ปฏิบัติการที่ 5

กิจกรรมเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสในเมล็ดข้าวสาลี

**α-Amylase Activity in Wheat (*Triticum spp*) Seeds**

**เอนไซม์อะไมเลส (enzyme amylases)**

แอลฟา-อะไมเลส(α-amylases) มีชื่อสามัญว่าไดแอสเทส (diastase) ส่วนชื่อทางการค้าคือ Termamyl และมีชื่อตามระบบว่า α-1,4-glucanohydrolase ซึ่ง เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายสับสเตรทจำพวกแป้งไกลโคเจน พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไปทั้งพืชและสัตว์ สำหรับในมนุษย์นั้นจะพบในส่วนที่เป็นน้ำลายและตับอ่อน หน้าที่หลักคือย่อยสลายแป้ง ให้เป็นโมโน โอลิโก-และได-ซัคคาไรด์ (Smith and Morton, 2010) เป็นเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน โดยมีลักษณะพิเศษคือมี Ca+2 1 ตัว ต่อเอนไซม์ 1 โมเลกุล และจะถูกกระตุ้นได้ด้วยอิออนของธาตุหมู่ 7 เช่น Cl-, Br-, และ F- มีค่า pK ของหมู่ที่แตกอิออนได้ในบริเวณอยู่ที่ pK 6.5-8.0

|  |
| --- |
|  |
| **รูป 5.1** การย่อยสลาย ของ (A) amylose และ (B) amylopectin ด้วยเอ็นไซม์ α-amylase |

เอนไซม์อะไมเลสที่สำคัญในแป้งจากข้าวสาลีคือ แอลฟา-อะไมเลส ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลาย สตาร์ชโมเลกุล ในลักษณะการย่อยแบบสุ่ม (random digestion) โดยมีลักษณะทำการย่อยในโมเลกุล (endo-enzyme)ในการสลายสับเสตท (Guerra et al., 2009) โดยทำการย่อยแป้งในเมล็ดที่เสียหายอย่างช้าๆ แต่ไม่สามารถย่อยแป้งในเมล็ดช่วงสภาวะปกติได้ แต่จะย่อยได้ดีเมื่อแป้งได้เกิดสภาวะการเจลาตินไนเซชัน การย่อยนี้จะเกิดขึ้นกับพันธะ 1, 4-แอลฟา ไกลโคซิดิกของแป้ง มีผลทำให้ลักษณะความหนืดข้นของแป้งลดลง ผลจากการย่อยนี้ อะไมโลสและอะไมโลเพกทินจะเปลี่ยนเป็นกลูโคส มอลโทส หรือ พอลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

|  |
| --- |
|  |
| **รูป 5.2** การการทำงานของเอ็นไซม์ α-amylase และ β-amylase |

ส่วนเบตา-อะไมเลส มีลักษณะในการย่อยสลายแป้งแบบย่อยจากส่วนนอกของโมเลกุลเข้าสู่ภายใน (exo-enzyme) โดยทำการย่อยแป้งจากส่วนปลายที่ไม่รีดิวซ์ (non-reducing end) เข้ามาตัดที่พันธะ 1,4- ไกลโคสซิดิก หากเบตา-อะไมเลสทำการย่อยอะไมโลสไปเรื่อยๆ ในที่สุดจะได้มอลโทสเป็นส่วนใหญ่ (Worthington Biochemical Corporation, 2019) ส่วนอะไมโลเพกทินนั้น หาก เบตา-อะไมเลสทำการย่อยจะได้ได้มอลโทส 60% และอีก 40% เป็นเดกซ์ทรินซึ่งได้แก่ เบตา-เดกซ์ทริน(β-dextrin), ลิมิต- เดกซ์ทริน(limit-dextrin) และอีรีโทร-เดกซ์ทริน (erythro-dextrin) เนื่องจากเบตา-อะไมเลสจะย่อยมอลโทสไปจนถึงกลูโคส 2 หรือ 3 โมเลกุลก่อนถึงจุดต่อหรือจุดที่เป็นกิ่งก้านที่มีพันธะ 1, 6-แอลฟา ไกลโคซิดิก การที่ยังมีโมเลกุลของเดกซ์ทรินเหลืออยู่ในปริมามากจากการสลายด้วยเบตา-อะไมเลส จึงจำเป็นที่จะต้องมีเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสมาทำงานร่วมกับเบตา-อะไมเลส เพื่อที่จะทำให้เอนไซม์ เบตา-อะไมเลสทำการย่อยได้เร็วขึ้น เนื่องจากเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจะย่อยแบบสุ่มทำให้เกิดปลายของน้ำตาลไม่รีดิวซ์มากขึ้น ดังรูป 2 (b) แล้วเอนไซม์เบตา-อะไมเลสเข้ามาย่อยได้เพิ่มขึ้นนั่นเอง

