

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

Potato dextrose agar (PDA) ประกอบด้วย

peeled, diced potato	200	g
dextrose	20	g
agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml
pH 5.0		

ต้มชิ้นมันฝรั่งที่หั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยมเล็กๆ ในน้ำกลั่น 500 ml เมื่อเดือดให้ต้มด้วยไฟอ่อนต่ออีก 15 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง บีบมันฝรั่งให้ละเอียดเพื่อให้ได้กากละเอียดผ่านออกมาด้วย ส่วนวุ้นและ dextrose ต้มรวมกันในน้ำกลั่นอีกส่วนหนึ่งจนละลายหมด นำส่วนผสมทั้งสองส่วนมารวมกันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml เทใส่ขวดอาหาร นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Malt extract agar with rose bengal (MA with rose bengal) ประกอบด้วย

malt extract	20	g
agar	15	g
rose bengal	0.033	g
chloramphenical	0.05	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 ml ต้มจนวุ้นละลาย เทใส่ขวดอาหาร นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Corn-meal agar (CMA) ประกอบด้วย

ข้าวโพดป่น	30	g
agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ต้มข้าวโพดป่นในน้ำกลั่น 500 ml เมื่อเดือดให้ต้มด้วยไฟอ่อนต่ออีก 15 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง ส่วนวุ้นแยกต้มในน้ำกลั่นอีกส่วนหนึ่งจนละลายหมด นำส่วนผสมทั้งสองส่วนมารวม

กัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml เทใส่ขวดอาหาร นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

water agar ที่โรยด้วยเมล็ดข้าวเหนียว (WA+S) ประกอบด้วย

agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml
เมล็ดข้าวเหนียว	1	ช้อนโต๊ะ

ต้มวุ้นในน้ำกลั่นจนละลายดี เทใส่ขวดอาหาร ส่วนเมล็ดข้าวแยกใส่จานอาหาร นำทั้งส่วนไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที สำหรับเมล็ดข้าวนำไปอบคั่วในตู้อบเพื่อให้แห้งดีก่อนที่จะนำไปโรยให้ทั่วผิวหน้าอาหารขณะอาหารวุ้นที่เทลงบนจานอาหารเริ่มจะแข็งตัว

Locust bean gum agar (LBA) ประกอบด้วย

KH_2PO_4	2.0	g
NaNO_3	2.0	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3	g
corn steep solids	1.0	g
trance metal solution	1.0	ml
locust bean gum	5.0	g
agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml
pH 5.5		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 ml ยกเว้น locust bean gum ซึ่งละลายยากควรค่อยๆ เทผสมลงไปเป็นอันดับสุดท้ายบนเครื่อง magnetic stirrer ปรับ pH ต้มจนวุ้นละลาย เทใส่ขวดอาหาร นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed medium) ประกอบด้วย

KH_2PO_4	2.0	g
NaNO_3	2.0	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3	g
corn steep solids	1.0	g
trace metal solution	1.0	ml
locust bean gum	5.0	g
น้ำกลั่น	1000	ml
pH 5.5		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 ml ยกเว้น locust bean gum ค่อยๆ เทผสมลงไป เป็นอันดับสุดท้ายบนเครื่อง magnetic stirrer ปรับ pH ต้มจนวุ้นละลาย เทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ขวดละ 50 ml ใส่ glass bead ลงไปขวดละ 4-5 เม็ด นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อการผลิต mannanase (cultivation medium)

ประกอบด้วย

KH_2PO_4	2.0	g
NaNO_3	2.0	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3	g
corn steep solids	1.0	g
trace metal solution	1.0	ml
locust bean gum	10.0	g
น้ำกลั่น	1000	ml

pH 5.5

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 ml ยกเว้น locust bean gum ค่อยๆ เทผสมลงไป เป็นอันดับสุดท้ายบนเครื่อง magnetic stirrer ปรับ pH ต้มจนวุ้นละลาย เทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ขวดละ 50 ml ใส่ glass bead ลงไปขวดละ 4-5 เม็ด นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

trance metal solution

MnSO ₄ ·2H ₂ O	1.16	g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.14	g
CoCl ₂ anhydrous	0.20	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	g
น้ำกลั่น	100	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันดี เก็บไว้ในขวดสีชา

อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อราเพื่อทดสอบการผลิต mannanase 3 สูตร ได้แก่

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบ	%w/v	reference
1	Glucose	0.30	ดัดแปลงจาก Utho and Peberdy, 1991
	Peptone	0.10	
	Urea	0.03	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.14	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03	
	CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.03	
	Trance metal solution	0.10	
	Locust bean gum	1.00	
	pH 5.5		
2	KH ₂ PO ₄	0.05	Ooi and Kikuchi, 1995
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	
	Peptone	0.50	
	Locust bean gum	1.00	
	pH 6.5		
3	KH ₂ PO ₄	0.20	Araujo and Ward, 1990
	NaNO ₃	0.20	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.03	
	Corn steep solids	0.10	
	Trance metal solution	0.10	
	Locust bean gum	1.00	
	pH 5.5		

ภาคผนวก ข

การทำ slide culture และสไลด์กึ่งถาวร

การทำ slide culture

1. เตรียมอาหาร PDA ในจานอาหาร โดยเทอาหารให้หนาประมาณ 2 มิลลิเมตร
2. เมื่ออาหารแข็งตัวดีแล้ว ใช้มีดปาดเนื้อติดวุ้นให้เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 0.5 x 0.5 mm
3. นำชิ้นวุ้นมาวางบนสไลด์ที่วางอยู่บนแท่งแก้วรูปตัววีในจานอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว
4. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อรามาแต่ละบริเวณด้านข้างทั้งสองด้านของชิ้นวุ้น
5. คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ที่เตรียมไว้ในจานอาหารซึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาปิดบนชิ้นวุ้น โดยให้ชิ้นวุ้นอยู่ตรงกลางพอดี
6. ใส่ก้อนสำลีที่ชุบน้ำพอลิเมอร์และฆ่าเชื้อแล้วในแต่ละจานๆ ละ 1 ก้อน เพื่อช่วยให้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่แห้งและแห้งจนเกินไป บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วันหรือนานกว่านี้ขึ้นอยู่กับ การเจริญของเชื้อแต่ละชนิด นำมาตรวจสอบลักษณะของเชื้อราที่ต้องการศึกษา และนำไปทำเป็น สไลด์กึ่งถาวรต่อไป

การทำสไลด์กึ่งถาวร

1. ใช้ปากคีบจับแผ่นแก้วปิดสไลด์ออกมาจากชิ้นวุ้น และค่อยๆ หยิบชิ้นวุ้นทิ้งไป จะได้ ตัวอย่างเชื้อรา 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่เจริญบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ และตัวอย่างที่เจริญบนแผ่น สไลด์
2. หยด 95% เอทานอลเพื่อกำจัดสปอร์ที่มากเกินไปออกไปบ้าง และเพื่อไล่ฟองอากาศ ออกจากเส้นใยเชื้อรา แล้วเอียงทิ้งไป ชุบเบาๆ ด้วยกระดาษทิชชูตรงมุมที่เอทานอลไหลออกมา ระวังอย่าให้เส้นใยเสียหาย
3. หยด lactophenol หรือ lactophenol cottonblue 1 หยดลงบนบริเวณที่มีเชื้ออยู่ ปิดทับ ด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์อันใหม่ ส่วนแผ่นแก้วปิดสไลด์ที่มีเชื้ออยู่อีกอันก็ทำเช่นเดียวกัน เพียงแต่ หยดน้ำยาบนสไลด์แผ่นเดียวกันบริเวณข้างๆ หรืออาจทำบนสไลด์แผ่นใหม่ แล้วคว่ำด้านที่มีเชื้ออยู่ ลงบนน้ำยา ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เช็ดน้ำยาส่วนเกินให้แห้งโดยใช้กระดาษทิชชูชุบน้ำยา
4. ใช้เข็มเขี่ยแผ่นแก้วปิดสไลด์ให้ตรง แล้วทาขอบรอบๆ แผ่นแก้วปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทา เล็บ ทิ้งให้แห้ง แล้วทาซ้ำอีกรอบ จะได้สไลด์กึ่งถาวรตามต้องการ

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดเอนไซม์โดยวิธี gel diffusion

Phosphate Buffer ประกอบด้วย

Stock solutions

A : 0.2M สารละลายของ monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.8 g ในน้ำกลั่น 1000 ml)

