ.....	29

3.2.5.8 การศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคส.....	29
3.2.5.9 การศึกษาผลของตัวยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคส.....	29
3.2.5.10 ศึกษาผลของตัวทำลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์.....	30
3.2.5.11 ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธิ์.....	30
3.2.5.12 การศึกษาการกำจัดสีสังเคราะห์ด้วยแลคเคสบริสุทธิ์.....	30
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	32
4.1 จุลินทรีย์ผลิตแลคเคส.....	32
4.2 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยวิธี 16s rDNA.....	33
4.3 การแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. FN1.....	35
4.3.1 การผลิตแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. FN1.....	35
4.3.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซีโตน.....	35
4.3.3 การแยกบริสุทธิ์แลคเคสด้วย Fast Flow Protein Liquid Chromatography.....	35
4.3.3.1 การแยกบริสุทธิ์แลคเคสด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี.....	35
4.3.3.2 การแยกบริสุทธิ์แลคเคสด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ.....	36
4.4 การวิเคราะห์การแยกบริสุทธิ์แลคเคส.....	37
4.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	40
4.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์แลคเคสด้วยเทคนิค Gel filtration chromatography.....	41
4.7 การศึกษาสมบัติบางประการของแลคเคสบริสุทธิ์.....	41
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	65
รายการอ้างอิง.....	66
ประวัติผู้เขียน.....	73

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สถานะอะตอมทองแดงที่แตกต่างกันในแลคเคสจากรา	5
ตารางที่ 2 ข้อมูลเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>Bacillus</i> sp. FN1 กับ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์อื่น ๆ.....	34
ตารางที่ 3 การแยกบริสุทธิ์แลคเคส จาก <i>Bacillus</i> sp. FN1	39
ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความจำเพาะของสับสเตรทจาก <i>Bacillus</i> sp. FN1	49
ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> sp. FN1.....	50



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 กลไกการเกิดออกซิเดชันของไดฟีนอลโดยแลคเคส	4
ภาพที่ 2 กลไกการเกิดออกซิเดชันของ 2,6-DMP โดยแลคเคส.....	5
ภาพที่ 3 Timeline ของการศึกษาโครงสร้างผลึกแลคเคส.....	7
ภาพที่ 4 โครงสร้างผลึกแลคเคสจาก <i>Coprinus cinereus</i> ที่ความละเอียดขนาด 1.68 Å	8
ภาพที่ 5 การเกิดออกซิเดชันของ phenolic subunits ของลิกนินโดยแลคเคส	8
ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีของ <i>Bacillus</i> sp. FN1 ที่มี 0.02% (w/v) guaiacol เป็นสับสเตรท.....	32
ภาพที่ 7 รูปร่างเซลล์ของ <i>Bacillus</i> sp. FN1 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	32
ภาพที่ 8 การผลิตแลคเคสและลิกนินเปอร์ออกซิเดสจาก <i>Bacillus</i> sp. FN1.....	33
ภาพที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของ <i>Bacillus</i> sp. FN1.....	34
ภาพที่ 10 Elution profile ของโปรตีนแลคเคสบนคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200.....	36
ภาพที่ 11 Elution profile ของโปรตีนแลคเคสบนคอลัมน์ที่บรรจุ Q-sepharose.....	37
ภาพที่ 12 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	40
ภาพที่ 13 การตรวจสอบความบริสุทธิ์แลคเคสด้วยเทคนิค Gel filtration chromatography.....	41
ภาพที่ 14 ผลการศึกษา pH ที่มีต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. FN1.....	43
ภาพที่ 15 ความเสถียรของ pH ที่มีต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. FN1.....	44
ภาพที่ 16 การศึกษาของอุณหภูมิต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. FN1.....	46
ภาพที่ 17 ความเสถียรของอุณหภูมิต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. FN1	47
ภาพที่ 18 จลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> sp. FN1 โดยสับสเตรท	50
ภาพที่ 19 ผลของไออนโนโลหะที่มีผลต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. FN1	55
ภาพที่ 20 ผลการศึกษาผลกระทบของตัวยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก <i>Bacillus</i> sp. FN1.....	57

ภาพที่ 21 ผลการศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก Bacillus sp. FN1..... 59

ภาพที่ 22 ผลการศึกษาผลกระทบของสารลดแรงตึงผิวต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก Bacillus sp. FN1..... 61

ภาพที่ 23 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการลดสีของแลคเคสบริสุทธิ์จาก Bacillus sp. FN1..... 62

ภาพที่ 24 ผลการสแกนค่าการดูดกลืนแสงเพื่อศึกษาการลดสีของแลคเคสบริสุทธิ์จาก Bacillus sp. FN1..... 63



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัญหาแหล่งน้ำเน่าเสียเกิดจากของเสียหรือสารปนเปื้อนจากกระบวนการต่าง ๆ ในโรงงานอุตสาหกรรม และมักพบของเสียหรือสารปนเปื้อนนี้ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) ทั้งในรูปสารอินทรีย์ เช่น ลิกนิน และสารอนินทรีย์ เช่น สีย้อมผ้า หรือสารกำจัดศัตรูพืช ของเสียและสารปนเปื้อนเหล่านี้มีโครงสร้างที่ซับซ้อน ทำให้ไม่สามารถย่อยสลายได้เองในธรรมชาติ และมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ และพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งสีย้อมสังเคราะห์ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม เช่น เคมีภัณฑ์ ยา ชีวการแพทย์ อาหาร เครื่องหนัง สิ่งทอ พลาสติก และอุตสาหกรรมการพิมพ์ สีย้อมส่วนใหญ่มีความเสี่ยงสูงเนื่องจากเป็นพิษหรือเป็นสารก่อมะเร็งต่อสิ่งมีชีวิตจำนวนมาก (Othman *et al.*, 2018) ในอุตสาหกรรมสิ่งทอประมาณ 2 ใน 3 ของการใช้สีย้อมด้านอุตสาหกรรมทั้งหมดมาจากสีย้อมเอโซ ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยการปล่อยน้ำเสียปนเปื้อนด้วยสีย้อมเอโซที่ยังไม่ได้รับการบำบัดสู่สิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ ก่อให้เกิดประเด็นปัญหาทางนิเวศวิทยาและสุขภาพของมนุษย์ที่รุนแรง (Saratale *et al.*, 2011) ทำให้สารประกอบเหล่านี้ทนต่อการทำลาย จึงทำให้การกำจัดของเสียและสารปนเปื้อนทำได้ยากวิธีที่ใช้กำจัดของเสียและสารปนเปื้อนเหล่านี้มีทั้งวิธีทางกายภาพและทางเคมี เช่น การตกตะกอน การดูดซับ แต่วิธีเหล่านี้มีราคาค่อนข้างสูง เกิดปฏิกิริยาที่รุนแรง และไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีการใช้วิธีทางชีวภาพบำบัดด้วยจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ เช่น แลคเคส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถกำจัดสีย้อมเอโซโดยใช้กลไกในการสร้างอนุมูลอิสระ (Khan *et al.*, 2012) วิธีนี้มีราคาถูกและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าวิธีทางกายภาพและเคมี

แลคเคส (benzenediol: oxygen oxidoreductase, E.C. 1.10.3.2) เป็น multicopper oxidase สามารถออกซิไดซ์สับสเตรทได้หลากหลาย ทั้งสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกและที่ไม่ใช่ฟีนอลิกสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น การทำเยื่อกระดาษ การฟอกขาว การกำจัดสีย้อม การสังเคราะห์สารอินทรีย์ อีกทั้งสามารถกำจัดสีได้อีกด้วย (Bagewadi *et al.*, 2017) แลคเคสสามารถพบได้ในกลุ่มเห็ดรา เช่น *Ascomycetes*, *Deuteromycetes*, *Basidiomycetes*, *Neurospora crassa*, *Phanerochaete flavidio-alba*, *Trametes pubescens*, *Coriolus hirsutus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Panus tigrinus* และในแบคทีเรีย เช่น *Azospirillum lipoferum*, *Marinomonas mediterranea*, *Bacillus subtilis* และ *Streptomyces lavendulae* และยังพบได้ในแมลงอีกด้วย (Javadzadeh and Asoodeh, 2020) ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะแยกบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของแลคเคสที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* FN1

ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำทิ้ง บริษัท โนเบิลเท็กซ์การย้อม จำกัด อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม และเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการลดสีได้สูง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 แยกบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของแลคเคสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. FN1
- 1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการลดสีสังเคราะห์ของแลคเคสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. FN1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ผลิตแลคเคสในอาหารเหลว
- 1.3.2 แยกบริสุทธิ์แลคเคส โดยมีขั้นตอนดังนี้
 - 1.3.2.1 ตกตะกอนโปรตีนด้วย 60% (v/v) Acetone
 - 1.3.2.2 Gel filtration chromatography ผ่าน Sephacryl S-200
 - 1.3.2.3 Anion exchange chromatography ผ่าน Q-Sepharose
 - 1.3.2.4 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยวิธี SDS-PAGE และ Native-PAGE
- 1.3.3 ศึกษาสมบัติของแลคเคส
 - 1.3.3.1 ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของแลคเคสบริสุทธิ์
 - 1.3.3.2 ศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์
 - 1.3.3.3 ศึกษา pH ที่เหมาะสมและความเสถียรต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธิ์
 - 1.3.3.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมและความเสถียรต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธิ์
 - 1.3.3.5 ศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธิ์
 - 1.3.3.6 ศึกษาผลกระทบของตัวยับยั้งต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธิ์
 - 1.3.3.7 ศึกษาผลกระทบของตัวทำลายอินทรีย์ต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธิ์
 - 1.3.3.8 ศึกษาผลกระทบของสารลดแรงตึงผิวต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธิ์
 - 1.3.3.9 ศึกษาประสิทธิภาพการลดสีสังเคราะห์กลุ่มเอโซของแลคเคสบริสุทธิ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

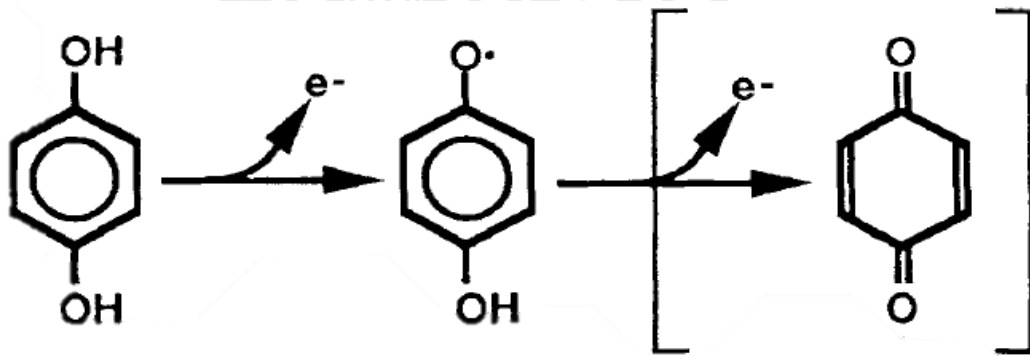
ทราบสมบัติและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคส และนำไปประยุกต์ใช้ในการลดสีได้



บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

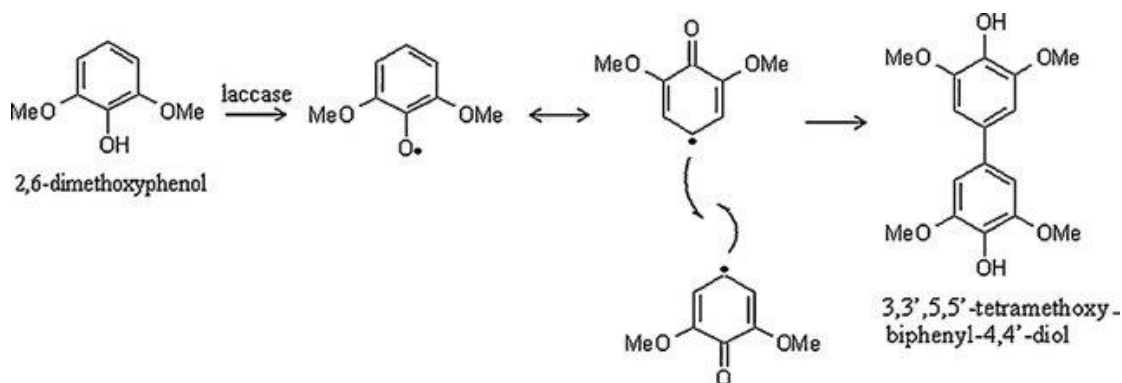
2.1 แลคเคส

แลคเคส Laccases (benzene diol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม oxidases ที่ถูกนำมาศึกษามากที่สุด ถูกค้นพบครั้งแรกจากยางของต้น Lacquer (*Rhus vernicifera*) ในประเทศญี่ปุ่น แลคเคสจัดอยู่ในกลุ่ม blue multicopper oxidases ซึ่งเร่งปฏิกิริยา one-electron oxidation ของสับสเตรท 4 โมเลกุล ควบคู่กับ four-electron reduction ของออกซิเจนไปเป็นน้ำ (Kumar *et al.*, 2016) แลคเคสพบได้ในพืช แมลง และแบคทีเรียโดยพบมากในเชื้อรา แลคเคสสามารถกำจัดสารปนเปื้อนฟีนอล เช่น เปลี่ยนอะมิโนเอมีนไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นอันตราย/เป็นอันตรายน้อยกว่าได้ (Ademakinwa and Agboola, 2016) แลคเคสสามารถออกซิไดซ์สับสเตรทได้หลากหลาย ทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้งไดฟีนอลทั่วไป เช่น hydroquinone และ catechol ซึ่งเป็นสับสเตรทที่ดี (ภาพที่ 1) แต่น้อยกว่า guaiacol และ 2,6-dimethoxyphenol (DMP) (ภาพที่ 2) ส่วนสับสเตรทที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ *p*-phenylene diamine และ syringaldazine [N, N'-bis (3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzylidene hydrazine)] (Thurston, 1994)



ภาพที่ 1 กลไกการเกิดออกซิเดชันของไดฟีนอลโดยแลคเคส

ที่มา : Thurston, 1994



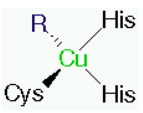
ภาพที่ 2 กลไกการเกิดออกซิเดชันของ 2,6-DMP โดยแลคเคส

ที่มา : Adalakun *et al.*, 2012

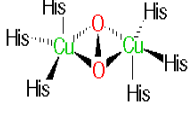
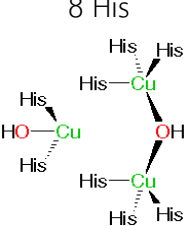
2.2 สมบัติโม่เลกุลแลคเคส

แลคเคสเมื่ออยู่ในรูปของ holoenzyme มีคอปเปอร์ 4 อะตอมต่อ 1 โมโนเมอร์ แบ่งอะตอมของคอปเปอร์ในโครงสร้างเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้ด้วย UV/visible และ Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy (ตารางที่ 1) โดยคอปเปอร์ type-I (T1) จะตอบสนองต่อสีฟ้าที่มีความยาวคลื่นประมาณ 600 นาโนเมตร และสามารถตรวจวัดได้ด้วย EPR ส่วนคอปเปอร์ type-II (T2) จะไม่มีสี แต่ตรวจวัดด้วย EPR ได้ และคอปเปอร์ type-III (T3) จะวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่นที่ใกล้กับคลื่นรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-Visible) แต่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วย EPR โดยบริเวณ T2 และ T3 จะเคลื่อนตัวเข้าใกล้กันและรวมกันเป็น trinuclear centre (Madhavi and Lele, 2009)

ตารางที่ 1 สถานะอะตอมทองแดงที่แตกต่างกันในแลคเคสจากรา

ชนิดของทองแดง	อะตอมทองแดง/โปรตีน	สัญญาณ EPR	ลักษณะ	Coordination	หน้าที่
1	1	+ Paramagnetic	“Blue Cu ²⁺ ” ถูกดูดกลืนที่ 610 nm (ออกซิเดชัน) ศักย์ไฟฟ้าในการเกิดรีดอกซ์ +785 mV	2 His, 1 Cys, 1 Leu 	สารออกซิเดชัน (ขั้น 1 อิเล็กตรอน)

ตารางที่ 1 (ต่อ) สถานะอะตอมทองแดงที่แตกต่างกันในแลคเคสจากรา

ชนิดของทองแดง	อะตอมทองแดง/ โปรตีน	สัญญาณ EPR	ลักษณะ	Coordination	หน้าที่
2	1	+ Paramagnetic	“Non-blue Cu^{2+} ” (ยึดจับได้กับ azide, fluoride, cyanide)	Trinuclear Center 	การออกซิเดชัน กลับของ 1 Cu^{2+} เสถียรในตัวกลาง H_2O_2
3	2	- Diamagnetic	ร่วมกับ Cu^{2+} - Cu^{2+} ดูดกลืนที่ 330 nm (การออกซิเดชัน)	8 His 	O_2 รััดักชันโดย ออกซิเดชันเอนไซม์ (มีการเคลื่อนที่ของ อิเล็กตรอน 4 ตัว)

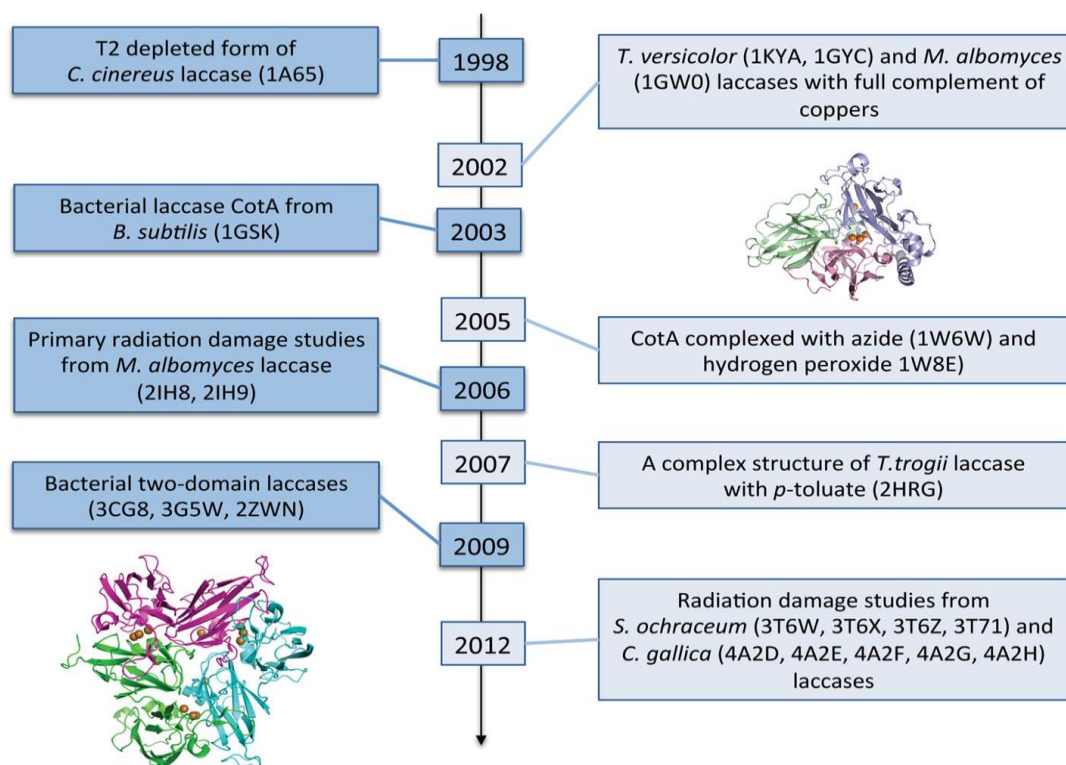
ที่มา : พิเชิตพล เจริญทรัพย์ยานันท์, 2550

2.3 โครงสร้างผลึกของแลคเคส

โครงสร้างผลึก (Crystal structure) คือ การจัดเรียงกันของอะตอมเป็นการเฉพาะตัวในผลึก โครงสร้างผลึกประกอบด้วย หน่วยเซลล์ (Unit cell) ซึ่งเป็นกลุ่มอะตอมที่จัดเรียงกันในทางเฉพาะ เป็นโครงสร้างสามมิติ รูปผลึก (Crystal form) เกิดจากการจับกันหรือจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบของอะตอมในโครงสร้างภายในและปรากฏเป็นรูปผลึกมีหน้าผลึกด้านต่าง ๆ ประกอบกันขึ้นมาเป็นรูปทรงเรขาคณิตแตกต่างกัน ซึ่งสามารถจัดแบ่งออกได้รูปแบบผลึกโดยพิจารณาจากองค์ประกอบต่าง ๆ ของผลึก

โครงสร้างผลึกของแลคเคสได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางด้วยเทคนิค X-ray crystallography โดยในปี 1998 มีการแก้ไขโครงสร้างผลึกแรกของแลคเคสที่ได้จาก *Coprinus cinereus* เนื่องจากยังไม่พบอะตอมคอปเปอร์ที่ตำแหน่ง type-2 ในปี 2002 ได้พบอะตอมคอปเปอร์ครบทุกตำแหน่งในโครงสร้างผลึกแลคเคสจาก *Melanocarpus albomyces* และ *Trametes versicolor* (ภาพที่ 3) ในปีต่อมาได้มีการกำหนดโครงสร้างผลึกแลคเคสจาก *Bacillus subtilis* ตั้งแต่นั้นมา มีโครงสร้างของแลคเคสเพิ่มมากขึ้น ทั้งโครงสร้างเชิงซ้อนกับสารตั้งต้น ตัวยับยั้ง และ

oxidation product รวมถึง mutant structure ปัจจุบันมีโครงสร้างผลึก laccase มากถึง 90 โครงสร้างที่อยู่ใน Protein Data Bank (PDB) (Hakulinen and Rouvinen, 2015)



ภาพที่ 3 Timeline ของการศึกษาโครงสร้างผลึกแลคเคส

ที่มา : Hakulinen and Rouvinen, 2015

การศึกษาโครงสร้างผลึกแลคเคส ใช้ความละเอียด (Resolution) ขนาด 1.68 Å ใช้เทคนิคการแทนที่ของโมเลกุล โดยใช้ต้นแบบแลคเคสจาก *Coprinus cinereus* (pdb code : 1HFU) (ภาพที่ 4) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างโปรตีนแบบพับขดงอและเป็นโปรตีนก่อนที่รวมกับน้ำตาล เรียกว่า ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ที่มีขนาด 70 × 60 × 50 Å โครงสร้างโมเลกุลที่มีการจัดเรียงโดเมน (Cupredoxin-like domains) ในแต่ละโดเมนมีการต่อแบบ greek key β -barrel กับอะตอมของคอปเปอร์ 3 กลุ่ม โดยโดเมนที่ 1 อยู่ในช่วง 1-141 , โดเมนที่ 2 อยู่ในช่วง 142-303 และโดเมนที่ 3 อยู่ในช่วง 304-498 โครงสร้างโมเลกุลของแลคเคสมีความแข็งแรงและเสถียรมาก เนื่องจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนซัลไฟด์ระหว่าง Cys85 กับ Cys485 ของโดเมนที่ 1 และ 3 ตามลำดับ และระหว่าง Cys117 กับ Cys204 ในโดเมนที่ 1 และ 2 แสดงโครงสร้างแลคเคสที่คล้ายกับแลคเคสในกลุ่ม *Basidiomyceteous* และ *Trametes versicolor* (Hakulinen et al., 2002)