**เอนไซม์อะไมเลสจากข้าวสาลี**

เอนไซม์อะไมเลสจากข้าวสาลีเป็นเอนไซม์ที่ถูกค้นพบโดย Kirchoff (Tiwari et al., 2015) เป็นเอนไซม์ซึ่งใช้ในการย่อยแป้ง (amylolytic enzyme) ชนิดไฮโดรเลส (hydrolase) ซึ่งมีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ที่อยู่ภายในโครงสร้างของแป้งซึ่งประกอบด้วยอะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) เอนไซม์นี้พบมากในเมล็ดธัญพืชต่าง ๆ สามารถพบได้ในเนื้อเยื้อส่วนต่าง ๆ ของข้าวสาลี จากการศึกษาพบว่าในเมล็ดพืชที่กำลังงอกของพืชบางชนิดเช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวฟ่าง และข้าว (rice) มีกิจกรรม (total activity) และกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของแอลฟาและเบตาอะไมเลสต่างจากเมล็ดที่อยู่ในระยะพัก ดังตาราง 1

**ตาราง 1** กิจกรรม (total activity) และกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์แอลฟาและเบตาอะไมเลสในเมล็ดธัญพืชบางชนิด

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **ธัญพืช** | **แอคติวิตีของเบตาอะไมเลส** | | **แอคติวิตีของแอลฟาอะไมเลส** | |
| **"Specific" ยูนิต** | **"Total" ยูนิต** | **"Specific" ยูนิต** | **"Total" ยูนิต** |
| Barley  Wheat  Rye  Oats  Maize  Sorghum  Rice | 10.7  7.5  9.1  0.7  \*  \*  \* | 29.8  25.1  17.8  2.4  \*  \*  \* | 0.045  0.050  0.089  0.262  0.101  0.031  0.075 | 0.058  0.063  0.111  0.297  0.249  0.249  - |

อ้างอิงจาก ขจีนาฎ โพธิเวชกุล (2541)

\* มีปริมาณต่ำกว่าความไวของวิธีที่จะสามารถวัดได้

หมายเหตุ หน่วยของ enzyme activity (total activity) หมายถึง เมื่อ 1 หน่วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ( 1 unit ) มีค่าเท่ากับเอนไซม์ย่อยสับสเตรท (soluble starch) แล้วให้น้ำตาลรีดิวซ์ (มอลโทส) จำนวน 1 *μ*mole ต่อ 1 min ที่ 37 องศาเซลเซียส ส่วนหน่วยของ specific activity หมายถึง enzyme activity ต่อ 1 มิลลิกรัมของโปรตีน

ข้าวสาลีเป็นธัญพืชเมืองหนาวที่สามารถขึ้นได้ดีในที่สูงหรือในพื้นที่มีอากาศหนาวเย็นและอากาศค่อนข้างแห้ง ข้าวสาลีจัดเป็นพืชกึ่งแห้งแล้ง (semiarid crop) ชอบดินที่มี pH ประมาณ 6.5 - 7.5 ถ้าเป็นพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจะปลูกได้ดีในดินชุดร้อยเอ็ด ถ้าเป็นพื้นที่ในภาคเหนือ จะปลูกได้ดีในดินชุดแม่ขาน แต่ในปัจจุบันได้มีหลายหน่วยงานเข้ามาวิจัยและปรับปรุงพันธุ์ทำให้การปลูกข้าวสาลีปลูกได้เกือบทุกพื้นที่ในประเทศไทย ยกเว้นภาคใต้ เนื่องจากข้าวสาลีไม่ชอบพื้นที่ที่น้ำขัง เพราะถ้ามีน้ำขังจะเกิดโรคทันที ดังนั้น ถ้าจะให้ได้ผลผลิตที่ดี ต้องเลือกพันธุ์ข้าวสาลีที่เหมาะสมกับพื้นที่ที่ใช้ปลูกข้าวสาลี

สำหรับการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลีโดยวิธีการวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์อัลฟ่า-อะไมเลส ตลอดจนทำการหาค่าความจำเพาะของกิจกรรมเอ็นไซม์อัลฟ่า-อะไมเลสก็เป็นส่วนหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพที่เกิดขึ้นจากการเก็บรักษา เมล็ดพันธุ์ และสถานที่ปลูกต่างๆกัน

**สารเคมีและอุปกรณ์**

**1. สารเคมี**

1. Egg albumin

2. Calcium chloride anhydrous

3. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

4. Folin-ciocalteau’s pheol reagent

5. Hydrochloric acid

6. Maltose monohydrate

7. Sodium hydroxide

8. Sodium carbonate

9. Potassium sodium tartrate

10. Starch

11. Tris-hydrochloric aminomethane

# 2. วัสดุอุปกรณ์

## 

1. เครื่องอบแบบเป่าลมร้อน
2. เครื่องเขย่าและควบคุมอุณหภูมิ (incubate)
3. เครื่องบด (blender)
4. เครื่องชั่ง
5. Refrigerated centrifuge
6. Spectrophotometer
7. pH – meter
8. Hot plate and stirrer

**วิธีการทำการทดลอง**

# ขั้นตอนการวิธีการเตรียมสาร

1. การเตรียมสารสำหรับสกัดเอนไซม์

1.1 เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 7.2 M

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ( MW. 36.46 g/mol ) 58.20 ml ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 40.00 ml แล้วปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วยน้ำกลั่น

1.2 เตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.02 M

ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ (MW. 110.99 g/mol) 0.2220 g นำไปละลายน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 ml ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วยน้ำกลั่น

* 1. เตรียมสารละลายบัฟเฟอทริส–ไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.05M pH 7.4

ในแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 mM

ชั่งทริส – ไฮดรอกซีเมธิลอะมิโนมีเธน (MW. 121.14 g/mol) 6.0570 g นำไปละลายน้ำกลั่นประมาณ 800.00 ml เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.02 M ลงไป 25.00 ml ปรับpH ของสารละลายให้ได้ 7.4 โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 7.2 M แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000.00 ml ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000.00 ml ด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียมสารสำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานมอลโทสเข้มข้น 5.0 *μ*mol / ml

ชั่งมอลโทสโมโนไฮเดรต (MW. 360.3 g/mol) 0.1802 g นำไปละลายน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 ml ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วยน้ำกลั่น

2.2 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 M

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (MW. 40.00 g/mol) 8.0000 g ละลายน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 ml ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วยน้ำกลั่น

* 1. เตรียมสารละลาย 3,5 –ไดไนโตรซาลิกไซลิก(3,5-Dinitrosalicylic reagent, DNS reagent)

ชั่งกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิกไซลิก (MW. 228.10 g/mol) 1.0000 g ละลายในสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 M ปริมาตร 20.00 ml เติมน้ำกลั่นลงไป 50.00 ml อุ่นจนละลายหมดจากนั้นเติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (MW. 282.23 g/mol) ลงไปอีก 30.0000 g คนสารต่อไปจนละลายหมดแล้วนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 100.00 ml ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 ml ด้วยน้ำกลั่น

2.4 เตรียมสับสเตรท (substrate) เข้มข้น 1% w/v สำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์

ชั่งแป้ง (starch soluble) 1.0000 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 20 ml แล้วค่อย ๆ รินลงในบีกเกอร์น้ำกลั่นที่ต้มเดือด 80.00 ml พร้อมกับคนสารละลายตลอดเวลา จากนั้นต้มเดือดอีก 5 นาที ทำให้สารละลายเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง

1. 3. การเตรียมสารสำหรับหาปริมาณโปรตีน
2. 3.1 เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานเข้มข้น 250 *μ*g/ml

ชั่ง Egg albumin (MW. approx 67000) 0.1250 g ละลายน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด

1. ml

3.2 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 M

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0000 g ละลายน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 250.00 ml

