

## ภาคผนวก

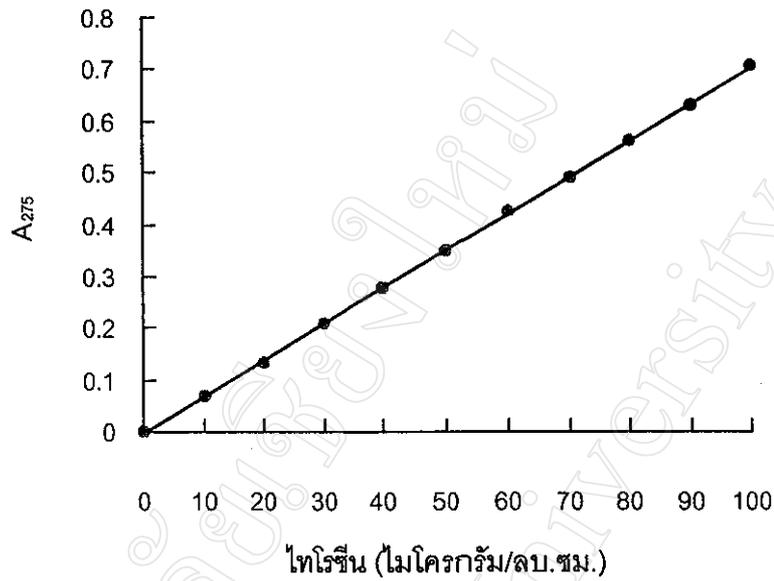
### 1. การคำนวณแอกติวิตีของโปรตีนโดยวิธีไฮโดรไลซิสเคซีน

การวิเคราะห์แอกติวิตีของไรบอสโปรตีนโดยวิธีนี้ เป็นการวัดอัตราการเร่งปฏิกิริยาของการไฮโดรไลซิสเคซีน ซึ่งทำได้โดยวัดความเข้มข้นของสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ไม่ตกตะกอน หลังจากหยุดปฏิกิริยาด้วย TCA ด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายไทโรซีนมาตรฐาน ซึ่งจะช่วยให้ทราบปริมาณของสารผลิตภัณฑ์จากความเข้มข้นของไทโรซีน และคำนวณแอกติวิตีโปรตีน ซึ่งเทียบจากปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของโปรตีนเท่ากับ 1 ไมโครโมล ของผลิตภัณฑ์หรือไทโรซีนในภาวะที่ทดลอง ต่อ 1 นาที

กราฟมาตรฐานไทโรซีนได้จากการเจือจางสารละลายไทโรซีน  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  ด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  โดยให้ปริมาตรของสารละลายสุดท้ายเป็น 5 ลบ.ซม. นำสารละลายไปวัดค่า  $A_{275}$  และใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายเปรียบเทียบจากค่าที่ได้ในตาราง ผ.1 นำไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง  $A_{275}$  กับความเข้มข้นของไทโรซีนได้ดังในรูป ผ.1

ตาราง ผ.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ของสารละลายไทโรซีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 10-100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$

สารละลายไทโรซีนมาตรฐาน ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )	$A_{275}$			
	1	2	3	เฉลี่ย
10	0.071	0.063	0.066	0.067
20	0.143	0.123	0.137	0.134
30	0.216	0.199	0.209	0.208
40	0.283	0.271	0.275	0.276
50	0.357	0.338	0.349	0.348
60	0.431	0.414	0.424	0.423
70	0.496	0.480	0.494	0.490
80	0.569	0.550	0.563	0.560
90	0.638	0.618	0.638	0.631
100	0.709	0.696	0.707	0.704



รูป ผ.1 กราฟมาตรฐานไทโรซีน

จากการตรวจหาแอกติวิตีโปรตีนของสารตัวอย่าง ค่า  $A_{275}$  ที่วัดได้ นำไปเทียบหาความเข้มข้นของไทโรซีนจากกราฟรูป ผ.1

ความชันของกราฟ (s)	=	$0.276/40$
	=	$6.9 \times 10^{-3}$ ลบ.ชม./ไมโครกรัม
ได้ความเข้มข้นไทโรซีน	=	$A_{275}/s$
	=	$A_{275}/6.9 \times 10^{-3}$ ไมโครกรัม/ลบ.ชม.
เนื่องจากปริมาตรของสารละลายในปฏิกิริยา	=	$V_t$ ลบ.ชม.
นั่นคือปริมาณผลิตภัณฑ์เทียบเท่ากับไทโรซีน	=	$V_t \times (A_{275}/6.9 \times 10^{-3})$ ไมโครกรัม
เนื่องจากมวลโมเลกุลไทโรซีน	=	181.19 กรัม/โมล
ดังนั้น จำนวนโมลของผลิตภัณฑ์เทียบเท่ากับไทโรซีน	=	$\frac{V_t \times A_{275}}{1.25}$ โมล
เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา	=	10 นาที
สารละลายตัวอย่างเอนไซม์ที่ใช้ทดลอง	=	$V_0$ ลบ.ชม.
ดังนั้นสารละลายตัวอย่างนี้ทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์เทียบเท่ากับไทโรซีน	=	$\frac{V_t \times A_{275}}{1.25 \times 10 \times V_0}$ โมล/ลบ.ชม. นาที