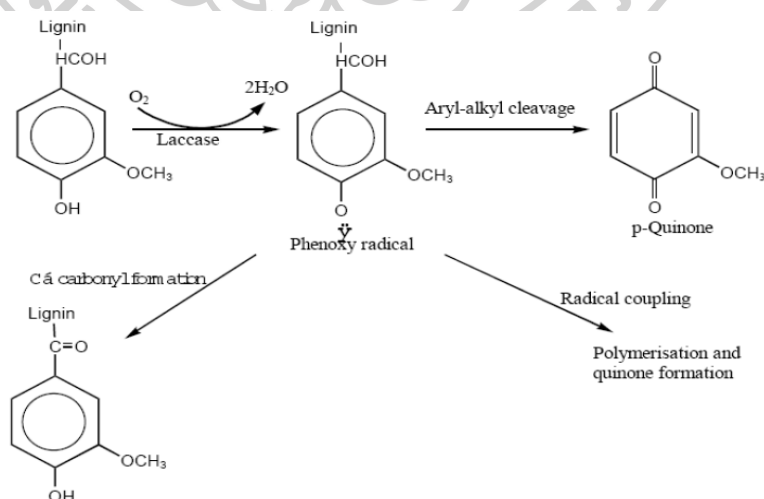


ภาพที่ 4 โครงสร้างผลึกแลคเคสจาก *Coprinus cinereus* ที่ความละเอียดขนาด 1.68 Å
ที่มา : Ducros *et al*, 2001

2.4 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคส

แลคเคสเมื่อเข้าทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นฟีนอลิกของลิกนินจะทำให้เกิด C α oxidation , C α -C β cleavage และ aryl-alkyl cleavage การเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสเกี่ยวข้องกับ (ภาพที่ 5)

1. การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของคอปเปอร์ type-I โดย reducing substrate
2. การถ่ายโอนอิเล็กตรอนภายในโครงสร้าง จาก type-I กับคอปเปอร์ type-II และ III
3. บริเวณคอปเปอร์ type-II และ III เกิดการรีดิวซ์ HC-OH ไปเป็นน้ำ



ภาพที่ 5 การเกิดออกซิเดชันของ phenolic subunits ของลิกนินโดยแลคเคส
ที่มา : Madhavi and Lele, 2009

2.5 สีย้อม

สีย้อม (dye) คือ สีชนิดหนึ่งที่ใช้ในการย้อมเส้นใยของผ้า อาจจะเป็นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ก็ได้ มีลักษณะเป็นผลึกหรือผงละเอียด สีย้อมบางชนิดละลายน้ำได้ บางชนิดไม่สามารถละลายน้ำ แต่จะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ เมื่อนำสีย้อมไปใช้ในกระบวนการย้อม จะทำให้โมเลกุลสีย้อมซึมผ่านเข้าไปในตัวทำละลายโดยจะทำลายโครงสร้างผลึกของวัตถุนั้นชั่วคราว ซึ่งอาจเกิดพันธะไอออนิก (ionic bond) หรือพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) กับวัตถุที่ต้องการย้อมโดยตรง สีที่เห็นจากสีย้อมเกิดจากอิเล็กตรอนในพันธะคู่ ซึ่งอยู่ในโมเลกุลของสีย้อมดูดกลืนพลังงานแสงในช่วงสเปกตรัมที่ต่างกัน พลังงานแสงที่สายตามองเห็นจะมีความยาวคลื่นช่วง 400-700 นาโนเมตร สีย้อมที่มีโครงสร้างทางโมเลกุลต่างกันจะมีความสามารถในการดูดกลืนพลังงานสีที่มีความยาวคลื่นต่าง ๆ กันไป ซึ่งสายตาสถาสามารถปรับภาพได้ จึงทำให้โมเลกุลสีย้อมต่างโทนสีกันแสดงสีให้เราเห็นด้วยสายตาสถาออกมาเป็นต่างกันได้ ทั้งนี้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

สีย้อมธรรมชาติ (natural dyestuffs) เป็นสีย้อมที่มาจากแหล่งธรรมชาติ โดยเฉพาะพืชและสัตว์ สีย้อมที่มาจากส่วนประกอบพืช เช่น ส่วนลำต้น ส่วนดอก ส่วนเปลือก ส่วนใบ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น สีดำจากลูกมะเกลือ สีน้ำเงินจากต้นคราม สีเหลืองจากเนื้อไม้ไผ่ สีแดงจากดอกกรรณิการ์ สีแดงจากรากต้นเข็ม ส่วนสีย้อมที่มาจากสัตว์ เช่น สีม่วงแดงของครั่ง สีม่วงจากหอยสังข์ หนาม เป็นต้น

สีย้อมสังเคราะห์ (synthetic dyestuffs) เป็นสีย้อมที่เกิดขึ้นจากกระบวนการทางเคมี

การจำแนกสีย้อมที่นิยมกันมากที่สุด คือ การจำแนกสีย้อมตามการนำไปใช้ เพราะจะต้องมีความคงทนการซัก มีความคงทนต่อแสงและยังต้องมีความคงทนต่อความร้อน โดยที่สีย้อม แต่ละประเภทจะมีสูตรโครงสร้างทางเคมี สมบัติของสีย้อม ตลอดจนวิธีใช้ที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้สีย้อมจึงมีความสำคัญอย่างมากในการย้อมสี เพราะวัตถุที่ต้องการย้อมอาจสามารถย้อมด้วยสีย้อมเพียงชนิดเดียวหรือย้อมด้วยสีย้อมหลายชนิดที่ต่างชนิดกันได้ (จิระนันท์ สินทร, 2561)

2.6 กลไกการกำจัดสีโดยจุลินทรีย์

กลไกในการกำจัดสีย้อมโดยจุลินทรีย์มี 2 แบบ คือ

2.6.1 กลไกการดูดซับ

กลไกการดูดซับในกิจกรรมการกำจัดสีย้อมเกิดจากแบคทีเรียดูดซับสีเข้าสู่เซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของสีย้อมลดลงขั้นหนึ่ง แต่เป็นเพียงระยะเวลาสั้น ๆ ไม่สามารถลดสีได้ในระยะยาว จนเมื่อถึงจุดที่แบคทีเรียดูดซับสีจนถึงจุดอิ่มตัวแล้ว เซลล์จะมีกระบวนการทางชีวภาพเพื่อกำจัดสีเกิดขึ้น

2.6.2 กลไกการกำจัดสีด้วยเอนไซม์

จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์และเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อเร่งปฏิกิริยาการกำจัดสีย้อม โดยปฏิกิริยาการกำจัดสีย้อม อาจประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด เรียกรวมว่า Ligninolytic enzymes ได้แก่ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidases; LiP, EC 1.11.1.14), แลคเคส (Laccases; Lac, EC 1.10.3.2) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidases; MnP, EC 1.11.1.13) เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากกลไกการกำจัดแบบ Oxidative สำหรับเอโซรีดักเทส (azoreductase, EC 1.7.1.6) เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากกลไกการกำจัดแบบ Reductive โดยจุลินทรีย์ผลิตขึ้น และปล่อยออกมาย่อยสลายสารจำพวกอะโรมาติกซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ เอโซรีดักเทสต้องการ NADH และ NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ ในการกำจัดสีย้อมเอโซรีดักเทสมีทั้งชนิดที่เป็น Intracellular enzyme และ Extracellular enzyme (สุกัลยา บริสุทธิ์, 2553)

สำหรับ lignin peroxidases มีรายงานว่าจากการเพาะเลี้ยง *Trametes versicolor* U97, *Trametes versicolor* U80 และ *Trametes versicolor* YS001 ในอาหารเหลวเพื่อผลิต Lignin peroxidases พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน *T. versicolor* U97 สามารถกำจัดสีได้สูงสุด 89% (Sari *et al.*, 2015) ในปี 2019, Akansha และคณะได้ศึกษาการกำจัดสีในกลุ่ม sulfonated azo dye (Methyl orange) โดยใช้แลคเคสที่ผลิตได้จาก *Bacillus stratosphericus* SCA1007 พบว่าสามารถกำจัดสี Methyl orange ได้ 100% ที่ความเข้มข้นสี 150 mg/L เมื่อปรับที่ pH 7.0 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 12 ชั่วโมง (Akansha *et al.*, 2019) และแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Arthrospira maxima* สามารถกำจัดสี Reactive Blue 4 และ Remazol Brilliant Blue R (RBBR) ได้ 84% และ 49% ได้ภายในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (Afreen *et al.*, 2018) และจากการแยกบริสุทธิ์ Manganese peroxidases ที่ผลิตได้จาก *Cerrena unicolor* BBP6 พบว่าสามารถกำจัดสี Remazol brilliant blue R ได้ 81.0% ในระยะเวลา 5 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง สามารถกำจัดสีต่าง ๆ ได้สูงสุด ดังนี้ crystal violet (80.9%), methyl orange (77.6%), bromophenol blue (62.2%) และ Congo red (53.9%) (H. Zhang *et al.*, 2018)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Cambria และคณะ (2000) รายงานการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Rigidoporus lignosus* และศึกษาโครงสร้างและจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ประเมินผลของ pH (3.0-7.0) อุณหภูมิ (25-65 องศาเซลเซียส) และตัวทำละลายอินทรีย์ (Acetone, DMSO, Methanol, Acetonitrile และ Dioxane) ต่อกัมมันตภาพและความเสถียรของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่หลากหลาย โดยกระบวนการผลิตและการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต,

DEAE–Sephacel column และ Mono–Q HR 5/5 column พบว่า แลคเคสมีความบริสุทธิ์และผลผลิตที่ได้เพิ่มขึ้น 23.7 เท่า 15.1% ตามลำดับ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 54 kDa

Johannes และ Majcherczyk (2000) รายงานการศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ซัลไฮดริลต่อกัมมันตภาพของแลคเคสที่ผลิตจาก *Trametes versicolor* โดยใช้ 2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) และ 2,6-dimethoxyphenol เป็นสับสเตรท พบว่า sodium azide (ความเข้มข้น 1 mM) สามารถยับยั้งการออกซิไดซ์สับสเตรทของแลคเคสได้

Telke และคณะ (2011) รายงานว่าแลคเคสจาก *Bacillus sp.* ADR มีความบริสุทธิ์มากขึ้น 56 เท่า เมื่อผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยอะซีโตน และ DEAE-Cellulose anion exchange chromatography และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 kDa แลคเคสบริสุทธิ์ที่ได้สามารถออกซิไดซ์ 2,6-DMP, *o*-tolidine, hydroquinone, L-DOPA และ guaiacol โดยมี pH ที่เหมาะสมคือ 3.0, 4.0 และ 5.0 เมื่อใช้ *o*-tolidine, 2,6-DMP และ guaiacol เป็นสับสเตรท ตามลำดับ แลคเคสมีความเสถียรที่ pH 7.0-9.0 และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อประเมินผลของตัวยับยั้งพบว่า Sodium azide (NaN_3), L-cysteine และ dithiothreitol สามารถยับยั้งการออกซิไดซ์สับสเตรทของแลคเคสได้ 97%, 98% และ 93% ตามลำดับ

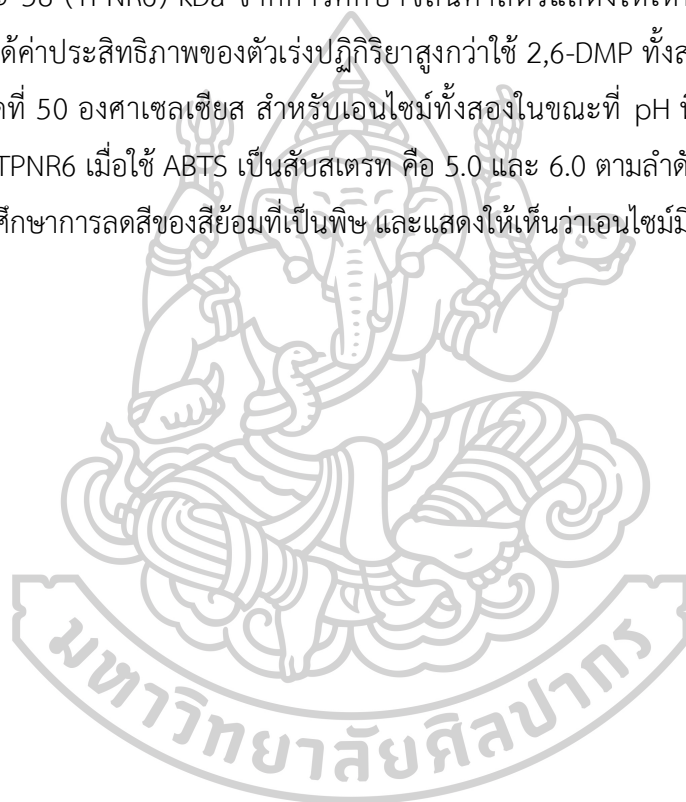
Sondhi และคณะ (2014) รายงานว่าแลคเคสจาก *Bacillus tequilensis* SN4 (SN4LAC) มีความเสถียรต่อ thermo-alkali โดยแลคเคสถูกทำให้บริสุทธิ์จนเป็นเนื้อเดียวกัน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32 kDa จาก UV-visible spectrum และ peptide mass fingerprinting แสดงให้เห็นว่า SN4LAC เป็น multicopper oxidase แลคเคสสามารถออกซิไดซ์สับสเตรทได้หลากหลาย และจากค่าประสิทธิภาพของตัวเร่งปฏิกิริยา (k_{cat}/K_m) พบว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์ 2, 6-dimethoxyphenol และถูกยับยั้งได้โดยตัวยับยั้งการทำงานของแลคเคส เช่น NaN_3 , cysteine, dithiothreitol และ β -mercaptoethanol นอกจากนี้ พบว่า SN4LAC เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และมีค่ากัมมันตภาพแลคเคสมากกว่า 80% ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ 2, 6-DMP, ABTS, syringaldazine และ guaiacol เท่ากับ 8.0, 5.5, 6.5 และ 8.0 ตามลำดับ ที่ pH 9.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่ากัมมันตภาพแลคเคสมากกว่า 75% และกัมมันตภาพแลคเคสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อมี Cu^{2+} , Co^{2+} , SDS และ CTAB ที่ความเข้มข้น 1 mM และ 5 mM และมีความเสถียรเมื่อมีเฮไลต์ ไอออนโลหะ และสารลดแรงตึงผิว โดย SN4LAC มีความเสถียรในสภาวะที่รุนแรง เช่น อุณหภูมิ pH โลหะหนัก เฮไลต์ และสารซักล้างสูง

Yan และคณะ (2015) รายงานว่า *Trametes* บางสายพันธุ์ เช่น *T. versicolor*, *T. pubescens* และ *T. trogii* สามารถผลิตแลคเคสที่ทนอุณหภูมิสูงได้ แต่มีบางสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส งานวิจัยนี้ศึกษากัมมันตภาพแลคเคส และอัตราการเจริญของ *Trametes trogii* LK13 ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส จากการศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิและ organic cosolvent ของแลคเคสที่ผลิตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที และความเข้มข้นของ organic cosolvent 25%-50% (v/v) มีค่ากัมมันตภาพของเอนไซม์ 50% เมื่อเทียบกับหลอดควบคุม นอกจากนี้ ยังพบว่าใน crude enzyme มีค่ากัมมันตภาพของแลคเคสสูง (1,000 U/g) แต่ค่ากัมมันตภาพของ cellulase (2 U/g) และ xylanase ต่ำ (140 U/g)

Yasar และคณะ (2019) รายงานว่า *Bacillus subtilis* LP2 สามารถผลิตแลคเคสที่ทนต่อสภาวะความเป็นด่างได้ โดยแลคเคสบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* LP2 มีความบริสุทธิ์สูงถึง 77% และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35-40 kDa นอกจากนี้แลคเคสที่ได้สามารถทำงานได้ในช่วง pH 4.0-10.0 และอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส โดยค่ากัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดเท่ากับ 140.4 U/mg ($\mu\text{mol}/\text{min mg}$) ที่ pH 8.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท เมื่อศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ด้วยการนำไปบ่มที่ pH 8.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 และ 40 นาที ได้ค่า relative activity เท่ากับ 60% และ 20% ตามลำดับ จากการศึกษาผลกระทบของตัวบัฟเฟอร์พบว่า SDS (10 mM) และ EDTA (5 mM) สามารถยับยั้งกัมมันตภาพของแลคเคสจาก 100% เป็น 0% และ 56% ตามลำดับ แต่ NaCl (500 mM) สามารถเพิ่มกัมมันตภาพของแลคเคสเป็น 167% แสดงให้เห็นว่าแลคเคสที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* LP2 มีศักยภาพที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ

Ezike และคณะ (2020) รายงานว่าแลคเคสบริสุทธิ์ *TpWRF03* (*TpL*) ที่แยกบริสุทธิ์ได้จาก *Trametes polyzona* WRF03 เป็นโมโนเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66 kDa มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 4.5 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยแลคเคสมีความเสถียรมากที่สุดในช่วง pH 5.5-6.5 และที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส กัมมันตภาพของแลคเคสถูกยับยั้งได้โดย NaN_3 , Sodium cyanide และ Fe^{2+} และ *TpL* แสดงสามารถลดสีได้มากกว่า 50% ในสี coomassie brilliant blue (72.35%) และ malachite green (57.84 %) แต่ประสิทธิภาพในการลดสี Azure B (1.78%) และ methylene blue (0.38 %) ค่อนข้างน้อย แสดงให้เห็นว่า *TpWRF03* มีคุณสมบัติที่ดีสำหรับการใช้งานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

Sharma และคณะ (2020) รายงานผลการคัดแยกแบคทีเรียทนความร้อนที่จากบ่อน้ำพุร้อน Tattapani เมือง Chhattisgarh ประเทศอินเดีย พบว่าหลังจากการคัดแยกแบคทีเรียผลิตแลคเคส โดยใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท สามารถแยกแบคทีเรียได้ 2 ชนิดคือ TPNR1 และ TPNR6 โดยผลการวิเคราะห์ลำดับยีนทางชีวเคมีและ 16S rRNA ระบุว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus licheniformis* จึงตั้งชื่อเป็น *B. licheniformis* TPNR1 และ *B. licheniformis* TPNR6 เมื่อศึกษากัมมันตภาพแลคเคสที่ผลิตได้จาก TPNR1 และ TPNR6 โดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรทได้ค่ากัมมันตภาพแลคเคสเท่ากับ 3.1 U/mL และ 7.1 U/mL ตามลำดับ แลคเคสบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 44 (TPNR1) และ 38 (TPNR6) kDa จากการศึกษาจลนศาสตร์แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้ ABTS เป็นสับสเตรทจะได้ค่าประสิทธิภาพของตัวเร่งปฏิกิริยาสูงกว่าใช้ 2,6-DMP ทั้งสองชนิด การทำงานของแลคเคสสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์ทั้งสองในขณะ pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ TPNR1 และ TPNR6 เมื่อใช้ ABTS เป็นสับสเตรท คือ 5.0 และ 6.0 ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์ทั้งสอง ถูกนำไปศึกษาการลดสีของสีย้อมที่เป็นพิษ และแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีศักยภาพสูงในการลดสี



บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือ

1. Autoclave Ss-325 (Tomy, Japan)
2. Autoclave Ss-700 (Tomy, Japan)
3. Autopipette
4. Centrifuge (Z36HK) (HERMLE, Germany)
5. Hot air oven model ULM 500 (Memment, Germany)
6. Incubator (Pol-Eko Aparatura, Thailand)
7. Laminar flow (NUAIRE, Minnesota)
8. Magnetic stirrer (MSH-20A) (Vision Scientific, England)
9. Microcentrifuge (microfuge 16) (Beckman-Coulter, Germany)
10. Microplate reader (Infinite F50) (Tecan, Austria)
11. pH meter (METTLER TOLEDO, Thailand)
12. Shaking incubator (JSSI-300C) (JS RESEARCH INC, Korea)
13. Spectrophotometer (Genesys 10s UV-Vis)(Thermo Fisher Scientific, USA)
14. Spectrophotometer (Libra S22) (Biochrom, England)
15. Thermomixer (Eppendorf, Germany)
16. Fast Protein Liquid Chromatography รุ่น AKTAFPLC
17. Vortex (Scientific Industries, USA)
18. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO, Thailand)
19. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO, Thailand)
20. เครื่องทำน้ำกลั่น (Maxima Ls.Model) (ELGA, UK)

3.1.2 อุปกรณ์

1. eppendorf tube
2. loop
3. Rack

4. กระจกฉีตแอลกอฮอล์
5. กระจกตวง
6. ขวดรูปชมพู่
7. จานเพาะเชื้อ
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. ปีกเกอร์
10. ผ้าเช็ดโต๊ะ
11. ไฟแช็ก
12. หลอดทดลอง
13. อะลูมิเนียมฟอยล์

3.1.3 สารเคมี

1. Acetic acid (V.S. Chem House, Thailand)
2. Acetone (LKK polymer & Engineering, Thailand)
3. Agar (HiMedia Laboratories, India)
4. Ammonium persulfate (Bio-Rad, USA)
5. *o*-Anisidine (Sigma-Aldrich, USA)
6. *p*-Anisidine (Sigma-Aldrich, USA)
7. 2,2'-azino-bis (3ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (Sigma-Aldrich, USA)
8. Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)
9. Bromocresol green (Sigma-Aldrich, USA)
10. Calcium chloride dihydrate (Riedel-de Haën, Germany)
11. Cobalt (II) Chloride (Ajax Finechem, Australia)
12. Congo red (Sigma-Aldrich, USA)
13. Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich, USA)
14. Copper (II) sulphate anhydrous (Ajax Finechem, Australia)
15. L-Cysteine (Fluka Guarantee, USA)
16. 2,6-Dimethoxyphenol (Sigma-Aldrich, India)

17. Ethanol (RCI Labscan Limited, Thailand)
18. Ethylenediaminetetraacetic acid (Central Drug House (P), India)
19. Glycerol (Amresco, USA)
20. Glycine (RCI Labscan Limited, Thailand)
21. Glucose (HiMedia Laboratories, India)
22. Guaiacol (Sigma-Aldrich, USA)
23. Hydrochloric acid (RCI Labscan Limited, Thailand)
24. Iron (II) sulfate heptahydrate (Sigma-Aldrich, USA)
25. Manganese (II) sulfate (Ajax Finechem, Australia)
26. Magnesium sulphate heptahydrate (Sigma-Aldrich, Germany)
27. Methanol (RCI Labscan Limited, Thailand)
28. Methyl orange
29. 2-mercaptoethanol (Bio-Rad, USA)
30. Peptone (Sisco Research Laboratories, India)
31. Phenol red (Sigma-Aldrich, USA)
32. Potassium dihydrogen orthophosphate (RCI Labscan Limited, Thailand)
33. di-Potassium hydrogen orthophosphate (Ajax Finechem, Australia)
34. Sodium acetate (HiMedia Laboratories, India)
35. Sodium azide (Fluka Guarantee, USA)
36. Sodium chloride (RCI Labscan Limited, Thailand)
37. Sodium dodecyl sulfate (Scharlab, Spain)
38. Sodium hydroxide (Chem-Lab, Belgium)
39. Syringalgazine (Chem-Imrex, USA)
40. Tetramethylethylenediamine (Bio-Rad, USA)
41. Tris (Amresco, USA)
42. Triton x-100 (Amresco, USA)
43. Tween 80 (Amresco, USA)
44. Tween 20 (Omnipur, USA)

45. Tyrosine	(Sigma-Alorich, USA)
46. Veratryl alcohol	(Sigma-Alorich, USA)
47. Yeast extract	(HiMedia Laboratories, India)
48. Zinc sulfate heptahydrate	(Fluka Guarantee, USA)

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา คือ *Bacillus* sp. FN1 ที่คัดแยกได้จากน้ำเสีย บริษัท โนเบิลเท็กซ์การ ย้อม จำกัด อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม เก็บรักษาไว้ใน 80% (v/v) กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (จิระนนท์ สินทร, 2561)

