

## ภาคผนวก ก

### พืชสมุนไพร

#### พืชสมุนไพร

คนทีสอ (*Vitex trifolia* Linn.) (สมุนไพรสวนสิริรุกขชาติ, 2535)

ชื่อสกุล : Verbanaceae

ชื่ออื่น : คนทีสอ คินสอ คุณทีสอ โคนคินสอ ดอกสมุทรี สีเลื้อนน้อย ทิสอ ผีเลื้อ ผีเลื้อนน้อย มูคเพ็ง สีสอ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้พุ่มสูง 3-4 เมตร ใบประกอบแบบนิ้วมือ เรียงตรงข้าม ใบย่อย 3 ใบ รูปขอบขนานแกมไข่กลับ กว้าง 2.5-3.0 เซนติเมตร ยาว 4-6 เซนติเมตร ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง กลีบดอกสีม่วง ปลายแยกเป็นสองปาก ปากบนมี 2 กลีบ ปากล่างมี 3 กลีบ ผลเป็นผลสดรูปกลม

ตำราไทยใช้เป็นใบยาขับเสมหะ บำรุงธาตุ รากรักษาโรคตับ ผลแก้หืดไอ มองคร่อ (อาการไอชนิดหนึ่ง) ริดสีดวงทวาร รากและใบต้มแก้ไข้ ขับเหงื่อ ใบแช่น้ำอาบและโรคผิวหนัง ผื่นคัน

สาบเสือ (*Chromolaena odorata* (Linn.) King et Robins) (สมพร, 2525)

ชื่อสกุล : Asteraceae (Compositae)

ชื่อพ้อง : *Eupatorium conyzoides* Vahl., *E. odoratum*

ชื่ออื่น : ขำผักราช ไร่ปลูกอ ชีโพกวย เซโพกวย หญ้าดอกขาว บ่อไล่ บ้านร้าง เบนจมาศ มนทน รำเคย หญ้าเมืองวาย

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้พุ่ม ลำต้นตั้งตรงสูง 1-2.5 เมตร มีขน ใบเดี่ยว เรียงสลับรูปไข่แกมสามเหลี่ยม กว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 5-10 เซนติเมตร ปลายใบเรียวแหลมหรือสอบ โคนใบรูปลิ้น ขอบใบหยักซี่ฟัน มีขนทั้งสองด้าน ก้านใบยาวได้ถึง 6 เซนติเมตร ดอกช่อกระจุกแน่น ออกเป็นช่อเชิงหลั่นที่ปลายกิ่ง ช่อย่อยเป็นรูปทรงกระบอกกิ่งรูปประฉิ่ง เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ชั่นใบประดับ 4-5 ชั่น ใบประดับชั้นนอกรูปไข่ ชั่นในรูปแถบปลายแหลมสีขาว มีเส้น

สีเขียว 3 เส้น ดอกย่อยช่อละ 20-35 ดอก สีม่วงแกมน้ำเงิน พบน้อยที่เป็นสีขาว มีกลิ่นหอม ผลแห้ง เมล็ดล่อนรูปรีงยาว สีดำมีเหลี่ยม ยาว 4 มิลลิเมตร

สรรพคุณ : ดัน – แก้ปวดท้อง ท้องขึ้น ท้องเฟ้อ แก้บวม ดูดหนอง

ใบ – รักษาแผลสด สมานแผล ถอนพิษ แก้อักเสบ แก้พิษน้ำเหลือง แก้ตาฟาง แก้ตา และ ห้ามเลือด แก้ริดสีดวงทวารหนัก รักษาแผลเปื่อย

ดอก – แก้ก้อนใน กระหายน้ำ ชูกำลัง แก้อ่อนเพลีย บำรุงหัวใจ แก้ไข้ ทั้งคันแก้ บาดทะยัก

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา : ด้านเชื้อแบคทีเรีย ด้านเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ด้านเชื้อรา ควบคุมการกินอาหาร ของแมลง ไล่แมลงฆ่าตัวอ่อนของแมลง ห้ามเลือด ลด Prothrombin time ทำให้หลอดเลือดหด ตัว กระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบหดเกร็ง

