การศึกษาผลของสารสกัดจาก *Vibrio harveyi* ต่อการยับยั้งการผลิตเมลานิน

INHIBITION OF MELANIZATION BY *Vibrio harveyi* EXTRACT

กฤกร ทวนทอง

ณัฐฌา ลิขิตตานนท์

ปวรุตม์ สินโน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2556

การศึกษาผลของสารสกัดจาก *Vibrio harveyi* ต่อการยับยั้งการผลิตเมลานิน

INHIBITION OF MELANIZATION BY *Vibrio harveyi* EXTRACT

กชกร ทวนทอง

ณัฐฌา ลิขิตตานนท์

ปวรุตม์ สินโน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

INHIBITION OF MELANIZATION

BY *Vibrio harveyi* EXTRACT

KODCHAKORN THUANTHONG

NATTACHA LIKITTANON

POWARUT SINNO

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN ENVIRONMENTAL RESOURCE CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ **การศึกษาผลของสารสกัดจาก *Vibrio harveyi* ต่อการยับยั้งการเกิดเมลานิน**

Inhibition of melanization by *Vibrio harveyi* extract

ชื่อนักศึกษา นางสาวกชกร ทวนทอง

นางสาวณัฐฌา ลิขิตตานนท์

นายปวรุตม์ สินโน

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังอนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิตสาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม ประจำปีการศึกษา 2556

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาผลการของสารสกัด *Vibrio harveyi* ต่อการยับยั้งการผลิตเมลานิน		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกชกร	ทวนทอง	53051138
	นางสาวณัฐฌา	ลิขิตตานนท์	53051180
	นายปวรุตม์	สินโน	53051211
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
สาขาวิชา	เคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม		
ปีการศึกษา	2556		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์		

บทคัดย่อ

มนุษย์มีเซลล์ผิวหนังที่สร้างเม็ดสีเมลานิน โดยเอนไซม์ไทโรซีเนส (tyrosinase) มีบทบาทมากที่สุดในการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ทำให้แต่ละคนมีสีผิวต่างกัน สีผิวของคนเราสามารถที่จะเข้มขึ้นหรือจางลงได้ นอกจากนี้การเกิดเมลานินยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของแมลงและกุ้ง โดยพบว่างานวิจัยก่อนหน้านี้แบคทีเรีย *Vibrio cholerae* สร้างสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนสได้ งานวิจัยนี้จึงทำการสกัดสารจากแบคทีเรีย ที่ชื่อว่า วิบริโอ ฮาวีอาย (*Vibrio harveyi*) เพื่อศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีเนส การสกัดสารจากแบคทีเรีย วิบริโอ ฮาวีอาย จะทำสารสกัดให้แห้งด้วยการระเหยและนำมาละลายด้วย DMSO จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนส การศึกษาการยับยั้งแอคติวิตีของไทโรซีเนสของสารสกัดทำได้โดยใช้ L-DOPA และ 4-methylcatehol เป็นสับสเตรทและวัดแอคติวิตีของไทโรซีเนส จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตรและ 490 นาโนเมตร จะพิจารณาประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งไทโรซิเนสได้จากอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา จากผลที่ได้พบว่าสารสกัดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนสได้ โดยใช้ L-DOPA ที่เป็นสับสเตรทได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับ 4-methylcatechol และการยับยั้งขึ้นกับปริมาณของตัวยับยั้ง

คำสำคัญ : ไทโรซีเนส , L-DOPA , *Vibrio harveyi* , 4-methylcatechol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	INHIBITION OF MELANIZATION BY *Vibrio harveyi* EXTRACT
Students	Miss KodchakornThuanthong
	Miss Nattacha Likittanon
	Mr. Powarut Sinno
Degree	Bachelor of Science
MajorProgram	Environmental Resource Chemistry
Academic Year	2013
Advisor	Dr.TipachaiVatanavicharn

ABSTRACT

Human has skin cells creating melanin whereas tyrosinase enzyme is a central role synthesize cause of a different skin color that are able to be darken or lighter . According to the problems , abundantly studying of melanin inhibition . In this research study tyrosinase enzyme inhibition by the extracts of bacteria , (*Vibrio harveyi*) , was dried by evaporation and dissolved in DMSO then use it to study tyrosinase enzyme inhibition. A study of tyrosinase enzyme activity inhibition use L-DOPA and 4-methylcatehol as substrate . Then measuring tyrosinase enzyme activity from absorbance at wavelength of 475 nm and 490 nm . Consider the efficiency of the extract inhibiting tyrosinase from reaction speed from slope graph. Conclude that , *Vibrio harveyi* extract can inhibit tyrosinase enzyme and L-DOPA is a better substrate compare to 4-methylcatechol