3.2.2 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. FN1 เพื่อผลิตแลคเคส

1. ปิเปิดเชื้อที่ผลิตแลคเคสมา 200 ไมโครลิตร เลี้ยงใน LB medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ถ่ายเชื้อลงในอาหารแข็งที่มี guaiacol 0.02% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (โคโลนีมีสีชมพู)
3. เชี่ยโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนีเลี้ยงใน LB medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ถ่ายเชื้อทั้งหมดเลี้ยงในอาหารเหลว (production medium) ที่มี guaiacol 0.02% (w/v) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (ทั้งหมด 50 มิลลิลิตร) จำนวน 2 ฟลาสก์ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน
5. ถ่ายเชื้อทั้งหมดเลี้ยงในอาหารเหลว (production medium) ที่มี guaiacol 0.02% (w/v) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร (ทั้งหมด 500 มิลลิลิตร) จำนวน 2 ฟลาสก์ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

3.2.3 การแยกบริสุทธิ์แลคเคส

3.2.3.1 การเตรียม crude laccase

แยกส่วนใสกับส่วนตะกอนจากน้ำหมักโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสไปวิเคราะห์กัมมันตภาพแลคเคส และปริมาณโปรตีน

3.2.3.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอะซิโตน (C_3H_6O)

นำส่วนใสที่แยกได้จากข้อ 3.2.3.1 มาตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตน (C_3H_6O) ที่ความเข้มข้น 60% (v/v)

เริ่มตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตน (C_3H_6O) ที่แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ลงในส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.2.3.1 โดยค่อย ๆ เติมอะซิโตนทั้งหมด 4 ครั้ง แบ่งครั้งละเท่า ๆ กัน พร้อมกวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 15,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอน ละลายตะกอนด้วย 25 mM Tris-HCl pH 7.0 นำสารละลายตะกอนโปรตีนไปวิเคราะห์กัมมันตภาพแลคเคสและปริมาณโปรตีน

3.2.3.3 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography)

การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีด้วยเครื่อง Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC with Frac-900 ; Amersham Pharmacia, Sweden) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200 โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ยึดคอลัมน์กับ clamp ที่ประกอบอยู่ด้านข้างของเครื่อง และต่อสายคอลัมน์เข้าเครื่อง
2. ล้างสายของเครื่องโดยการตั้งค่า pump wash ไปที่ pump A และ B เครื่องจะปั๊ม 25 mM Tris-HCl pH 7.0 เข้าไปแทนที่เอทานอลภายในเครื่อง
3. ปรับอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร/นาที แล้ว equilibrate คอลัมน์ต่อด้วย 25 mM Tris-HCl pH 7.0 ประมาณ 2 เท่า ของปริมาณคอลัมน์ (bedvolume) หรือจนกว่า conductivity จะคงที่
4. ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยปรับอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร/นาที
5. ชะโปรตีนด้วย 25 mM Tris-HCl pH 7.0 โดยเก็บ fraction ละ 2 มิลลิลิตร นำแต่ละ fraction มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้ 25 mM Tris-HCl pH 7.0 เป็น blank นำ fraction ที่มีกัมมันตภาพแลคเคสมารวมกัน
6. นำไปวิเคราะห์กัมมันตภาพแลคเคสและตรวจสอบความบริสุทธิ์ต่อไป

3.2.3.4 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วยเครื่อง FPLC ผ่านคอลัมน์ XK16 ที่บรรจุ Q-Sepharose โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ยึดคอลัมน์กับ clamp ที่ประกอบอยู่ด้านข้างของเครื่อง และต่อสายคอลัมน์เข้าเครื่อง
2. ล้างสายของเครื่องโดยการตั้งค่า pump wash ไปที่ pump A และ B เครื่องจะปั๊ม 25 mM Tris-HCl pH 7.0 เข้าไปแทนที่เอทานอลภายในเครื่อง
3. ปรับอัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที แล้ว equilibrate คอลัมน์ต่อด้วย 25 mM Tris-HCl pH 7.0 ประมาณ 2 เท่า ของปริมาณคอลัมน์ (bedvolume) หรือจนกว่า conductivity จะคงที่
4. ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ 70 มิลลิลิตร โดยปรับอัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที
5. ชะโปรตีนด้วย 25 mM Tris-HCl pH 7.0 โดยเก็บ fraction ละ 4 มิลลิลิตร
6. เปลี่ยนมาชะด้วย 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.0 ที่ผสมกับ 1 M NaCl ชะโปรตีนส่วนที่จับเรซินออกด้วย NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มจากความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 M NaCl ตามลำดับ เก็บ fraction จนไม่ปรากฏ Peak โปรตีน
7. นำแต่ละ fraction มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้ 25 mM Tris-HCl pH 7.0 เป็น blank
8. เพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) จนเหลือตัวอย่างประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หุ้มมันตภาพแลคเคส และตรวจสอบความบริสุทธิ์ต่อไป

3.2.3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยวิธี SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

นำโปรตีนที่มีค่าหุ้มมันตภาพแลคเคสจากข้อ 3.2.3.4 มาทำให้เข้มข้น และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE

การเตรียมแผ่นเจลสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

1. เตรียมเครื่องมือ โดยเช็ดแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่นให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น และ 70% (v/v) เอทานอล

2. วาง spacer ลงที่ขอบแผ่นกระจก ประกอบกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกัน หนีบกระจกให้แน่นด้วยตัวหนีบ เตรียม separating gel ให้มีปริมาตรเป็น 3 ใน 4 ส่วนของกระจก แล้วเทลงในช่องว่างระหว่างกระจกทั้ง 2 แผ่น

สำหรับแผ่นเจลแบบ 10% (ชั้น separating gel) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมสารต่าง ๆ ดังนี้

สารละลาย 30% Bis-acrylamide	1.70	มิลลิลิตร
สารละลายบัฟเฟอร์ 1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.30	มิลลิลิตร
สารละลาย 10% (w/v) SDS	50.0	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	1.90	มิลลิลิตร
สารละลาย 10% (w/v) แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	50.0	ไมโครลิตร
TEMED	2.0	ไมโครลิตร

3. เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าของ separating gel เพื่อให้ผิวหน้าแผ่นเจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว (ประมาณ 30 นาที) และเตรียมส่วน stacking gel ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร

สำหรับแผ่นเจล 5% (ชั้น stacking gel) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ผสมสารต่าง ๆ ดังนี้

สารละลาย 30% Bis-acrylamide	330.0	ไมโครลิตร
สารละลายบัฟเฟอร์ 1.5 M Tris-HCl pH 8.8	250.0	ไมโครลิตร
สารละลาย 10% (w/v) SDS	20.0	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	1.40	มิลลิลิตร
สารละลาย 10% (w/v) แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	20.0	ไมโครลิตร
TEMED	2.00	ไมโครลิตร

4. เอียงกระจกเพื่อเทน้ำออก จากนั้นเท stacking gel บนผิวหน้า ของ separating gel ที่แข็งตัวแล้วและทำช่องสำหรับใส่สารตัวอย่างโดยใช้หวีกดลงใน stacking gel ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ให้เจลแข็งตัว

5. ดึงหรือออก นำแผ่นกระจกที่เตรียมได้ไปไว้ใน chamber เท Tris-Glycine running buffer ความเข้มข้น 1 เท่าที่เตรียมไว้เทใน chamber ชั้นนอก และเทให้ท่วมถึงช่องใน chamber

6. นำแอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบความบริสุทธิ์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 4X loading dye ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ใส่ลงในช่อง

7. ต่อวงจรกระแสไฟฟ้าให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 25 มิลลิแอมแปร์ เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่ถึงเกือบปลายสุดของ separating gel ทำการแกะแผ่นเจลออกจากกระจก อย่างระมัดระวังแล้วย้อมแผ่นเจลด้วย coomassie blue R-250 ล้างสีออกด้วย destain solution I และ destain solution II จนแผ่นเจลใส และเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

3.2.3.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยวิธี Native-PAGE

(Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Solano *et al.*, 2001)

นำโปรตีนที่มีค่ากัมมันตภาพแลคเคสจากข้อ 3.2.3.4 มาทำให้เข้มข้น และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี Native-PAGE

การเตรียมแผ่นเจลสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

1. เตรียมเครื่องมือ โดยขีดแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่นให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น และ 70% (v/v)

EtOH

2. วาง spacer ลงที่ขอบแผ่นกระจก ประกอบกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกัน หนีบกระจกให้แน่นด้วยตัวหนีบ เตรียม separating gel ให้มีปริมาตรเป็น 3 ใน 4 ส่วนของกระจก แล้วเทลงในช่องว่างระหว่างกระจกทั้ง 2 แผ่น

สำหรับแผ่นเจลแบบ 12% (ชั้น separating gel) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมสารต่าง ๆ ดังนี้

สารละลาย 30% Bis-acrylamide	2.0	มิลลิลิตร
สารละลายบัฟเฟอร์ 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	800.0	ไมโครลิตร
สารละลาย 10% (w/v) SDS	50.0	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	2.1	มิลลิลิตร
สารละลาย 10% (w/v) แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	50.0	ไมโครลิตร
TEMED	2.0	ไมโครลิตร

3. เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าของ separating gel เพื่อให้ผิวหน้าแผ่นเจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว (ประมาณ 30 นาที) และเตรียมส่วน stacking gel ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร

สำหรับแผ่นเจล 5% (ชั้น stacking gel) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ผสมสารต่าง ๆ ดังนี้

สารละลาย 30% acrylamide	330.0	ไมโครลิตร
สารละลายบัฟเฟอร์ 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	250.0	ไมโครลิตร
สารละลาย 10% (w/v) SDS	20.0	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	1.4	มิลลิลิตร
สารละลาย 10% (w/v) แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	20.0	ไมโครลิตร
TEMED	2.0	ไมโครลิตร

4. ใส่หวี (template comb) บนช่องว่างระหว่างกระจก ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีให้เจลแข็งตัว

5. นำแผ่นกระจกที่ได้ไปไว้ใน chamber และเติม running buffer ที่เตรียมไว้เทใน chamber

6. โหลดตัวอย่างลงในช่อง (well) โดยผสมเอนไซม์ปริมาตร 15 ไมโครลิตร กับ 4X loading dye ที่ปราศจากสารรีดิวซ์ (SDS และ β -mercaptoethanol) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 25 มิลลิแอมแปร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-60 นาที หลังจากนั้นล้างออก SDS ด้วย 2.5% (v/v) Triton X-100 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที และล้าง Triton X-100 ออกด้วย 0.5 mM Tris-HCl pH 8.0 จำนวน 3 รอบ

7. นำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย 2.5 mM DMP และ 0.2 mM CuSO_4 ใน 20 mM buffer ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที สังเกตแถบสีน้ำตาลที่ปรากฏขึ้น

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976)

1. ปิเปิดตัวอย่างที่เจือจางแล้วหรือสารละลายมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร ใส่ใน microplate

2. เติม Dye reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (blank ใช้น้ำกลั่น) คำนวณความเข้มข้นของโปรตีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน bovine serum albumin (BSA)

3.2.5 การศึกษาคุณสมบัติของแลคเคส

3.2.5.1 การศึกษาความจำเพาะของสับสเตรตต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์

ศึกษาความจำเพาะของสับสเตรตต่าง ๆ ดังนี้ veratryl alcohol, 2,6-DMP, Tyrosine, ABTS, *p*-Anisidine และ *o*-Anisidine โดยนำไปวัดกัมมันตภาพของแลคเคสที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสม

3.2.5.2 การวิเคราะห์กัมมันตภาพแลคเคส

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

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

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

Control enzyme tube ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

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

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/L)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 10^6}{14,800 \times 30 \times 0.2} \times \text{Dilution factor}$$

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

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

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

Control enzyme tube ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร

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

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/L)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 10^6}{12,000 \times 30 \times 0.2} \times \text{Dilution factor}$$

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

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

Reaction tube ประกอบด้วย 10 mM veratryl alcohol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ 2 mM H_2O_2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

Control enzyme tube ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมกับ 10 mM veratryl alcohol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ 2 mM H_2O_2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

Blank tube ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และ 10 mM veratryl alcohol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ 2 mM H_2O_2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/L)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 10^6}{9,300 \times 30 \times 0.2} \times \text{Dilution factor}$$

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

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

Reaction tube ประกอบด้วย 0.3 mM SGZ ในสารละลาย DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

Control enzyme tube ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมกับเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

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

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/L)} = \frac{(\text{Ab}_{\text{sample}} - \text{Ab}_{\text{Control}}) \times 10^6}{64,000 \times 30 \times 0.2} \times \text{Dilution factor}$$

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

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

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

Control enzyme tube ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมกับเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

Blank tube ประกอบด้วย 1 mM ABTS ใน 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/L)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 10^6}{36,000 \times 30 \times 0.2} \times \text{Dilution factor}$$

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

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

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

Control enzyme tube ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมกับเอนไซม์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร

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

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/L)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 10^6}{12,000 \times 30 \times 0.2} \times \text{Dilution factor}$$

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

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

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

Control enzyme tube ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมกับเอนไซม์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 542 นาโนเมตร

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

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/L)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 10^6}{11,300 \times 30 \times 0.2} \times \text{Dilution factor}$$

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

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

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

Control enzyme tube ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมกับเอนไซม์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

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

$$\text{ค่ากัมมันตภาพแลคเคส (U/L)} = \frac{(\text{Ab}^{\text{sample}} - \text{Ab}^{\text{Control}}) \times 10^6}{1,173 \times 30 \times 0.2} \times \text{Dilution factor}$$

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

3.2.5.3 การศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์

ในการศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคส โดยใช้สับสเตรท คือ 1-20 mM 2,6-DMP, 1-20 mM Guaiacol, 0.1-2.0 mM ABTS, 1-20 mM *p*-Anisidine และ 1-20 mM *o*-Anisidine บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ของแลคเคสบริสุทธิ์ จาก Lineweaver-Burk plot

3.2.5.4 การศึกษา pH ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์กัมมันตภาพแลคเคส

เตรียม Assay mixture โดยประกอบไปด้วย (Reaction tube, Control enzyme tube และ Blank tube) ศึกษาหา pH ที่เหมาะสม โดยใช้บัฟเฟอร์ ดังนี้ 25 mM Sodium acetate (pH 3.0-6.0), 25 mM Tris-HCl (pH 7.0-9.0), 25 mM Glycine-NaOH (pH 10.0-11.0) บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ DMP เป็นสับสเตรท วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

3.2.5.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกัมมันตภาพแลคเคส

เตรียม Assay mixture โดยประกอบไปด้วย ด้วย (Reaction tube, Control enzyme tube และ Blank tube) โดยใช้สับสเตรทและ pH ที่เหมาะสมสำหรับกัมมันตภาพแลคเคส และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ DMP เป็นสับสเตรท วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

3.2.5.6 การศึกษาความเสถียรของ pH

เตรียม Assay mixture โดยประกอบไปด้วย ด้วย (Reaction tube, Control enzyme tube และ Blank tube) โดยใช้สับสเตรทที่เหมาะสม (กัมมันตภาพแลคเคสสูงสุด) ศึกษาหา pH ที่เหมาะสม โดยบ่มแลคเคสในบัฟเฟอร์ ดังนี้ 25 mM Sodium acetate (pH 3.0-6.0), 25 mM Tris-HCl (pH 7.0-9.0), 25 mM Glycine-NaOH (pH 10.0-11.0) และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดกัมมันตภาพแลคเคสที่ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม

3.2.5.7 การศึกษาความเสถียรของอุณหภูมิ

เตรียม Assay mixture โดยประกอบไปด้วย ด้วย (Reaction tube, Control enzyme tube และ Blank tube) โดยใช้สับสเตรทและ pH ที่เหมาะสมสำหรับกัมมันตภาพแลคเคส และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4, 25, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดกัมมันตภาพแลคเคสที่ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ DMP เป็นสับสเตรท วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

3.2.5.8 การศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคส (Daassi *et al.*, 2013)

เตรียม Assay mixture โดยประกอบไปด้วย (Reaction tube, Control enzyme tube และ Blank tube) เติมไอออนโลหะแต่ละชนิด (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} และ Zn^{2+}) โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 และ 5 mM นำไปบ่มโดยใช้สับสเตรท pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกัมมันตภาพแลคเคสเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ DMP เป็นสับสเตรท วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

3.2.5.9 การศึกษาผลของตัวยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคส (Daassi *et al.*, 2013)

เตรียม Assay mixture โดยประกอบไปด้วย (Reaction tube, Control enzyme tube และ Blank tube) เติมตัวยับยั้งแต่ละชนิด (Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Sodium azide (NaN_3), β -mercaptoethanol และ L-cysteine) โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 และ 5 mM บ่มโดยใช้สับสเตรท, pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกัมมันตภาพแลคเคสเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ DMP เป็นสับสเตรท วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

3.2.5.10 ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธ์ (Bagewadi *et al.*, 2017)

เตรียม Assay mixture โดยประกอบไปด้วย (Reaction tube, Control enzyme tube และ Blank tube) เติมตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ Acetone, Dimethyl formamide (DMF), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Ethanol และ Methanol บ่มเอนไซม์กับตัวทำละลายอินทรีย์ ความเข้มข้น 25% และ 50% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพของแลคเคสที่อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (หลอดควบคุมใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนสารละลายอินทรีย์)

3.2.5.11 ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวต่อความเสถียรของแลคเคสบริสุทธ์ (Bagewadi *et al.*, 2017)

เตรียม Assay mixture โดยประกอบไปด้วย (Reaction tube, Control enzyme tube และ Blank tube) เติมสารลดแรงตึงผิวชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Triton X-100, Tween 20 และ Tween 80 และสารซักล้าง (detergent) ได้แก่ Sodium dodecyl sulfate (SDS) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 และ 10 mM บ่มกับเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพของแลคเคสที่อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (หลอดควบคุมใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนสารลดแรงตึงผิว)

3.2.5.12 การศึกษาการกำจัดสีสังเคราะห์ด้วยแลคเคสบริสุทธ์ (Bagewadi *et al.*, 2017)

ศึกษาการกำจัดสีสังเคราะห์ด้วยแลคเคสบริสุทธ์จาก *Bacillus sp.* FN1 โดยใช้สีสังเคราะห์ดังนี้ Bromocresol green ($\lambda_{\max} = 615 \text{ nm}$), Congo red ($\lambda_{\max} = 480 \text{ nm}$), Methyl orange ($\lambda_{\max} = 465 \text{ nm}$) และ Phenol red ($\lambda_{\max} = 558 \text{ nm}$) เตรียม Assay mixture (Control tube และ Reaction tube) โดยเตรียมสีต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 mg/L ใน 25 mM buffer และแลคเคสบริสุทธ์ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 5.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในอุณหภูมิที่แลคเคสมีความเหมาะสมมากที่สุด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์การกำจัดสีโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร สามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีได้ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของการกำจัดสี (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

เมื่อ; A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงชั่วโมงที่ 0

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงโมมต่าง ๆ



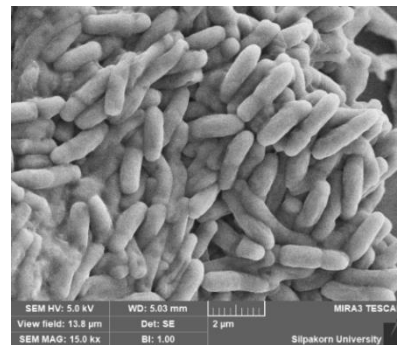
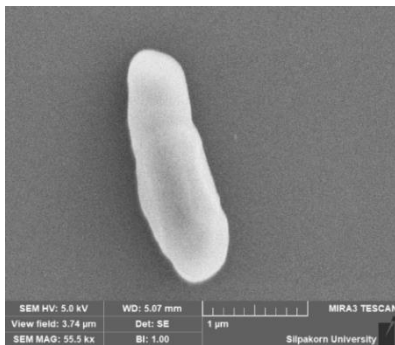
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 จุลินทรีย์ผลิตแลคเคส

Bacillus sp. FN1 เป็นจุลินทรีย์ผลิตแลคเคสที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้ง บริษัท โนเบิลเท็กซ์การย้อม จำกัด อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ที่มี guaiacol เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถ เจริญเติบโตได้ดีและมีลักษณะโคโลนีเป็นสีชมพู (ภาพที่ 6) และจากการศึกษารูปร่างเซลล์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) พบว่า เซลล์มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งสั้น ๆ ขนาด 1.5–3.0 μm ดังแสดงในภาพที่ 7

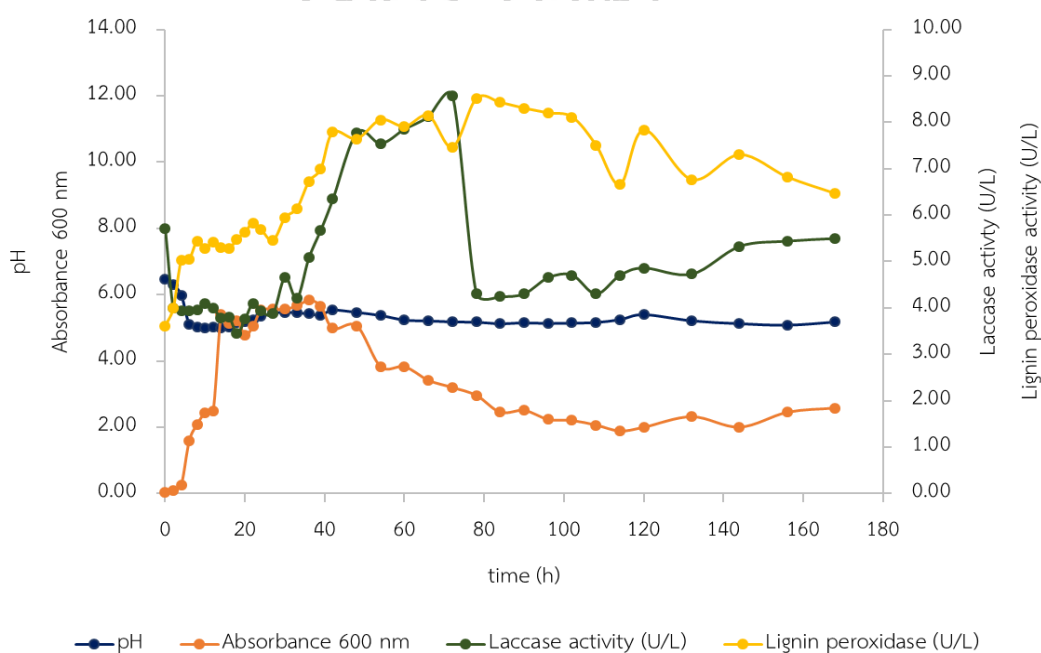


ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus* sp. FN1 ที่มี 0.02% (w/v) guaiacol เป็นสับสเตรท บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (A) โคโลนีบนอาหารแข็ง และ (B) เซลล์แขวนลอย ในอาหารเหลว



ภาพที่ 7 รูปร่างเซลล์ของ *Bacillus* sp. FN1 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

การผลิตแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 ในอาหารเหลวที่มี 0.02% (w/v) guaiacol ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 8 พบว่า *Bacillus* sp. FN1 ผลิตแลคเคสได้สูงสุดที่ 72 ชั่วโมง (3 วัน) โดยมีค่ากัมมันตภาพแลคเคสเท่ากับ 8.57 U/L และผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 78 (8.52 U/L) งานวิจัยของ Sondhi และคณะ (2015) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต และการผลิตแลคเคสของ *Bacillus tequilensis* SN4 โดยเฉพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าจุลินทรีย์ผลิตแลคเคสได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 (24 nkats/mL) งานวิจัยของ Mehandia และคณะ (2020) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและการผลิตแลคเคส *Alcaligenes faecalis* XF1 โดยเฉพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบว่าจุลินทรีย์ผลิตแลคเคสได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 8 การผลิตแลคเคสและลิกนินเปอร์ออกซิเดสจาก *Bacillus* sp. FN1 ในอาหารเหลวที่มี guaiacol บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

4.2 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยวิธี 16s rDNA

ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรีย โดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งการวิเคราะห์จะจำแนกโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA กับฐานข้อมูล ผลการวิเคราะห์พบว่า *Bacillus* sp.