พบว่าภายในใบมีสารฝาดสมาน (tannin) กรดอะนิซิก (anisic acid) และ อัลกอฮอล์ (trihydric alcohol) น้ำตาลและ ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (flavonoid glycosides) และพบว่าน้ำดื่ม จากใบและต้นสาบเสือ กระตุ้นการทำงานของหัวใจของสัตว์ทดลอง หนูตะเภาและ กระต่าย และมีผลต่อสมดุลของสัตว์ทดลอง (สมพร, 2525)

ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz.) (สมุนไพรสวนสิริรุกษชาติ, 2535)

ชื่อสกุล : Acanthaceae

ชื่ออื่น : ทองคันชั่ง หญ้ามันไก่

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้พุ่มสูง 1-2 เมตร กิ่งอ่อนมักเป็นสันสี่เหลี่ยม ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม รูปไข่หรือรูปวงรี กว้าง 2-4 เซนติเมตร ดอกช่อ ออกที่ซอกใบ กลีบดอกสีขาว โคนกลีบติดกัน เป็นหลอด ปลายแยกเป็นสองปาก ปากล่างมีจุดประสีม่วงแดง ผลเป็นผลแห้ง แตกได้

ตำราไทยใช้ใบสดและรากบดละเอียด แช่เหล้าโรง 1 สัปดาห์ เอาน้ำทาแก้กลากเกลื้อน สารสำคัญคือ rhinacanthin และ oxymethylanthraquinone ในใบเป็นสารไกลโคไซด์

ควินิน (*Cinchona succirubra* Par.) (สมุนไพรสวนสิริรุกษชาติ, 2535)

ชื่อสกุล : Rubiaceae

ชื่ออื่น : ชิงโคนา

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ยืนต้นสูง 10-15 เมตร ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปวงรีแกมใบหอก อยู่ระหว่างก้านใบ ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอด สีขาวหรือสีชมพู ผลแห้งแตกได้รูปกระสวยยาว เมื่อสุกสีน้ำตาลแดง

นิยมใช้เปลือกและเปลือกกรากทำประโยชน์ทางยาบำบัดโรคมาลาเรีย เนื่องจากภายในเปลือกประกอบด้วย อัลคาลอยด์ ประมาณ 25 ชนิด แต่มีอัลคาลอยด์ที่สำคัญคือ ควินิน (quinin) ควินิดิน (quinidine) ซิงโคนิน (cinchonine) และ ซิงโคนิดิน (cinchonidine) ควินินเป็นสารที่สำคัญมากในซิงโคนาสีเหลือง แต่ในซิงโคนาสีแดงจะมีปริมาณของซิงโคนิดินสูง สารต่างๆที่กล่าวมาในควินินจะมีรสขม ใช้เป็นยาขมเจริญอาหาร (bitter tonic) เปลือกนำมาทำเป็นยาขมหรือยาต้มอมกลั้วคอ โดยสรุปแล้ว อัลคาลอยด์ที่สำคัญคือ ควินินใช้บำบัดโรคมาลาเรีย และควินิดินมีฤทธิ์ทำให้หัวใจคลายแต่ในกรณีที่ได้รับสารควินินเกินขนาดจะทำให้หูอื้อ

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) (สมุนไพรสวนสิริรุกษชาติ, 2535)

ชื่อสกุล : Malvaceae

ชื่ออื่น : กระเจี๊ยบเปรี้ยว ผักกึ่งเต็ง ส้มกึ่งเต็ง ส้มตะเลงเครง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้พุ่มสูง 50-180 เซนติเมตร มีหลายพันธุ์ ลำต้นสีม่วงแดง ใบเดี่ยว รูปฝ่ามือ 3 หรือ 5 แฉก กว้างและยาวใกล้เคียงกัน 8-15 เซนติเมตร ดอกเดี่ยวออกที่ซอกใบ กลีบดอกสีชมพู หรือเหลืองบริเวณกลางดอกสีม่วงแดง เกสรตัวผู้เชื่อมกันเป็นหลอด ผลเป็นผลแห้งแตกได้ มีกลีบเลี้ยงสีแดงหุ้มไว้

