บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

กรอบแนวคิดงานวิจัยแสดงในรูปที่ 3.1 หลังจากเชื้อเห็ดถูกเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง วัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงซึ่งมีเอนไซม์เจือปนถูกนำมาแยกและนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยระบบสารละลายน้ำสอง วัฏภาค โดยเริ่มจากการศึกษาเส้นแบ่งวัฏภาคของระบบ และเลือกช่วงที่เหมาะสมมาใช้ศึกษาถึงผลของน้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์ ความเข้มข้นของโพลิเมอร์และเกลือฟอสเฟต ที่มีผลต่อการแยกเอนไซม์ในแต่ละวัฏภาค ค่าความบริสุทธิ์ที่เกิดขึ้นจากการสกัด

3.2 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้

3.2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ เตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค วัดกิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แกลบ รำข้าว

2) สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ประกอบด้วย Polyethylene glycol MW.1000, 4000 และ 6000, Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), Potassium hydroxide (KOH), Hydrochloric acid (HCl)

3) สารเคมีที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ABTS, Sodium acetate, Trichloroacetic acid (TCA)

4) สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA), Coomassie brilliant blue R-250, Ethanol, Phosphoric acid

3.2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้อง

1) เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง

2) เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

3) เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH Meter)

4) เครื่องชั่งหยาบ 2 ตำแหน่ง

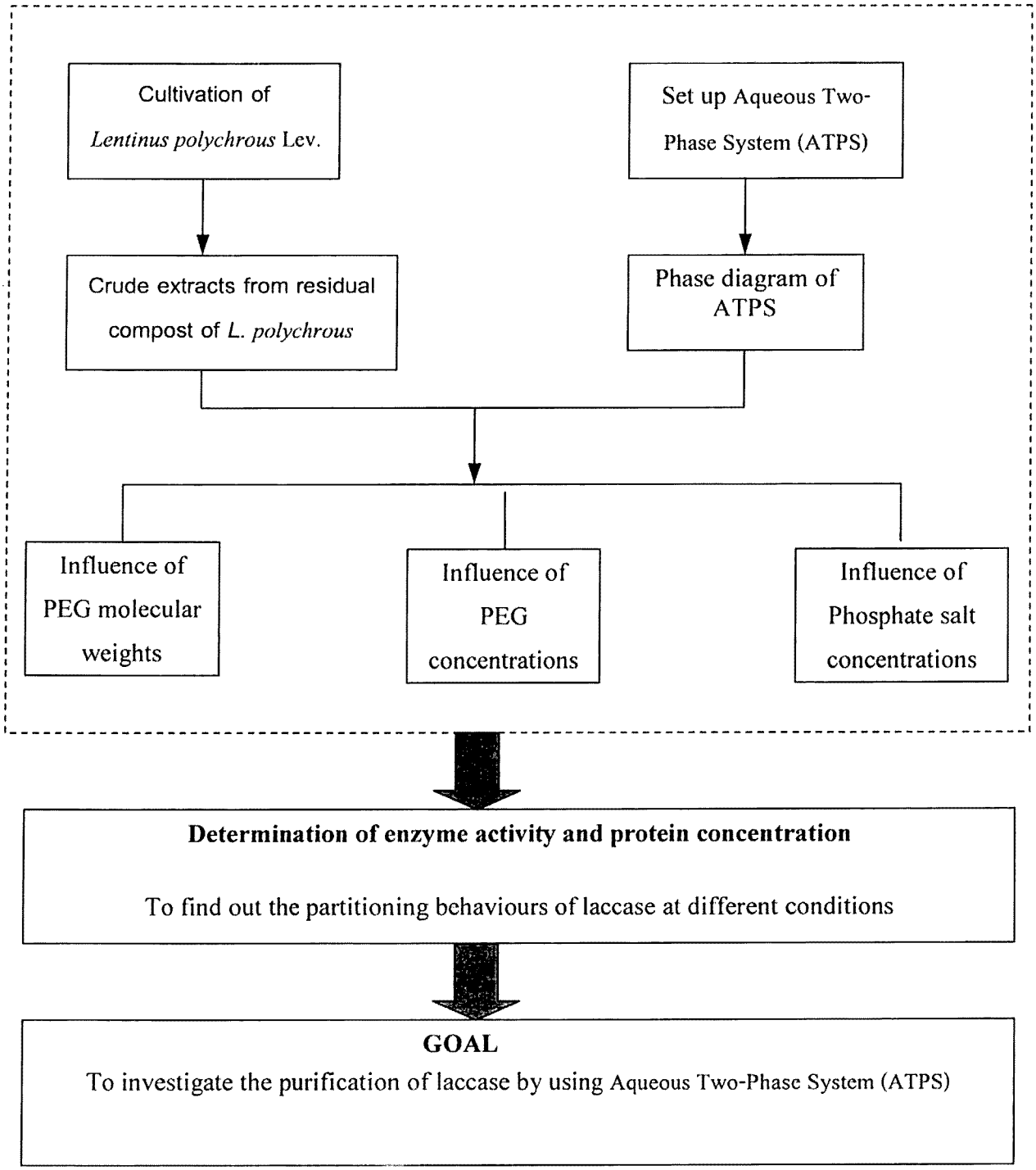
5) เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง

6) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

7) เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)

8) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

9) กระดาษกรอง



รูปที่ 3.1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

3.3 เชื้อเห็ด

เชื้อเห็ดที่ใช้มีชื่อว่า *Lentinus polychrous* Lev. หรือเรียกว่าเห็ดบด หรือเห็ดกระด้าง โดยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อเห็ดจาก ดร.จิรภา เพชร์สม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามโดยทำการเก็บรักษาและเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งด้วยเทคนิคปลอดเชื้อดังต่อไปนี้

3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อเห็ดบด (Preservation of *Lentinus polychrous Lev.*)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ลงบนจานเพาะเชื้อ ตัดเชื้อเห็ดบดให้ได้ขนาดกว้างยาวประมาณ 0.5x0.5 ซม. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเห็ดบดลงบนอาหาร PDA ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นใช้พาราฟินหุ้ม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ทุกๆ 4 สัปดาห์

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดบด (Cultivation of *Lentinus polychrous Lev.*)

เตรียมอาหารแข็งสำหรับการเพาะเลี้ยงโดยผสมแกลบกับรำในอัตราส่วน 1:2 โดยน้ำหนัก บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรปิดฝาด้วยสำลีและใช้กระดาษฟอยปิดทับอีกชั้น หลังผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121^{0}C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายเชื้อเห็ดบดที่เจริญบน PDA ขนาด 0.5x0.5 ซม. ลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 14 วัน จะได้อาหารแข็งที่มีเชื้อเห็ดเจริญดังรูปที่ 3.2

รูปที่ 3.2 เชื้อเห็ดบดเจริญบนอาหารแข็งหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

3.4 การเตรียมเอนไซม์แลคเคสหยาบ (Preparation of crude enzyme)

เอนไซม์แลคเคสหยาบถูกเตรียมตามวิธีของ Sarnthima et al. (Sarnthima et al., 2009) โดยนำเชื้อเห็ดบดที่เจริญบนอาหารแข็ง 14 วัน ดังรูปที่ 3.2 มาเติมน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วน น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 กรัม นำมากวนบนเครื่องกวนแบบแม่เหล็กเป็นเวลา 45 นาที กรองกากอาหารเลี้ยงเชื้อออกโดยใช้ผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ผ่านการกรองมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนตะกอนทิ้งไป และส่วนที่เป็นสารละลายจะเรียกว่าเอนไซม์หยาบ บันทึกปริมาตรที่ได้ นำเอนไซม์หยาบที่สกัดได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.5 การเตรียม Stock solutions และวิเคราะห์ Phase diagram (Preparation of stock solutions and phase diagram determination)

เตรียมสารละลาย PEG (M.W. 1000, 4000 และ 6000) ความเข้มข้น 50% (w/w) โดยละลาย PEG 50 กรัม ในน้ำกลั่น 50 กรัม และเตรียมสารละลายเกลือฟอสเฟต ความเข้มข้น 35% (w/w) โดยชั่ง K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 (อัตราส่วน 2:1) 35 กรัม เติมน้ำ 65 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วย KOH ให้เท่ากับ 7.0

นำสารละลาย PEG ความเข้มข้น 50% (w/w) ที่เตรียมจากข้างต้นมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) โดยมีน้ำหนักรวมเท่ากับ 5 กรัม จากนั้นค่อยๆเติมสารละลายเกลือฟอสเฟต ความเข้มข้น 35% (w/w) พร้อมเขย่า จนกระทั่งถึงจุด cloud point (สารละลายเริ่มขุ่น) จะเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคขึ้นบันทึกน้ำหนักของสารละลายเกลือฟอสเฟตที่ใช้ คำนวณ % ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการเกิดสองวัฏภาค ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลมาหาค่าเฉลี่ยและพล็อตกราฟระหว่าง % โดยน้ำหนักของ PEG และ % โดยน้ำหนักของเกลือฟอสเฟต

3.6 การเตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคเพื่อทำเอนไซม์แลคเคสให้บริสุทธิ์

เลือกความเข้มข้นของสาร PEG และเกลือฟอสเฟตที่ทำให้เกิดสองวัฏภาค เตรียมลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายเอนไซม์หยาบปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในระบบ เติมน้ำกลั่นให้มีน้ำหนักรวม 10 กรัม จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังเกิดการแยกวัฏภาคขึ้น บันทึกค่าปริมาตรของสารละลายในวัฏภาคบนและล่าง นำตัวอย่างในแต่ละวัฏภาคไปวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาสัมประสิทธิ์การแยก และค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เกิดขึ้น