FN1 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Bacillus tequilensis* มากที่สุด (99.93%) และรองลงมา คือ *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* (99.84%) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA สามารถแยกความแตกต่างของแบคทีเรียออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังนั้น *Bacillus* sp. FN1 จึงไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus tequilensis* ได้ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในภาพที่ 9

ลำดับนิวคลีโอไทด์			
Nucleotide sequence(s)			
ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3')
No.	Sample No.	Nucleotide region of	Nucleotide sequence (5' -> 3')
2	FN1	16S rDNA	>FN1 CGCTCAGGACGAAACGCTGGCCGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCCTCCCTGATGTAGCGGC GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGTAATACCGGATGGTGTGTT TGAACCGCATGGTTCAACATAAAAGGTGGCTTCGGTACCCTTACAGATGGACCGCGGGCATTAGCTAGTTGGTGAGG TAATGGCTCACCAGGCAACGATGCTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGCCCCAGACTCC TACGGGAGGACAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCG ATCGTAAAGCTCTGTTGTAGGGAAGAACACTACCGTTGAAATAGGGCGGTACTTACCGGTACCTAACAGAAAGCCACG CTAACACTAGTGGCCAGCAGCCCGGTAACCTAGGTGGCAAGCGTTTCCGGAATATTGGCGCTAAGGGCTCGCAGGCG GTTCTTAAGTCTGATCGAAAGCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCACTGGAACTGGGGAACCTGACTCGAAGAGGAG AGTGGAACTCACGCTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGAACACCGAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA CAGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACAGGATGATGCTAAGTGT TAGGGGTTTTCCGCCCTTATGCTGCAGCTAACGATTAAGCCTCCGCTGGGAGTACGCTCGAAGACTGAAACTCAA AGAATTGACGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA TCCTTGACAATCCTAGAGATAGGAGCTCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGTGGTGCATGTTGCTGCTGAGTCTGTGCTG GAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGC CGGTGACAAACCGGAGGAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGCTACAATGGA CAGAACAAGGGCAGCAACCGGAGGTTAAGCAATCCCAAAATCTGTCTCAGTTCGGATCGAGTCTGCAACTCGAC TCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCT CACACCAGAGAGTTGTAACACCCGAAGTGGTGGTAACTTTTAGGAGCCAGCCCGCAAGTGGGACAGATGATTGG G

ภาพที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของ *Bacillus* sp. FN1

ตารางที่ 2 ข้อมูลเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bacillus* sp. FN1 กับ *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่น ๆ

Strain: FN1

Rank	Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise Similarity(%)	Mismatch/ Total nt
1	<i>Bacillus tequilensis</i>	KCTC 13622	Gatson et al. 2006	AYTO01000043	99.93	1/1469
2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>stercoris</i>	D7XPN1	Adelskov and Patel 2017	JHCA01000027	99.84	2/1265
3	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-23049	Nakamura et al. 1999	CP002905	99.80	3/1469
4	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	KCTC 13429	Rooney et al. 2009	AMXN01000021	99.80	3/1469
5	<i>Bacillus cabrialesii</i>	TE3	de Los Santos Villalobos et al. 2999	MK462260	99.80	3/1469
6	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCIB 3610	(Ehrenberg 1835) Nakamura et al. 1999	ABQL01000001	99.73	4/1469
7	<i>Bacillus halotolerans</i>	ATCC 25096	(Delaporte and Sasson 1967) Tindall 2017	LPVF01000003	99.66	5/1469
8	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	Ruiz-Garcia et al. 2005	AY603658	99.64	5/1403
9	<i>Bacillus vallismortis</i>	DV1-F-3	Roberts et al. 1996	JH600273	99.59	6/1469
10	<i>Bacillus majavensis</i>	RO-H-1	Roberts et al. 1994	JH600280	99.46	8/1469
11	<i>Bacillus nakamurai</i>	NRRL B-41091	Dunlap et al. 2016	LSAZ01000028	99.46	8/1469
12	<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613	Sumpavapol et al. 2010	AJVF01000043	99.32	10/1469
13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DSM 7	(ex Fukumoto 1943) Priest et al. 1987	FN597644	99.18	12/1469
14	<i>Bacillus atrophaeus</i>	JCM 9070	Nakamura 1989	AB021181	99.12	13/1469
15	<i>Bacillus glycinifermentans</i>	GO-13	Kim et al. 2015	LECW01000063	98.64	20/1468

4.3 การแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Bacillus sp.* FN1

4.3.1 การผลิตแลคเคสจาก *Bacillus sp.* FN1

การผลิตแลคเคสจาก *Bacillus sp.* FN1 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ เป็นเวลา 3 วัน พบว่า crude laccase มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 23.85 มิลลิกรัม และมีค่ากัมมันตภาพแลคเคสทั้งหมดเท่ากับ 6.49 U ซึ่งมีค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 0.25 U/mg protein

4.3.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตน

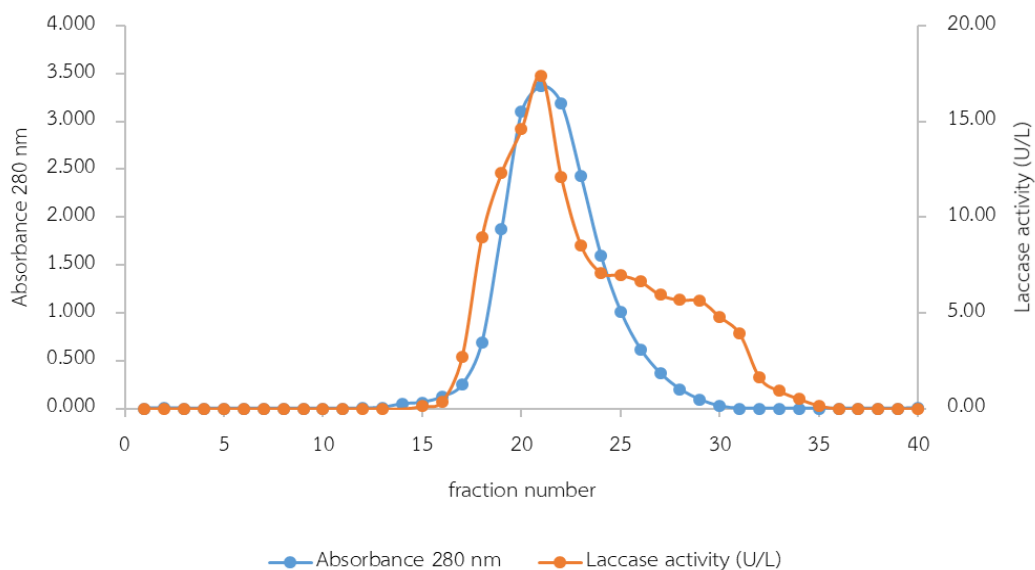
นำ crude laccase มาตกตะกอนด้วย 60% (v/v) อะซิโตนในที่เย็นจัด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 25 mM Tris-HCl pH 7.0 วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 7.56 มิลลิกรัม และมีค่ากัมมันตภาพทั้งหมดเท่ากับ 2.81 U มีค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 0.37 U/mg

4.3.3 การแยกบริสุทธิ์แลคเคสด้วย Fast Flow Protein Liquid Chromatography

4.3.3.1 การแยกบริสุทธิ์แลคเคสด้วยวิธีเจลฟิเตรชันโครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography)

นำตะกอนโปรตีนที่ได้หลังตกตะกอนด้วย 60% (v/v) อะซิโตนมาแยกบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง FPLC โดยใช้วิธีเจลฟิเตรชัน ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200 ที่ปรับสมดุลด้วย 25 mM Tris-HCl pH 7.0 อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที หลังผ่านคอลัมน์เก็บตัวอย่างสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ fraction ละ 2.0 มิลลิลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่ากัมมันตภาพของแลคเคสมาพลอตกราฟความสัมพันธ์ดังแสดงในภาพที่ 10

ผลการทดลองพบว่า fraction ที่ 17-30 ปริมาตร 28 มิลลิลิตร พบว่าที่ fraction ที่ 21 มีค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สูงสุดเท่ากับ 3.288 และค่ากัมมันตภาพแลคเคสเท่ากับ 15.81 U/L และมีกัมมันตภาพแลคเคสรวม (fraction ที่ 17-30) เท่ากับ 14.02 U/L ค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 0.95 U/mg และมีความบริสุทธิ์ 3.74 เท่า

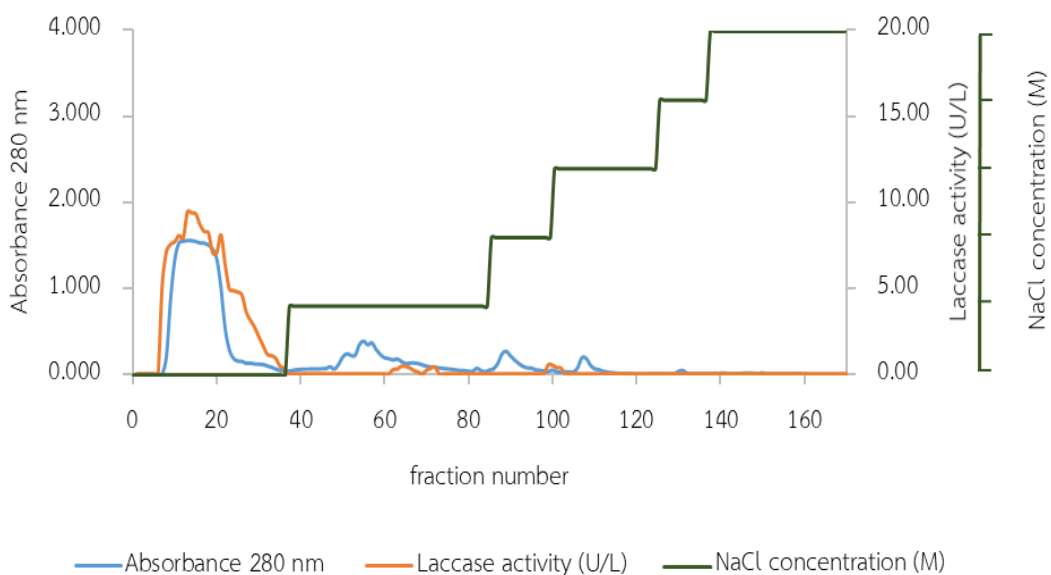


ภาพที่ 10 Elution profile ของโปรตีนแลคเคสบนคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200 โดยใส่โปรตีนตัวอย่าง 10.0 มิลลิลิตร (total volume = โปรตีนตัวอย่าง 2.0 มิลลิลิตร ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 8.0 มิลลิลิตร) ผ่านเครื่อง FPLC โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200 ละลายสารละลาย 25 mM Tris-HCl pH 7.0 อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร/นาที เก็บ fraction ละ 2.0 มิลลิลิตร

4.3.3.2 การแยกบริสุทธิ์แลคเคสด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

นำเอนไซม์ที่ได้หลังจากผ่านขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง FPLC โดยใช้วิธีเจลฟิลเตรชัน ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200 มาแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Q-Sepharose ที่ปรับสมดุลด้วย 25 mM Tris-HCl pH 7.0 อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที หลังผ่านคอลัมน์เก็บตัวอย่างสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ fraction ละ 4.0 มิลลิลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่ากัมมันตภาพของแลคเคสมาพลอตกราฟความสัมพันธ์ดังแสดงในภาพที่ 11

ผลการทดลองพบว่า fraction ที่ 8-30 ปริมาตร 92 มิลลิลิตร พบว่าที่ fraction ที่ 13 มีค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สูงสุดเท่ากับ 1.555 และค่ากัมมันตภาพแลคเคสเท่ากับ 6.97 U/L และมีกัมมันตภาพแลคเคสรวม (fraction ที่ 8-30) เท่ากับ 4.26 U/L ค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 1.18 U/mg และมีความบริสุทธิ์ 4.67 เท่า



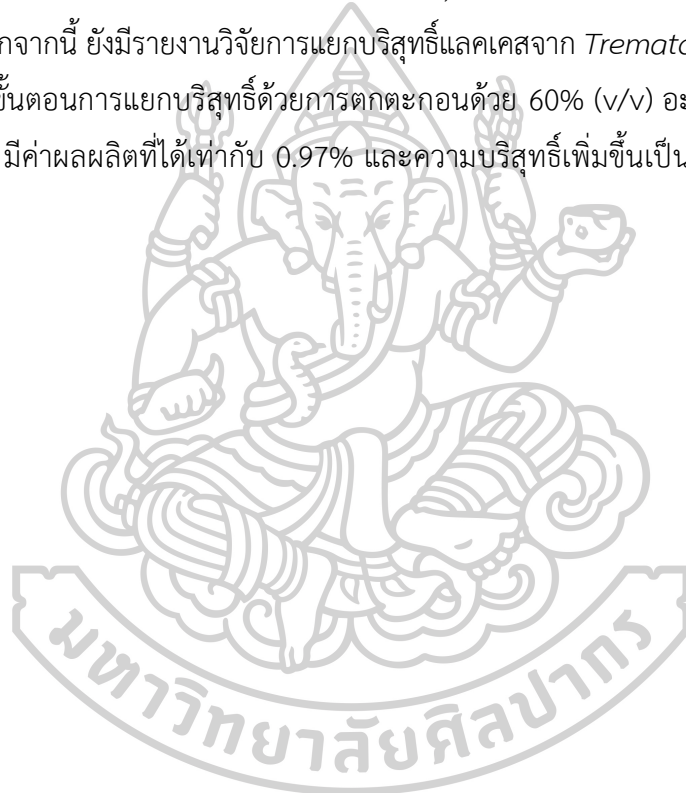
ภาพที่ 11 Elution profile ของโปรตีนแลคเคสบนคอลัมน์ที่บรรจุ Q-sepharose โดยใช้โปรตีนตัวอย่างจาก fraction ที่ 8-30 ที่ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200 ปริมาตรรวม 84 มิลลิลิตร มาผ่านเครื่อง FPLC โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุ Q-Sepharose เชะด้วยสารละลาย 25 mM Tris-HCl pH 7.0 ที่มีความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 M อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที่ เก็บ fraction ละ 4 มิลลิลิตร

4.4 การวิเคราะห์การแยกบริสุทธิ์แลคเคส

แลคเคสบริสุทธิ์ที่ได้จาก *Bacillus sp.* FN1 ผ่านขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ 3 ขั้นตอน คือ ตกตะกอนด้วย 60% (v/v) อะซิโตน จากนั้นนำไปแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี โดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-200 แล้วนำไปแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Q-Sepharose และนำไปคำนวณค่ากัมมันตภาพจำเพาะ จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ (fold) และผลผลิตที่ได้ของการแยกบริสุทธิ์ (yield) โดยแสดงผลในตารางที่ 3

จากตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าหลังผ่านกระบวนการแยกบริสุทธิ์แลคเคสด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ และนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ตามลำดับ แลคเคสบริสุทธิ์ที่ได้มีค่ากัมมันตภาพแลคเคสและปริมาณโปรตีนทั้งหมดลดลง หลังจากขั้นตอนตกตะกอนด้วย 60% (v/v) อะซิโตน ค่าผลผลิตที่ได้ลดลงเหลือ 43.34% และมีความบริสุทธิ์เพียง 1.47 เท่า ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการแยกแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Mycena purpureofusca* โดยแลคเคสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซิโตนมีค่าผลผลิตที่ได้ และความบริสุทธิ์

เท่ากับ 48% และ 1.6 เท่า ตามลำดับ (Sun *et al.*, 2013) และยังมีรายงานวิจัยการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Bacillus* sp. ADR โดยตกตะกอนด้วย 30% (v/v) อะซิโตน พบว่าแลคเคสที่ได้มีค่าผลผลิตที่ได้สูงถึง 50% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10 เท่า (Telke *et al.*, 2011) แลคเคสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้วมีค่ากัมมันตภาพแลคเคสทั้งหมด 0.39 U ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 0.33 มิลลิกรัม มีค่าผลผลิตที่ได้เท่ากับ 6.04% และความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 4.67 เท่า จากรายงานวิจัยการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Alcaligenes faecalis* XF1 โดยมีขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ 2 ขั้นตอน คือ ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (0-80%) และ DEAE-Cellulose พบว่ามีค่าผลผลิตที่ได้เท่ากับ 12.0% และความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 3.8 เท่า (Mehandia *et al.*, 2020) ซึ่งใกล้เคียงกับความบริสุทธิ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยการแยกบริสุทธิ์แลคเคสจาก *Trematosphaeria mangrovei* หลังจากผ่านขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วย 60% (v/v) อะซิโตน และ Sephadex G-100 พบว่า มีค่าผลผลิตที่ได้เท่ากับ 0.97% และความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 31.47 เท่า (Mabrouk *et al.*, 2012)



ตารางที่ 3 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์จาก *Bacillus sp.* FN1

Purification step	Volume (ml)	Activity (U/L)	Total activity (U)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude laccase	1,000.00	6.49	6.49	0.026	25.06	0.25	100.00	1.00
60%(v/v) Acetone precipitation	30.00	80.39	2.81	0.216	7.56	0.37	43.34	1.47
Sephacryl S-200	28.00	14.02	0.39	0.015	0.41	0.95	6.05	3.74
Q-Sepharose	92.00	4.26	0.39	0.004	0.33	1.18	6.04	4.67

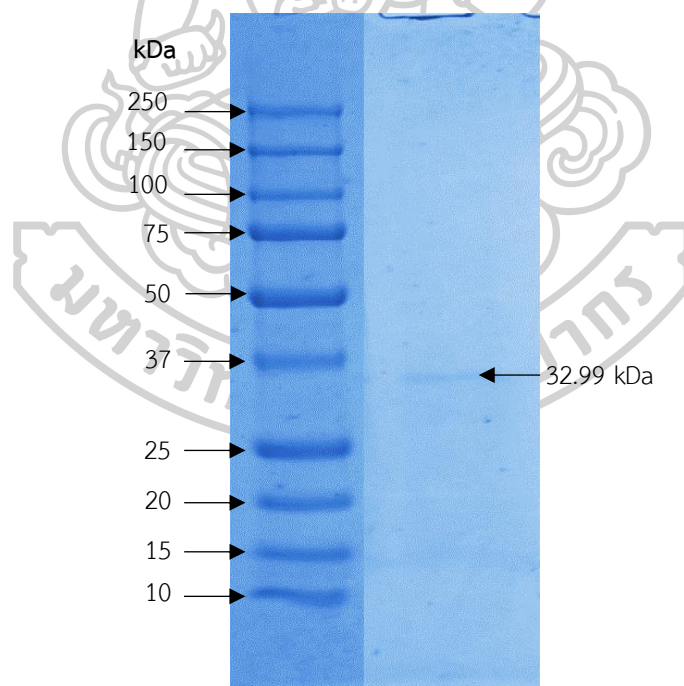
กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DMP (DMP , $\epsilon = 14,800 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$) 1 μmol ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

4.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแลคเคสด้วยเทคนิค SDS-PAGE

(Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

เมื่อนำแลคเคสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์จากการผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Q-Sepharose มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ และมวลโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังภาพที่ 12

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแถบของโปรตีนในส่วนแลคเคสที่ผ่านขั้นตอนสุดท้ายของการแยกบริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ Q-Sepharose พบแถบโปรตีนจำนวน 1 แถบ เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน มีมวลโมเลกุลขนาดเท่ากับ 32.99 kDa ซึ่งมวลโมเลกุลของแลคเคสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุล 24-80 kDa (Sharma *et al.*, 2020) โดยมวลโมเลกุลที่ได้จากงานวิจัยนี้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Sharma และคณะ (2019) ที่ได้รายงานว่ แลคเคสที่ได้จาก *Bacillus sp.* PC-3 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 36 kDa นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับโมเลกุลของแลคเคสที่ได้จากจุลินทรีย์อื่นๆ ดังนี้ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ TPRN1 (44 kDa) และ TPRN6 (38 kDa), *Trametes polyzona* WRF03 (66 kDa) และ *Aureobasidium pullans* (61 kDa) (Ezike *et al.*, 2020; Nelson and Anne, 2021; Sharma *et al.*, 2020)



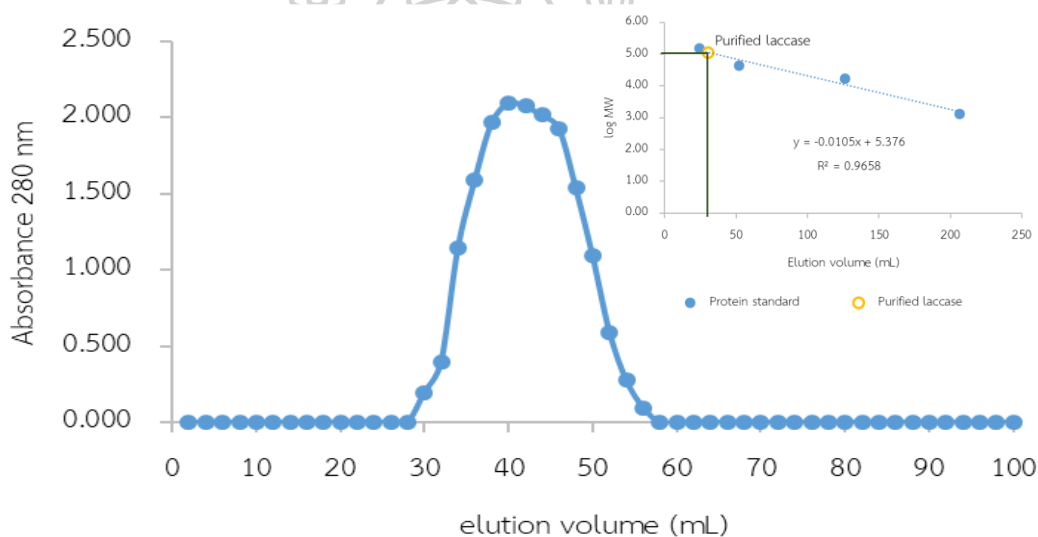
ภาพที่ 12 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน (Biorad, USA)

แถวที่ 2 โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Q-Sepharose ที่ถูกชะด้วย 25 mM Tris-HCl pH 7.0 (fraction ที่ 8-30) ที่ผ่านการ Freeze dry

4.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์แลคเคสด้วยเทคนิค Gel filtration chromatography

ตรวจสอบความบริสุทธิ์แลคเคสผ่าน Gel filtration chromatography ที่ภายในคอลัมน์บรรจุ Sephacryl S-200 ขนาดด้วย 25 mM Tris-HCl pH 7.0 โดยใช้อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อ นาที เก็บ fraction ละ 2 มิลลิลิตร โดยโปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือ Gel filtration standard (BIO-RAD) ซึ่งประกอบด้วย Thyroglobulin (MW = 670,000 kDa), globulin (MW = 158,000 kDa), Ovalbumin (MW = 44,000 kDa), Myoglobin (MW = 17,000 kDa) และ Vitamin B12 (MW = 1,350 kDa) โปรตีนมาตรฐานนี้จะถูกชะออกมาที่ปริมาตร 8, 24, 52, 126 และ 206 มิลลิลิตรตามลำดับ และโปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ถูกชะออกมาที่ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เมื่อคำนวณหาโมเลกุลจากสมการในภาพที่ 13 จะได้โมเลกุลเท่ากับ 115.08 kDa