B : 0.2M สารละลายของ dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 56.65 g หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.7 g ในน้ำกลั่น 1000 ml)

Working stock

x ml of A + y ml of B เจือจางในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 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

Congo red 1.0% ประกอบด้วย

Congo red 10 g

NaNO_3 0.5 g

ละลายส่วนผสมทั้งสองใน 0.2M K_2HPO_4 (34.8g ในน้ำกลั่น 1000 ml) ควรเตรียมใหม่
ทุกครั้งก่อนใช้

1M NaCl ประกอบด้วย

NaCl	49	g
น้ำกลั่น	100	ml

นำ NaCl ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยแท่งแก้วคน

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method**DNS-reagent ประกอบด้วย**

3,5 dinitrosalicylic acid	1%
phenol	0.2%
Na ₂ SO ₃	0.05%
NaOH	1%

ละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid ในสารละลาย NaOH คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงเติม phenol และ Na₂SO₃ ปริมาณให้เป็น 100 ml เก็บในขวดสีชา

Sodium potassium tartrate 40%

นำ Na-K tartrate 40 g มาละลายในน้ำกลั่น 100 ml คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

Sodium acetate Buffer ประกอบด้วย**Stock solutions**

A : 0.2M สารละลายของ acetic acid (11.55 g ในน้ำกลั่น 1000 ml)

B : 0.2M สารละลายของ sodium acetate (C₂H₃O₂Na 16.4 g หรือ C₂H₃O₂Na.3H₂O 27.2 g ในน้ำกลั่น 1000 ml)

Working stock

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

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

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method

สารละลาย A (A-reagent) ประกอบด้วย

Na_2CO_3 2.0%

NaOH 0.1M

เตรียมโดยชั่ง NaOH 0.4 g ละลายในน้ำกลั่น เติม Na_2CO_3 2 g ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

สารละลาย B (B-reagent) ประกอบด้วย

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5%

Na-K tartrate 1.0%

เตรียมโดยชั่ง Na-K tartrate 1 g ละลายในน้ำกลั่น เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

สารละลาย C (C-reagent) ประกอบด้วย

A-reagent 50 ml

B-reagent 1 ml

ผสมสารละลายทั้งสองให้เป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

สารละลาย D (D-reagent) ประกอบด้วย

Folin-ciocalteu reagent

น้ำกลั่น

เจือจาง Folin-ciocalteu reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

ภาคผนวก ง

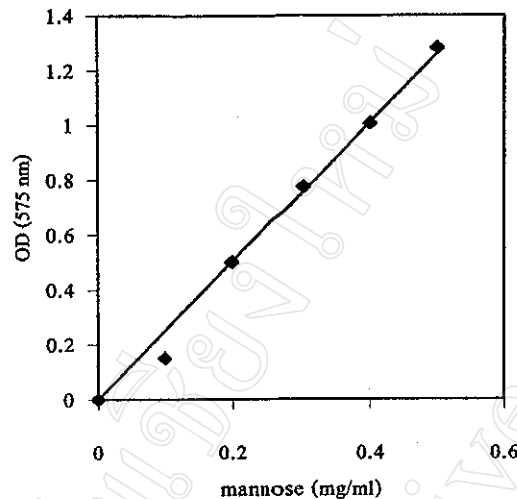
กราฟมาตรฐาน การหาปริมาณแอนไซม์และโปรตีน

การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย mannose (วัดนัลลีย์ และสรวง,2536)

1. เตรียม stock solution ของ mannose ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยชั่ง mannose 0.10 g ละลายในน้ำกลั่นใน volumetric flask ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน mannose ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 mg/ml โดยนำสารละลายจาก stock solution ปริมาตร 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 ml ใส่ในหลอดทดลอง 11 หลอดตามลำดับ เติมน้ำกลั่นให้แต่ละหลอดมีปริมาตรครบ 1 ml จะได้ความเข้มข้นตามลำดับข้างต้น
3. เติมน้ำ DNS-reagent 2.0 ml นำไปอุ่นในน้ำเคี่ยอนาน 15 นาที
4. เติมน้ำ Na-K tartrate 40% 1.0 ml ทันที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm ได้ผลดังตาราง 32 แล้วนำผลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน ดังภาพ 50