#### **เตรียมสารละลาย A**

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 20.0000 g ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M

ปรับปริมาตรให้เป็น 100.00 ml ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

#### **เตรียมสารละลาย B**

ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (MW. 249.68 g/mol) 0.5000 g ละลายน้ำกลั่นปริมาตร 40.00 ml แล้วชั่ง โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 1.0000 g ละลายน้ำกลั่นปริมาตร 40.00 ml นำสารละลายทั้งสองผสมกันแล้วปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 100.00 ml ด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 ml

#### **เตรียมสารละลาย C**

นำสารละลาย A 50.00 ml ผสมกับสารละลาย B 1.00 ml (ผสมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

#### **เตรียมสารละลาย D**

ผสมสารละลาย Folin-ciocalteau’s phenol กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้สารละลายทั้งสอง อย่างละ 10.00 ml

# ขั้นตอนวิธีการทดลอง

4. การหากิจกรรมของเอนไซม์อัลฟ่า-อะไมเลสโดยใช้วิธีเทียบมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส

4.1 การทำการกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| สารที่ใช้ (มล) | หลอดที่ | | | | | | | | | | |
| Blank | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| สารละลายมาตรฐานมอลโทส 5.0 *μ*mole / ml | - | 0.10 | 0.20 | 0.30 | 0.40 | 0.50 | 0.60 | 0.70 | 0.80 | 0.90 | 1.0 |
| น้ำกลั่น | 1.00 | 0.90 | 0.80 | 0.70 | 0.60 | 0.50 | 0.40 | 0.30 | 0.20 | 0.10 | - |
| สารละลาย DNS reagent | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| แช่น้ำเดือด 5 นาที แล้วแช่น้ำเย็นทันที | | | | | | | | | | | |
| เติมน้ำเมื่อถึงอุณหภูมิห้อง | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 |
| เขย่าวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm | | | | | | | | | | | |

ทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) และ ค่าความเข้มข้นในแต่ละหลอด (แกน x) โดยหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูล (R) และ สมการเส้นตรง (y=Ax+B)

4.2 การหากิจกรรมของเอนไซม์อัลฟ่า-อะไมเลส

นำสารละลายเอนไซม์อัลฟ่า-อะไมเลสที่แช่แข็งไว้มาเจือจาง 40 เท่า ด้วย สารละลายบัฟเฟอทริส–ไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.05M pH 7.4 แล้วทำการทดลองตามตาราง

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| สารที่ใช้ (มล) | | หลอดที่ | | | |
|  |  | Blank | 1 | 2 | 3 |
| สารละลายเอนไซม์ที่เจือจาง 1/40 | | - | 0.50 | 0.30 | 0.20 |
| สารละลาย Tris-HCl 0.05M pH 7.4 | | 1.00 | - | 0.20 | 0.30 |
| Incubate 37 Co นาน 5 นาที | | | | | |
| สารละลายน้ำแป้ง | | - | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| Incubate 37 Co นาน 30 นาที | | | | | |
| สารละลาย DNS reagent | | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| แช่น้ำเดือด 5 นาที แล้วแช่น้ำเย็นทันที | | | | | |
| เติมน้ำเมื่อถึงอุณหภูมิห้อง | | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 |
| เขย่าวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm | | | | | |

จากข้อมูลที่ได้ นำมาคำนวนหา enzyme activity (total activity)

ซึ่งหมายถึง เมื่อ 1 หน่วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ( 1 unit ) มีค่าเท่ากับเอนไซม์ย่อยสับสเตรท (soluble starch) แล้วให้น้ำตาลรีดิวซ์ (มอลโทส) จำนวน 1 *μ*mole ต่อ 1 min ที่ 37 องศาเซลเซียส

5. การหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีเทียบกราฟมาตรฐานโปรตีน