ภาพที่ 13 การตรวจสอบความบริสุทธิ์แลคเคสด้วยเทคนิค Gel filtration chromatography

4.7 การศึกษาสมบัติบางประการของแลคเคสบริสุทธิ์

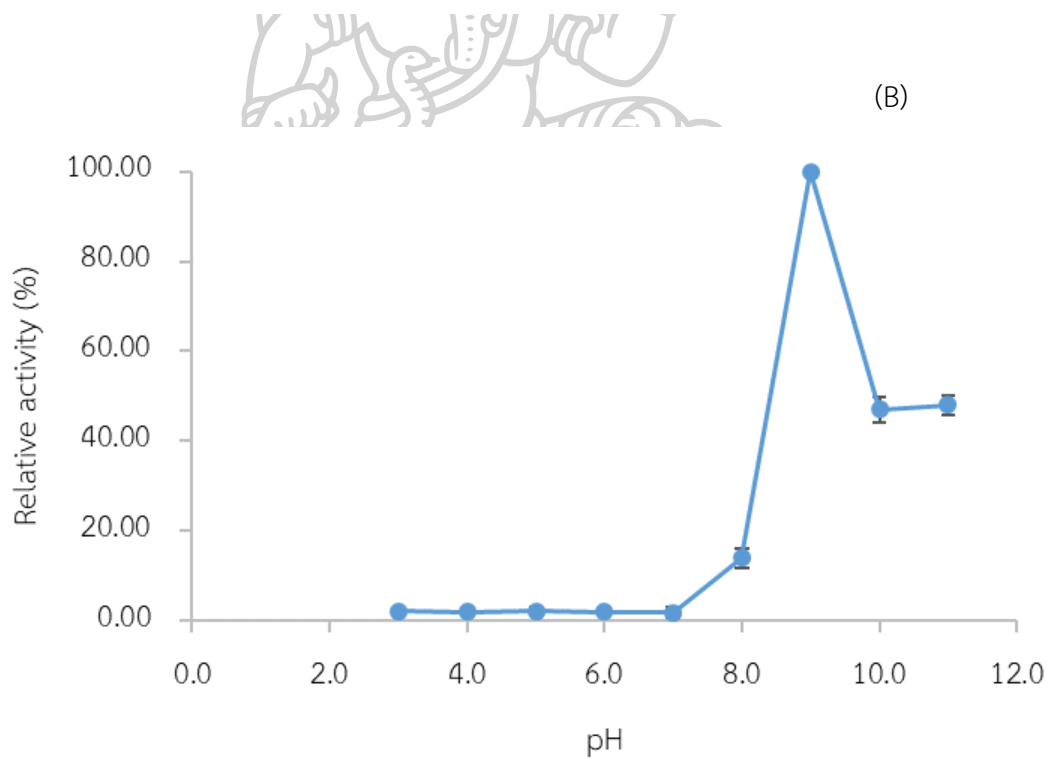
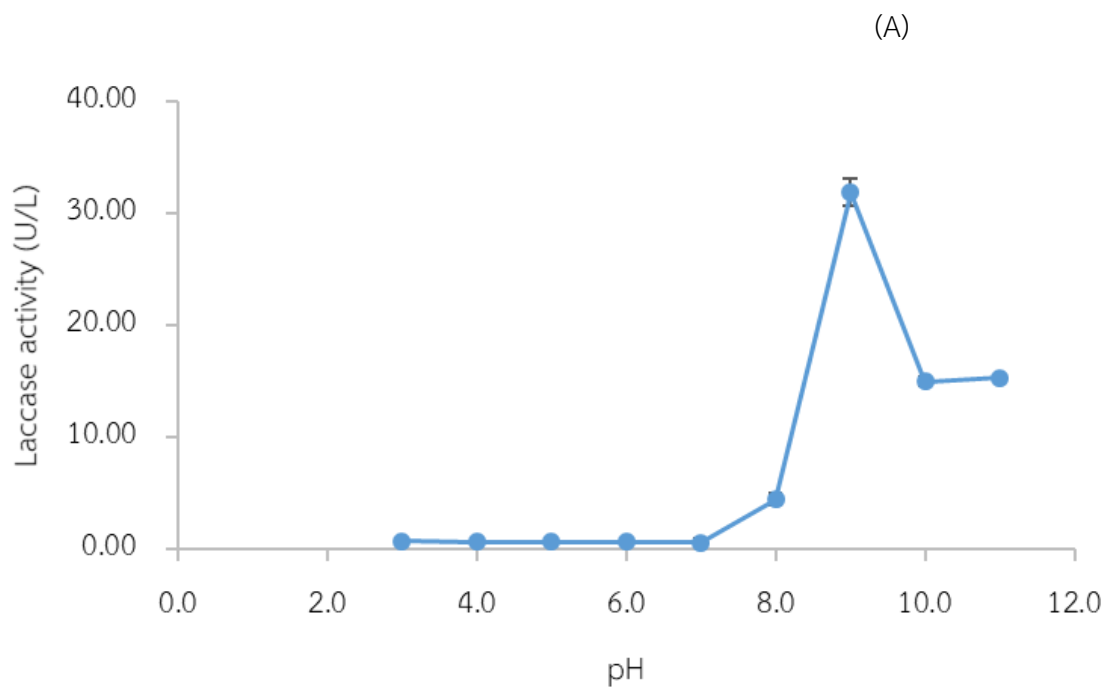
4.6.1 การศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมและความเสถียรต่อกัมมันตภาพแลคเคส

การศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 ที่ผ่านคอลัมน์ Q-Sepharose โดยนำ fraction ที่ 8-30 มา pool รวมกัน เพื่อศึกษา pH ที่แลคเคส เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุด โดยใช้ 2,6-DMP เป็นสับสเตรทละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่าง ๆ ในบัฟเฟอร์ 3 ชนิด คือ 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 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพแลคเคส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 14

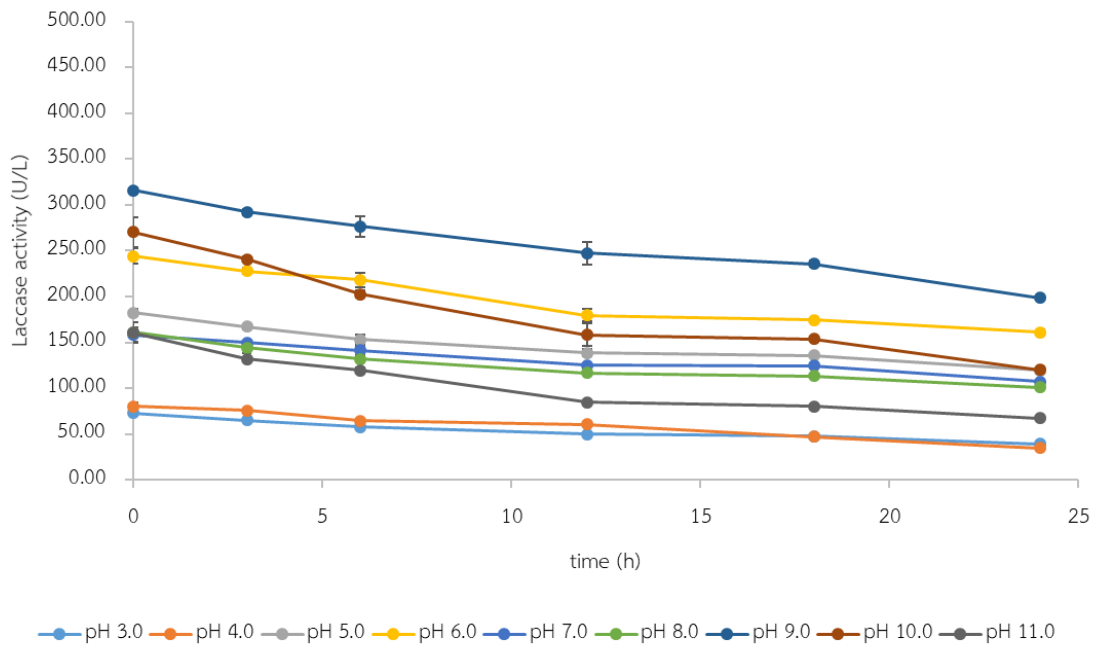
จากการทดลองพบว่า pH มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคส โดยแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 ที่ pH 9.0-10.0 มีค่า Relative activity อยู่ในช่วง 40-100% ค่า pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสสูงสุดคือ pH 9.0 มีค่ากัมมันตภาพแลคเคสเท่ากับ 31.92 U/L (ภาพที่ 14A และภาพที่ 14B) แสดงให้เห็นว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 เป็น Alkaline Laccase ที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH ที่เป็นต่าง จากรายงานวิจัยการศึกษาการแยกบริสุทธิ์และคุณลักษณะแลคเคสจาก *Bacillus subtilis* MTCC 2414 พบว่ามีค่า pH ที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสในช่วง pH ที่เป็นต่าง และสูงสุดที่ pH 9.0 เมื่อใช้ 2,6-DMP เป็นสับสเตรท (Muthukumarasamy *et al.*, 2015) นอกจากนี้ ยังพบว่าเมื่อใช้ ABTS เป็นสับสเตรท แลคเคสจาก *Mycena purpureofusca* และ *Bacillus subtilis* LP2 พบว่ามีค่า pH ที่เหมาะสมสูงสุดที่ pH 2.2 และ 8.0 ตามลำดับ (Sun *et al.*, 2013; Yasar *et al.*, 2019)

เมื่อศึกษาความเสถียรของแลคเคสใน pH ต่าง ๆ พบว่าในช่วง pH 5.0-9.0 ยังคงมีค่า Relative activity สูงกว่า 50% โดยเฉพาะที่ pH 7.0 มีค่า Relative activity อยู่ 67.85% (ภาพที่ 15) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sharma และคณะ (2019) ที่ศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. PC-3 พบว่าหลังจากที่บ่มเอนไซม์ที่ pH 7.0 เป็นเวลา 240 นาที ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ยังคงเหลืออยู่ 95% เมื่อใช้ ABTS เป็นสับสเตรท ในขณะที่ pH 8.0 และ 9.0 คงเหลืออยู่ 77 และ 70% ตามลำดับ

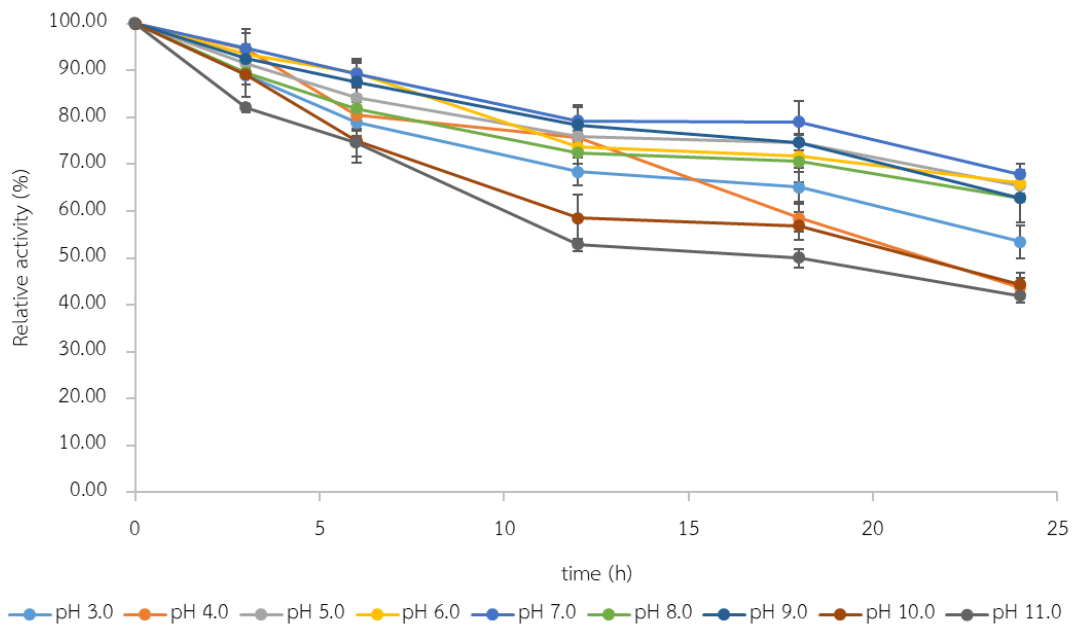


ภาพที่ 14 ผลการศึกษา pH ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสจาก *Bacillus sp.* FN1 โดย (A) Laccase activity (U/L) และ (B) Relative activity (%) วิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 60 °C โดยใช้ 2,6-DMP เป็น สับสเตรท

(A)



(B)



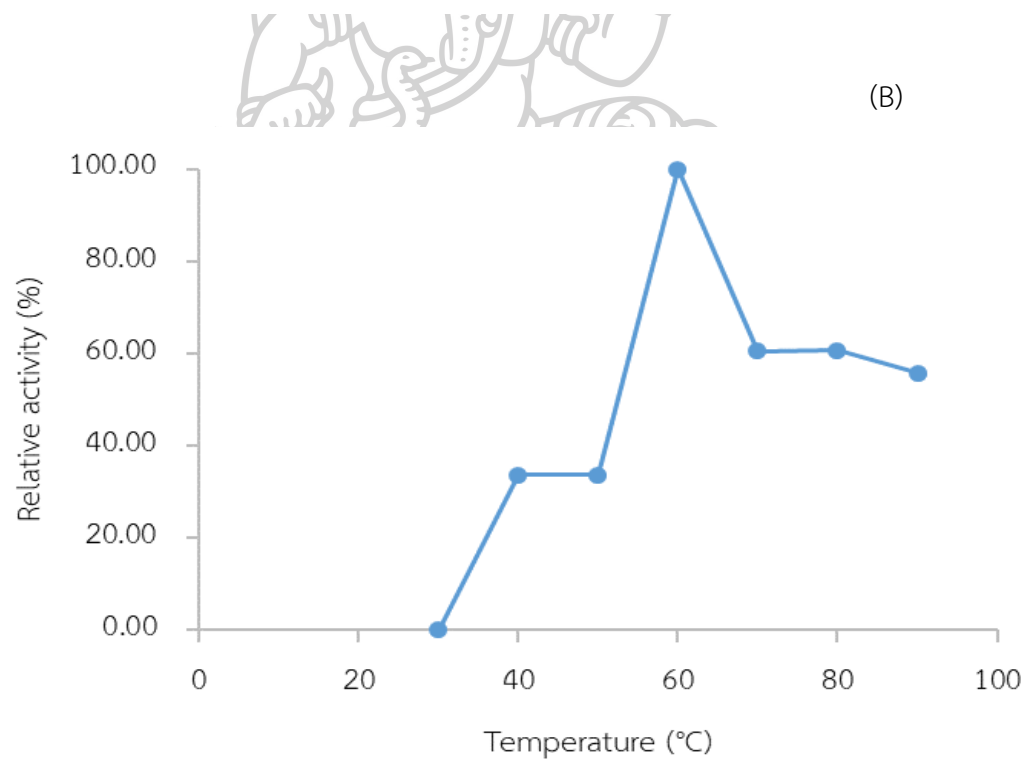
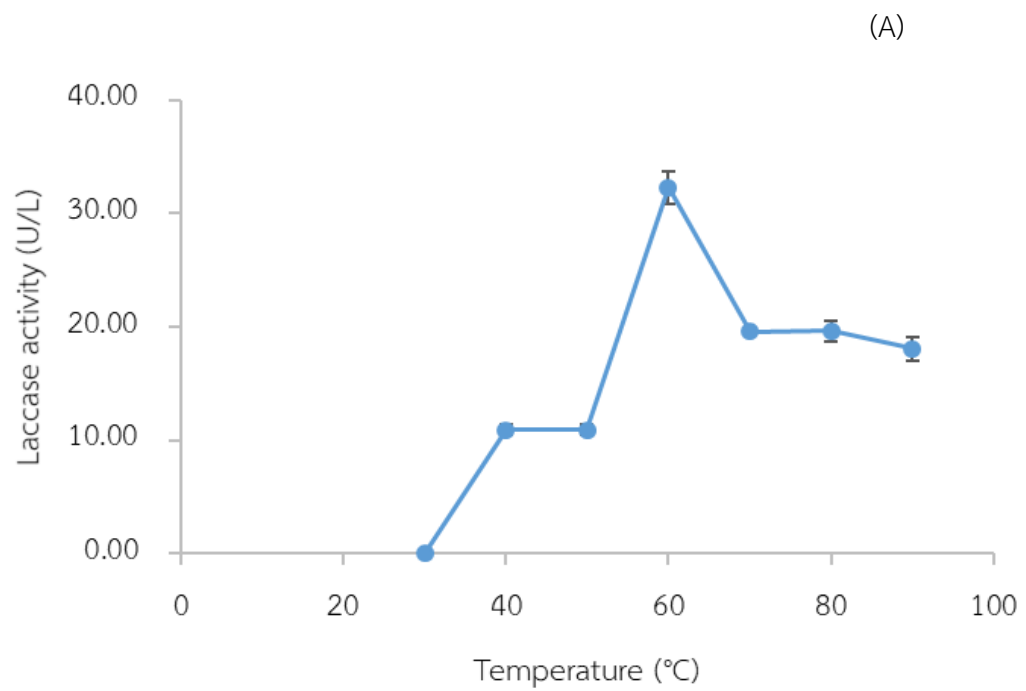
ภาพที่ 15 ความเสถียรของ pH ที่มีต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 โดย (A) Laccase activity (U/L) และ (B) Relative activity (%) วิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้ 2,6-DMP เป็นสับสเตรท

4.7.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม (Optimum temperature)

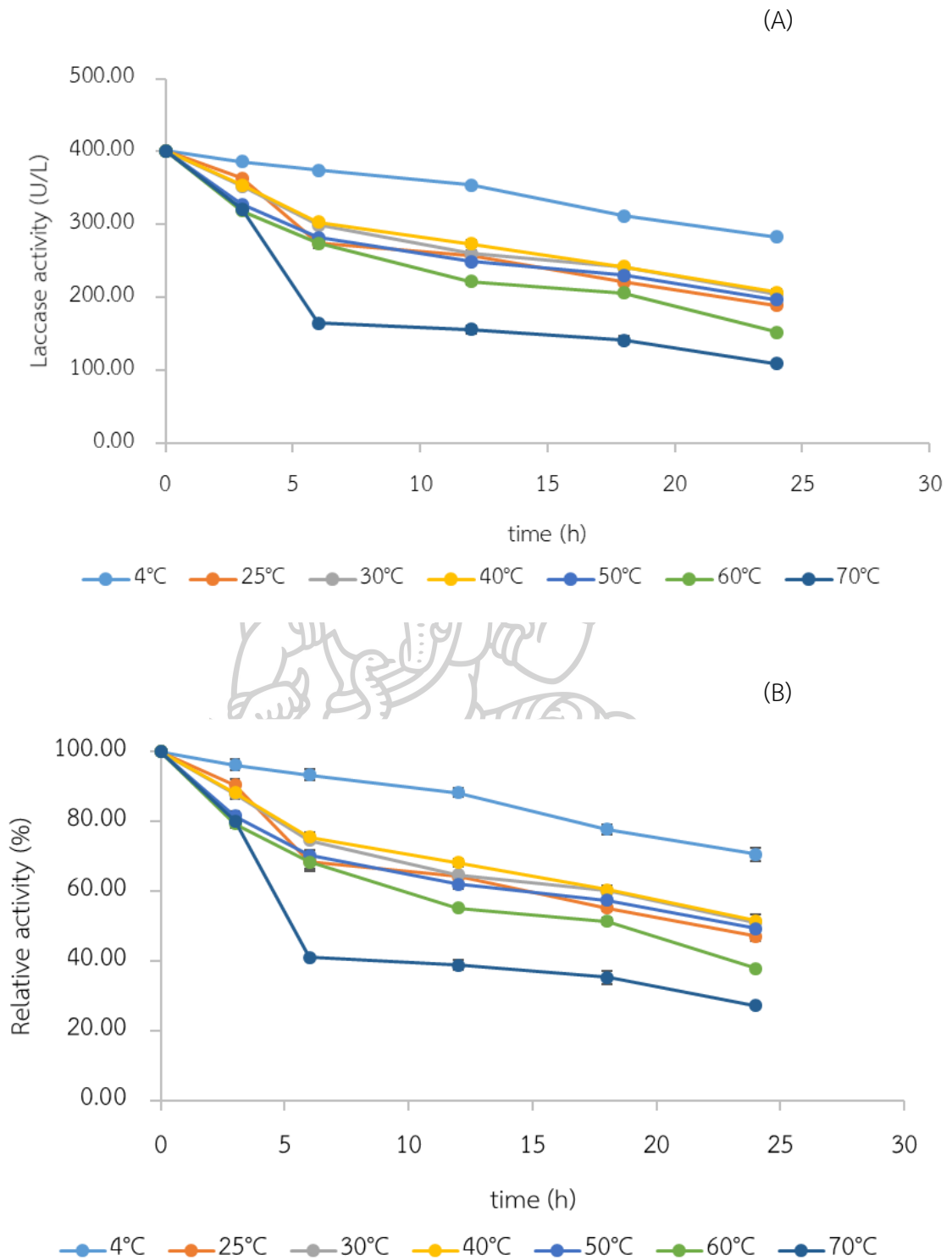
การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 ที่ผ่านคอลัมน์ Q-Sepharose โดยนำ fraction ที่ 8-30 มา pool รวมกัน เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่แลคเคสเร่งปฏิกิริยาได้สูงสุด โดยใช้ 2,6-DMP ที่เป็นสับสเตรทละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 25 mM Tris-HCl pH 9.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพแลคเคส แสดงผลการทดลองในภาพที่ 16

จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคส โดยเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 60-90 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสสูงสุดคือ 60 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากัมมันตภาพแลคเคสเท่ากับ 32.32 U/L เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นมากกว่า 70 องศาเซลเซียส มีผลทำให้กัมมันตภาพแลคเคสลดลง จากรายงานการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแลคเคสที่ผลิตจาก *Ganoderma australe* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยในช่วงอุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส มีค่า Relative activity (%) สูงกว่า 60% (Si et al., 2021) นอกจากนี้ ยังพบว่าแลคเคสที่ได้จาก *Trematosphaeria mangrovei* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส และรองลงมาคือ 40 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียสสามารถเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ 11.38 และ 3.29% ตามลำดับ และแลคเคสที่ได้จาก *Bacillus amyloliquefaciens* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 65 องศาเซลเซียส (Lončar et al., 2014; Mabrouk et al., 2012) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสของงานวิจัยนี้อีกด้วย

เมื่อศึกษาความเสถียรของแลคเคสในอุณหภูมิต่าง ๆ โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส มีค่า Relative activity สูงกว่า 50% และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่า Relative activity อยู่ 53.41% (ภาพที่ 17) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wang et al. (2011) ที่พบว่า *Bacillus subtilis* WD23 มีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส (Relative activity > 60%) นอกจากนี้ ยังพบว่าแลคเคสจาก *Bacillus vallismortis* fmb-103 เป็นแลคเคสที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส โดยกัมมันตภาพแลคเคสจะลดลงครึ่งหนึ่งที่เวลา 10 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ (Zhang et al., 2013) ซึ่งเมื่อเทียบกับงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าแลคเคสที่ได้จาก *Bacillus* sp. FN1 มีความเสถียรในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสได้ดีกว่า โดยกัมมันตภาพแลคเคสจะลดลงครึ่งหนึ่งที่เวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 16 การศึกษาของอุณหภูมิต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 โดย (A) Laccase activity (U/L) และ (B) Relative activity (%) วิเคราะห์ที่ pH 9.0 โดยใช้ 2,6-DMP เป็นสับสเตรท