ตาราง 32 ปริมาณ mannose และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm

Standard No.	Mannose concentration(mg/l)	Absorbance
1	0.0	0.000
2	0.1	0.189
3	0.2	0.460
4	0.3	0.745
5	0.4	1.021
6	0.5	1.249
7	0.6	1.510
8	0.7	1.765
9	0.8	1.969
10	0.9	2.160
11	1.0	2.348



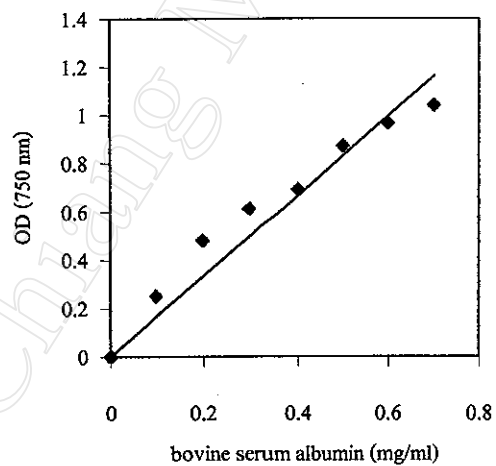
ภาพ 50 กราฟมาตรฐานของ mannose กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm

การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน (bovine serum albumin)

1. เตรียม stock solution ของ bovine serum albumin ความเข้มข้น 0.50 mg/ml โดยชั่ง bovine serum albumin 0.10 g ละลายในน้ำกลั่นใน volumetric flask ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 mg/ml โดยนำสารละลายจาก stock solution ปริมาตร 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 ml ใส่ในหลอดทดลอง 11 หลอดตามลำดับ เจือจางด้วยการเติมน้ำกลั่นให้แต่ละหลอดมีปริมาตรครบ 1 ml จะได้ความเข้มข้นตามลำดับข้างต้น
3. นำสารละลาย bovine serum albumin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆอย่างละ 0.10 ml ใส่ในหลอดทดลอง
4. เติมสารละลาย C-reagent 5.0 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
5. เติมสารละลาย D-reagent 0.5 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
6. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm ได้ผลดังตาราง 33 แล้วนำผลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน ดังภาพ 51

ตาราง 33 ปริมาณ bovine serum albumin และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm

Standard No.	Bovine serum albumin concentration (mg/l)	Absorbance
1	0.0	0.000
2	0.1	0.250
3	0.2	0.480
4	0.3	0.613
5	0.4	0.692
6	0.5	0.873
7	0.6	0.966
8	0.7	1.041
9	0.8	1.216
10	0.9	1.255
11	1.0	1.458



ภาพ 51 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm

การหาปริมาณเอนไซม์และโปรตีน

การตรวจวัด mannanase activity

mannanase activity วัดได้จากปริมาณน้ำตาล mannose ที่ถูกปล่อยออกมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate โดยวิธีของ Alberto and Own (1990) ใช้ 3-5-dinitrosalicylic reagent (DNS) เป็นตัวทำปฏิกิริยากับ mannose ในการทำกราฟมาตรฐาน โดยมี locust bean gum 1% (w/v) ใน 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.6 เป็น substrate

การตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์จาก reaction mixture ทำได้โดยนำเตรียม reaction mixture ทั้ง 4 ชนิดดังตาราง 34 ในอ่างน้ำแข็งก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที เติม DNS-reagent ลงไปหลอดละ 2.0 ml นำไปอุ่นในน้ำเดือดนาน 15 นาที เติม Na-K tartrate 40% 1.0 ml ทันที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD 575 nm นำผลที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาล mannose แต่ถ้าไม่สามารถวัดได้ให้เจือจาง crude enzyme แล้วเตรียม reaction mixture ใหม่ ผ่านขั้นตอนต่างๆเช่นเดิมจนสามารถวัดได้

ตาราง 34 การเตรียม reaction mixture ของเอนไซม์กับ substrate

Reaction	Reaction mixture		
	Crude enzyme (ml)	Substrate (ml)	Sodium acetate buffer (ml)
1. control (C)	0.0	0.0	1.0
2. enzyme+substrate (ES)	0.5	0.5	0.0
3. enzyme blank (EB)	0.5	0.0	0.5
4. substrate blank (SB)	0.0	0.5	0.5

