ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

Bennet's agar

yeast extract	1	g
beef extract	1	g
N-Z amine, type A	2	g
glucose	10	g
agar	20	g
distilled water	1,000	ml
pH 7.3		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

casein agar

solution A : skim milk	10	g
distilled water	90	ml

เติมนมลงในน้ำพร้อมกับคนตลอดเวลาเพื่อไม่ให้นมจับเป็นก้อน

solution B : agar	3	g
distilled water	97	ml

autoclave สารละลายทั้งสองชนิดแยกกันที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50°C ผสมสารละลายทั้งสองชนิดให้เข้ากันดีแล้วจึงเทใส่ในจานอาหาร

gelatin agar (Atlas, 1993)

gelatin	15	g
peptone	4	g
yeast extract	1	g
agar	15	g

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Hickey Tresner's agar

dextrin	10	g
yeast extract	1	g
beef extract	1	g
N-Z amine type A	2	g
$CoCl_2.6H_2O$	0.02	g (ใน Atlas, 1993 ใช้ $CaCl_2$ 2 g แทน)
agar	15	g
distilled water	1,000	ml
pH 7.3		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Humic acid vitamin agar

humic acid	1	g (ละลายใน 0.2 N NaOH 10 ml)
Na_2HPO_4	0.5	g
KCl	1.71	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.05	g
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	g
$CaCO_3$	0.02	g
agar	18	g
distilled water	1,000	ml
pH 7.2		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาทีแล้วทิ้งไว้ให้เย็นก่อนเทลงในจานอาหารให้เติม vitamin B stock 10 ml (ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง)

vitamin B stock (100x)

thiamine-HCl	0.005	g

riboflavin	0.005	g
niacin	0.005	g
pyridoxin-HCl	0.005	g
inositol	0.005	g
panthothenate	0.005	g
p-aminobenzoic acid	0.005	g
biotin	0.0025	g
distilled water	100	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันแล้วกรองเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°Cในขวดสีชา

ISP medium No.1 (tryptone-yeast extract agar)

tryptone	5	g
yeast extract	3	g
agar	15	g
distilled water	1,000	ml
pH 7.0-7.2		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ISP medium No. 2 (yeast extract-malt extract agar)

yeast extract	4	g
malt extract	10	g
dextrose	4	g
agar	20	g
distilled water	1,000	ml
pH 7.3		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ISP medium No.3 (oatmeal agar)

oatmeal	20	g
agar	18	g

ต้ม oatmeal ในน้ำกลั่น 1,000 ml จนเดือดเป็นเวลา 20 นาทีแล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 1,000 ml แล้วเติม salt solution 1 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 ด้วย NaOH แล้วเติมวุ้นต้มให้วุ้นละลายก่อนนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ISP medium No. 4 (inorganic salt-starch agar)

solution I ละลาย starch 10 g ในน้ำกลั่น 500 ml

solution II

KH_2PO_4	1	g
$MgSO_4.7H_2O$	1	g
NaCl	1	g
$(NH_4)_2SO_4$	2	g
$CaCO_3$	2	g
distilled water	500	ml
trace salt solution	1	ml
pH 7.0-7.4		

ผสม solution I และ solution II ให้เข้ากันก่อนเติม agar 20 g ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

nitrate agar

beef extract	3	g
peptone	5	g
potassium nitrate	1	g
agar	15	g
distilled water	1,000	ml
pH 7.0		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13 × 100 mm หลอดละ 3 ml นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

nutrient agar

beef extract	3	g
peptone	5	g
agar	15	g
distilled water	1,000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

oat meal mannitol agar

oat meal	20	g
mannitol	10	g
salt solution	1	ml
agar	18	g
distilled water	1,000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

salt solution

$FeSO_4.7H_2O$	0.1	g
$MnCl_2.4H_2O$	0.1	g
$ZnSO_4.7H_2O$	0.1	g
distilled water	100	ml

potato dextrose agar (Atlas, 1993)

glucose	20	g
potato	300	g
agar	15	g

ปอกเปลือกมันฝรั่งแล้วหั่นเป็นชิ้นๆ เติมน้ำกลั่น 500 ml ต้มจนเดือดให้ต้มต่อไป 30 นาที แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำต่อจนครบ 1 ลิตรแล้วจึงเติม glucose กับ agar คนให้เข้ากันต้มจนวุ้นละลายหมดนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