ภาพที่ 17 ความเสถียรของอุณหภูมิต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 โดย (A) Laccase activity (U/L) และ (B) Relative activity (%) วิเคราะห์ที่ pH 9.0 โดยใช้ 2,6-DMP เป็นสับสเตรท

4.7.3 ศึกษาความจำเพาะของสับสเตรทและค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธ์

การศึกษาสับสเตรทที่เหมาะสมต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 ที่ผ่านคอลัมน์ Q-Sepharose โดยนำ fraction ที่ 8-30 มา pool รวมกันเพื่อศึกษาผลของสับสเตรทที่แลคเคสเร่งปฏิกิริยาได้สูงสุด โดยนำสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ดังนี้ กัวไอเอคอล (guaiacol), เวอร์ราทิลแอลกอฮอล์ (veratryl alcohol), 2,6-DMP (2,6-Dimethoxyphenol), ไทโรซีน (Tyrosine), ซิงริงกัลดาซีน (Syringaldazine), ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), *o*-Anisidine และ *p*-Anisidine มาละลายด้วย 25 mM Tris-HCl pH 9.0 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปวัดกัมมันตภาพแลคเคส ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4

จากการศึกษาความจำเพาะของสับสเตรทต่อกัมมันตภาพของแลคเคสบริสุทธ์ที่แสดงในตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 สามารถออกซิไดซ์สับสเตรทได้หลากหลาย โดยสามารถออกซิไดซ์ DMP ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *p*-Anisidine, veratryl alcohol, guaiacol, *o*-Anisidine, ABTS และ syringaldazine ตามลำดับ แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์ veratryl alcohol และ Tyrosine ได้ ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mehandia *et al.* (2020) พบว่าแลคเคสจาก *Alcaligenes faecalis* XF1 สามารถออกซิไดซ์สับสเตรทได้ดังนี้ 2,6-DMP, guaiacol, ABTS, Catechol และ syringaldazine และจากงานวิจัยของ Sharma *et al.* (2020) พบว่าแลคเคสจาก *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ TPRN1 และ TPRN6 สามารถออกซิไดซ์ 2,6-DMP และ ABTS ได้ โดยสามารถออกซิไดซ์ ABTS ได้ดีกว่า และจากงานวิจัยของ Nelson and Anne (2021) พบว่าแลคเคสจาก *Aureobasidium pullans* สามารถออกซิไดซ์ ABTS, guaiacol, catechol และ pyrogallol แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์ Tyrosine และ L-DOPA ได้

ศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธ์ โดยใช้สารตั้งต้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 1-20 mM guaiacol, 1-20 mM 2,6-DMP, 0.1-2 mM ABTS, 1-20 mM Veratryl alcohol, 1-20 mM *o*-Anisidine และ 1-20 mM *p*-Anisidine โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ของแลคเคสบริสุทธ์จาก Lineweaver-Burk plot โดยแสดงผลค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ในตารางที่ 5 และกราฟระหว่าง $1/[S]$ กับ $1/V$ แสดงผลในภาพที่ 18

จากการศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธ์จาก *Bacillus* sp. FN1 เปรียบเทียบสารตั้งต้นคือ 2,6-DMP, ABTS, guaiacol, Veratryl alcohol, *o*-Anisidine และ *p*-Anisidine พบว่าอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา V_{max} เท่ากับ 20.243, 0.015, 0.017, 0.151, 0.015 และ 0.022 mM/min ตามลำดับ และมีค่าคงที่ Michaelis-Menten (K_m) เท่ากับ 0.806, 0.387, 1.125, 1.517, 0.384 และ 0.601 mM ตามลำดับ และพบว่า 2,6-DMP มีค่า V_{max} และ $K_{catalytic}$

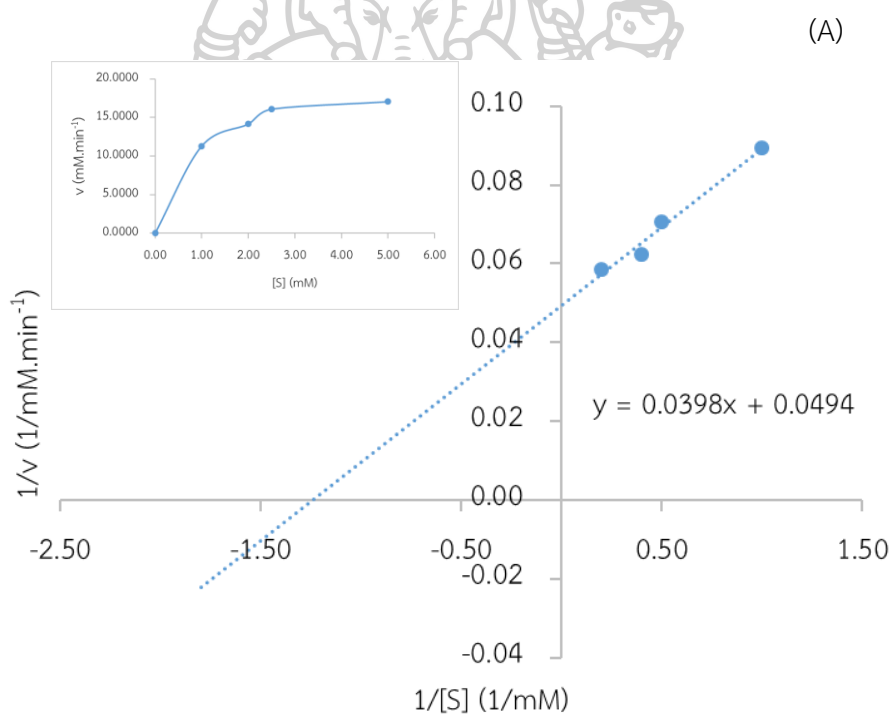
ที่สูง และมีค่า K_m ที่ต่ำแสดงให้เห็นว่า 2,6-DMP เป็นสับสเตรทที่เหมาะสมสำหรับแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 ดังที่แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความจำเพาะของสับสเตรทจาก *Bacillus* sp. FN1 ที่อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสม

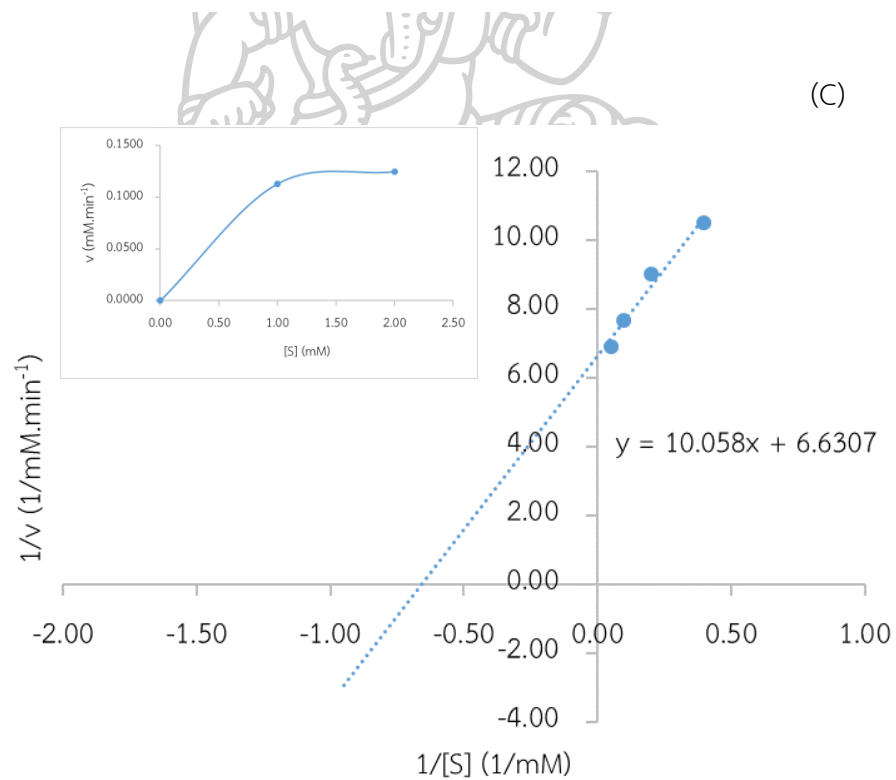
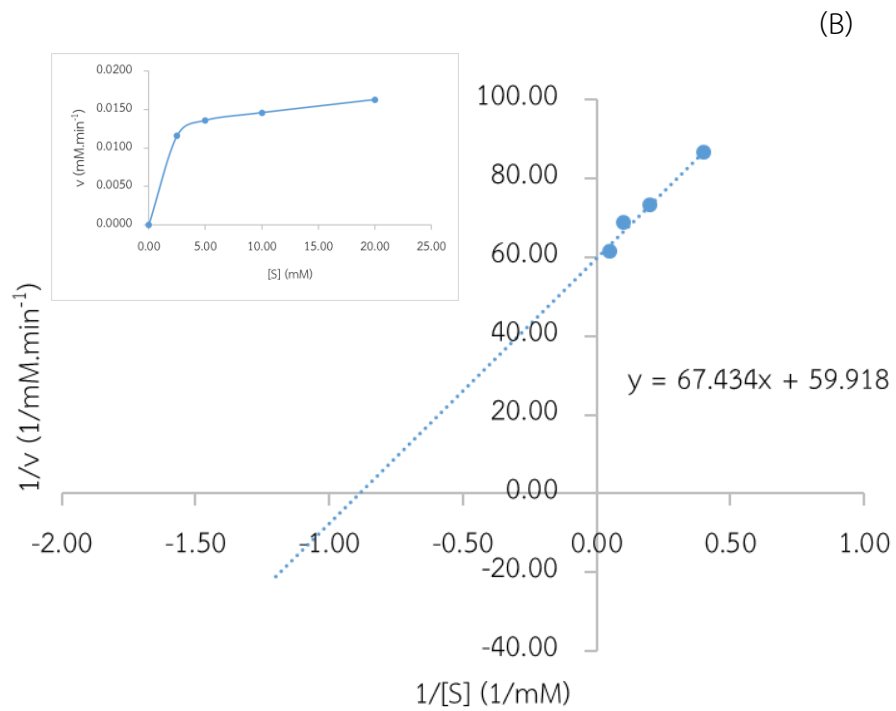
Substrate	λ_{max} (nm)	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	Laccase activity (U/L)	Relative Activity (%)	References
2,6-DMP	468	14,800	287.61±0.007	100.00±0.002	Wariishi <i>et al.</i> (1992)
ABTS	420	36,000	0.20±0.003	0.07±0.003	Siroosi <i>et al.</i> (2016)
Syringaldazine	468	64,000	0.09±0.003	0.03±0.002	Siroosi <i>et al.</i> (2016)
Guaiacol	436	12,000	0.40±0.003	0.14±0.009	Yasar <i>et al.</i> (2019)
<i>o</i> -Anisidine	542	11,300	0.29±0.002	0.10±0.010	Li <i>et al.</i> (2008)
<i>p</i> -Anisidine	460	1,173	6.87±0.003	2.39±0.154	Muñoz <i>et al.</i> (1997)
Veratryl Alcohol	310	9,300	5.74±0.009	2.00±0.051	Tien and Kirk (1988)
Tyrosine	278	12,000	0	0	Sondhi <i>et al.</i> (2014)

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. FN1

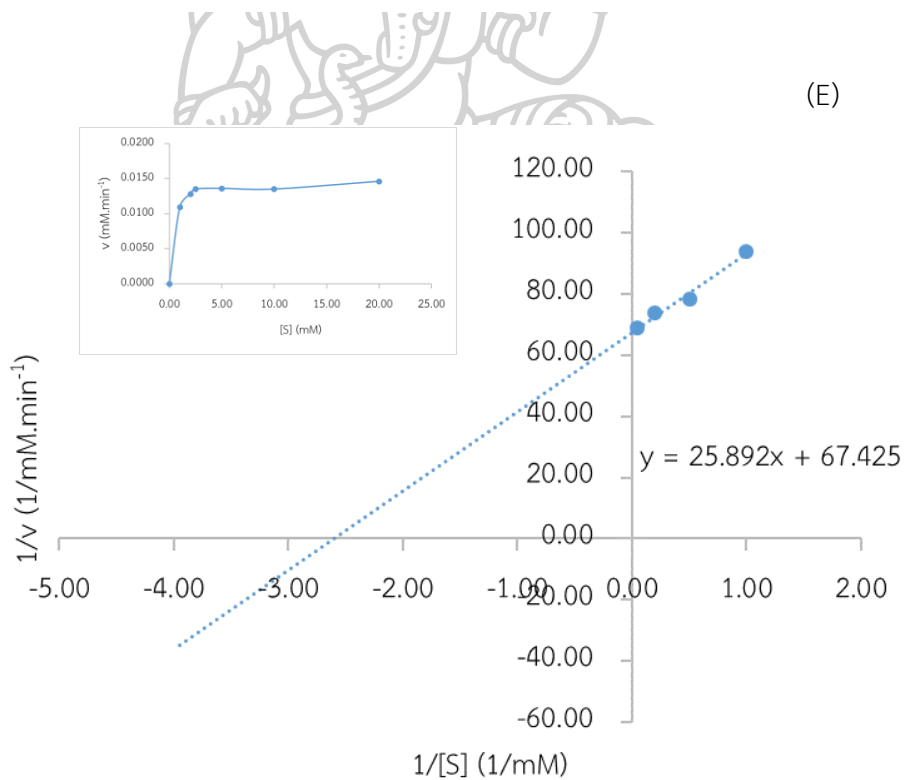
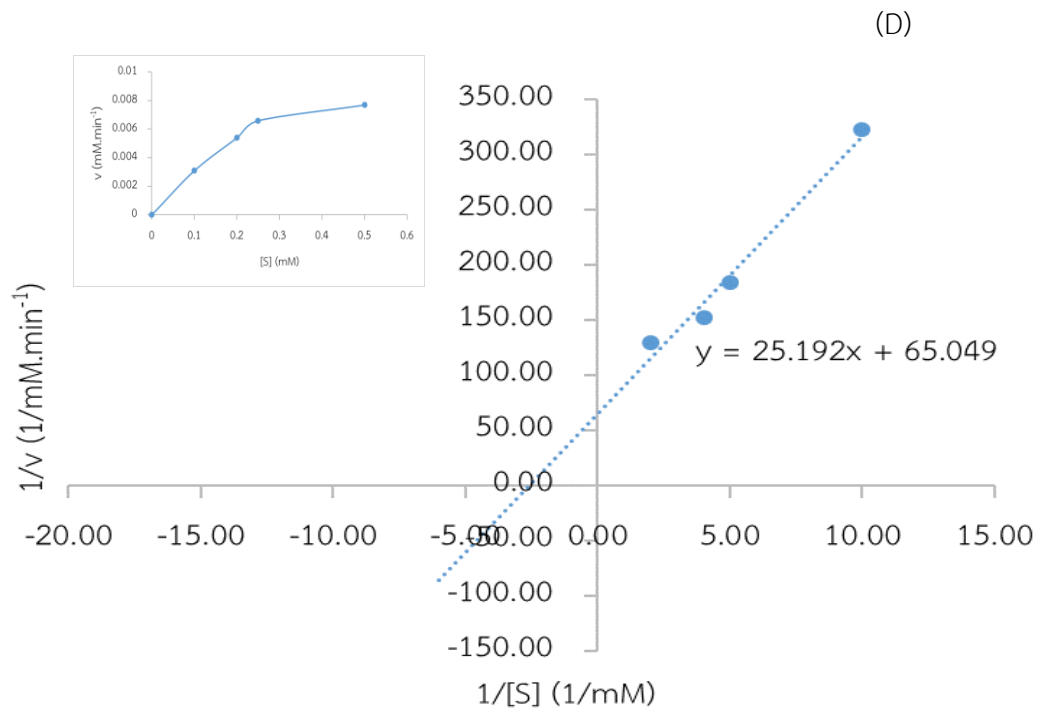
Substrates	K_m (mM)	V_{max} (mM min ⁻¹)	K_{cat} (sec ⁻¹)	K_{cat}/K_m (sec ⁻¹ mM ⁻¹)
DMP	0.806	20.243	2,985.693	3,704.334
Guaiacol	1.125	0.017	2.507	2.229
Veratryl Alcohol	1.517	0.151	22.271	14.681
ABTS	0.387	0.15	22.124	57.168
<i>o</i> -Anisidine	0.384	0.15	22.124	57.614
<i>p</i> -Anisidine	0.601	0.022	3.245	5.399



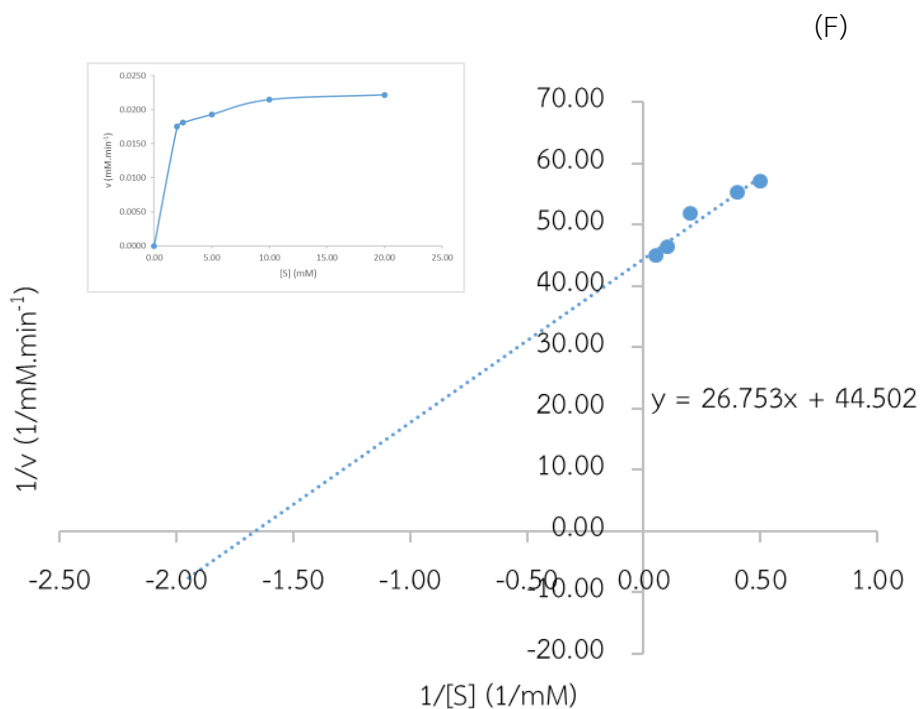
ภาพที่ 18 จลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. FN1 โดยสับสเตรท (A) 2,6-DMP, (B) guaiacol, (C) Veratryl alcohol, (D) ABTS, (E) *o*-Anisidine และ (F) *p*-Anisidine



ภาพที่ 18 (ต่อ) จลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธีจาก *Bacillus* sp. FN1 โดยสับสเตรท (A) 2,6-DMP, (B) guaiacol, (C) Veratryl alcohol, (D) ABTS, (E) *o*-Anisidine และ (F) *p*-Anisidine



ภาพที่ 18 (ต่อ) จลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. FN1 โดยสับสเตรท (A) 2,6-DMP, (B) guaiacol, (C) Veratryl alcohol, (D) ABTS, (E) *o*-Anisidine และ (F) *p*-Anisidine



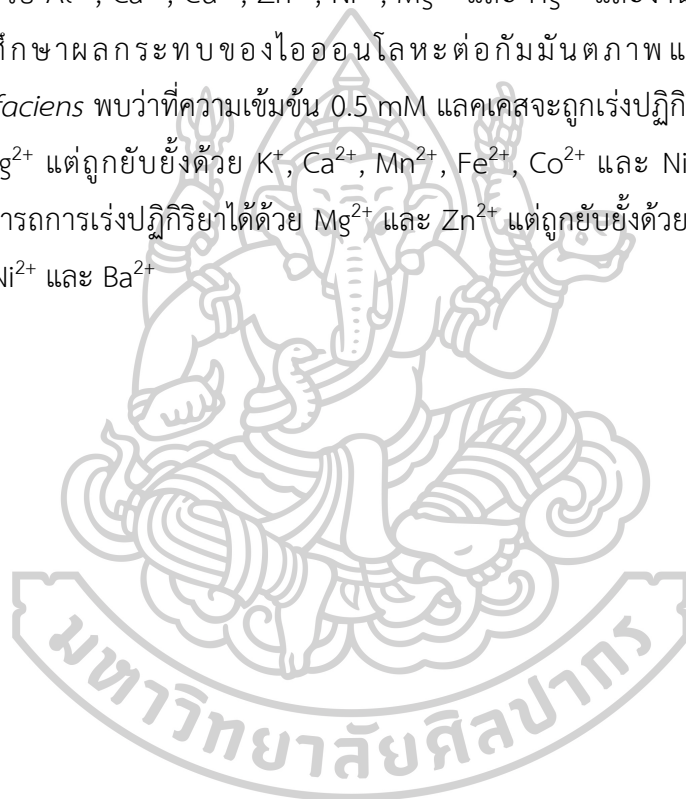
ภาพที่ 18 (ต่อ) จลนศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. FN1 โดยสับสเตรท (A) 2,6-DMP, (B) guaiacol, (C) Veratryl alcohol, (D) ABTS, (E) *o*-Anisidine และ (F) *p*-Anisidine

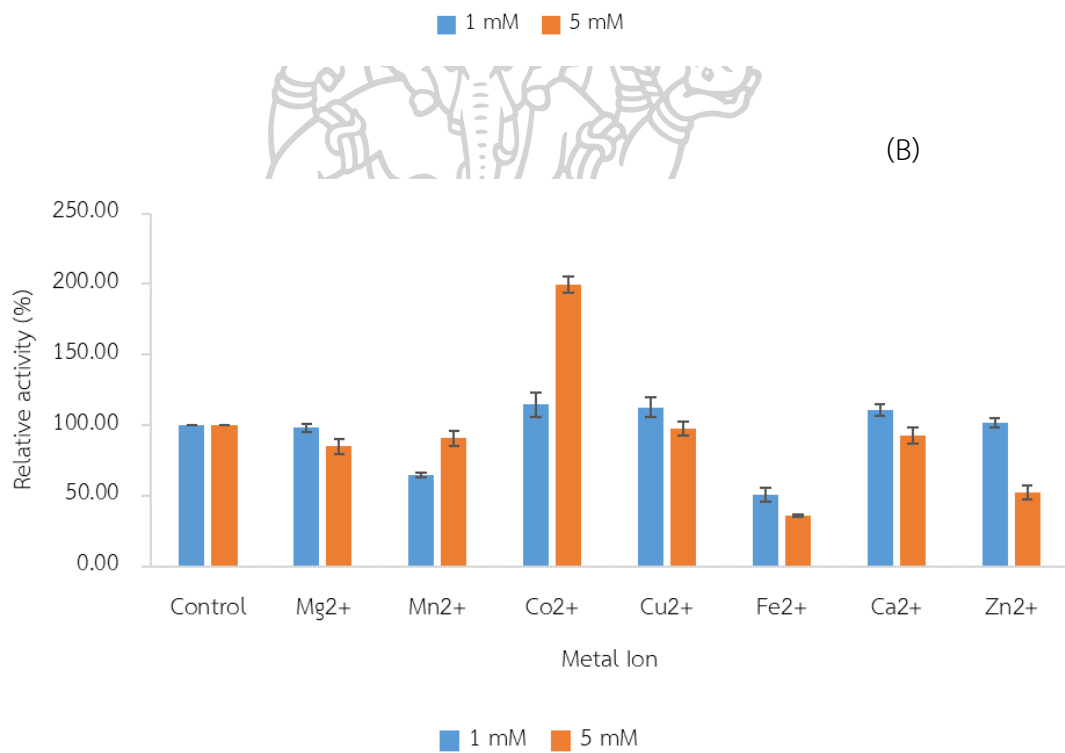
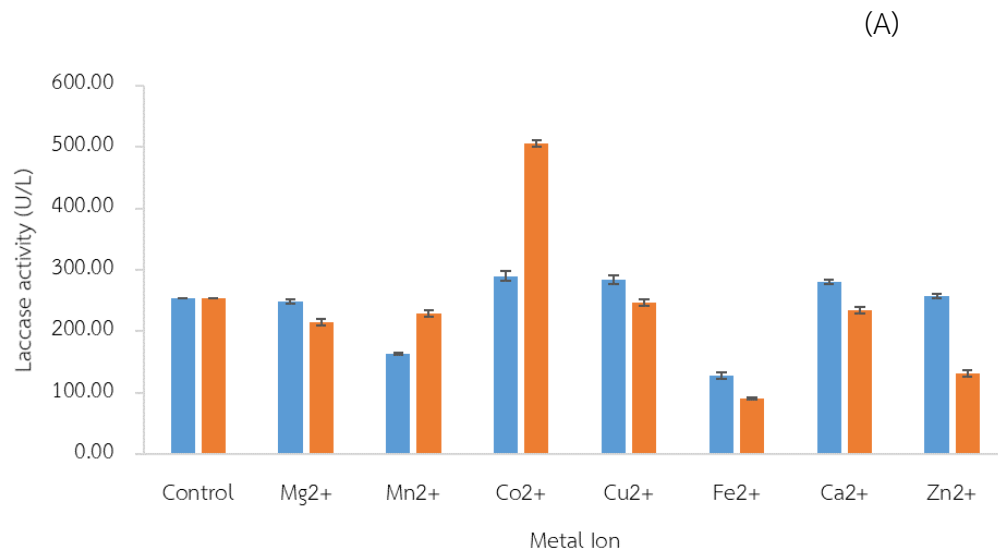
4.7.4 การศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อเอนไซม์

