

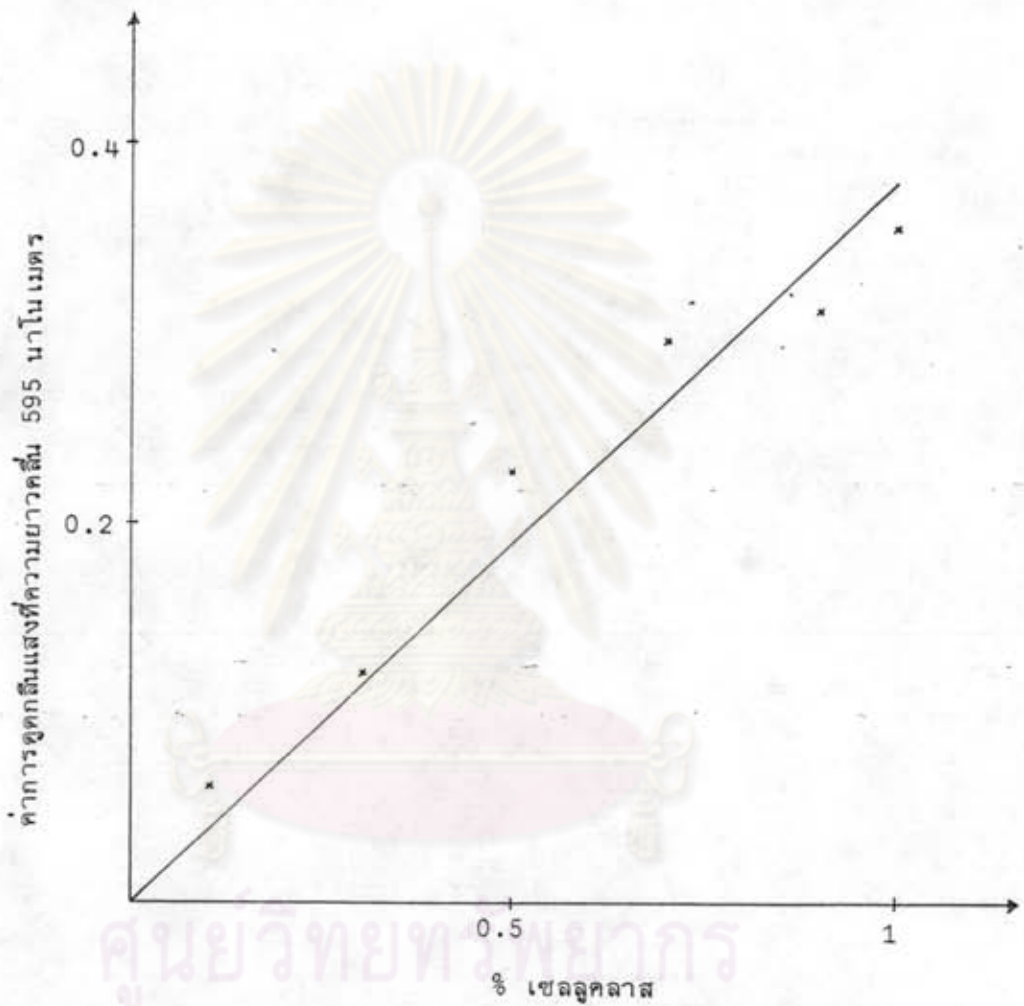
บทที่ 5

ผลการทดลอง

ตารางที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรต่อ % เซลลูโลส

| เซลลูโลส (%) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร |            |           |
|--------------|--|------------|-----------|
|              | ครั้งที่ 1                                   | ครั้งที่ 2 | ค่าเฉลี่ย |
| 1            | 0.334  | 0.382      | 0.358     |
| 0.9          | 0.268  | 0.356      | 0.312     |
| 0.7          | 0.240  | 0.352      | 0.296     |
| 0.5          | 0.217  | 0.236      | 0.227     |
| 0.3          | 0.151  | 0.089      | 0.12      |
| 0.1          | 0.087  | 0.041      | 0.064     |
| 0            | 0  | 0          | 0         |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

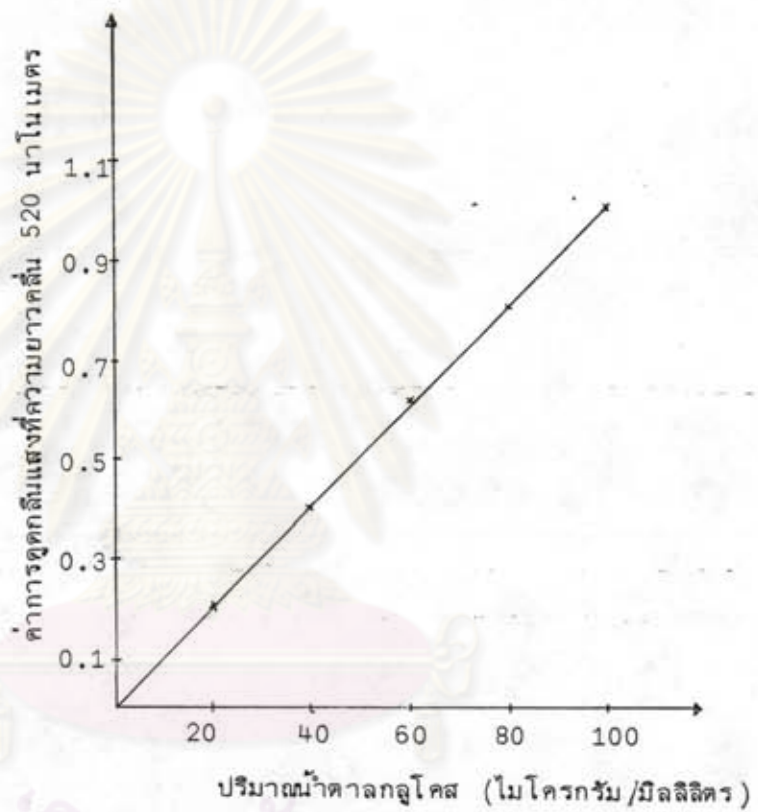


รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณเอนไซม์โดยใช้ เซลลูโลสเป็นมาตรฐาน

ตารางที่ 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

| น้ำตาลกลูโคส<br>(ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร |
|---------------------------------------|--|
| 0                                     | 0  |
| 20                                    | 0.209  |
| 40                                    | 0.402  |
| 60                                    | 0.620  |
| 80                                    | 0.804  |
| 100                                   | 1.002  |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11

กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณ

น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้กลูโคสเป็นมาตรฐาน

ตารางที่ 11 แสดงการคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพตามผลิตภัณฑ์เมล็ดสัปดาห์ที่ 30 สัปดาห์ที่

|            | CMCase activity<br>ยูนิต/ลิตร |       |       | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น<br>595 นาโนเมตร |       |       | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น<br>520 นาโนเมตร |        |       |       |       |        |
|------------|-------------------------------|-------|-------|---|-------|-------|---|--------|-------|-------|-------|--------|
|            | 4 วัน                         | 6 วัน | 8 วัน | 10 วัน  | 4 วัน | 6 วัน | 8 วัน   | 10 วัน | 4 วัน | 6 วัน | 8 วัน | 10 วัน |
| TISTR 3012 | 0.00                          | -     | -     | -   | 0.005 | 0.008 | 0.005   | 0.008  | 0.047 | 0.063 | 0.030 | 0.018  |
| 3045       | -                             | -     | -     | -   | 0.007 | 0.007 | 0.009   | 0.009  | 0.041 | 0.056 | 0.038 | 0.036  |
| 3080       | 0.05                          | 13.08 | 16.91 | 23.68   | 0.015 | 0.034 | 0.035   | 0.046  | 0.179 | 0.308 | 0.251 | 0.245  |
| 3081       | 0.04                          | 0.22  | -     | -   | 0.005 | 0.010 | 0.006   | 0.008  | 0.197 | 0.300 | 0.219 | 0.237  |
| 3092       | -                             | -     | -     | -   | 0.004 | 0.006 | 0.006   | 0.008  | 0.063 | 0.084 | 0.033 | 0.040  |
| 3093       | 0.07                          | 0.07  | 1.80  | 9.21  | 0.014 | 0.015 | 0.020   | 0.019  | 1.018 | 0.823 | 0.065 | 0.024  |
| 3112       | -                             | -     | -     | -   | 0.003 | 0.005 | 0.005   | 0.004  | 0.038 | 0.052 | 0.022 | 0.022  |
| 3113       | 0.15                          | 0.38  | 0.45  | 4.93  | 0.012 | 0.006 | 0.006   | 0.007  | 0.769 | 0.840 | 0.092 | 0.035  |
| 3114       | 0.04                          | 0.09  | -     | -   | 0.009 | 0.013 | 0.012   | 0.012  | 0.262 | 0.291 | 0.212 | 0.214  |
| 3159       | -                             | 21.02 | 23.73 | 27.26   | 0.007 | 0.016 | 0.024   | 0.036  | 0.042 | 0.126 | 0.154 | 0.206  |
| 3160       | 0.11                          | 0.10  | -     | -   | 0.006 | 0.006 | 0.012   | 0.012  | 0.724 | 0.321 | 0.238 | 0.208  |
| 3162       | 0.37                          | 0.26  | 0.63  | 0.75  | 0.006 | 0.010 | 0.014   | 0.015  | 0.288 | 0.262 | 0.196 | 0.217  |
| 3167       | 0.28                          | 21.02 | 14.11 | 20.91   | 0.009 | 0.028 | 0.023   | 0.036  | 0.231 | 0.385 | 0.271 | 0.214  |
| 3173       | -                             | 6.20  | 2.65  | 3.45  | 0.006 | 0.014 | 0.010   | 0.015  | 0.039 | 0.056 | 0.040 | 0.056  |
| 3194       | -                             | -     | -     | -   | 0.007 | 0.007 | 0.006   | 0.012  | 0.083 | 0.085 | 0.043 | 0.056  |

ตารางที่ 11 (ต่อ)

|            | CMCase activity<br>มิลลิกรัม/ลิตร |       |              | ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น<br>595 นาโนเมตร |       |              | ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น<br>520 นาโนเมตร |       |              |       |       |
|------------|-----------------------------------|-------|--------------|--|-------|--------------|--|-------|--------------|-------|-------|
|            | 4 วัน                             | 6 วัน | 8 วัน 10 วัน | 4 วัน  | 6 วัน | 8 วัน 10 วัน | 4 วัน  | 6 วัน | 8 วัน 10 วัน |       |       |
| TISTR 3210 | -                                 | -     | -            | 0.005  | 0.008 | 0.006        | 0.010  | 0.047 | 0.075        | 0.023 | 0.039 |
| 3225       | -                                 | -     | -            | 0.008  | 0.006 | 0.007        | 0.009  | 0.058 | 0.270        | 0.041 | 0.044 |
| 3226       | 0.40                              | 0.55  | 0.54         | 0.005  | 0.008 | 0.004        | 0.006  | 1.126 | 1.334        | 0.986 | 1.818 |
| 3230       | 0.19                              | 13.08 | 16.91        | 0.007  | 0.014 | 0.022        | 0.032  | 0.285 | 0.235        | 0.149 | 0.138 |
| 3251       | 0.26                              | -     | -            | 0.006  | 0.005 | 0.022        | 0.038  | 0.152 | 0.049        | 0.124 | 0.178 |
| 3282       | 18.82                             | 0.21  | 0.26         | 0.010  | 0.017 | 0.025        | 0.034  | 0.043 | 0.043        | 0.030 | 0.037 |
| 3283       | -                                 | -     | -            | 0.009  | 0.007 | 0.004        | 0.006  | 0.050 | 0.038        | 0.020 | 0.032 |
| 3285       | -                                 | -     | -            | 0.003  | 0.007 | 0.005        | 0.011  | 0.030 | 0.045        | 0.021 | 0.044 |
| 3296       | 0.27                              | 0.92  | 6.13         | 0.007  | 0.014 | 0.011        | 0.013  | 1.399 | 0.111        | 0.060 | 0.047 |
| 3302       | -                                 | -     | -            | 0.002  | 0.004 | 0.004        | 0.009  | 0.045 | 0.052        | 0.032 | 0.053 |
| 3322       | -                                 | -     | -            | 0.006  | 0.007 | 0.007        | 0.009  | 0.046 | 0.047        | 0.019 | 0.032 |
| 3324       | -                                 | -     | -            | 0.006  | 0.005 | 0.010        | 0.010  | 0.048 | 0.041        | 0.009 | 0.039 |
| 3331       | 0.17                              | 0.08  | -            | 0.011  | 0.012 | 0.014        | 0.025  | 0.219 | 0.289        | 0.202 | 0.193 |
| 3334       | -                                 | -     | -            | 0.004  | 0.006 | 0.010        | 0.009  | 0.037 | 0.051        | 0.029 | 0.051 |
| 3335       | 18.82                             | 13.08 | 23.73        | 0.005  | 0.007 | 0.014        | 0.018  | 0.275 | 0.097        | 0.185 | 0.100 |

หมายเหตุ - ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรใช้สำหรับ วัดระยะเวลาปล่อยแลคติก

โดยวิธี Dye release assay

- ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรใช้สำหรับ วัดระยะเวลาที่ยับยั้งการเจริญ

โดยวิธีของ Somogyi และ Nelson

ตารางที่ 12 แสดงผลการทดลองหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์

| ค่าความเป็นกรด-ด่าง |                               | ค่าการดูดกลืนแสง                |                                 | CMCase activity<br>(ยูนิต์/ลิตร) |
|---------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| เริ่มต้น            | หลังเพาะเลี้ยง<br>เชื้อ 8 วัน | ที่ความยาวคลื่น<br>595 นาโนเมตร | ที่ความยาวคลื่น<br>520 นาโนเมตร |                                  |
| 3                   | 2.4                           | 0.003                           | 0.061                           | 3.60                             |
| 4                   | 3.0                           | 0.004                           | 0.004                           | 5.86                             |
| 5                   | 2.9                           | 0.004                           | 0.088                           | 3.07                             |
| 6                   | 2.8                           | 0.004                           | 0.045                           | 3.72                             |
| 7                   | 2.6                           | 0.005                           | 0.077                           | 3.72                             |
| 8                   | 2.7                           | 0.007                           | 0.090                           | 3.07                             |