ตำราไทยใช้ใบและยอดซึ่งมีรสเปรี้ยวแก้ไอ เมล็ดบำรุงธาตุ ขับปัสสาวะ มีรายงานการทดลองในผู้ป่วยโรคนี้่วในท่อไต ดื่มน้ำซีกลิบลี้งแห้งของผล 3 กรัม ในน้ำ 300 ซีซี วันละ 3 ครั้ง ทำให้ถ่ายปัสสาวะสะดวกขึ้น บางรายน้ำหลุดได้เอง นอกจากนี้ทำให้ผู้ป่วยกระเพาะปัสสาวะอักเสบมีอาการปวดแสบเวลาปัสสาวะน้อยลง ในกลีบที่ห่อหุ้มเมล็ดมีสีแดงเนื่องจากมีสารพวก anthocyanin ซึ่งเป็นสีที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ

เสลดพังพอน (*Barleria lupulina* Lindl.) (นันทวัน และ อรุณ, 2543)

ชื่อสกุล : Acanthaceae

ชื่ออื่น : เชือกเข็กเขม พิมเสนตัน

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้พุ่มสูงได้ถึง 1.5 เมตร แตกกิ่งก้านมาก ใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามรูปแถบแกมขอบขนาน กว้าง 0.9-1.4 เซนติเมตร ยาว 3-8.5 เซนติเมตร ปลายใบมนเป็นติ่ง หนามสั้น โคนใบรูปกลมหัวใจใบเกลี้ยงยาวได้ถึง 9 เซนติเมตร ใบประดับรูปไข่กว้าง กว้างได้ถึง 1.2 เซนติเมตร ยาวได้ 1.8 เซนติเมตร ปลายเป็นติ่งหนามสั้น มีขนครุยสั้นที่ด้านหลังของคอดที่หุ้มกาบผล ใบประดับย่อยรูปใบหอก ปลายเป็นติ่งหนาม กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉกรูปไข่กว้าง ขนาดไม่เท่ากันกว้าง 1-4 มิลลิเมตร ยาว 6-9 มิลลิเมตร ปลายเป็นรยางค์แข็งสั้น กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอด ยาวได้ถึง 3 เซนติเมตร ปลายผายออกเป็น 2 ปาก สีเหลือง ผลแตกได้รูปกระสวย

ตำราไทย : ราก - แก้พิษตะขาบ แมลงป่อง พิษงูกัด

ต้น - พอกแผลเรื้อรัง แก้พิษงู

ใบ - พอกแผลเรื้อรัง แก้พิษงู แก้โรคฝีดาษ แก้ไข้ทรพิษ ถอนพิษแมลงสัตว์กัดต่อย ทำให้เลือดไหลเวียนดี แก้โรคลมพิษ แก้น้ำร้อนลวก

เถา - แก้บวมอักเสบ แก้วัวโรค แก้ประดง ถอนพิษ พิษตะขาบ แมลงป่อง แก้พิษงู แก้พิษแมลงกัดต่อย

หัว - แก้พิษงู แก้พิษตะขาบ แมลงป่อง

ทั้งต้น - แก้ปวดฟัน แก้พิษทุกชนิดกัด

ด้านไวรัสมัน แก้พิษงูเห่า แก้ปวด ด้านการอักเสบ

น้ำมันราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) (สารานุกรมสมุนไพร (2), 2503)

ชื่อสกุล : Euphorbiaceae

ชื่ออื่น : นมราชสีห์ ผักโขมแดง หญ้าน้ำหมึก

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุก มีน้ำยางขาว สูง 15-20 เซนติเมตร ลำต้นมีขนละเอียด สีน้ำตาลอ่อน ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม รูปขอบขนาน ไข่ใบมีขนทั้งสองข้าง กว้าง 1-1.5 เซนติเมตร ยาว 2-4 เซนติเมตร ดอกช่อออกที่ซอกใบ ดอกแยกเพศไม่มีกลีบเลี้ยง กลีบดอกใบประดับเป็นรูปถ้วย สีเขียว ผลแห้งแตกได้มี 3 พู เมื่อสุกสีเหลือง

ตำราไทยใช้ทั้งต้น ตัดสั้นๆ ประมาณครึ่งนิ้ว คั่วไฟพอเหลือง ชงคั้นแต่น้ำ ขับปัสสาวะ แก้ปัสสาวะแดงหรือขุ่นข้น ดันสดคั้นน้ำดื่ม เพิ่มน้ำมันและฟอกน้ำมันให้สะอาด สารสกัดต้นมีฤทธิ์ลดไข้ ลดอาการปวดในสัตว์ทดลอง การทดลองทางคลินิกพบว่าสามารถรักษาโรคบิดมีตัวได้