starch casein agar

soluble starch	15	g
KH_2PO_4	2	g
KNO_3	2	g
NaCl	2	g
casein	0.3	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.05	g
$CaCO_3$	0.02	g
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	g
agar	15	g
distilled water	1,000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีหลังจาก autoclave แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิ 50°C แล้วจึงเติม cyclohexamide, nystatin และ nalidixic acid (ละลายใน NaOH 0.1 N) อย่างละ 50 mg ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

starch hydrolysis agar

nutrient agar	23	g
potato starch	10	g
distilled water	1,000	ml

ละลายวุ้นในน้ำ 500 ml ต้มให้ละลาย ละลายแป้งในน้ำ 250 ml ต้มให้ละลาย ผสมสารละลายวุ้นและแป้งเข้าด้วยกัน เติมน้ำ 250 ml นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

yeast extract agar

yeast extract	1	g
beef extract	1	g
N-Z amine,type A	2	g
maltose	2	g
agar	20	g
distilled water	1,000	ml
pH 7.3		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารสำหรับทดสอบ mannanase (Downie *et al*, 1994)

locust bean gum	0.1	%
Phyta gel	0.7	%

ละลาย locust bean gum ใน 0.1M citrate-0.2 M phosphate buffer pH 4.8 ที่อุณหภูมิ 60°C คนให้เข้ากันเป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วเติม Phyta gel ละลายให้เข้ากันโดยใช้ microwave แล้วเทใส่ในจานอาหารจานละ 20 ml

อาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed medium) (วรางคณา, 2539)

mannitol	10	g
peptone	20	g
meat extract	10	g
yeast extract	10	g
distilled water	1,000	ml
pH 7.0		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีสเพื่อการผลิตเอนไซม์ (cultivation medium)
(วรางคณา, 2539)

KH_2PO_4	0.5	g
$NaNO_3$	2	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.3	g
$CaCl_2.2H_2O$	0.3	g
trace metal solution	1	ml
locust bean gum	10	g
corn steep solid	1	g
distilledwater	1,000	ml
pH 5.5		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

trace metal solution

$MnSO_4.2H_2O$	1.6	g
$ZnSO_4.7H_2O$	1.4	g
$CoCl_2$ anhydrous	2.0	g
$FeSO_4.7H_2O$	5.0	g
distilled water	1,000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันแล้วเก็บในขวดสีชา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบ	% (w/v)	reference
1	KH_2PO_4	0.2	Araujo and Ward, 1990a
	$NaNO_3$	0.2	
	$MgSO_4.7H_2O$	0.03	
	$CaCl_2.2H_2O$	0.03	
	trace metal solution	0.1	
	locust bean gum	1.0	
	corn steep solid	0.1	
	pH 5.5		
2	$MgSO_4.7H_2O$	0.02	Mendoza *et al.*, 1994 a
	$FeSO_4.7H_2O$	0.001	
	$CaCl_2$	0.005	
	K_2HPO_4	0.75	
	KH_2PO_4	0.2	
	$(NH_4)_2SO_4$	0.02	
	locust bean gum	1.0	
	peptone	0.5	
	yeast extract	0.5	
	pH 7.0		
3	KH_2PO_4	0.05	Ooi and Kikuchi, 1995
	$MgSO_4.7H_2O$	0.05	
	locust bean gum	1.0	
	peptone	0.5	
	pH 6.5		
4	K_2HPO_4	0.754	Mendoza *et al.*, 1994 b
	KH_2PO_4	0.232	
	$CaCl_2$	0.05	
	$FeSO_4.7H_2O$	0.001	
	$(NH_4)_2SO_4$	0.02	
	locust bean gum	1.0	
	meat extract	1.0	
	pH 7.0		

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

acetate buffer

stock solution

A : 0.2 M ของสารละลาย acetic acid (11.55 ml ของ glacial acetic acid ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

B : 0.2 M ของสารละลาย sodium acetate (16.4 g ของ $C_2H_3O_2Na$ ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

working solution

x ml of A + y ml of B เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวม 100 ml

x	y	pH
46.3	3.7	3.6
41.0	6.0	3.8
44.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.0	30.0	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.5	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

citrate-phosphate buffer

stock solution

A : 0.1 M ของสารละลาย citric acid (19.21 g ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