- หมายเหตุ - ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรใช้สำหรับวิเคราะห์หาเซลล์เลสแอกทีวิตี โดยวิธี Dye release assay
- ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Somogyi และ Nelson

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 แสดงผลการทดลองหาอัตราการใช้ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์

| อัตราการใช้ | ค่าการดูดกลืนแสง                |                                 | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิตร) | ค่าความเป็นกรด<br>ต่างหลังเพาะ<br>เลี้ยงเชื้อ 8 วัน |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|
|             | ที่ความยาวคลื่น<br>595 นาโนเมตร | ที่ความยาวคลื่น<br>520 นาโนเมตร |                                 |   |
| 100         | 0.004                           | 0.090                           | 11.18                           | 3.30  |
| 150         | 0.007                           | 0.127                           | 18.68                           | 2.74  |
| 200         | 0.017                           | 0.247                           | 27.26                           | 3.34  |
| 250         | 0.016                           | 0.229                           | 23.68                           | 2.73  |

- หมายเหตุ - ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรใช้สำหรับวิเคราะห์หา  
เซลล์แอคทีวิตี โดยวิธี Dye release assay
- ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรใช้สำหรับวิเคราะห์หา  
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Somogyi และ Nelson



ตารางที่ 14 แสดงผลการทดลองคัดเลือกแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต  
เซลลูเลส

| แหล่งอาหารคาร์บอนที่ใช้        | ค่าความเป็นกรด-ด่าง<br>หลังเพาะเลี้ยงเชื้อ<br>8 วัน | CMCase activity<br>ยูนิต/ลิตร |
|--------------------------------|---|-------------------------------|
| YM ไม่เติมคาร์บอน              | 2.42  | 9.80                          |
| YM + 2% คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส | 3.21  | 20.91                         |
| YM + 2% ผงเซลลูโลส             | 2.57  | 20.91                         |
| YM + 2% เซลโลไบโอส             | 2.14  | 7.78                          |
| YM + 2% อะวิเซล                | 3.10  | 14.07                         |

- หมายเหตุ - YM = อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดยีสต์-มอลต์  
- แหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลสคือผงเซลลูโลส 2%

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 แสดงผลการทดลองคัดเลือกแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต เซลลูเลส

| แหล่งอาหารไนโตรเจนที่ใช้  | ค่าความเป็นกรด-ด่าง<br>หลังเพาะเลี้ยงเชื้อ<br>8 วัน | CMCase activity<br>ยูนิต/ลิตร |
|---|---|-------------------------------|
| YM + 2% KC floc   | 2.84  | 11.18                         |
| YM <sup>*</sup> + 2% KC floc + 0.5% ไกลซีน                            | 3.74  | 8.68                          |
| YM <sup>*</sup> + 2% KC floc + 0.5% ยูเรีย                            | 8.33  | 0.14                          |
| YM <sup>*</sup> + 2% KC floc + 0.5% ยูเรีย<br>+ แอมโมเนียมซัลเฟต(1:1) | 7.97  | 0.00                          |
| YM <sup>*</sup> + 2% KC floc + 0.5%<br>แอมโมเนียมซัลเฟต               | 3.46  | 4.93                          |
| YM <sup>*</sup> + 2% KC floc + 0.5%<br>โซเดียมไนเตรต                  | 3.18  | 1.28                          |

- หมายเหตุ - YM<sup>\*</sup> = อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดยีสต์-มอลต์ที่ไม่เติม 0.5% เปปโตน  
- แหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลสคือเปปโตน 0.5%

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 แสดงผลการแยกเอนไซม์ที่มีรสขี้

| ขั้นตอนการทดลอง                        | ปริมาณ<br>(มิลลิกรัม) | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิตร) | ปริมาณโปรตีน<br>(กรัม/ลิตร) | specific activity | purification<br>fold |
|--|-----------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------|
| crude enzyme<br>(เอนไซม์หลัง dialysis) | 590                   | 15.00                           | 7.878                       | 1.904             | 1                    |
| DEAE-Bio-Gel A column                  | 28                    | 14.00                           | 5.460                       | 2.564             | 1.35                 |
| Sephacryl S 200 HR column              | 3.6                   | 28.00                           | 1.586                       | 17.654            | 9.27                 |
| Mono Q HR column                       | 1                     | 4.10                            | 0.030                       | 136.667           | 71.78                |

หมายเหตุ specific activity = CMCase activity/ปริมาณโปรตีน

| หลอดที่ | ปริมาณโปรตีน<br>(ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิตร) |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 1       | 1053.3342                             | 0.41                            |
| 2       | 1346.6677                             | 1.00                            |
| 3       | 1180.0009                             | 1.10                            |
| 4       | 1228.889                              | 6.70                            |
| 5       | 1540.001                              | 12.00                           |
| 6       | 1435.556                              | 17.00                           |
| 7       | 1538.557                              | 14.00                           |
| 8       | 1550.001                              | 13.00                           |
| 9       | 1260.001                              | 8.60                            |
| 10      | 1032.223                              | 3.50                            |
| 11      | 1012.223                              | 5.90                            |
| 12      | 931.112                               | 4.50                            |
| 13      | 900.00                                | 2.70                            |
| 14      | 823.334                               | 2.60                            |
| 15      | 802.223                               | 2.40                            |
| 16      | 806.667                               | 2.20                            |
| 17      | 808.890                               | 1.80                            |
| 18      | 726.667                               | 1.90                            |
| 19      | 827.778                               | 1.30                            |
| 20      | 675.556                               | 0.76                            |
| 21      | 550.000                               | 0.76                            |
| 22      | 423.334                               | 0.70                            |
| 23      | 381.111                               | 0.62                            |
| 24      | 317.778                               | 0.42                            |
| 25      | 284.445                               | 0.37                            |
| 26      | 264.445                               | 0.21                            |