## ภาคผนวก ข

### อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

#### Rose bengal malt extract agar

|                 |           |
|-----------------|-----------|
| Malt extract    | 20.0 g    |
| Rose bengal     | 0.03 g    |
| Chloramphenicol | 0.12 g    |
| Agar            | 15.0 g    |
| Distilled water | 1,000 ml. |
| พีเอช           | 7.0       |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไป autoclave ที่ อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### Malt extract agar

|                 |           |
|-----------------|-----------|
| Malt extract    | 20.0 g    |
| Agar            | 15.0 g    |
| Distilled water | 1,000 ml. |
| พีเอช           | 7.0       |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไป autoclave ที่ อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### อาหารสำหรับทดสอบการสร้าง ไซลแนนส (Downie และคณะ 1994)

|                 |      |
|-----------------|------|
| locust bean gum | 0.1% |
| Phyta gel       | 0.7% |

ละลาย locust bean gum ใน 0.1 M citrate-0.2 M phosphate buffer พีเอช 4.8 ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเติม Phyta gel ละลายให้เข้ากันโดยการผ่าน microwave และเทใส่จานอาหารจานละ 20 ml.

**อาหารเหลวสำหรับการทดสอบการสร้างและผลิตเอนไซม์ ไซลานเนส (Kqeen และคณะ 1999)**

|                                           |       |     |
|-------------------------------------------|-------|-----|
| $\text{NH}_4\text{NO}_3$                  | 2     | g   |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.05  | g   |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5   | g   |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                  | 0.5   | g   |
| KCl                                       | 0.5   | g   |
| Yeast extract                             | 0.01  | g   |
| Xylan (birchwood xylan)                   | 10    | g   |
| Distilled water                           | 1,000 | ml. |

## ภาคผนวก ค

### การเตรียมสารเคมี

#### Congo red

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Congo red         | 10 g  |
| NaNO <sub>3</sub> | 0.5 g |

ละลายส่วนผสมทั้งสองใน 0.2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (34 g ในน้ำกลั่น 1000 ml.) ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

#### DNS reagent

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| 3,5-dinitrosalicylic acid       | 1.0 % |
| phenol                          | 0.2%  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> | 0.05% |
| NaOH                            | 1.0%  |

ละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid กับ NaOH ในน้ำกลั่น 50 ml. จนเข้ากันก่อน แล้วเติม phenol และ Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> ปรับปริมาตรเป็น 100 ml. เก็บในขวดสีชา

#### Na-K tartrate

นำ Na-K tartrate 40 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml. คนให้เข้ากัน

#### Citrate-phosphate buffer

##### stock solution

A : 0.1 M citric acid (19.21 g ในน้ำกลั่น 1000 ml.)

B : 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (53.65 g ในน้ำกลั่น 1000 ml )

##### working solution

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

| x    | y    | พีเอช |
|------|------|-------|
| 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   |

### Phosphate buffer

stock solution

A : 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (27.8 g ในน้ำกลั่น 1000 ml.)

B : 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (28.4 g ในน้ำกลั่น 1000 ml)



working solution

x ml. of A + y ml. Of B เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 200 ml.

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

**สารละลายที่ใช้ในการทดสอบโปรตีน (Bollag และคณะ 1996)**

Reagent A : 2% w/v  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ละลายใน 0.1 M NaOH

B1 : 1.0% w/v  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

B2 : 2% Na-K-tartrate

สารละลาย folin (เจือจางสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1)

C : ผสมสาร A : B : B1 ในอัตราส่วน 100 : 1 : 1

## ภาคผนวก ง

### กราฟมาตรฐานและการวัดปริมาณแอนไซม์

#### การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย ไซโลส

1. เตรียม stock solution ของ ไซโลสความเข้มข้น 500  $\mu\text{g/ml}$ . โดยชั่งไซโลส 50 mg ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตร เป็น 100 ml. โดยใช้ volumetric flask จะได้สารละลายเข้มข้น 500  $\mu\text{g/ml}$ .
2. เตรียมสารละลายไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยการดูดสารละลายไซโลสจาก stock solution ปริมาตร 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 ml. และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 1.0 ml. จะทำให้แต่ละหลอดการทดลองมีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500  $\mu\text{g/ml}$ . ตามลำดับ
3. เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 2.0 ml. เขย่าให้เข้ากันและไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที
4. เติมสารละลาย 40% Na-K tartrate ลงไปหลอดละ 1.0 ml.
5. ทิ้งไว้ให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm. เทียบกับหลอดควบคุมโดยใช้ น้ำกลั่นแทนสารละลาย ไซโลส
6. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างปริมาณ ไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสง

#### การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA (Bovine Serum Albumin)

1. เตรียม stock solution ของ BSA ความเข้มข้น 0.1 mg/ml. โดยชั่ง BSA 10 mg ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตร เป็น 100 ml. โดยใช้ volumetric flask จะได้สารละลายเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$ .
2. เตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยการดูดสารละลายไซโลสจาก stock solution ปริมาตร 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 ml. เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 0.30 ml. จะทำให้แต่ละหลอดการทดลองมีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300  $\mu\text{g/ml}$ . ตามลำดับ
3. เติมสารละลาย C ปริมาตร 3.0 ml. ลงไปในแต่ละหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที

4. เติมสารละลาย folin ปริมาตร 0.3 ml. ลงไปในแต่ละหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm.
6. เขียนกราฟระหว่าง ค่าความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสง

#### การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (xylanase activity) (นลิน, 2541)

การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จะวัดจากน้ำตาลที่เกิดขึ้นระหว่างการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท (xylan : birchwood xylan) โดยดูจากสีที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของสารละลาย dinitrosalicylic reagent (DNS) กับน้ำตาลที่เกิดขึ้น

#### วิธีการทดลอง

1. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรทดังตาราง

| reaction             | Reaction mixture |                    |              |
|----------------------|------------------|--------------------|--------------|
|                      | enzyme (ml.)     | 1% substrate (ml.) | Buffer (ml.) |
| Control (C)          | -                | -                  | 1.0          |
| Enzyme+substrate(ES) | 0.5              | 0.5                | -            |
| Enzyme blank (EB)    | 0.5              | -                  | 0.5          |
| Substrate blank (SB) | -                | 0.5                | 0.5          |

2. นำส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้ง 4 ชนิด ไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที
3. เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 2.0 ml. เขย่าให้เข้ากันและไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที
4. เติมสารละลาย 40% Na-K tartrate ลงไปหลอดละ 1.0 ml.
5. ทิ้งไว้ให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm. เทียบกับหลอดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลาย ไซโลส

#### หน่วยการทำงานของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ออกมา 1  $\mu\text{mol}$  ภายในเวลา 1 นาที

ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงสุทธิ ( $\Delta A$ ) ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่า  $\Delta A = \text{ES} - \text{EB} - \text{SB}$

### การคำนวณปริมาณเอนไซม์ ไซลเนส

จากการทดลองใช้ reaction time เท่ากับ 5 นาที ได้ ไซโลส = X mg.

คิดเป็น  $X \times 10^3 / 150 \mu\text{mol.}$

(molecular weight ของน้ำตาล ไซโลส เท่ากับ 150)

ดังนั้นใน 1 นาที จะได้ ไซโลส  $= X \times 10^3 / (150 \times 5)$

จากการทดลองใช้ปริมาณเอนไซม์  $= 0.5 \text{ ml.}$

ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์  $= X \times 10^3 / (150 \times 5 \times 0.5 \text{ U/ml.})$

### การหา แอคติวิตีจำเพาะ ของเอนไซม์

ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของการเร่งปฏิกิริยาในรูปหน่วยของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน เนื่องจากในสารละลายโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจะมีโปรตีนมากมายหลายชนิด ดังนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เท่ากันอาจมาจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในปริมาณที่ต่างกันก็ได้ และจากค่าดังกล่าวทำให้ทราบถึงควมบริสุทธิ์ของโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ในสารละลายได้ โดยค่าแอกติวิตีจำเพาะ จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่เอนไซม์ออกไป

แอกติวิตีจำเพาะ = Unit/mg protein

### การวัดปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนใน crude enzyme โดย Lowry method

1. นำ crude enzyme ปริมาตร 0.3 ml. นำมาเติมสารละลาย C ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที
2. เติมสารละลาย folin ปริมาตร 0.3 ml. และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm. และหาค่าปริมาณโปรตีนโดยนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BSA