5.1 การทำกราฟมาตราฐานโปรตีน

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| สารเคมีที่ใช้ (ml) | หลอดที่ | | | | | | | | | | |
| Blank | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| สารละลายมาตรฐาน Egg albumin 250 ug /ml  น้ำกลั่น  เติมสารละลาย C | -  1.00  5.00 | 0.10  0.90  5.00 | 0.20  0.80  5.00 | 0.30  0.70  5.00 | 0.40  0.60  5.00 | 0.50  0.50  5.00 | 0.60  0.40  5.00 | 0.70  0.30  5.00 | 0.80  0.20  5.00 | 0.90  0.10  5.00 | 1.00  -  5.00 |
| เขย่าทิ้งไว้ 10 นาที | | | | | | | | | | | |
| เติมสารละลาย D | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| เขย่าทิ้งไว้ 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm | | | | | | | | | | | |
| ค่าการดูดกลืนแสง 750 nm |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

ทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) และ ค่าความเข้มข้นในแต่ละหลอด

(แกน x) โดยหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูล (R) และ สมการเส้นตรง (y=Ax+B)

5.2 การหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 10 เท่าด้วย น้ำกลั่น แล้วทำการทดลองตามตาราง

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| สารที่ใช้ (มล) | | หลอดที่ | | | |
|  |  | Blank | 1 | 2 | 3 |
| สารละลายเอนไซม์ที่เจือจาง 1/10 | | - | 1.00 | 0.50 | 0.30 |
| น้ำกลั่น | | 1.00 | - | 0.50 | 0.70 |
| เติมสารละลาย C | | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| เขย่าทิ้งไว้ 10 นาที | | | | | |
| เติมสารละลาย D | | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| เขย่าทิ้งไว้ 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm | | | | | |
| ค่าการดูดกลืนแสง 750 nm | |  |  |  |  |
| ความเข้มข้น (*μ*mole / ml)\*\* | |  |  |  |  |
| \*\* ค่าความเข้มข้นหาได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโปรตีน ข้อ 5.1 | | | | | |

จากข้อมูลที่ได้ นำมาคำนวนหา

- specific activity

ซึ่งหมายถึง enzyme activity ต่อ 1 มิลลิกรัมของโปรตีน

บันทึกผลการทดลองบทที่ 5

**เรื่อง กิจกรรมเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสในเมล็ดข้าวสาลี**

**กลุ่มปฏิบัติการที่ ................... Section…………..วันที่ทำปฏิบัติการ...............................**

**เริ่มปฏิบัติการเวลา......................เสร็จสิ้นปฏิบัติการเวลา................**

**1).กิจกรรมการทำการกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส**

**- ขั้นตอนการบันทึกผล**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| สารที่ใช้ (มล) | หลอดที่ | | | | | | | | | | |
| Blank | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| สารละลายมาตรฐานมอลโทส 5.0 *μ*mole / ml | - | 0.10 | 0.20 | 0.30 | 0.40 | 0.50 | 0.60 | 0.70 | 0.80 | 0.90 | 1.0 |
| น้ำกลั่น | 1.00 | 0.90 | 0.80 | 0.70 | 0.60 | 0.50 | 0.40 | 0.30 | 0.20 | 0.10 | - |
| สารละลาย DNS reagent | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| แช่น้ำเดือด 5 นาที แล้วแช่น้ำเย็นทันที | | | | | | | | | | | |
| เติมน้ำเมื่อถึงอุณหภูมิห้อง | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 |
| เขย่าวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm | | | | | | | | | | | |
| ความเข้มข้น (*μ*mole / ml) ได้จากการคำนวน |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | | | | | | | | | | | |

-ขั้นตอนการแสดงการคำนวนความเข้มข้น (*μ*mole / ml) ในแต่ละหลอด

- กิจกรรมทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) และ ค่าความเข้มข้นในแต่ละหลอด (แกน x) โดยหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูล (R) และ สมการเส้นตรง (y=Ax+B)