เมื่อกำหนดให้ 1 ยูนิต โปรตีน คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ตกตะกอนเทียบเท่ากับไทโรซีนซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ที่สภาวะการทดลอง

$$\text{นั่นคือ สารละลายตัวอย่างมีแอกติวิตีโปรตีน} = \frac{V_t \times A_{275}}{12.5 \times V_o} \quad \text{ยูนิต/ลบ.ชม.}$$

จากความสัมพันธ์นี้สามารถใช้คำนวณหาแอกติวิตีของโปรตีนในสารตัวอย่างทั่วเคาะห้ทั้งหมด

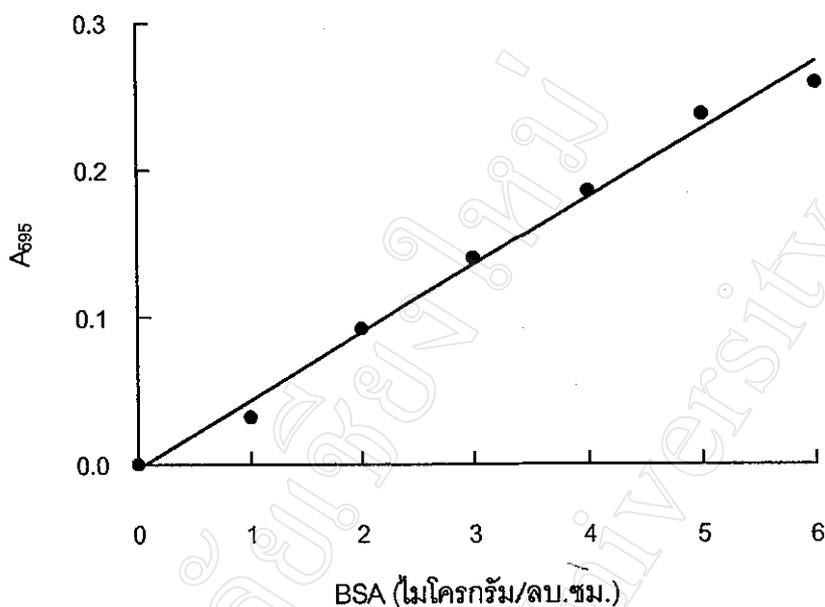
## 2. การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีน ทำได้โดยการวัดความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการจับกันระหว่างสารละลายโปรตีนกับสีย้อม (Coomassie brilliant blue G-250) ในสารละลายกรด ด้วยค่าการดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA และคำนวณปริมาณโปรตีนซึ่งเทียบจากปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น

กราฟมาตรฐานโปรตีนโดยเตรียมจากเจือจางสารละลาย BSA 1 มก./ลบ.ชม. ให้มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มก./ลบ.ชม. ด้วยน้ำกลั่น ให้สารละลายมีปริมาตรรวม 5 ลบ.ชม. ซึ่งมีสารละลายสีย้อมในปริมาตร 4.3 ลบ.ชม. เขย่าสารละลาย แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่เติมน้ำกลั่นแทน BSA เป็นสารละลายเปรียบเทียบ ผลการใช้ BSA เป็นสารมาตรฐานในการหาปริมาณโปรตีน ได้ค่า  $A_{595}$  ดังแสดงในตาราง ผ.2 ซึ่งเขียนกราฟความสัมพันธ์ของ  $A_{595}$  กับความเข้มข้นของ BSA ได้ผลดังรูป ผ.2

ตาราง ผ.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจาก BSA ที่ความเข้มข้น 1-6 mg/cm<sup>3</sup> กับ Coomassie brilliant blue

สารละลาย BSA (μg/cm <sup>3</sup> )	$A_{595}$			
	1	2	3	เฉลี่ย
1	0.036	0.017	0.042	0.032
2	0.103	0.074	0.098	0.092
3	0.149	0.130	0.140	0.140
4	0.188	0.151	0.218	0.186
5	0.229	0.210	0.274	0.238
6	0.258	0.235	0.284	0.259