## ภาคผนวก จ

### การทำ SDS-PAGE

#### การเตรียม Sodium Dodesyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

1. ล้างแผ่นกระจกด้วย ethanol
2. ผสมสารละลายต่างๆเพื่อใช้เป็น separating gel นำสารผสมไปทำการ degas โดยการให้ความร้อน หรือ ใช้ sonicator เป็นเวลา 15 นาที และทำการเติม TEMED ในลำดับสุดท้าย
3. เติมน้ำสารละลายที่ผสมกันเสร็จสมบูรณ์แล้วลงในแผ่นกระจกโดยให้ความสูงระหว่างขอบกระจกและขอบ gel ประมาณ 2.0 cm. รองจนกระทั่ง gel คงตัว และเติมทับด้วย stacking gel และนำ comp เสียบลงไป และรอเวลาให้ gel คงตัว ประมาณ 15-20 นาที จึงทำการดึง comp ออก โดยควรที่จะให้ ระยะระหว่างด้านล่างของหลุมที่จะเติมตัวอย่างกับขอบของ separating gel ห่างกัน ประมาณ 5-8 mm.
4. เตรียมอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องให้พร้อมก่อนที่จะทำการเติมตัวอย่าง
5. เติมตัวอย่างปริมาณ 10-15  $\mu$ l. ลงในช่องตัวอย่าง โดยมี marker ในช่องแรกเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ
6. นำชุดตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้วแช่ใน chamber ที่มี running buffer อยู่ จากนั้นจึงทำการ run gel โดยควบคุมกระแสไฟฟ้าที่ 8 mA เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งแถบสีเคลื่อนที่ลงมาถึงด้านล่างของแผ่นกระจก
7. นำ gel มาย้อมสีด้วย Coomassie blue solution เป็นเวลา 30 นาที และล้างสีออก ด้วย destain solution (50% methanol, 10% acetic acid) จนกระทั่งเห็นแถบสีของโปรตีนที่ต้องการ
8. เก็บตัวอย่าง gel ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ

#### สารเคมีที่ใช้

##### 1. Separating gel (12%T)

|                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| acrylamide/bisacrylamide (30%T,2.7%C) | 4.0 ml.  |
| 1.0 M Tris-Cl พีเอช 8.0               | 2.5 ml.  |
| 20%SDS                                | 0.05 ml. |
| Deionized water                       | 3.4 ml.  |

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| 10% Ammonium persulfate | 0.05 ml. |
|-------------------------|----------|

|       |           |
|-------|-----------|
| TEMED | 0.005 ml. |
|-------|-----------|

ทำการเติม AMP และ TEMED ก่อนที่จะทำการเติมลงใน glass plate

## 2. Stacking gel (4%T)

|                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| acrylamide/bisacrylamide (30%T,2.7%C) | 0.67 ml. |
|---------------------------------------|----------|

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| 1.0 M Tris-Cl พีเอช 8.0 | 1.25 ml. |
|-------------------------|----------|

|        |           |
|--------|-----------|
| 20%SDS | 0.025 ml. |
|--------|-----------|

|                 |           |
|-----------------|-----------|
| Deionized water | 3.075 ml. |
|-----------------|-----------|

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| 10% Ammonium persulfate | 0.025 ml. |
|-------------------------|-----------|

|       |           |
|-------|-----------|
| TEMED | 0.005 ml. |
|-------|-----------|

## 3. Loading buffer (5x running buffer, พีเอช 8.3)

|           |         |
|-----------|---------|
| Tris base | 15.0 g. |
|-----------|---------|

|         |         |
|---------|---------|
| Glycine | 72.0 g. |
|---------|---------|

|     |        |
|-----|--------|
| SDS | 5.0 g. |
|-----|--------|

|                 |           |
|-----------------|-----------|
| Distilled water | 1,000 ml. |
|-----------------|-----------|

## 4. Sample buffer

|          |         |
|----------|---------|
| Glycerol | 0.8 ml. |
|----------|---------|

|                |         |
|----------------|---------|
| 0.5 M Tris-HCl | 1.0 ml. |
|----------------|---------|

|        |         |
|--------|---------|
| 10%SDS | 1.6 ml. |
|--------|---------|

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Beta-mercaptoethanol | 0.4 ml. |
|----------------------|---------|