3.7 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและปริมาณโปรตีน

หลังจากสารละลายเอนไซม์หยาบถูกนำมาเติมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเข้าสู่สมดุล ทำการเก็บตัวอย่างสารละลายจากทั้งสองวัฏภาคมาวิเคราะห์ดังนี้

3.7.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส

ทดสอบโดยวัดการออกซิไดซ์ของ ABTS ตามวิธีวิเคราะห์ที่อธิบายโดย Khammuang and Sarnthima (Khammuang and Sarnthima, 2007) โดยเติมเอนไซม์ตัวอย่าง (50μ L) ลงใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ (940μ L) pH 4.5 และสารละลาย 10 mM ABTS (10μ L) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 32 ^{0}C เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 80% w/v TCA (50μ L) นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm กำหนดให้หนึ่งหน่วยเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ออกซิไดซ์ ABTS ได้ 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (Molar extinction of ABTS at 420 nm = 3.6×10^{4} $M^{-1}cm^{-1}$)

3.7.2 การวัดปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนถูกวิเคราะห์ตามวิธีของ Bradford (Bradford, 1976) เริ่มจากการเตรียม Bradford reagents โดยละลาย 50 มิลลิกรัม Coomassie brilliant blue G250 ใน 25 มิลลิลิตร 95% ethanol เติม 85% (w/v) phosphoric acid ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรรวม 500 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ก่อนนำไปใช้นำสารละลายดังกล่าวมากรองผ่านการกรอง Whatman No.1 เก็บสารละลายในขวดสีชา อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนใช้ทุกครั้งต้องนำมากรองสารที่ตกตะกอนออกก่อน

นำสารตัวอย่างมา 40 ไมโครลิตร เติม Bradford reagents 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm และเตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยเตรียมในช่วงความเข้มข้น 0-1000 μg/ml

3.8 ศึกษาลักษณะการแยกของเอนไซม์แลคเคสในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ภายใต้สภาวะต่างๆ

ปัจจัยในการศึกษาครั้งนี้เพื่อดูการแยกชั้น ได้แก่ขนาดโมเลกุลและความเข้มข้นของPEG ความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟต โดยวัดจากกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดที่ปรากฏอยู่ในแต่ละวัฏภาค เทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมด เพื่อใช้ในการคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์และค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นเทียบกับเอนไซม์หยาบ

การคำนวณค่าที่ได้จากการทดลองซึ่งคำนวณหาค่า Enzyme Activity, Specific activity Partition coefficient, Volume ratio, Purification factor (PF) และ Percentage activity yield ซึ่งอธิบายดังต่อไปนี้

ก. Enzyme Activity (unit/ml)

$$\text{Enzyme Activity} = \frac{(A_{420})(0.001 \times 10^{6})(D)}{(\varepsilon)(V)(t)}$$

เมื่อ A_{420} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm.

D = Dilution factor

ε = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm. เท่ากับ 3.6×10^4

V = ปริมาตรของ enzyme ที่ใช้ทำปฏิกิริยา (ml)

t = เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา (min.)

ข. Specific activity

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{Enzyme activity}}{\text{Protein concentration}}$$

เมื่อ Enzyme Activity มีหน่วยเป็น unit/ml

Protein concentration มีหน่วยเป็น mg/ml

Specific activity มีหน่วยเป็น unit/mg

ค. Partition coefficient of enzyme and protein

$$K_E = \frac{A_T}{A_B}$$

เมื่อ K_E = Partition coefficient (Enzyme Activity)

A_T = Enzyme Activity in top phase (unit/ml)

A_B = Enzyme Activity in bottom phase (unit/ml)

$$K_P = \frac{P_T}{P_B}$$

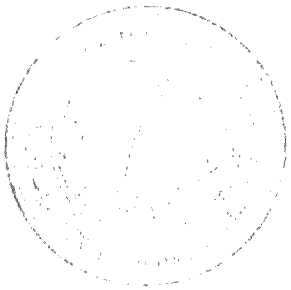
เมื่อ K_P = Partition coefficient (Protein)

P_T = Protein Concentration in top phase (mg/ml)

P_B = Protein Concentration in bottom phase (mg/ml)

ง. Volume ratio

$$V_R = \frac{V_T}{V_B}$$



เมื่อ V_T = Volume in top phase (ml)

V_B = Volume in bottom phase (ml)

จ. Purification factor (PF)

$$PF = \frac{A_T / P_T}{A_i / P_i}$$

เมื่อ A_t = Enzyme Activity in top phase (unit/ml)

A_i = Enzyme Activity initial (unit/ml)

P_t = Protein Concentration in top phase (mg/ml)

P_i = Protein Concentration initial (mg/ml)

ฉ. Percentage activity yield

$$\%Yield_T = \frac{100}{1 + \frac{1}{V_R K_E}}$$

เมื่อ V_R = Volumes Ratio

K_E = Partition coefficient (Enzyme Activity)