**2). กิจกรรมการหา activity ของเอนไซม์อัลฟ่า-อะไมเลส**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| สารที่ใช้ (มล) | | หลอดที่ | | | |
|  |  | Blank | 1 | 2 | 3 |
| สารละลายเอนไซม์ที่เจือจาง 1/40 | | - | 0.50 | 0.30 | 0.20 |
| สารละลาย Tris-HCl 0.05M pH 7.4 | | 1.00 | - | 0.20 | 0.30 |
| สัดส่วนการเจือจาง | | 0 | 1/1 | 3/5 | 2/5 |
| Incubate 37 Co นาน 5 นาที | | | | | |
| สารละลายน้ำแป้ง | | - | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| Incubate 37 Co นาน 30 นาที | | | | | |
| สารละลาย DNS reagent | | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| แช่น้ำเดือด 5 นาที แล้วแช่น้ำเย็นทันที | | | | | |
| เติมน้ำเมื่อถึงอุณหภูมิห้อง | | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 |
| เขย่าวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm | | | | | |
| ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm | | 0 |  |  |  |
| ความเข้มข้น (*μ*mole / ml) จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานมอลโตส | |  |  |  |  |
| ความเข้มข้นแต่ละหลอด (*μ*mole / ml) คูณส่วนกลับการเจือจางแต่ละหลอด | |  | X (1/1)  =…………….. | X (5/2)  =…………….. | X (5/3)  =…………….. |
| ความเข้มข้นเฉลี่ย (*μ*mole / ml) | |  |  | | |
| ความเข้มข้นเฉลี่ย (*μ*mole / ml) คูณส่วนกลับการเจือจางรวม = ความเข้มข้นเฉลี่ยที่แท้จริง | |  | X (40/1)  =……………………………….. | | |

- กิจกรรมแสดงการคำนวณหา enzyme activity (total activity)

3). การทำกราฟมาตรฐานโปรตีน

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| สารเคมีที่ใช้ (ml) | หลอดที่ | | | | | | | | | | |
| Blank | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| สารละลายมาตรฐาน Egg albumin 250 ug /ml  น้ำกลั่น  เติมสารละลาย C | -  1.00  5.00 | 0.10  0.90  5.00 | 0.20  0.80  5.00 | 0.30  0.70  5.00 | 0.40  0.60  5.00 | 0.50  0.50  5.00 | 0.60  0.40  5.00 | 0.70  0.30  5.00 | 0.80  0.20  5.00 | 0.90  0.10  5.00 | 1.00  -  5.00 |
| เขย่าทิ้งไว้ 10 นาที | | | | | | | | | | | |
| เติมสารละลาย D | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| เขย่าทิ้งไว้ 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm | | | | | | | | | | | |
| ความเข้มข้น (*μ*g / ml) ได้จากการคำนวน |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ค่าการดูดกลืนแสง 750 nm |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

- กิจกรรมแสดงการคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีน (*μ*g / ml) ของแต่ละหลอด

- กิจกรรมทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) และ ค่าความเข้มข้นโปรตีนในแต่ละหลอด

(แกน x) โดยหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูล (R) และ สมการเส้นตรง (y=Ax+B)

4). การหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| สารที่ใช้ (มล) | | | หลอดที่ | | | | | | |
|  |  | | Blank | | 1 | | 2 | | 3 |
| สารละลายเอนไซม์ที่เจือจาง 1/10 | | | - | | 1.00 | | 0.50 | | 0.30 |
| น้ำกลั่น | | | 1.00 | | - | | 0.50 | | 0.70 |
| สัดส่วนการเจือจาง | | |  | | 1/1 | | 1/2 | | 3/10 |
| เติมสารละลาย C | | | 5.00 | | 5.00 | | 5.00 | | 5.00 |
| เขย่าทิ้งไว้ 10 นาที | | | | | | | | | |
| เติมสารละลาย D | | | 0.50 | | 0.50 | | 0.50 | | 0.50 |
| เขย่าทิ้งไว้ 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm | | | | | | | | | |
| ค่าการดูดกลืนแสง 750 nm | | |  | |  | |  | |  |
| ความเข้มข้น (mg / ml)ได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโปรตีน | | |  | |  | |  | |  |
| ความเข้มข้นแต่ละหลอด (mg / ml) คูณส่วนกลับการเจือจางแต่ละหลอด | |  | | X (1/1)  =…………….. | | X (2/1)  =…………….. | | X (10/3)  =…………….. | |
| ความเข้มข้นเฉลี่ย (mg / ml) | |  | |  | | | | | |
| ความเข้มข้นเฉลี่ย (mg / ml) คูณส่วนกลับการเจือจางรวม = ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ยที่แท้จริง | |  | | X (10/1)  =……………………………….. | | | | | |

- กิจกรรมแสดงการคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ยที่แท้จริงของสารละลาย (mg / ml)

- กิจกรรมแสดงการคำนวณหา Specific enzyme activity