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| 0.05%(w/v) bromophenol blue | 0.2 ml. |
|-----------------------------|---------|

|                 |         |
|-----------------|---------|
| Distilled water | 4.0 ml. |
|-----------------|---------|

## ภาคผนวก จ

### การทำ Thin-layer chromatography (Kqueen และคณะ 1999)

1. นำตัวอย่างน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ปริมาตร 10 ul หยดลงบน stationary phase โดยใช้ หลอด capillary สำหรับ stationary phase ที่ใช้คือ silica gel และ สารละลายน้ำตาลมาตรฐานคือ ไซโลส และ xylooligosaccharide
2. นำแผ่น silica gel มาแช่ใน chamber ที่มี mobile phase คือ สารผสมของ butanol : 2-propanol : H<sub>2</sub>O : Acetic acid (7 : 5 : 4 : 2)
3. รอจน mobile phase เคลื่อนที่จนถึง solvent front (15 cm.) และเป่าให้แห้งโดยใช้ hair dryer
4. นำแผ่น silica gel ไปพ่นโดย developing agent (p-anisaldehyde : sulfuric acid : ethanol อัตราส่วน 1 : 1 : 18)
5. นำไปอบที่ 120 °C นาน 3 นาที และสังเกตสีที่เกิดขึ้น



ภาคผนวก ข

ตารางแสดงผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์

ตาราง 7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท

| เวลา (นาที) | ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่อุณหภูมิต่างๆ (mg/ml.) |      |      |      |      |      |
|-------------|------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
|             | 30                                                   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   |
| 5           | 0.16                                                 | 0.33 | 0.69 | 0.50 | 0.56 | 0.52 |
| 10          | 0.44                                                 | 0.85 | 1.15 | 1.04 | 0.75 | 0.73 |
| 15          | 0.67                                                 | 1.37 | 0.92 | 1.1  | 0.99 | 1.41 |
| 20          | 0.95                                                 | 1.55 | 1.34 | 1.19 | 1.13 | 1.39 |
| 25          | 1.18                                                 | 1.95 | 1.38 | 1.67 | 1.59 | 1.35 |
| 30          | 1.01                                                 | 2.74 | 1.84 | 1.76 | 1.22 | 1.38 |
| 40          | 1.91                                                 | 2.28 | 1.98 | 2.03 | 1.61 | 0.91 |
| 50          | 1.93                                                 | 2.46 | 2.04 | 2.66 | 1.81 | 0.97 |
| 60          | 2.17                                                 | 2.94 | 2.18 | 2.66 | 1.76 | 1.16 |

ตาราง 8 การผลิตเอนไซม์ของเชื้อ ไอโซเลต D01 ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

| เวลา (วัน) | อุณหภูมิ (°C)    |                  |                  |                  |                  |                  |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|            | 20               |                  | 25               |                  | 30               |                  |
|            | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตี จำเพาะ | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตี จำเพาะ | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตี จำเพาะ |
| 1          | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                |
| 2          | 0.55             | 0.34             | 0.92             | 0.62             | 3.26             | 1.98             |
| 3          | 0.68             | 0.45             | 3.01             | 2.00             | 7.07             | 4.36             |
| 4          | 6.89             | 4.74             | 14.33            | 12.14            | 14.15            | 8.84             |
| 5          | 10.09            | 6.15             | 13.65            | 10.5             | 4.74             | 10.35            |

ตาราง 9 ผลของ พีเอช เริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus* D01

| พีเอช | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตีจำเพาะ (U/mg) |
|-------|------------------|------------------------|
| 3     | 0.89             | 0.45                   |
| 4     | 8.64             | 4.97                   |
| 5     | 17.96            | 8.51                   |
| 6     | 14.56            | 7.28                   |
| 7     | 4.94             | 2.61                   |
| 8     | 1.35             | 0.81                   |

ตาราง 10 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus* D01

| อุณหภูมิ (°C) | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตีจำเพาะ (U/mg) |
|---------------|------------------|------------------------|
| 20            | 10.87            | 6.62                   |
| 25            | 17.74            | 13.64                  |
| 30            | 23.43            | 14.2                   |
| 37            | 0                | 0                      |
| 45            | 0                | 0                      |