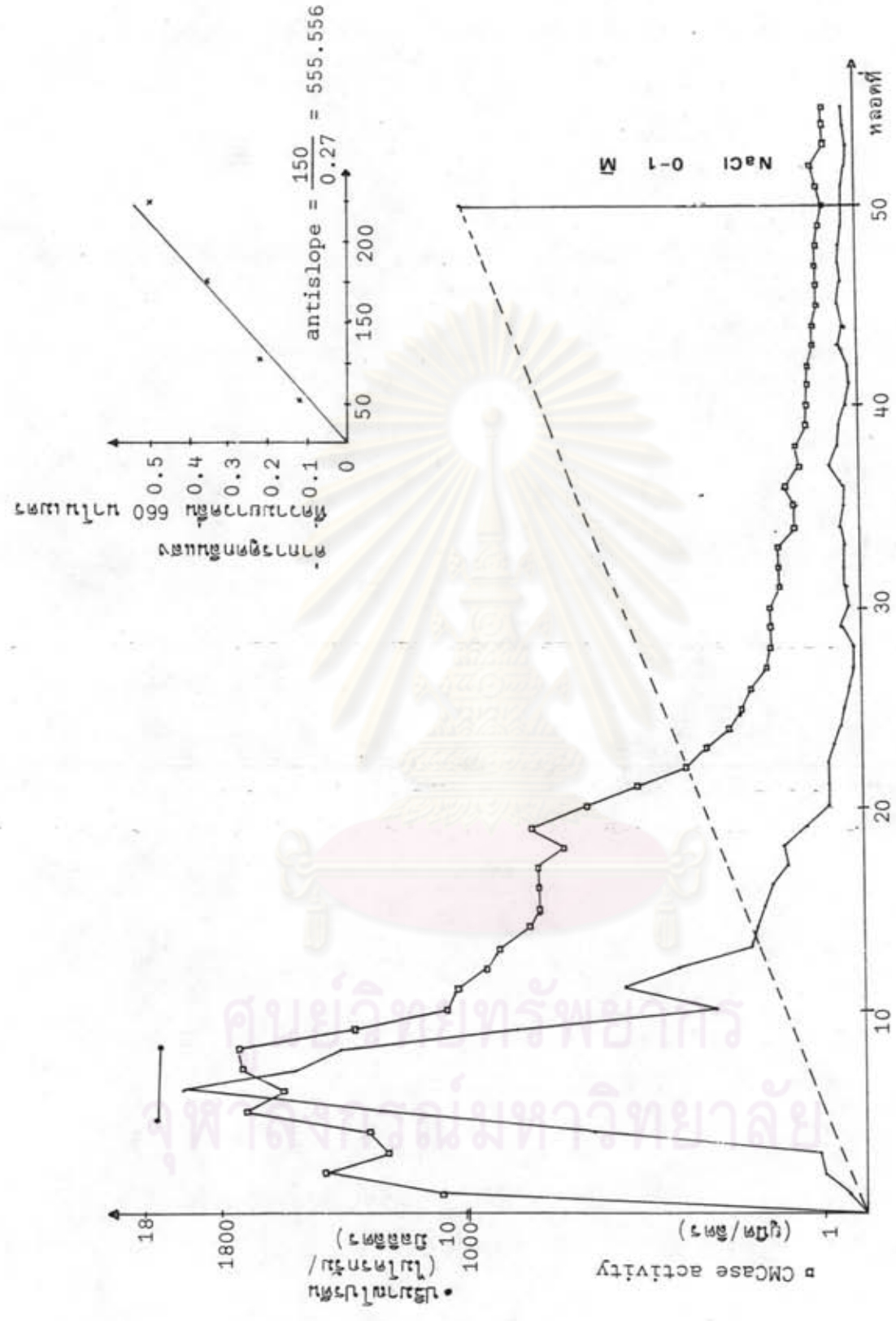
ตารางที่ 17 (ต่อ)

| หลอกลัก | ปริมาณโปรตีน<br>(ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิตร) |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 27      | 226.667                               | 0.14                            |
| 28      | 213.334                               | 0.12                            |
| 29      | 214.445                               | 0.42                            |
| 30      | 216.667                               | 0.21                            |
| 31      | 190.000                               | 0.32                            |
| 32      | 193.333                               | 0.28                            |
| 33      | 197.778                               | 0.30                            |
| 34      | 158.556                               | 0.42                            |
| 35      | 152.222                               | 0.28                            |
| 36      | 176.667                               | 0.32                            |
| 37      | 142.222                               | 0.68                            |
| 38      | 151.111                               | 0.42                            |
| 39      | 127.778                               | 0.40                            |
| 40      | 116.667                               | 0.21                            |
| 41      | 111.111                               | -                               |
| 42      | 112.222                               | 0.14                            |
| 43      | 104.445                               | 0.21                            |
| 44      | 106.667                               | 0.42                            |
| 45      | 97.775                                | 0.32                            |
| 46      | 97.775                                | 0.40                            |
| 47      | 94.444                                | 0.32                            |
| 48      | 90.000                                | 0.40                            |
| 49      | 88.889                                | 0.32                            |
| 50      | 77.778                                | 0.32                            |
| 51      | 91.111                                | 0.28                            |
| 52      | 108.389                               | 0.21                            |
| 53      | 74.444                                | 0.14                            |

| หลอดที่ | ปริมาณโปรตีน<br>(ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิตร) |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 54      | 77.778                                | -                               |
| 55      | 74.444                                | 0.21                            |
| 56      | 80.000                                | 0.14                            |
| 57      | 67.778                                | 0.40                            |

- หมายเหตุ - เครื่องหมาย - คือหาปริมาณไม่ได้เพราะพบมีจำนวนน้อยมาก
- นำสารละลายเอนไซม์หลอดที่ 5, 6, 7, 8 ไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟี
  - ตรวจสอบปริมาณโปรตีน โดยวิธีลาวรี
  - ตรวจสอบ CMCase activity จากการวัดความหนืดของคาร์บอกซีเมทซิลเซลลูโลส 1%

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 กราฟแสดงการทำไทริสซูธ์โดยวีซีแอมไอออน-เอกเซนจูโครมาโทกราฟี  
 □— CMCase activity (ยูนิต/ลิตร)  
 — ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