B : 0.2 M ของสารละลาย dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 g ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

working solution

x ml of A + y ml of B เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ml

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

x	y	pH
44.6	5.4	2.6
42.2	7.8	2.8
39.8	10.2	3.0
37.7	12.3	3.2
35.9	14.1	3.4
33.9	16.1	3.6
32.3	17.7	3.8
30.7	19.3	4.0
29.4	20.6	4.2
27.8	22.2	4.4
26.7	23.3	4.6
25.2	24.8	4.8
24.3	25.7	5.0
23.3	26.7	5.2
22.2	27.8	5.4
21.0	29.0	5.6
19.7	30.3	5.8
17.9	32.1	6.0
16.9	33.1	6.2
15.4	34.6	6.4
13.6	36.4	6.6
9.1	40.9	6.8
6.5	43.6	7.0

Congo red 1.0%

congo red	10	g
$NaNO_3$	0.5	g

ละลายส่วนผสมทั้งสองใน K_2HPO_4 0.2 M (34.8 g ในน้ำกลั่น 1,000 ml) ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

DNS reagent

3,5-dinitrosalicylic acid	1.0	%

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

phenol	0.2	%
Na_2SO_3	0.05	%
NaOH	1.0	%

ละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid กับ NaOH จนหมดในน้ำกลั่น 50 ml ก่อน แล้วจึงเติม phenol และ Na_2SO_3 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml เก็บในขวดสีชา

Na-K tartrate

นำ Na-K tartrate 40 g มาละลายในน้ำกลั่น 100 ml คนให้ละลายจนหมด

phosphate buffer

stock solution

A : 0.2 M ของสารละลาย monobasic sodium phosphate(NaH_2PO_4 27.8 g ในน้ำกลั่น1,000ml)

B : 0.2M ของสารละลาย dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4 28.4 g ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

working solution

x ml of A + y ml of B เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200 ml

x	y	pH	x	y	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐานและการหาปริมาณเอนไซม์

การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย mannose

1. เตรียม stock solution ของ mannose ความเข้มข้น 1.0 mg/ml โดยชั่ง mannose 100 mg ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml โดยใช้ volumetric flask จะได้สารละลายความเข้มข้น 1 mg/ml

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน mannose ในหลอดทดลองโดยดูด mannose จาก stock solution 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 ml เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 1.0 ml ในแต่ละหลอดทดลองจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 mg/ml ตามลำดับ

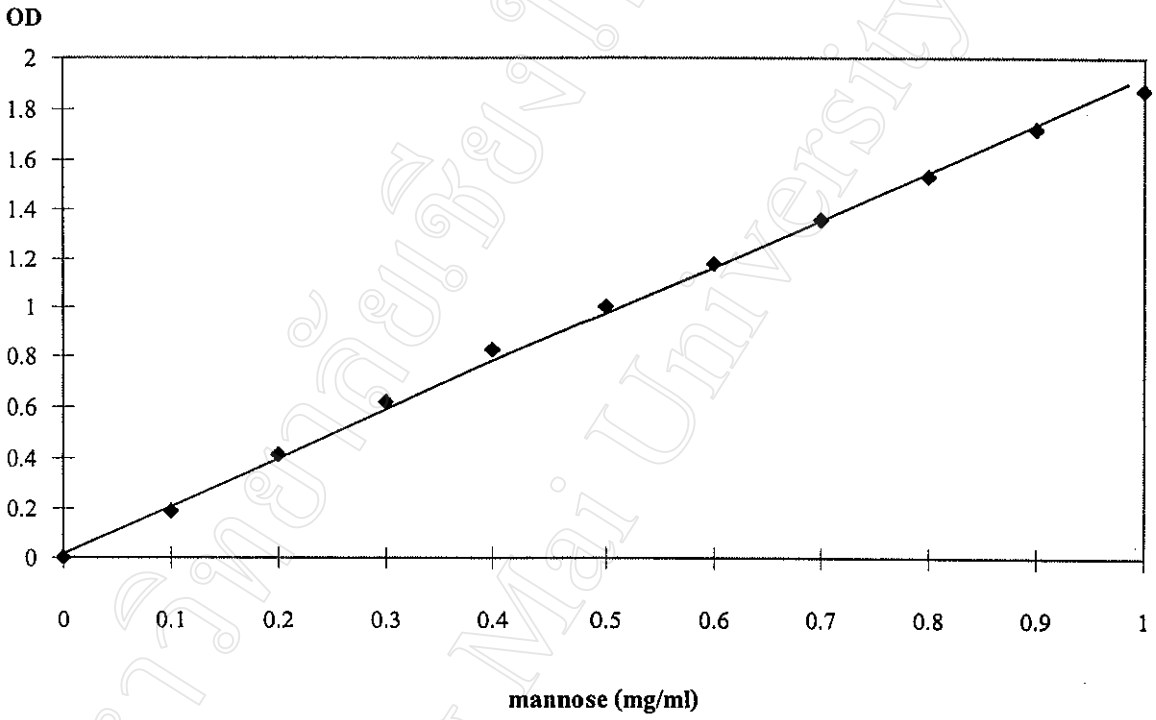
3. เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 2 ml แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที

4. เติมสารละลาย 40 % Na-K tartrate ลงไปหลอดละ 1 ml

5. ทิ้งไว้ให้เย็น แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นแทน mannose ได้ผลดังนี้

mannose (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง
0	0
0.1	0.189
0.2	0.415
0.3	0.620
0.4	0.827
0.5	1.004
0.6	1.182
0.7	1.361
0.8	1.536
0.9	1.724
1.0	1.876

6. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างปริมาณ mannose กับค่าการดูดกลืนแสง



การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย galactose

1. เตรียม stock solution ของ galactose ความเข้มข้น 0.5 mg/ml โดยชั่ง mannose 50 mg ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml โดยใช้ volumetric flask จะได้สารละลายความเข้มข้น 0.5 mg/ml

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน galactose ในหลอดทดลองโดยดูด galactose จาก stock solution 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 1.0 ml ในแต่ละหลอดทดลองจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mg/ml ตามลำดับ

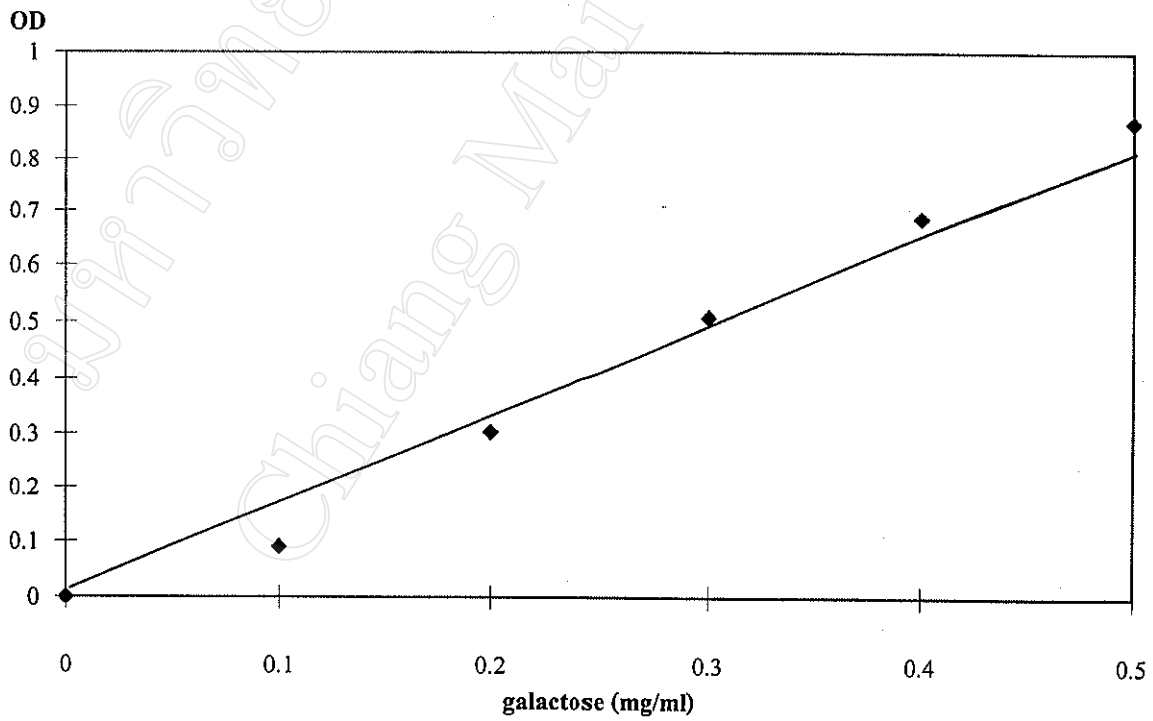
3. เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 2 ml แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที

4. เติมสารละลาย 40 % Na-K tartrate ลงไปหลอดละ 1 ml

5. ทิ้งไว้ให้เย็น แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นแทน galactose ได้ผลดังนี้

galactose (mg/ml)	OD
0	0
0.1	0.090
0.2	0.303
0.3	0.507
0.4	0.685
0.5	0.871

6. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างปริมาณ galactose กับ ค่าการดูดกลืนแสง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย *p*-nitrophenol

1. เตรียม stock solution ของ *p*-nitrophenol ความเข้มข้น 0.1 mg/ml โดยชั่ง *p*-nitrophenol 10 mg ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml โดยใช้ volumetric flask จะได้สารละลายความเข้มข้น 0.1 mg/ml

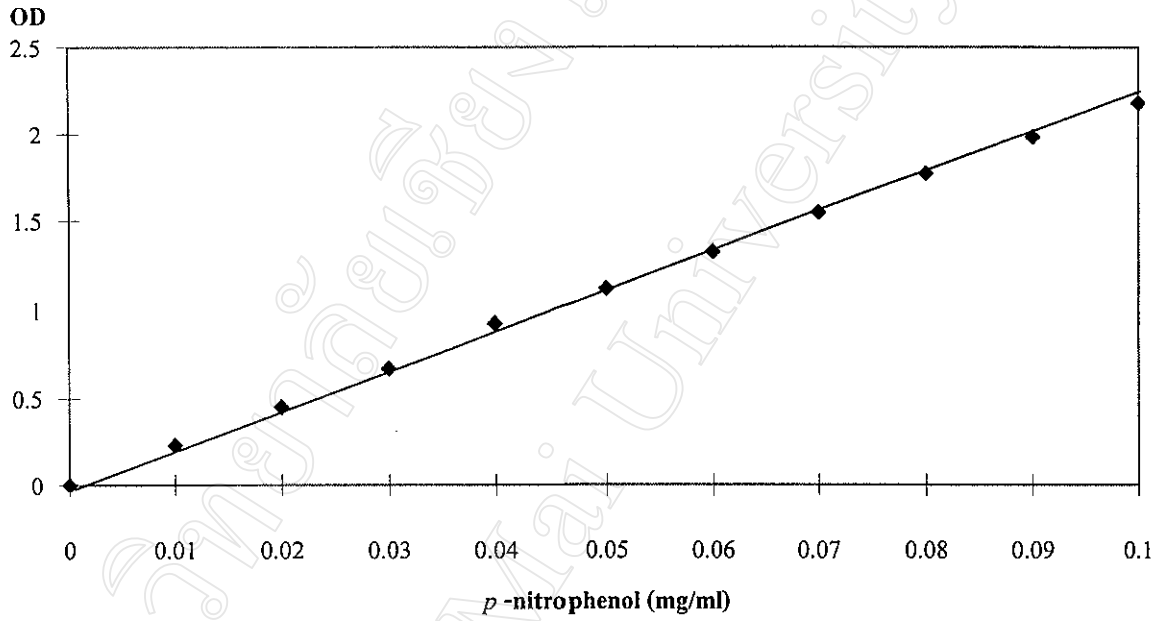
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol ในหลอดทดลองโดยดูด *p*-nitrophenol จาก stock solution 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 ml เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 1.0 ml ในแต่ละหลอดทดลองจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 และ 0.10 mg/ml ตามลำดับ

3. เติมสาละลาย 2% sodium carbonate ลงไป 2 ml

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุมได้ผลดังนี้

p-nitrophenol (mg/ml)	OD
0	0
0.01	0.230
0.02	0.450
0.03	0.669
0.04	0.924
0.05	1.116
0.06	1.324
0.07	1.546
0.08	1.771
0.09	1.983
0.10	2.181

5. นำค่าที่ได้สร้างกราฟระหว่าง *p*-nitriophenol กับค่าการดูดกลืนแสง



การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin

1. เตรียม stock solution ของ bovine serum albumin ความเข้มข้น 0.5 mg/ml โดยชั่ง mannose 50 mg ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml โดยใช้ volumetric flask จะได้สารละลายความเข้มข้น 0.5 mg/ml