การศึกษาผลของไอออนโลหะที่มีต่อกัมมันตภาพของแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 ที่ผ่านคอลัมน์ Q-Sepharose โดยนำ fraction ที่ 8-30 มา pool รวมกันเพื่อศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะที่เติมลงไปทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} และ Zn^{2+} โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM และ 5.0 mM บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดกัมมันตภาพแลคเคสโดยเทียบกับหลอดควบคุมที่เติมบัฟเฟอร์แทนไอออนโลหะ ในภาพที่ 19

จากผลการทดลองพบว่าไอออนโลหะมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคส โดยที่ความเข้มข้น 1.0 mM ถูกกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาได้ด้วย Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} และ Zn^{2+} ทำให้มีค่า relative activity (%) สูงกว่า 100% ซึ่งมีค่าเท่ากับ 114.61, 112.38, 110.72 และ 101.70% ตามลำดับ แต่ถูกยับยั้งด้วย Mg^{2+} , Mn^{2+} และ Fe^{2+} เมื่อเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะ ส่วนที่ความเข้มข้น 5.0 mM กระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาได้ด้วย Co^{2+} มีค่าเท่ากับ 199.29% เมื่อเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะ และถูกยับยั้งด้วย Fe^{2+} ซึ่งมีผลทำให้กัมมันตภาพแลคเคสลดลงอย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Abdelgalil *et al.* (2020) ที่ได้ศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะ

ต่อกัมมันตภาพแลคเคสของ *Alcaligenes faecalis* NY50 พบว่าที่ความเข้มข้น 1.0 mM และ 10.0 mM แลคเคสจะถูกกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาได้ด้วย Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{2+} และ Zn^{2+} แต่ถูกยับยั้งด้วย Fe^{2+} และ Hg^{2+} โดยมีค่า relative activity (%) เท่ากับ 15.6 และ 10.9% ตามลำดับ และงานวิจัยของ Neelkant *et al.* (2020) ได้ศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคสของ *Sphingobacterium* ksn-11 พบว่าที่ความเข้มข้น 1.0 mM แลคเคสจะถูกกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาได้ด้วย Al^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} และ Mg^{2+} แต่ถูกยับยั้งด้วย Zn^{2+} และ Hg^{2+} และที่ความเข้มข้น 3.0 mM สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ด้วย Co^{2+} และ Fe^{2+} แต่ถูกยับยั้งด้วย Al^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} และ Hg^{2+} และงานวิจัยของ Wang *et al.* (2019) ได้ศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อกัมมันตภาพแลคเคสของ *Bacillus amyloliquefaciens* พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 mM แลคเคสจะถูกเร่งปฏิกิริยาได้ด้วย Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} และ Mg^{2+} แต่ถูกยับยั้งด้วย K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} และ Ni^{2+} และที่ความเข้มข้น 5.0 mM สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ด้วย Mg^{2+} และ Zn^{2+} แต่ถูกยับยั้งด้วย K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} และ Ba^{2+}



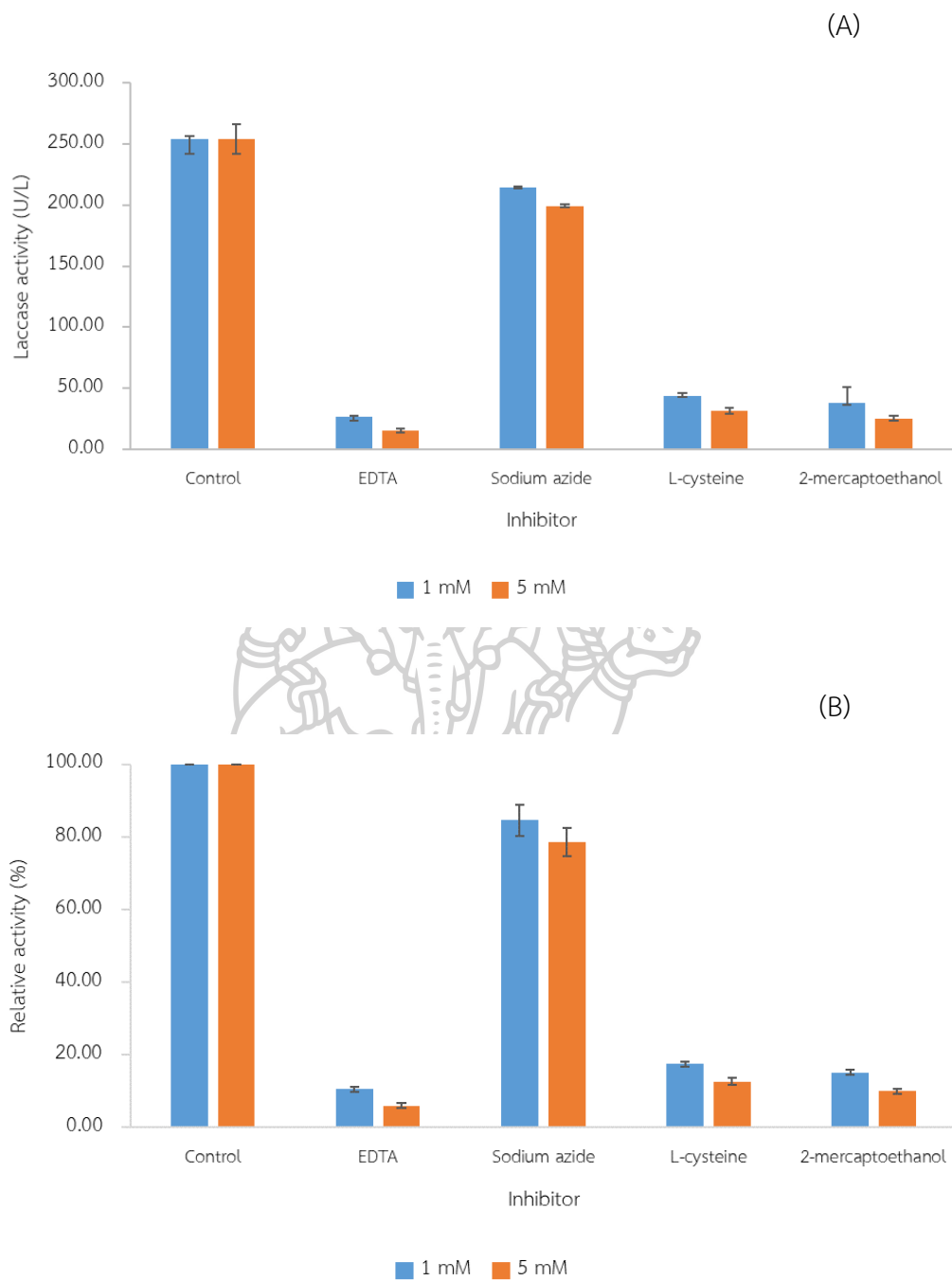


ภาพที่ 19 ผลของไอออนโลหะที่มีผลต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 โดย (A) Laccase activity (U/mL) และ (B) Relative activity (%)

4.7.5 การศึกษาผลกระทบของตัวยับยั้งต่อเอนไซม์

การศึกษาผลของตัวยับยั้งที่มีต่อกัมมันตภาพของแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 ที่ผ่านคอลัมน์ Q-Sepharose โดยนำ fraction ที่ 8-30 มา pool รวมกันเพื่อศึกษาผลกระทบของตัวยับยั้งที่เติมลงไปทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ EDTA, NaN_3 , L-Cysteine, และ β -mercaptoethanol โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM และ 5.0 mM บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดกัมมันตภาพแลคเคสโดยเทียบกับหลอดควบคุมที่เติมบัฟเฟอร์แทนตัวยับยั้งในภาพที่ 20

ผลการศึกษาสารยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์ พบว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เมื่อบ่มกับ EDTA, NaN_3 , L-Cysteine, และ β -mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 1.0 mM โดยมีค่า Relative activity (%) เท่ากับ 10.49, 84.56, 17.42 และ 15.14% ตามลำดับ และการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มแลคเคสกับตัวยับยั้งที่ความเข้มข้น 5.0 mM โดยมีค่า Relative activity (%) เท่ากับ 6.00, 78.65, 12.59 และ 9.96% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ H. Wang *et al.* (2019) ที่ทำการศึกษาผลกระทบของตัวยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสของ *Bacillus amyloliquefaciens* พบว่าเมื่อเติมตัวยับยั้ง DTT, EDTA, L-Cysteine, SDS และ β -mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 mM ทำให้แลคเคสถูกยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาโดยตัวยับยั้ง DTT (0.1, 0.5 และ 1.0 mM), L-Cysteine (1.0 mM) และ β -mercaptoethanol (0.5 และ 1.0 mM) สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสได้อย่างสมบูรณ์ (Relative activity เท่ากับ 0%) และงานวิจัยของ Zhang *et al.* (2013) ทำการศึกษาผลกระทบของตัวยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสของ *Bacillus valismortis* fmb-103 พบว่าเมื่อเติมตัวยับยั้ง L-Cysteine, dithiothreitol และ NaN_3 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสได้อย่างสมบูรณ์ (Relative activity เท่ากับ 0%) โดย EDTA ที่ความเข้มข้น 0.5, 2.5 และ 5.0 mM สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาได้ 85.4, 47.5 และ 13.2% ตามลำดับ

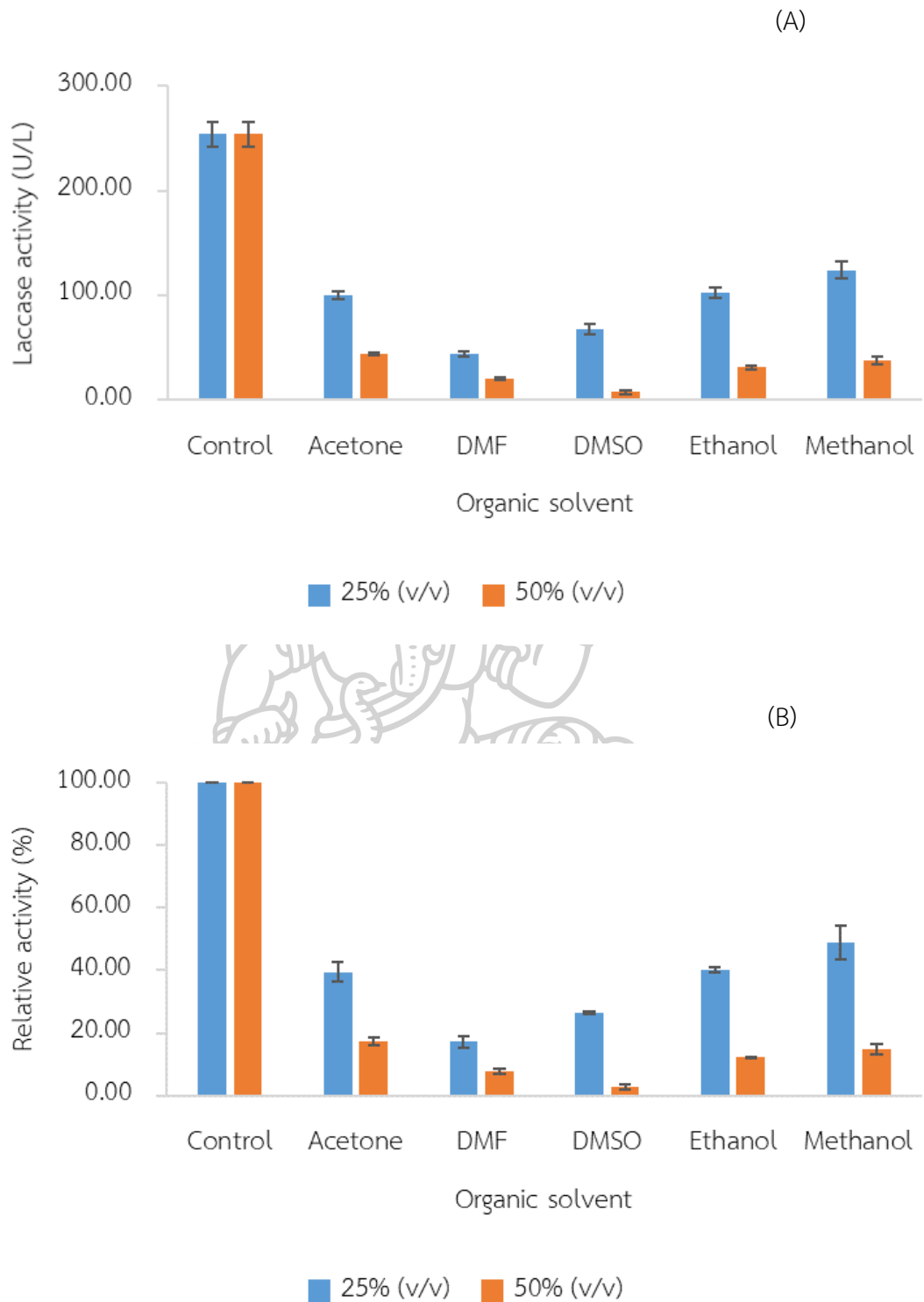


ภาพที่ 20 ผลการศึกษาผลกระทบของตัวยับยั้งต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus sp.* FN1 โดย (A) Laccase activity (U/L) และ (B) Relative activity (%)

4.7.6 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อเอนไซม์

การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อกัมมันตภาพของแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 ที่ผ่านคอลัมน์ Q-Sepharose โดยนำ fraction ที่ 8-30 มา pool รวมกันเพื่อศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เติมลงไปทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ Acetone, DMF, DMSO, Ethanol, และ Methanol โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 และ 50% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดกัมมันตภาพแลคเคสโดยเทียบกับหลอดควบคุมที่เติมบัฟเฟอร์แทนตัวทำละลายอินทรีย์ในภาพที่ 21

ผลการศึกษาตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์ พบว่าแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เมื่อบ่มกับ Acetone, DMF, DMSO, Ethanol, และ Methanol ที่ความเข้มข้น 25% (v/v) โดยมีค่า Relative activity (%) เท่ากับ 39.51, 17.20, 26.42, 40.17 และ 48.84% ตามลำดับ และการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มแลคเคสกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ความเข้มข้น 50% (v/v) โดยมีค่า Relative activity (%) เท่ากับ 17.23, 7.82, 2.83, 12.21 และ 14.86% ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Qiao *et al.* (2017) ศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อแลคเคสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* cjp3 โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ตัว คือ Methanol, Ethanol, Acetone และ DMSO ที่ความเข้มข้น 10-50% (v/v) พบว่าที่ความเข้มข้น 50% (v/v) ของ Methanol และ Acetone สามารถเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสได้ โดยมีค่า Relative activity (%) เท่ากับ 102.75 และ 112.55% ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นเดียวกัน Ethanol และ DMSO ถูกยับยั้งการเร่งปฏิกิริยา โดยมีค่า Relative activity (%) เท่ากับ 88.85 และ 94.28% ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Wang *et al.* (2011) ศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อแลคเคสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* WD23 พบว่า Acetone และ Methanol สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสได้ โดยมีค่า Relative activity (%) เท่ากับ 84.93 และ 2.53% ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Javadzadeh and Asoodeh (2020) พบว่าที่ความเข้มข้น 10 และ 20% (v/v) Acetone และ DMSO สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของแลคเคสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. CF96 ได้ (Relative activity < 50%) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่ *Bacillus* sp. FN1 ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เมื่อบ่มกับ Acetone, DMF, DMSO, Ethanol, และ Methanol ที่ความเข้มข้น 50% (v/v)

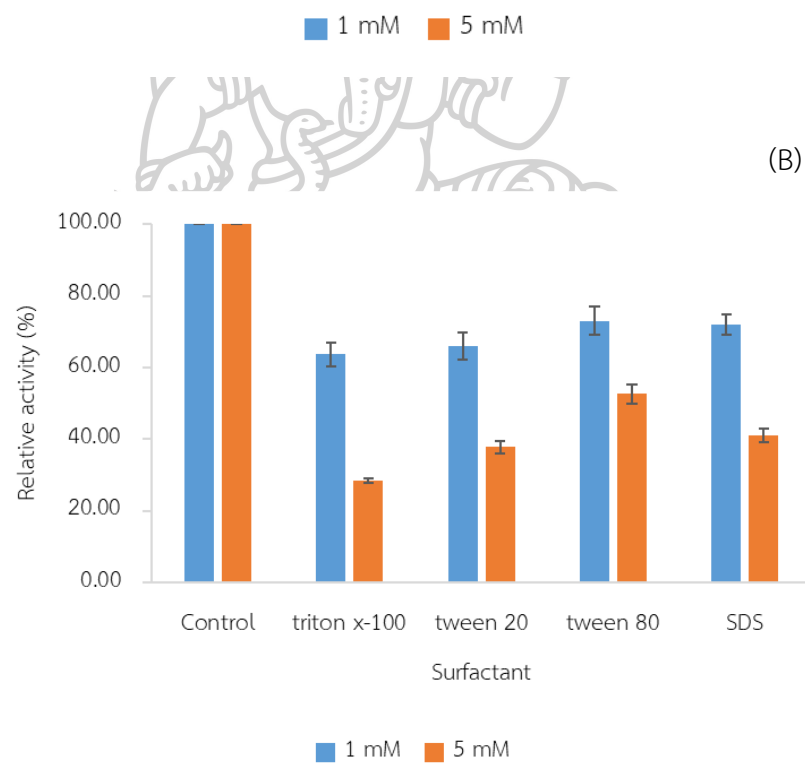
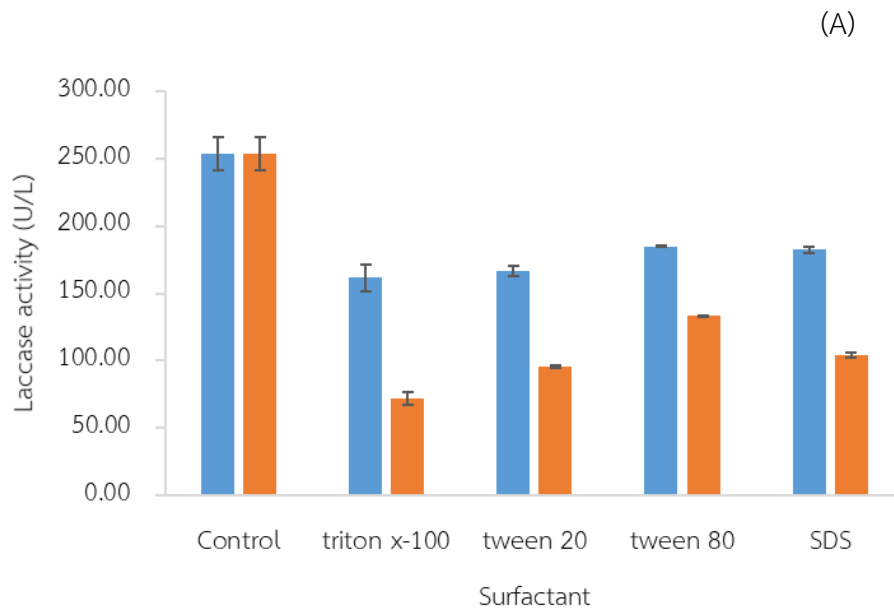


ภาพที่ 21 ผลการศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 โดย (A) Laccase activity (U/L) และ (B) Relative activity (%)

4.7.7 การศึกษาผลกระทบของสารลดแรงตึงผิวต่อเอนไซม์

การศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อกัมมันตภาพของแลคเคสจาก *Bacillus sp.* FN1 ที่ผ่านคอลัมน์ Q-Sepharose โดยนำ fraction ที่ 8-30 มา pool รวมกันเพื่อศึกษาผลกระทบของสารลดแรงตึงผิวที่เติมลงไปทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ Triton X-100, Tween 20, Tween 80 และสารซักล้าง (SDS) โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM และ 5.0 mM บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดกัมมันตภาพเอนไซม์โดยเทียบกับหลอดควบคุมที่เติมบัฟเฟอร์แทนสารลดแรงตึงผิวในภาพที่ 22

ผลการศึกษาสารลดแรงตึงผิวต่อกัมมันตภาพแลคเคสบริสุทธิ์ พบว่าแลคเคสจาก *Bacillus sp.* FN1 ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เมื่อบ่มกับ Triton X-100, Tween 20, Tween 80 และ SDS ที่ความเข้มข้น 1.0 mM โดยมีค่า Relative activity (%) เท่ากับ 60.45, 61.83, 69.71 และ 70.01% ตามลำดับ และการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มแลคเคสกับสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้น 5.0 mM โดยมีค่า Relative activity (%) เท่ากับ 28.23, 36.05, 50.20 และ 40.15% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Qiao *et al.* (2017) ที่ศึกษาผลกระทบของสารลดแรงตึงผิวต่อกัมมันตภาพแลคเคสที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* cjp3 พบว่า เมื่อบ่มแลคเคสกับ SDS ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 mM สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสได้ 85.33 และ 98.68% ตามลำดับ และจากงานวิจัย Abdelgalil *et al.* (2020) พบว่า Triton X-100 ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 10.0 mM สามารถเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสที่ผลิตจาก *Alcaligenes faecalis* NY50 ได้ 140.0 และ 116.2% ตามลำดับ ซึ่งต่างจากงานวิจัยนี้ที่ Triton X-100 ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสได้

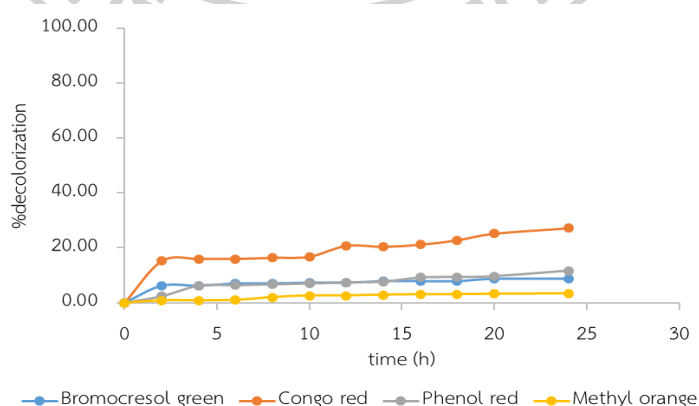


ภาพที่ 22 ผลการศึกษาผลกระทบของสารลดแรงตึงผิวต่อกัมมันตภาพแลคเคสจาก *Bacillus* sp. FN1 โดย (A) Laccase activity (U/L) และ (B) Relative activity (%)