รูป ๒.2 กราฟมาตรฐาน BSA

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างนั้น ทำโดยเทียบจากค่า  $A_{595}$  ของสารตัวอย่างกับ  
กราฟมาตรฐาน BSA ซึ่งมีความชันของกราฟ (s) = 0.140/3

$$= 0.047 \text{ ลบ.ซม./ไมโครกรัม}$$

ได้ความเข้มข้น BSA

$$= A_{595}/s$$

$$= A_{595}/0.047 \text{ ไมโครกรัม/ลบ.ซม.}$$

เนื่องจากปริมาตรของสารละลายในปฏิกิริยา

$$= V_t \text{ ลบ.ซม.}$$

นั่นคือปริมาณผลิตภัณฑ์เทียบเท่ากับ BSA

$$= V_t \times (A_{595}/0.047) \text{ ไมโครกรัม}$$

ใช้สารละลายตัวอย่างเอนไซม์

$$= V_o \text{ ลบ.ซม.}$$

ดังนั้นสารละลายตัวอย่างนี้ทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์เทียบเท่ากับ BSA

$$= \frac{V_t \times A_{595}}{0.047 \times V_o \times 1000} \text{ มิลลิกรัม}$$

$$0.047 \times V_o \times 1000$$

นั่นคือ สารละลายตัวอย่างมีปริมาณโปรตีน

$$= \frac{V_t \times A_{595}}{47 \times V_o} \text{ มิลลิกรัม}$$

$$47 \times V_o$$

จากความสัมพันธ์นี้สามารถใช้คำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมดได้

### 3. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl<sup>(68)</sup>

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยคิดเทียบจากไนโตรเจนทั้งหมดในสารตัวอย่าง ทำได้โดยเริ่มต้นหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งใช้ KHP เป็นสารมาตรฐานปฐมภูมิ 20 ลบ.ซม. ไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 ครั้ง ซึ่งผลการทดลองแสดงในตาราง ผ.3 และสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้ดังนี้

ตาราง ผ.3 ปริมาตร NaOH ที่ใช้ในการไทเทรตกับ 0.1000 M KHP 20 ลบ.ซม. โดยมีเมทิลเรดเป็นอินดิเคเตอร์

การทดลอง	1	2	3	เฉลี่ย
ปริมาตร NaOH (ลบ.ซม.)	19.20	19.30	19.00	19.20

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

โดย

$$M_1 = \text{ความเข้มข้นของสารละลาย KHP} = 0.1 \text{ M}$$

$$V_1 = \text{ปริมาตรของสารละลาย KHP} = 20 \text{ ลบ.ซม.}$$

$$M_2 = \text{ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์}$$

$$V_2 = \text{ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์} = 19.2 \text{ ลบ.ซม.}$$

จะได้ว่า

$$0.1000 \times 20 = M_2 \times 19.20$$

$$M_2 = \frac{0.1000 \times 20}{19.20}$$

$$19.20$$

ดังนั้น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มีความเข้มข้นที่แน่นอนเท่ากับ 0.1042 M

การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (0.1042 M) เป็นสารมาตรฐานในการหาความเข้มข้นดังวิธีในข้อ 2.2.8.5 ค. ผลที่ได้แสดงในตาราง ผ.4 และสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกได้เช่นเดียวกัน

โดย  $M_1$  = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ = 0.1042 M  
 $V_1$  = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ = 20 ลบ.ซม.  
 $M_2$  = ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก  
 $V_2$  = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก = 22.50 ลบ.ซม.

ตาราง ผ.4 ปริมาตร HCl ที่ใช้ในการไทเทรตกับ 0.1042 M NaOH 20 ลบ.ซม. โดยมีฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

การทดลอง	1	2	3	เฉลี่ย
ปริมาตร HCl (ลบ.ซม.)	22.66	22.50	22.50	22.50

เพราะฉะนั้น สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมไว้มีความเข้มข้นที่แน่นอนเท่ากับ 0.0926 M

### ประวัติผู้เขียน

- ชื่อ นางสาวปัฐมาวดี ทะนันชัย
- วัน เดือน ปี เกิด 9 ตุลาคม 2517
- ประวัติการศึกษา
- 1) มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนนารีรัตน์จังหวัดแพร่ พ.ศ. 2535
  - 2) ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ.2539
- ผลงานวิจัย
- 1) ปัฐมาวดี ทะนันชัย และ ภาวิณี คณาสวัสดิ์ (2542) การศึกษาการตกตะกอนโปรตีนและการทำแห้งยางมะละกอลองถิ่น งานประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 25, พิษณุโลก หน้า 786
  - 2) ปัฐมาวดี ทะนันชัย และ ภาวิณี คณาสวัสดิ์ (2543) การศึกษาการตรึงไรโอซอลโปรตีนบนไอออนแลกเปลี่ยนประจุ งานประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26, กรุงเทพฯ หน้า 579
  - 3) ปัฐมาวดี ทะนันชัย และ ภาวิณี คณาสวัสดิ์ (2543) Development of Dried Latex from Local Carica papaya for Soybean Protein Hydrolysis งานประชุมวิชาการ The 12<sup>th</sup> Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology "BIOTECHNOLOGY : IMPACTS & TRENDS", กาญจนบุรี หน้า 106