ตาราง 11 ผลของพีเอชต่อการทำงานของ crude ไซลาลเนส

| พีเอช | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตีสัมพัทธ์ (%) |
|-------|------------------|-----------------------|
| 3     | 8.95             | 57.9                  |
| 4     | 12.51            | 80.9                  |
| 5     | 15.46            | 100                   |
| 6     | 14.22            | 91.9                  |
| 7     | 13.00            | 84.1                  |
| 8     | 13.12            | 84.86                 |

ตาราง 12 ความเสถียรของ crude ไชลาเนสต่อค่าพีเอช

| พีเอช | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตีที่เหลือ (%) |
|-------|------------------|-----------------------|
| 3     | 1.72             | 14.3                  |
| 4     | 7.37             | 61.3                  |
| 5     | 12.02            | 100                   |
| 6     | 11.59            | 96.4                  |
| 7     | 9.32             | 77.5                  |
| 8     | 11.71            | 97.4                  |

ตาราง 13 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของ crude ไชลาเนส

| อุณหภูมิ (°C) | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตีสัมพัทธ์ (%) |
|---------------|------------------|-----------------------|
| 30            | 8.09             | 36.8                  |
| 40            | 13.24            | 60.2                  |
| 50            | 21.98            | 100                   |
| 60            | 16.01            | 72.8                  |
| 70            | 16.56            | 75.3                  |
| 80            | 16.28            | 74.06                 |

ตาราง 14 ความคงตัวของ crude ไชลาเนส ต่ออุณหภูมิ

| อุณหภูมิ (°C) | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตีที่เหลือ (%) |
|---------------|------------------|-----------------------|
| 30            | 17.20            | 100                   |
| 40            | 16.56            | 96.3                  |
| 50            | 12.36            | 71.9                  |
| 60            | 7.08             | 41.2                  |
| 70            | 3.86             | 22.4                  |
| 80            | 3.77             | 21.9                  |

ตาราง 15 ผลของ พีเอช ต่อกิจกรรมของไลลาเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

| พีเอช | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตีสัมพัทธ์(%) |
|-------|------------------|----------------------|
| 3     | 2.07             | 16.6                 |
| 4     | 11.52            | 92.2                 |
| 5     | 12.50            | 100                  |
| 6     | 10.41            | 83.3                 |
| 7     | 5.69             | 45.5                 |
| 8     | 5.28             | 42.2                 |

ตาราง 16 ผลความเสถียรของ ไลลาเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์พีเอช

| พีเอช | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตีที่เหลือ (%) |
|-------|------------------|-----------------------|
| 3     | 1.35             | 12.9                  |
| 4     | 10.03            | 95.8                  |
| 5     | 10.47            | 100                   |
| 6     | 9.53             | 91                    |
| 7     | 5.84             | 55.8                  |
| 8     | 5.99             | 57.2                  |

ตาราง 17 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของไลลาเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

| อุณหภูมิ (°C) | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตีสัมพัทธ์(%) |
|---------------|------------------|----------------------|
| 30            | 3.75             | 40.7                 |
| 40            | 8.54             | 92.7                 |
| 50            | 9.21             | 100                  |
| 60            | 8.73             | 94.8                 |
| 70            | 8.02             | 87.1                 |
| 80            | 2.27             | 24.6                 |

ตาราง 18 ความเสถียรของไลลาเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ต่ออุณหภูมิ

| อุณหภูมิ (°C) | แอกติวิตี (U/ml) | แอกติวิตีที่เหลือ (%) |
|---------------|------------------|-----------------------|
| 30            | 12.69            | 100                   |
| 40            | 10.63            | 83.8                  |
| 50            | 7.73             | 60.9                  |
| 60            | 3.39             | 26.7                  |
| 70            | 0                | 0                     |
| 80            | 0                | 0                     |

### ประวัติการศึกษา

|                   |                                                                                                                                                                                            |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อ              | นายนคร หน่อแก้ว                                                                                                                                                                            |
| วัน เดือน ปี เกิด | 23 มีนาคม 2520                                                                                                                                                                             |
| ประวัติการศึกษา   | สำเร็จมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนแม่แตงจังหวัดเชียงใหม่<br>ปีการศึกษา 2537<br>สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2541 |
| ที่อยู่ติดต่อได้  | 90 หมู่ 1 ต. สันมหาพน อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ 50150 โทร 053-470153                                                                                                                          |