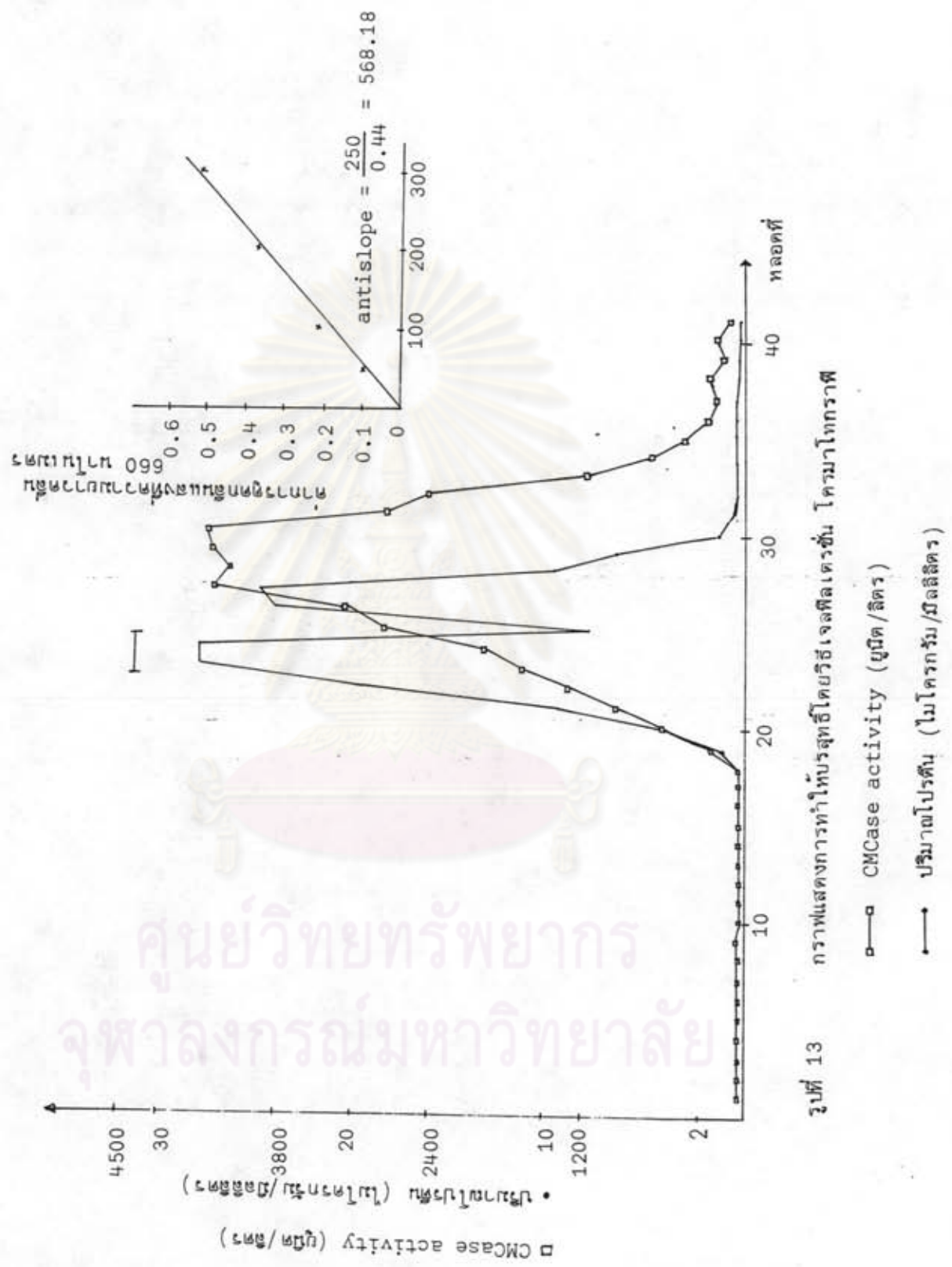
| หลอดที่ | ปริมาณโปรตีน<br>(ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิตร) |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 1       | -                                     | -                               |
| 2       | 5.681                                 | -                               |
| 3       | -                                     | -                               |
| 4       | -                                     | -                               |
| 5       | -                                     | -                               |
| 6       | -                                     | -                               |
| 7       | -                                     | -                               |
| 8       | -                                     | -                               |
| 9       | 28.409                                | -                               |
| 10      | 5.681                                 | -                               |
| 11      | 39.773                                | -                               |
| 12      | 17.045                                | -                               |
| 13      | 73.862                                | -                               |
| 14      | -                                     | -                               |
| 15      | 17.045                                | -                               |
| 16      | 11.364                                | -                               |
| 17      | -                                     | -                               |
| 18      | -                                     | -                               |
| 19      | 204.545                               | 0.85                            |
| 20      | 568.180                               | 3.80                            |
| 21      | 931.815                               | 9.10                            |
| 22      | 1318.178                              | 19.50                           |
| 23      | 1676.131                              | 28.00                           |
| 24      | 1954.539                              | 28.00                           |
| 25      | 2749.991                              | 7.50                            |
| 26      | 3073.854                              | 24.00                           |



| หลอดที่ | ปริมาณโปรตีน<br>(ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิตร) |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 27      | 3772.715                              | 25.00                           |
| 28      | 3647.716                              | 9.40                            |
| 29      | 3789.761                              | 6.30                            |
| 30      | 3835.215                              | 1.20                            |
| 31      | 2744.309                              | 0.47                            |
| 32      | 2102.266                              | 0.22                            |
| 33      | 1170.451                              | -                               |
| 34      | 659.089                               | -                               |
| 35      | 403.408                               | 0.35                            |
| 36      | 232.954                               | 0.28                            |
| 37      | 193.181                               | 0.28                            |
| 38      | 238.636                               | 0.21                            |
| 39      | 136.362                               | 0.21                            |
| 40      | 198.863                               | 0.14                            |
| 41      | 68.182                                | -                               |



- หมายเหตุ - เครื่องหมาย - คือหาปริมาณไม่ได้เพราะพบมีจำนวนน้อยมาก
- ตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี
  - ตรวจหา CMCase activity จากการวัดความหนืดของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส 1%
  - นำสารละลายเอนไซม์หลอดที่ 23, 24 ไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีฟาสต์-โปรตีนลิควิดโครมาโทกราฟี



รูปที่ 13

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

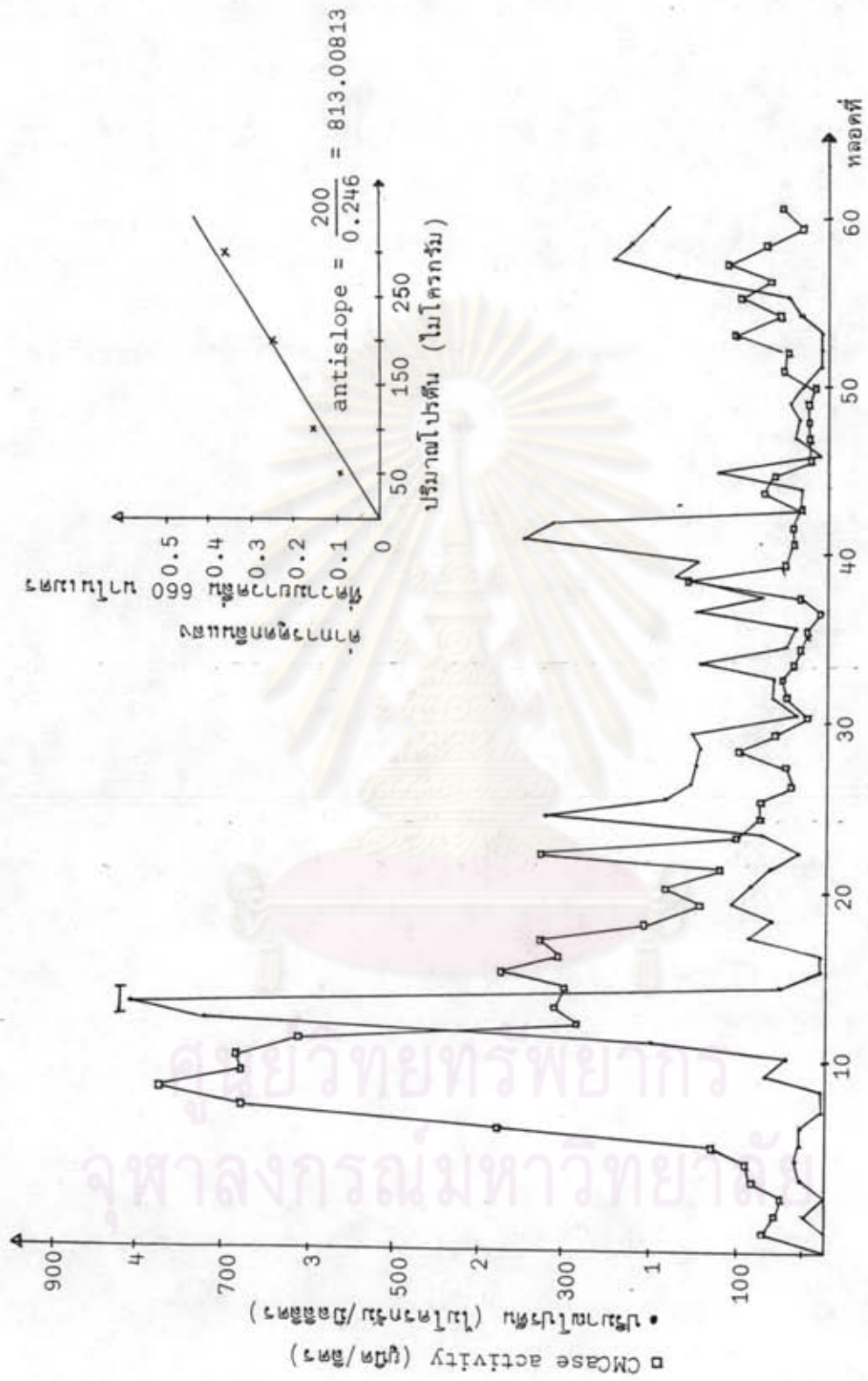
| หลอดทึ | ปริมาทโปรตีน<br>(โศรโศรกรรฟี่/มิลลิลิตร) | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิวิต) |
|--------|--|----------------------------------|
| 1      | 65.04                                    | -                                |
| 2      | 56.91                                    | 0.12                             |
| 3      | 48.78                                    | -                                |
| 4      | 81.30                                    | 0.14                             |
| 5      | 89.43                                    | 0.17                             |
| 6      | 130.08                                   | 0.14                             |
| 7      | 373.98                                   | 0.14                             |
| 8      | 674.80                                   | -                                |
| 9      | 772.36                                   | -                                |
| 10     | 674.80                                   | 0.35                             |
| 11     | 682.93                                   | 0.21                             |
| 12     | 609.76                                   | 1.00                             |
| 13     | 276.42                                   | 0.80                             |
| 14     | 308.94                                   | 4.10                             |
| 15     | 292.68                                   | 0.23                             |
| 16     | 373.98                                   | -                                |
| 17     | 300.81                                   | -                                |
| 18     | 325.20                                   | 0.44                             |
| 19     | 203.25                                   | 0.28                             |
| 20     | 138.21                                   | 0.55                             |
| 21     | 186.99                                   | 0.42                             |
| 22     | 113.82                                   | 0.32                             |
| 23     | 325.20                                   | 0.14                             |
| 24     | 97.56                                    | 0.35                             |
| 25     | 73.17                                    | 0.16                             |
| 26     | 73.17                                    | 0.97                             |