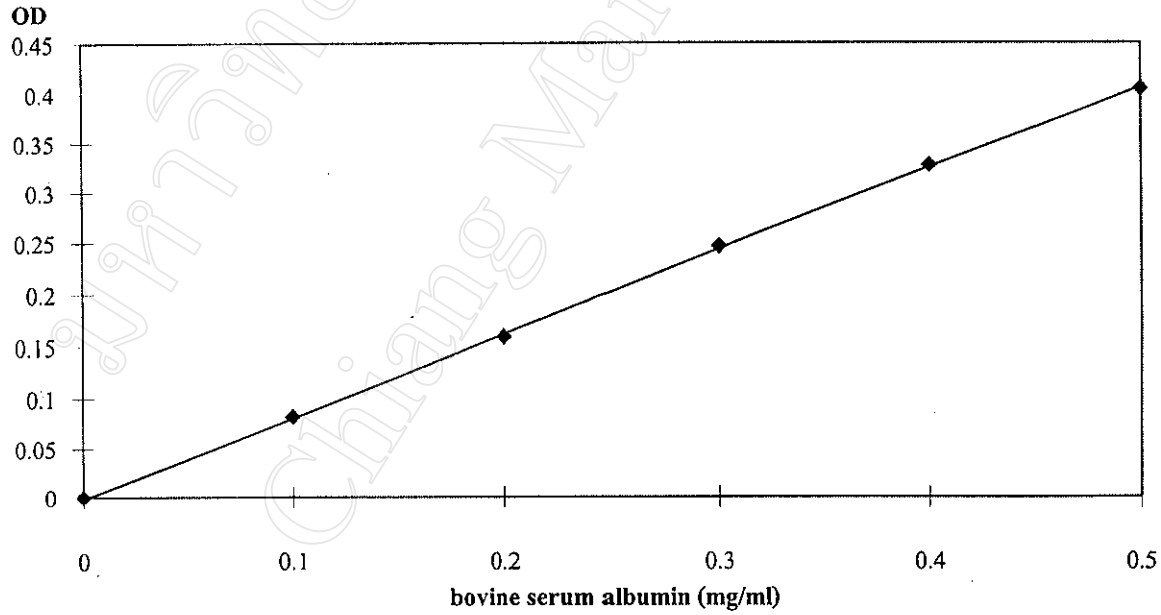
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน galactose ในหลอดทดลองโดยดูด galactose จาก stock solution 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 1.0 ml ในแต่ละหลอดทดลองจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mg/ml ตามลำดับ

3. ดูดสารละลายจากข้อ 2 ในแต่ละหลอดมา 50 µl แล้วเติมสารละลาย Bio-Rad protein assay ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 4 ลงไป 2.5 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรเทียบกับหลอดควบคุมได้ผลดังนี้

bovine serum albumin (mg/ml)	OD
0	0
0.1	0.082
0.2	0.159
0.3	0.246
0.4	0.327
0.5	0.405

5. เขียนกราฟระหว่าง bovine serum albumin กับค่าการดูดกลืนแสง



มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การหา specific activity ของเอนไซม์

ในการสกัดเอนไซม์จากแหล่งใดๆก็ตาม สิ่งสำคัญที่ควรจะทราบคือ ปริมาณของเอนไซม์ที่เตรียมได้ จะหาได้โดยการวัดประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งจะออกมาในรูปของ enzyme unit ในสารละลายที่สกัดได้นอกจากมีเอนไซม์แล้วยังมีโปรตีนชนิดอื่นๆและโมเลกุลอื่นๆ ปนอยู่ด้วย การบ่งบอกปริมาณเอนไซม์เป็นน้ำหนักจึงไม่ถูกต้อง ปริมาณของเอนไซม์จึงมักวัดในรูปของ speccific activity คือประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาในรูปหน่วยของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

$$\text{specific activity} = \frac{\text{unit}}{\text{mg protein}}$$

การวัดปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนใน crude enzyme โดยใช้ Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad®)

1. นำสารละลาย Bio-Rad protein assay (Coomassie Brilliant Blue G-250) เจือจางด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1 : 4

2. ดูด crude enzyme 50 µl ใส่ลงในหลอดทดลอง

3. เติมสารละลาย Bio-Rad protein assay ที่เจือจางแล้วลงไป 2.5 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin

การตรวจวัด mannanase activity

mannanase activity จะวัดจากปริมาณน้ำตาล mannose ที่ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท โดยวิธีของ Alberto and Owen (1990) ซึ่งใช้ dinitrosalicylic reagent (DNS) เป็นตัวทำปฏิกิริยาและ mannose ในการทำกราฟมาตรฐาน โดยมี locust bean gum 1%(w/v) ใน 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.8 เป็นสับสเตรท