หน่วยการทำงานของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ออกมา 1 μmol ภายในเวลา 1 นาที

ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงสุทธิ (ΔA) ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่า ΔA หาได้ดังนี้

$$\Delta A = ES - EB - SB$$

การคำนวณ mannanase activity

จากการทดลองใช้เวลา 30 นาที ได้ mannose	=	X mg
คิดเป็น (molecular weight ของ mannose=180.2)		$X \times 10^3 / 180.2 \mu\text{mol}$
ดังนั้นในเวลา 1 นาที จะได้ mannose	=	$X \times 10^3 / 180.2 / 30 \mu\text{mol}$
จากการทดลองใช้ปริมาณ crude enzyme*	=	0.5 ml
ดังนั้นมีค่า mannanase activity	=	$X \times 10^3 / 180.2 / 30 / 0.5 \text{ U/ml}$

*เนื่องจาก crude enzyme มีความเข้มข้นสูงจึงต้องเจือจาง 100 เท่า ก่อนนำมาเตรียม reaction mixture

การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry method

การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry method นี้เป็นวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีไบยูเรท โดยที่เริ่มแรกจะใช้สารละลาย copper ไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu (Phosphomolybdic-phosphotungstic mixed acid) ลงไป กรณีนี้จะปรีดิคซ์ copper complex ให้เป็นสารละลายสีน้ำเงินเข้ม ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมที่จะหาอยู่ระหว่าง 0.1-1.0 mg/ml ซึ่งทำให้วิธีนี้มีความไวกว่าวิธีไบยูเรท (ขวนพิศ, ไม่ระบุปีที่พิมพ์)

การวัดปริมาณโปรตีนของ crude enzyme ทำได้โดยนำ crude enzyme มา 0.1 ml เติมสารละลาย C-reagent 5.0 ml {C-reagent ประกอบด้วย A-reagent (2% w/v Na_2CO_3 ใน 0.1M NaOH) และ B-reagent (0.5% w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน 1% Na-K tartrate)} ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วเติมสารละลาย D-reagent 0.5 ml (D-reagent ประกอบด้วย 1N Folin-Ciocalteu reagent) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD 750 nm นำผลที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) แต่ถ้าไม่สามารถวัดได้ให้เจือจาง crude enzyme จนสามารถวัดได้

การหาค่า specific activity ของเอนไซม์

ในการสกัดเอนไซม์จากแหล่งใดก็ตามสิ่งสำคัญที่ควรจะต้องทราบเป็นอันดับแรกคือ ปริมาณของเอนไซม์ที่เตรียมได้ ซึ่งหาได้โดยการวัดประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งจะออกมาในรูปของ enzyme unit ในสารละลายที่สกัดได้นอกจากมีเอนไซม์แล้วยังมีโปรตีนชนิดอื่นๆ และโมเลกุลอื่นๆปนอยู่ด้วย การบ่งบอกปริมาณเอนไซม์เป็นน้ำหนักจึงไม่ถูกต้อง ปริมาณเอนไซม์

ในกรณีเอนไซม์ยังไม่บริสุทธิ์จึงมักวัดในรูป specific activity ซึ่งเป็นหน่วยสากล คือ ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาในรูปหน่วยของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

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

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวสุธีรา ทองกันทา

วัน เดือน ปีเกิด

วันที่ 4 มิถุนายน 2517

ประวัติการศึกษา

สำเร็จชั้นประถมศึกษา ปีการศึกษา 2528

จากโรงเรียนชุมชนบ้านแม่ใส จังหวัดพะเยา

สำเร็จชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น (วิทย์-คณิต)

ปีการศึกษา 2531 จากโรงเรียนพะเยาพิทยาคม

จังหวัดพะเยา

สำเร็จชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย (วิทย์-คณิต)

ปีการศึกษา 2534 จากโรงเรียนพะเยาพิทยาคม

จังหวัดพะเยา

สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี (วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา

จุลชีววิทยา) ปีการศึกษา 2539 จากภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ที่อยู่

69 หมู่ 6 ถนนพะเยา-ป่าแดด ตำบลห้วยแก้ว

กิ่งอำเภอภูพานขาว จังหวัดพะเยา 56000

โทรศัพท์ 054-483088