| หลอดที่ | ปริมาณโปรตีน<br>(ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิตร) |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 27      | 32.52                                 | 0.76                            |
| 28      | 40.65                                 | 0.73                            |
| 29      | 97.56                                 | 0.71                            |
| 30      | 56.91                                 | 0.76                            |
| 31      | 16.26                                 | 0.14                            |
| 32      | 40.65                                 | 0.30                            |
| 33      | 48.78                                 | 0.28                            |
| 34      | 32.52                                 | 0.73                            |
| 35      | 24.39                                 | 0.21                            |
| 36      | 16.26                                 | 0.14                            |
| 37      | -                                     | 0.76                            |
| 38      | 24.39                                 | 0.32                            |
| 39      | 113.82                                | 0.85                            |
| 40      | 40.65                                 | 0.71                            |
| 41      | 32.52                                 | 1.50                            |
| 42      | 32.52                                 | 1.30                            |
| 43      | 24.39                                 | 0.14                            |
| 44      | 65.04                                 | 0.12                            |
| 45      | 56.91                                 | 0.65                            |
| 46      | 8.13                                  | -                               |
| 47      | 16.26                                 | 0.17                            |
| 48      | 16.26                                 | 0.14                            |
| 49      | 16.26                                 | 0.21                            |
| 50      | 8.13                                  | 0.21                            |
| 51      | 48.78                                 | -                               |
| 52      | 40.65                                 | -                               |

| หลอดที่ | ปริมาณโปรตีน<br>(ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิตร) |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 53      | 105.69                                | -                               |
| 54      | 48.78                                 | 0.14                            |
| 55      | 97.56                                 | 0.21                            |
| 56      | 56.91                                 | 0.85                            |
| 57      | 113.82                                | 2.10                            |
| 58      | 65.64                                 | 1.10                            |
| 59      | 24.39                                 | 1.00                            |
| 60      | 48.78                                 | 0.88                            |

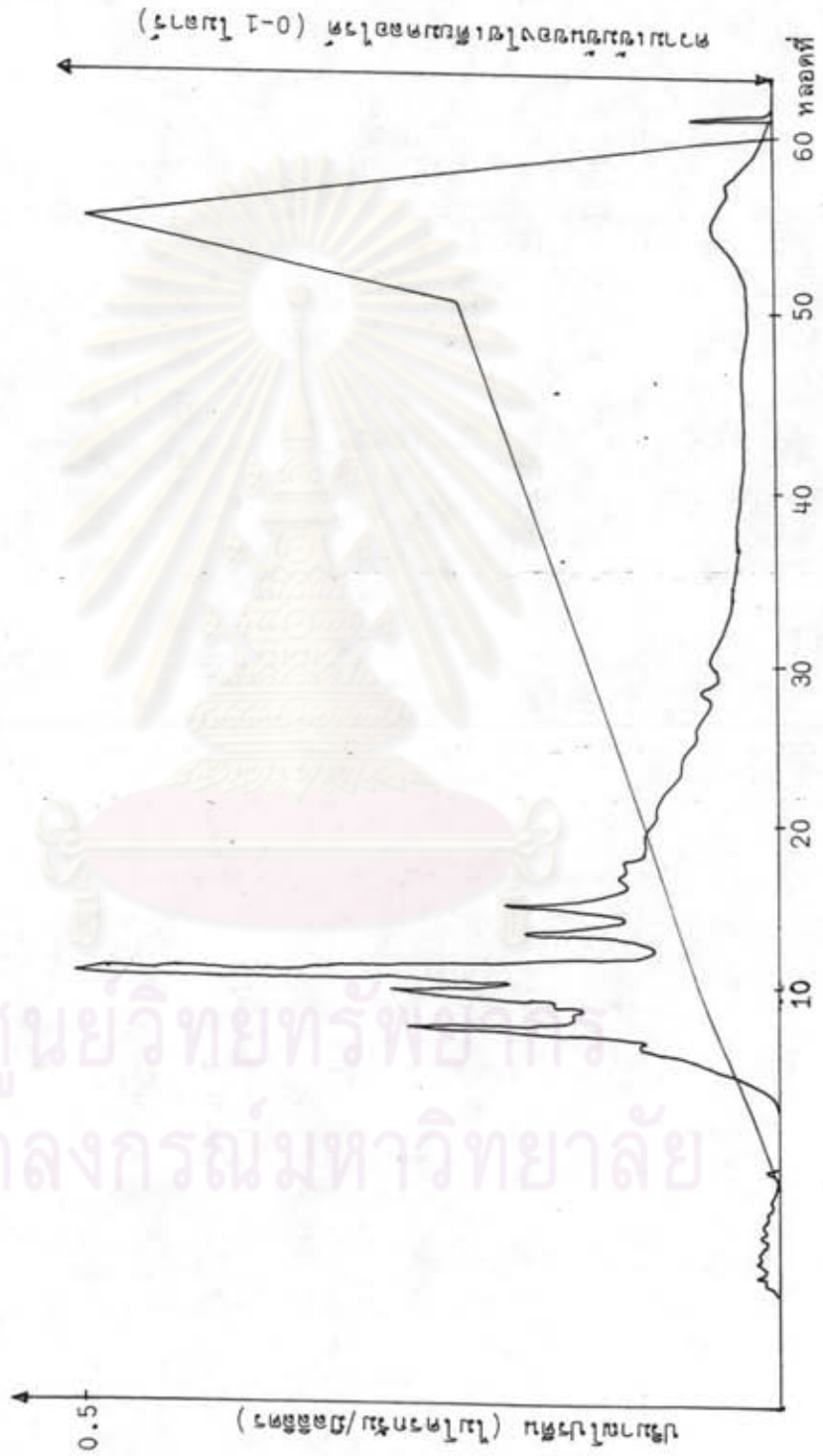
- หมายเหตุ - เครื่องหมาย - คือหาปริมาณไม่ได้เพราะพบมีจำนวนน้อยมาก
- ตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวารี
  - ตรวจหา CMCase activity จากการวัดความหนืดของคาร์บอกซีเมทซิลเซลลูโลส 1%
  - นำสารละลายเอนไซม์หลอดที่ 14 ไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้าผ่านโซเดียมโอดีซิล ซัลเฟต โพลีเอคริลเลอไมด์ เจล