การตรวจวัด galactanase activity

galactanase activity จะวัดจากปริมาณน้ำตาล galactose ที่ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท โดยวิธีของ Alberto and Owen (1990) ซึ่งใช้ dinitrosalicylic reagent (DNS) เป็นตัวทำปฏิกิริยาและ galactose ในการทำกราฟมาตรฐาน โดยมี galactan (arabic gum) 1% (w/v) ใน 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.8 เป็นสับสเตรท

วิธีทดลอง

1. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท (ตาราง 20)

ตาราง 20 การเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาเพื่อตรวจวัด mannanase/galactanase activity

reaction	reaction mixture		
	crude enzyme (ml)	substrate (ml)	sodium acetate buffer (ml)
1. control (C)	-	-	1.0
2. enzyme+substrate (ES)	0.5	0.5	-
3. enzyme blank (EB)	0.5	-	0.5
4. substrate blank (SB)	-	0.5	0.5

2. นำส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้ง 4 ชนิดไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที
3. เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 2 ml แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที
4. เติมสารละลาย Na-K tartrate 40% ลงไปหลอดละ 1 ml
5. ทิ้งไว้ให้เย็นแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร โดยใช้ C เป็น blank

การวัด β-mannosidase activity

บ่ม 2 mM *p*-nitrophenyl-β-D-mannopyrannoside ที่ละลายใน 0.1 M sodium acetate pH 5.8 (ชั่ง *p*-nitrophenyl-β-D-mannopyrannoside 0.068 g ใน buffer 100 ml สารตัวนี้ละลายได้ยากให้นำไป sonicate 10 นาที) 0.5 ml กับ crude enzyme 0.5 ml ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาทีแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 2% sodium carbonate 2 ml แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรเทียบกับสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol

หน่วยการทำงานของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ออกมา 1 μmol ภายในเวลา 1 นาที

ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงสุทธิ (Δ A) ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่า ΔA หาได้ดังนี้

$\Delta A = ES - EB - SB$

การคำนวณปริมาณเอนไซม์

mannanase และ galactanase

จากการทดลองใช้เวลา 30 นาทีได้ mannose/galactose= X mg

คิดเป็น $X \times 10^3/180.2$ μmol

(molecular weight ของ mannose และ galactose = 180.2)

ดังนั้นในเวลา 1 นาทีจะได้ mannose/galactose = $X \times 10^3/180.2/30$ μmol

จากการทดลองใช้ปริมาณเอนไซม์* = 0.5 ml

ดังนั้นเอนไซม์มี activity = $X \times 10^3/180.2/30/0.5$ Unit/ml

β-mannosidase

จากการทดลองใช้เวลา 30 นาทีได้ *p*-nitrophenol = X mg

คิดเป็น $X \times 10^3/139.11$ μmol

(molecular weight ของ *p*-nitrophenol = 139.11)

ดังนั้นในเวลา 1 นาทีจะได้ *p*-nitrophenol = $X \times 10^3/139.11/30$ μmol

จากการทดลองใช้ปริมาณเอนไซม์* = 0.5 ml

ดังนั้นเอนไซม์มี activity = $X \times 10^3/139.11/30/0.5$Unit/ml

* เนื่องจากเอนไซม์มีความเข้มข้นสูงจึงต้องเจือจาง 1000 เท่าสำหรับ mannanase, 10 เท่าสำหรับ galactanase และ 50 เท่าสำหรับ β-mannosidase

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ประวัติการศึกษา

ชื่อ	นางสาวนลิน วงศ์ขัตติยะ
วัน เดือน ปี เกิด	11 เมษายน 2514
ประวัติการศึกษา	สำเร็จมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนารีรัตน์จังหวัดแพร่ ปีการศึกษา 2531
	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2535
ประสบการณ์	นักเทคนิคการแพทย์ บริษัทเรดิโออิมมูนโนแอสเสย์เซนเตอร์ จำกัด กรุงเทพ พ.ศ. 2536
	นักเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลเชียงใหม่ราม จังหวัดเชียงใหม่ พ.ศ. 2538
ที่อยู่ที่ติดต่อได้	199/362 หมู่ 9 หมู่บ้านล้านนาวิลล์ ตำบลสันผีเสื้อ ถนนเชียงใหม่-แม่โจ้ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ โทร. 246823

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University