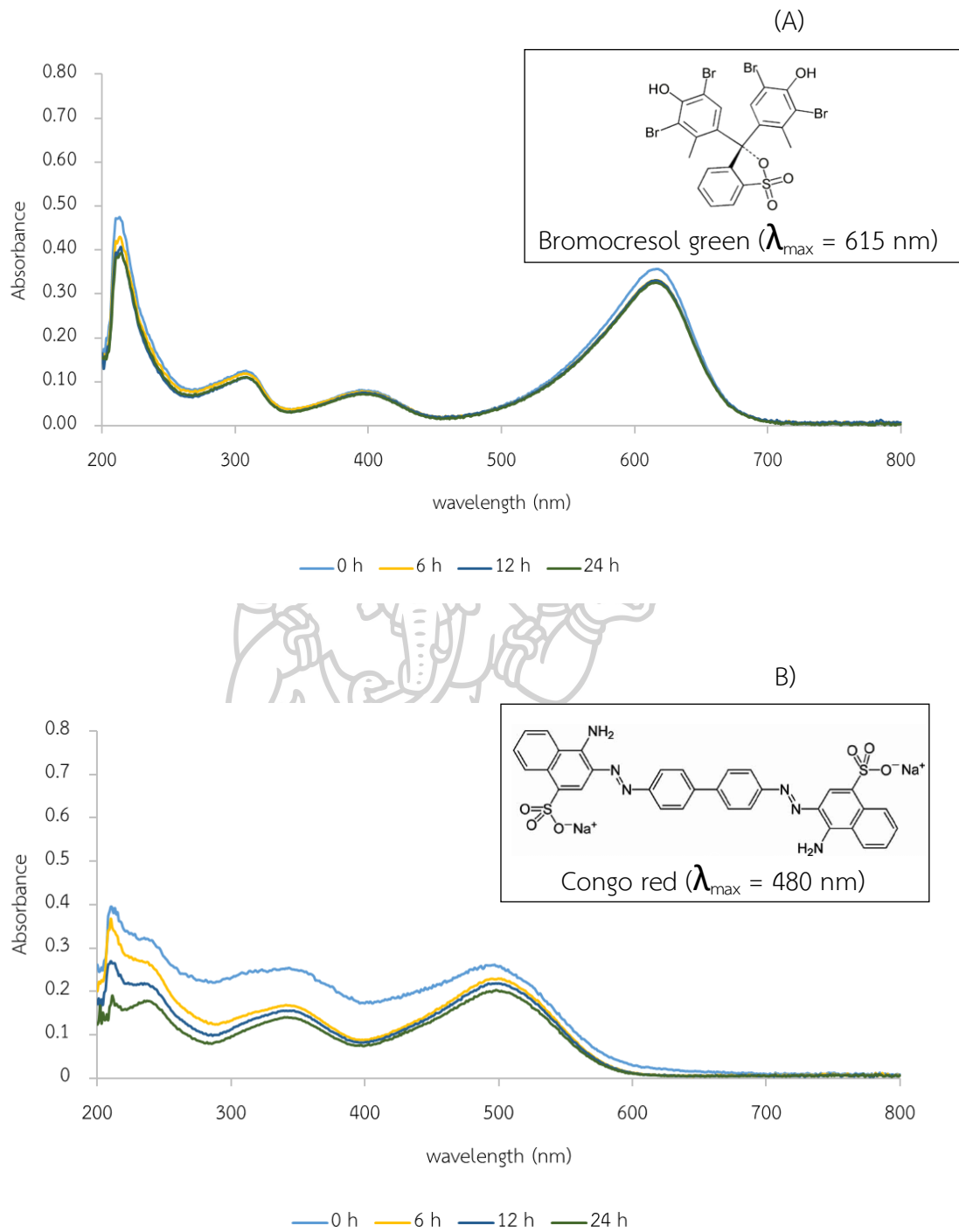
4.7.8 การศึกษาประสิทธิภาพการลดสีของแลคเคสบริสุทธ์

การศึกษาประสิทธิภาพการลดสีของแลคเคสบริสุทธ์จาก *Bacillus* sp. FN1 โดยบ่มแลคเคสบริสุทธ์ที่มีกัมมันตภาพแลคเคสเริ่มต้น 172.60 U/L กับสีสังเคราะห์ ได้แก่ Bromocresol green, Congo red, Phenol red และ Methyl orange ที่ความเข้มข้น 0.025 g/L (25 ppm) ที่ละลายใน 25 mM Tris-HCl pH 9.0 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปสแกนค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบผลประสิทธิภาพการลดสี (%decolorization) แสดงในภาพที่ 23

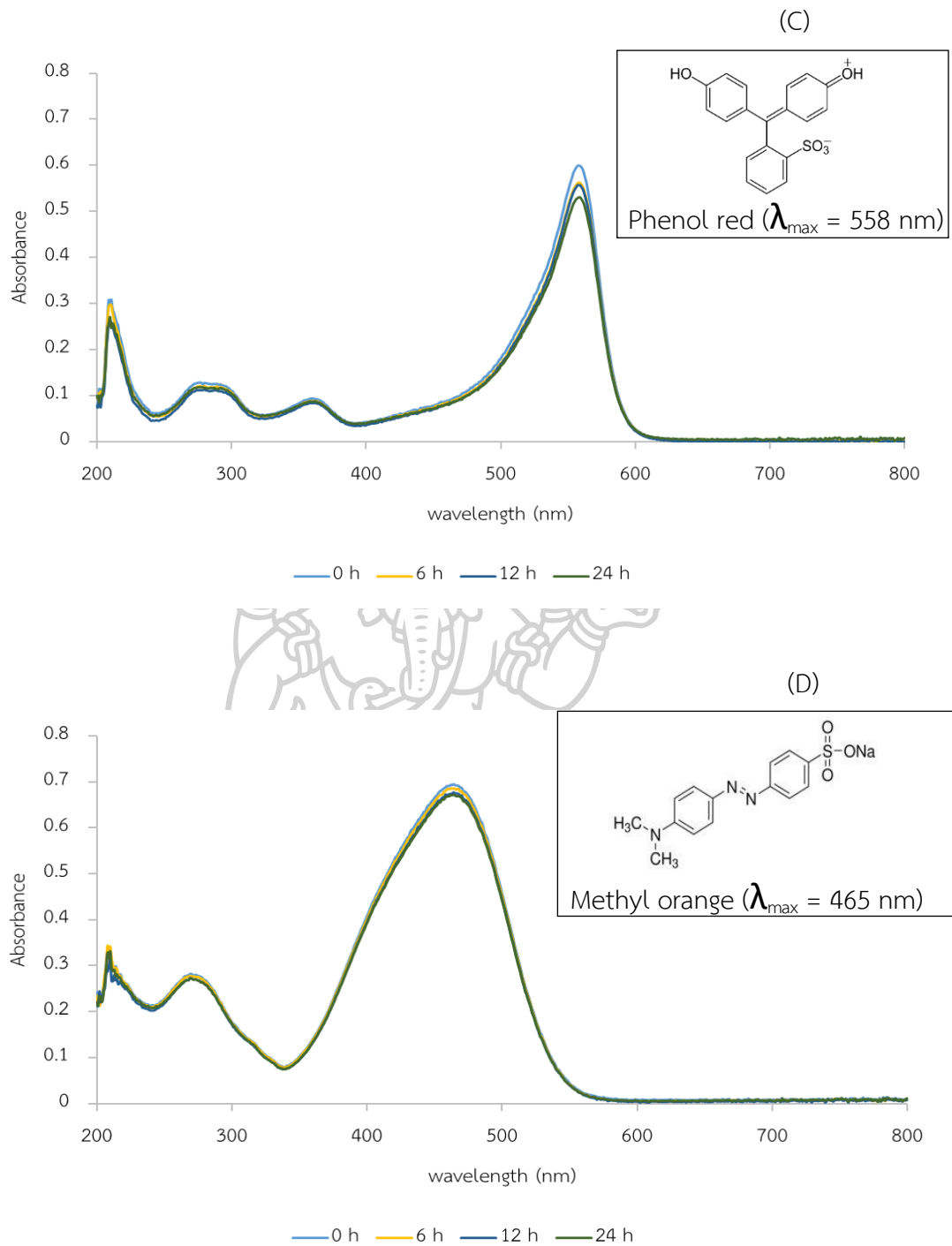
ผลการประเมินประสิทธิภาพการลดสีของแลคเคสบริสุทธ์โดยผลประสิทธิภาพการลดสี แสดงในภาพที่ 23 เมื่อบ่มแลคเคสกับสีสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 9.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแลคเคสสามารถลดสี Bromocresol green, Congo red, Phenol red และ Methyl orange ได้เพียงเล็กน้อยโดยมีประสิทธิภาพการลดสีที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 8.71, 27.20, 11.67 และ 3.32% ตามลำดับ จากงานวิจัยก่อนหน้า มีรายงานการศึกษาประสิทธิภาพการลดสี Congo red และ Methyl orange ด้วยแลคเคสที่ผ่านการแยกบริสุทธ์เป็นจำนวนมาก พบว่า *Trametes polyzona* WRF03, *Bacillus licheniformis* TPNR1, *Bacillus licheniformis* TPNR6 และ *Bacillus marisflavi* strain BB4 สามารถลดสี Congo red ได้ 18.11, 94.60, 93.90 และ 93.00% ที่เวลา 6, 12, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และ *Trametes polyzona* WRF03, *Bacillus licheniformis* TPNR1 และ *Bacillus licheniformis* TPNR6 สามารถลดสี Methyl orange ได้ 47.55, 92.40 และ 62.7% เวลา 6, 12 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ (Ezike *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2011)



ภาพที่ 23 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการลดสีของแลคเคสบริสุทธ์จาก *Bacillus* sp. FN1 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นสีเริ่มต้น 25 ppm



ภาพที่ 24 ผลการสังเกตค่าการดูดกลืนแสงเพื่อศึกษาการลดสีของแลคเคสบริสุทรีจาก *Bacillus sp.* FN1 โดยบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส pH 9.0 เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) Bromocresol green, (B) Congo red, (C) Phenol red และ(D) Methyl orange



ภาพที่ 24 (ต่อ) ผลการสแกนค่าการดูดกลืนแสงเพื่อศึกษาการลดสีของแลคเคสบริสุทธิจาก *Bacillus* sp. FN1 โดยบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส pH 9.0 เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) Bromocresol green, (B) Congo red, (C) Phenol red และ (D) Methyl orange

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยง *Bacillus sp.* FN1 เพื่อผลิตแลคเคส พบว่าค่ากัมมันตภาพแลคเคสในส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยงสูงสุดเท่ากับ 6.49 U/L เมื่อใช้ 2,6-DMP เป็นสับสเตรท และมีสภาวะที่เหมาะสมคือ pH 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาการแยกบริสุทธิ์แลคเคสที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* FN1 ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200 และ Q-Sepharose พบว่ามีค่ากัมมันตภาพจำเพาะ 1.18 U/mg มีความบริสุทธิ์ 4.67 เท่า และมีมวลโมเลกุลขนาด 32.99 kDa

การศึกษาคุณสมบัติของแลคเคสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ pH 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีกัมมันตภาพแลคเคสสูงที่สุดเมื่อใช้ 2,6-DMP เป็นสับสเตรท และจากการศึกษาจลนศาสตร์ของแลคเคสจะได้ค่า K_{cat} เท่ากับ 2,985.693, 2.507, 22.271, 22.124, 22.124 และ 3.245 sec^{-1} เมื่อใช้ 2,6-DMP, Guaiacol, Veratryl alcohol, ABTS, *o*-Anisidine และ *p*-Anisidine เป็นสับสเตรท ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะ พบว่าที่ความเข้มข้น 1 mM ถูกกระตุ้นได้ด้วย Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} และ Zn^{2+} แต่ที่ความเข้มข้น 5 mM ถูกกระตุ้นโดย Co^{2+} เพียงตัวเดียว นอกจากนี้ เมื่อศึกษาผลกระทบของตัวยับยั้ง ตัวทำลายอินทรีย์ และสารลดแรงตึงผิว พบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งปฏิกิริยาทั้งสองความเข้มข้น และยังถูกยับยั้งมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น จากการศึกษาประสิทธิภาพการลดสี แสดงให้เห็นว่าแลคเคสบริสุทธิ์จาก *Bacillus sp.* FN1 สามารถลดสีได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยสามารถลดสี Congo red ได้สูงสุด 27.20% รองลงมาคือ Methyl orange, Bromocresol green และ Phenol red ตามลำดับ

รายการอ้างอิง

- Abdelgalil, S. A., Attia, A. R., Reyed, R. M. and Soliman, N. A. (2020). Partial purification and biochemical characterization of a new highly acidic NYSO laccase from *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 79. doi:10.1186/s43141-020-00088-w
- Adelakun, O., Kudanga, T., Green, I., Le Roes-Hill, M., Burton, S. and Adelakun, Y. (2012). Process Biochemistry Enzymatic modification of 2,6-dimethoxyphenol for the synthesis of dimers with high antioxidant capacity.
- Ademakinwa, A. N. and Agboola, F. K. (2016). Biochemical characterization and kinetic studies on a purified yellow laccase from newly isolated *Aureobasidium pullulans* NAC8 obtained from soil containing decayed plant matter. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1) , 143-151. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.05.004>
- Afreen, S., Anwer, R., Singh, R. K. and Fatma, T. (2018). Extracellular laccase production and its optimization from *Arthrospira maxima* catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(7) , 1446-1453. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.015>
- Akansha, K., Chakraborty, D. and Sachan, S. G. (2019). Decolorization and degradation of methyl orange by *Bacillus stratosphericus* SCA1007. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101044. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101044>
- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.007>
- 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. doi:[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cambria, M., Cambria, A., Ragusa, S. and Rizzarelli, E. (2000). Production, purification,

- and properties of an extracellular laccase from *Rigidoporus lignosus*. *Protein Expression and Purification*, 18(2) , 141-147. doi:<https://doi.org/10.1006/prep.1999.1126>
- Daâssi, D., Zouari-Mechichi, H., Prieto, A., Martinez, M. J. and Mechichi, T. (2013). Purification and biochemical characterization of a new alkali-stable laccase from *Trametes* sp. isolated in Tunisia: Role of the enzyme in olive mill waste water treatment. *World journal of microbiology & biotechnology*, 29, 2145-2155. doi:10.1007/s11274-013-1380-7
- Daassi, D., Zouari-Mechichi, H., Prieto, A., Martinez, M. J., Nasri, M. and Mechichi, T. (2013). Purification and biochemical characterization of a new alkali-stable laccase from *Trametes* sp. isolated in Tunisia: role of the enzyme in olive mill waste water treatment. *World J Microbiol Biotechnol*, 29(11) , 2145-2155. doi:10.1007/s11274-013-1380-7
- Ducros, V., Brzozowski, A. M., Wilson, K. S., Ostergaard, P., Schneider, P., Svendsen, A. and Davies, G. J. (2001). Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different 'type 2 Cu-depleted' isoforms. *Acta Crystallographica Section D*, 57(2), 333-336. doi:doi:10.1107/S09074444900013779
- Ezike, T. C., Ezugwu, A. L., Udeh, J. O., Eze, S. O. O. and Chilaka, F. C. (2020). Purification and characterisation of new laccase from *Trametes polyzona* WRF03. *Biotechnology Reports*, 28, e00566. doi:<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00566>
- Hakulinen, N., Kiiskinen, L.-L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A. and Rouvinen, J. (2002). Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural Biology*, 9, 601. doi:10.1038/nsb823
- Hakulinen, N. and Rouvinen, J. (2015). *Three-dimensional structures of laccases* (Vol. 72).
- Javadzadeh, S.-G. and Asoodeh, A. (2020). A novel textile dye degrading extracellular laccase from symbiotic bacterium of *Bacillus* sp. CF96 isolated from gut termite (*Anacanthotermes*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 355-363. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.205>

- Johannes, C. and Majcherczyk, A. (2000). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 78(2), 193-199. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00208-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00208-X)
- Khan, R., Pathak, B. and Fulekar, M. H. (2012). Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: A review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12. doi:10.1007/s11157-012-9287-6
- Kumar, R., Kaur, J., Jain, S. and Kumar, A. (2016). Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 125-131. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.05.006>
- 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.
- Lončar, N., Gligorijević, N., Božić, N. and Vujčić, Z. (2014). Congo red degrading laccases from *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from salt spring in Serbia. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 91, 18-23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.008>
- Mabrouk, A. M., Kheiralla, Z. H., Hamed, E. R., Youssry, A. A. and Abd El Aty, A. A. (2012). Characterization and purification of the crude *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 11(2), 93.
- Madhavi, V. and Lele, S. S. (2009). Laccase: properties and applications. *BioResources*; Vol 4, No 4 (2009), 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00413>
- 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.
- 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
- Neelkant, K. S., Shankar, K., Jayalakshmi, S. K. and Sreeramulu, K. (2020). Purification, biochemical characterization, and facile immobilization of laccase from *Sphingobacterium ksn-11* and its application in transformation of diclofenac. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 192(3), 831-844.
- Nelson, A. A. and Anne, F. T. (2021). A novel acid-stable intracellular laccase from *Aureobasidium pullulans*: Purification, characterization and application in the removal of Bisphenol A from solutions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101966. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101966>
- Othman, A. M., Elsayed, M. A., Elshafei, A. M. and Hassan, M. M. (2018). Purification and biochemical characterization of two isolated laccase isoforms from *Agaricus bisporus* CU13 and their potency in dye decolorization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1142-1148. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.043>
- Qiao, W., Chu, J., Ding, S., Song, X. and Yu, L. (2017). Characterization of a thermo-alkali-stable laccase from *Bacillus subtilis* cjp3 and its application in dyes decolorization. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 52(8), 710-717. doi:10.1080/10934529.2017.1301747
- Saratale, R., Saratale, G., Chang, J.-S. and Govindwar, S. (2011). Bacterial Decolorization and Degradation of Azo Dyes: A Review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42, 138-157. doi:10.1016/j.jtice.2010.06.006
- Sari, A. A., Kurniawan, H. H., Nurdin, M. and Abimanyu, H. (2015). Decolorization of Black Liquor Wastewater Generated from Bioethanol Process by Using Oil Palm Empty Fruit Bunches. *Energy Procedia*, 68, 254-262. doi:<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.03.254>
- Sharma, A., Muthupriya, M., Raj, R., Shameen, Z., Sm, V., Niyonzima, F. N. and More, S. S. (2021). Properties of Laccase of *Bacillus marisflavi* Strain BB4 and its Synthetic Dyes Decolorization Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 91(2), 477-485. doi:10.1007/s40011-021-

01235-0

- Sharma, V., Ayothiraman, S. and Dhakshinamoorthy, V. (2019). Production of highly thermo-tolerant laccase from novel thermophilic bacterium *Bacillus* sp. PC-3 and its application in functionalization of chitosan film. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(6) , 672-678. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.11.008>
- Sharma, V., Upadhyay, L. and Vasanth, D. (2020). Extracellular Thermostable Laccase-Like Enzymes from *Bacillus licheniformis* Strains: Production, Purification and Characterization. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56(4), 420-432.
- Si, J., Wu, Y., Ma, H.-F., Cao, Y.-J., Sun, Y.-F. and Cui, B.-K. (2021). Selection of a pH- and temperature-stable laccase from *Ganoderma australe* and its application for bioremediation of textile dyes. *Journal of Environmental Management*, 299, 113619. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113619>
- 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.
- Solano, F., Lucas-Elio, P., López-Serrano, D., Fernández, E. and Sanchez-Amat, A. (2001). Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 204(1) , 175-181. doi:10.1111/ j.1574-6968.2001.tb10882.x
- Sondhi, S., Sharma, P., George, N., Chauhan, P. S., Puri, N. and Gupta, N. (2015). An extracellular thermo-alkali-stable laccase from *Bacillus tequilensis* SN4, with a potential to biobleach softwood pulp. *3 Biotech*, 5(2) , 175-185. doi:10.1007/s13205-014-0207-z
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0096951
- Sun, S., Zhang, Y., Que, Y., Liu, B., Hu, K. and Xu, L. (2013). Purification and characterization of fungal laccase from *Mycena purpureofusca*. *Chiang Mai J Sci*, 40, 151-160.

- Telke, A. A., Ghodake, G. S., Kalyani, D. C., Dhanve, R. S. and Govindwar, S. P. (2011). Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. ADR. *Bioresource Technology*, 102(2) , 1752-1756. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.086>
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140(1), 19-26. doi:doi:10.1099/13500872-140-1-19
- Tien, M. and Kirk, T. K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In *Methods in Enzymology* (Vol. 161, pp. 238-249): Academic Press.
- Wang, C., Zhao, M., Lu, L., Wei, X. and Li, T. (2011). Characterization of spore laccase from *Bacillus subtilis* WD23 and its use in dye decolorization. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2186-2192.
- Wang, H., Huang, L., Li, Y., Ma, J., Wang, S., Zhang, Y., Ge, X., Wang, N., Lu, F. and Liu, Y. (2019). Characterization and application of a novel laccase derived from *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.117>
- Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1992). Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *J Biol Chem*, 267(33), 23688-23695.
- Yan, J., Chen, Y., Niu, J., Chen, D. and Chagan, I. (2015). Laccase produced by a thermotolerant strain of *Trametes trogii* LK13. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 59-65. doi:10.1590/S1517-838246120130895
- Yasar, G., Guven, U. G., Guduk, E. and Aktas, F. (2019). Partial purification and characterization of the novel halotolerant and alkalophilic laccase produced by a new isolate of *Bacillus subtilis* LP2. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37(4), 268-277.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23) , 5468-5473. doi:10.1021/jf4010498
- Zhang, H., Zhang, J., Zhang, X. and Geng, A. (2018). Purification and characterization of a

novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Cerrena unicolor* BBP6 and its application in dye decolorization and denim bleaching. *Process Biochemistry*, 66, 222-229. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.12.011>

จิระนันท์ สินทร. (2561). การกำจัดน้ำเสียโรงงานสิ่งทอโดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ FN1 และ FN2 ที่แยกได้จากน้ำเสียโรงงานสิ่งทอ. จุลินทรีย์ปริญาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม.,

พิชิตพล เจริญทรัพย์ยานันท์. (2550). เอนไซม์ : เทคโนโลยีชีวภาพ. สาขาวิชาเทคโนโลยีเคมีสิ่งทอ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร, กรุงเทพฯ.

สุกัลยา บริสุทธิ์. (2553). การย่อยสลายสีย้อมเอโซด้วยเอโซรีดักเทส (AzoR1) จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ORB7106. วิทยานิพนธ์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.



ชื่อ-สกุล	สิริรัตน์ สุขพันธ์
วัน เดือน ปี เกิด	4 มกราคม 2539
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลนครปฐม จังหวัดนครปฐม
วุฒิการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสิรินธรราชวิทยาลัย ระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
ที่อยู่ปัจจุบัน	53 ถ.ช้างวัง ต.พระปฐมเจดีย์ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
ผลงานตีพิมพ์	Sirirat Sukphan and Sinthuwat Ritthitham. Decolorization of methyl orange by <i>Bacillus</i> sp. P1 The Pure and Applied Chemistry International Conference 2022, 30 June - 1 July 2022 (Poster presentation)