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 ภาพแสดงการทำไวรัสฤทธิ์โดยวิธีฟอสโตโปรตีน-ลิควิด-โครมาโทกราฟี

□ CMCase activity (เปิด/ลิตร)  
 ● ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

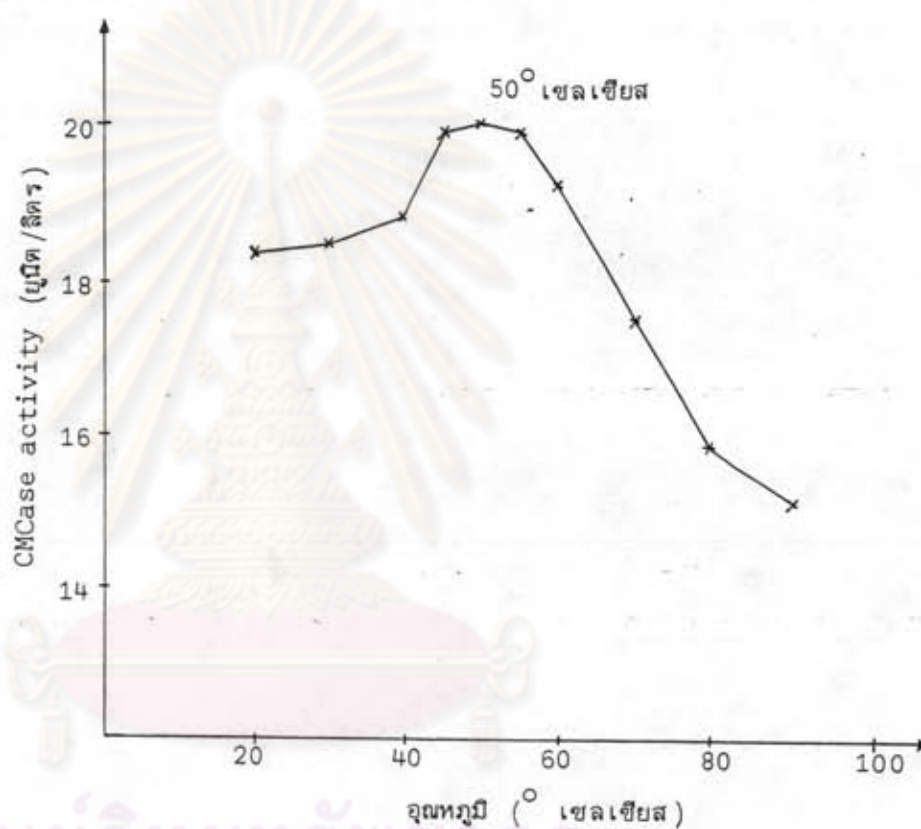
รูปที่ 15 กราฟแสดงการทำโทบรีสุทซ์จากเครื่องฟาสต์-โปรตีน-ลิควิด-โครมาโทกราฟี

ตารางที่ 20 แสดงผลการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

| อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) | CMCase activity<br>ยูนิต/ลิตร |
|----------------------------|-------------------------------|
| 20                         | 18.40                         |
| 30                         | 18.50                         |
| 40                         | 18.90                         |
| 45                         | 20.00                         |
| 50                         | 21.00                         |
| 55                         | 19.90                         |
| 60                         | 19.30                         |
| 70                         | 17.50                         |
| 80                         | 15.80                         |
| 90                         | 15.10                         |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 16

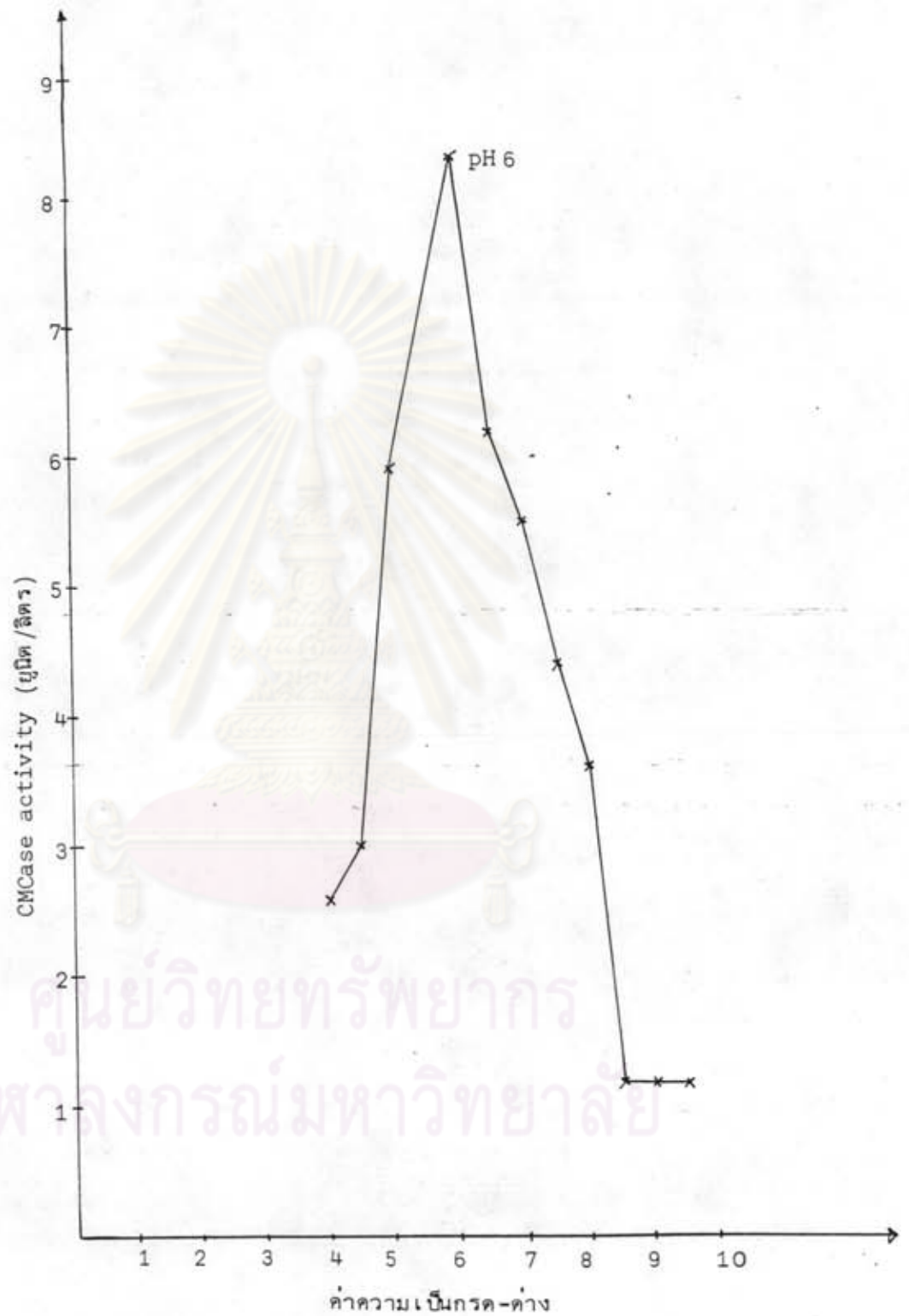
กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ

เอนไซม์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 แสดงผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์

| อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) | เวลา<br>(นาที) | CMCase activity<br>(ยูนิท/ลิตร) |
|----------------------------|----------------|---------------------------------|
| 55                         | 0              | 4.34                            |
|                            | 5              | 3.79                            |
|                            | 10             | 3.23                            |
|                            | 15             | 4.34                            |
|                            | 20             | 2.63                            |
|                            | 25             | 2.56                            |
|                            | 30             | 2.30                            |
| 70                         | 0              | 4.34                            |
|                            | 15             | 2.71                            |
|                            | 30             | 1.42                            |
|                            | 60             | 0.92                            |
|                            | 120            | 0.39                            |
| 90                         | 180            | 0.13                            |
|                            | 0              | 4.34                            |
|                            | 10             | 0.92                            |
|                            | 15             | 0.79                            |
|                            | 30             | 0.69                            |
|                            | 45             | 0.61                            |
|                            | 60             | 0.39                            |
| 70                         | 0.21           |                                 |



รูปที่ 17

กราฟแสดงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

ตารางที่ 22 แสดงผลการทดลอง หาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

| ค่าความเป็นกรด-ด่าง | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิตร) |
|---------------------|---------------------------------|
| 4                   | 2.56                            |
| 4.5                 | 3.04                            |
| 5                   | 5.93                            |
| 5.5                 | 5.45                            |
| 6                   | 8.31                            |
| 6.0                 | 8.31                            |
| 6.5                 | 6.20                            |
| 7.0                 | 5.45                            |
| 7.5                 | 4.34                            |
| 8                   | 3.79                            |
| 8                   | 3.44                            |
| 8.5                 | 1.23                            |
| 9                   | 1.26                            |
| 9.5                 | 1.20                            |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 23 แสดงผลของความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ต่อความคงตัวของเอนไซม์

| ค่าความเป็นกรด-ด่าง | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิตร) |
|---------------------|---------------------------------|
| 4                   | 3.45                            |
| 4.5                 | 2.97                            |
| 5                   | 5.47                            |
| 5.5                 | 5.47                            |
| 6                   | 8.80                            |
| 6                   | 7.89                            |
| 6.5                 | 6.80                            |
| 7                   | 5.25                            |
| 7.5                 | 4.36                            |
| 8                   | 3.80                            |
| 8.5                 | 8.32                            |
| 9                   | 1.33                            |
| 9.5                 | 1.21                            |

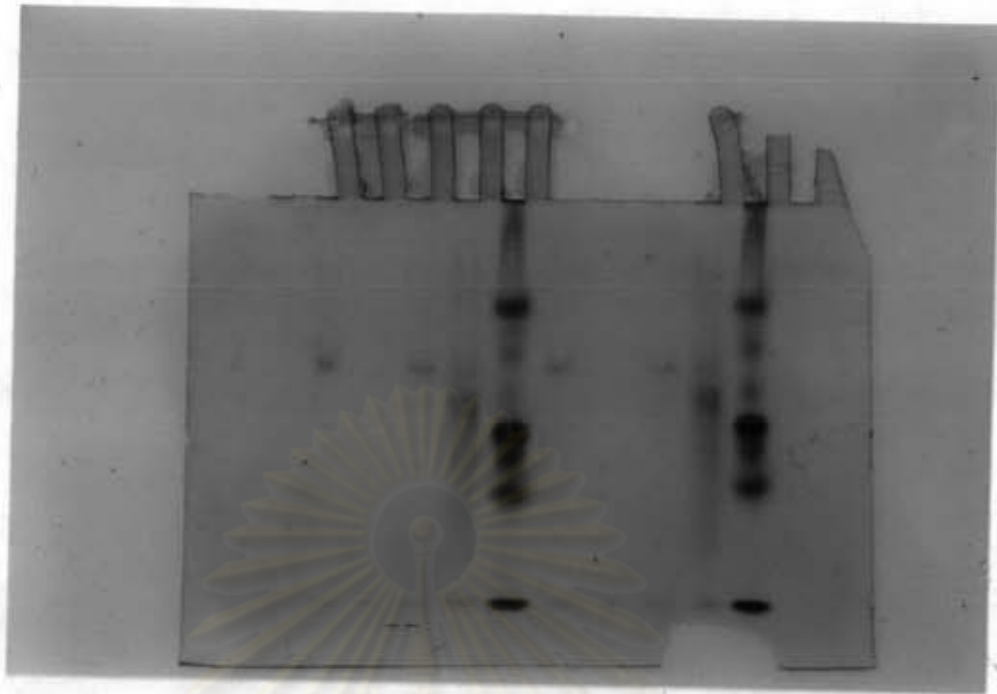
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 24 แสดงผลของสารเคมีต่อการทำงานของเอนไซม์

| ชื่อสารที่ใช้ทดสอบ                    | CMCase activity<br>(ยูนิต/ลิตร) |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| HgCl <sub>2</sub>                     | 1.58                            |
| MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 15.17                           |
| Iodoacetamide                         | 9.03                            |
| 2-mercaptoethanol                     | 15.17                           |
| DTT                                   | 20.72                           |
| PCMB                                  | 8.5                             |

หมายเหตุ - สารละลายเอนไซม์ที่นำมาใช้มี CMCase activity = 13.88 ยูนิต/ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



1 2 3                      1 2 3

รูปที่ 18 แสดงการเคลื่อนย้ายส่วไฟฟ้า

แถวที่

1. สารละลายเอนไซม์
2. ovalbumin
3. LMW Calibration Kit Protein Standards (10  $\mu$ L)

ประกอบด้วย

|                       |                |
|-----------------------|----------------|
| Phosphorylase b       | M.wt. = 94,000 |
| Albumin               | M.wt. = 67,000 |
| Ovalbumin             | M.wt. = 43,000 |
| Carbonic anhydrase    | M.wt. = 30,000 |
| Trypsin Inhibitor     | M.wt. = 20,000 |
| $\alpha$ -Lactalbumin | M.wt. = 14,400 |

สแตคกิ้ง เจล : โพลีเอคริลเลไมด์เจล 3.5 % ใน ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 0.125 โมลาร์  
ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 โซเดียมโดดีซิล ซัลเฟต 0.1 %

เซพาเรตติ้ง เจล : โพลีเอคริลเลไมด์เจล 9 % ใน ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 0.375 โมลาร์  
ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.8 โซเดียมโดดีซิล ซัลเฟต 0.1 %