Keywords :, tyrosinase , L-DOPA , *Vibrio harveyi* , 4-methylcatechol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีต้องขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการทำโครงงานพิเศษนี้จนประสบความสำเร็จ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ที่ให้คำแนะนำและเป็นกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาควิชาเคมี ที่อำนวยความสะดวกในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ รวมถึงการติดต่อประสานงานกับภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ขอขอบคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ธุรการ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือตลอดการการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีในการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทและเอกห้องปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมี สถานที่ และคำแนะนำต่างๆตลอดการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดในการทำโครงงานพิเศษ

กชกร ทวนทอง
ณัฐฌา ลิขิตตานนท์
ปวรุตม์ สินโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญรูป	VI
สัญลักษณ์และคำย่อ	VII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรีย *Vibrio Species*(Higher Order Taxonomy)	3
2.2 ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase system; proPO system)	5
2.3 เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase, PO)	7
2.4 สมบัติของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส	8
2.5 การจำแนกชนิดของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส	10
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
2.6.1 โมเลกุลขนาดเล็กที่ใช้ปกป้องแบคทีเรียที่ก่อโรคในแมลง	10
2.6.2 Mushroom tyrosinase	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 อุปกรณ์	12
3.2 เครื่องมือ	12
3.3 สารเคมี	13
3.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (*VH* 639)	13
3.5 การสกัดสารจากเชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (VH 639)	13
3.6 การวิเคราะห์ความสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนสโดยใช้ 4-Methylcatechol เป็นสับสเตรท	14
3.7 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งของไทโรซีเนสจากเห็ด โดยใช้ DOPA สับสเตรท	14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	
4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (*VH* 639)	15
4.2 การสกัดสารจากเชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (VH 639)	16
4.3 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งของไทโรซีเนสจากเห็ด	21
4.4 ผลการวิเคราะห์ผลการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซีเนสเมื่อเติม DMSO และไม่เติม DMSO	22
4.5 ผลการทดสอบแอคติวิตี้การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ 4-methylcatechol เป็นสับสเตรท	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4.6 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซีเนสโดยใช้ DOPAเป็นสับเสตรท	24
4.7 ตารางแสดงการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนสที่ปริมาณต่างๆของตัวยับยั้ง	25
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	28
5.2 ข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก ก เครื่องมือ สารเคมีและอุปกรณ์	31
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	34
ภาคผนวก ค รายละเอียดผลการทดลอง	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1	สับสเตรทของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสัตว์	8
ตารางที่ 2	สับสเตรทของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในพืช	9
ตารางที่ 4.1	อัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส	21
ตารางที่ 4.2	อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเมื่อเติม DMSO และไม่เติม DMSO	22
ตารางที่ 4.3	ตารางแสดงอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ 4- methylcatechol เป็นสับสเตรท	24
ตารางที่ 4.4	ตารางแสดงอัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ DOPA เป็นสับสเตรท	24
ตารางที่ 4.5	อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างในแต่ละปริมาตร	26
ตารางที่ 4.6	ตารางแสดงแอคติวิตี้ของสารตัวอย่างในแต่ละปริมาตร	26
ตารางที่ ค-1	ปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์ไทโรซีเนส	38
ตารางที่ ค-2	อัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส	39
ตารางที่ ค-3	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย	40
ตารางที่ ค-4	อัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส	41
ตารางที่ ค-5	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย	41
ตารางที่ ค-6	อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา	42
ตารางที่ ค-7	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายครั้งที่ 1	42
ตารางที่ ค-8	อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา	43
ตารางที่ ค-9	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายครั้งที่ 2	43
ตารางที่ ค-10	อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา	44
ตารางที่ ค-11	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายครั้งที่ 3	44
ตารางที่ ค-12	อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา	45
ตารางที่ ค-13	ตารางแสดงแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไทโรซีเนสโดยใช้ DOPA เป็น สับเสตรททำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ ค-14	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารตัวอย่าง	46
ตารางที่ ค-15	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบลงค์	46
ตารางที่ ค-16	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ DMSO	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
รูปที่ 1	ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน	6
รูปที่ 4.1	เชื้อ *Vibio harveyi* ที่มีการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง TSB + 2% NaCl หลังบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18 -24 ชั่วโมง	15
รูปที่ 4.2	เชื้อ *Vibio harveyi* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB + 2% NaCl ก่อนนำไป เขย่า	16
รูปที่ 4.3	เชื้อ *Vibio harveyi* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB + 2% Nacl หลังนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	17
รูปที่ 4.4	สารละลายเซลล์ *Vibrio harveyi* ก่อนนำไปเขย่า 2-3 ชั่วโมง	17
รูปที่ 4.5	สารละลายเซลล์ *Vibio harveyi* หลังนำไปเขย่า สารละลายจะขุ่นขึ้น	18
รูปที่ 4.6	สารละลายเซลล์ *Vibio harveyi* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงทั้งหมด จะถูกสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต	18
รูปที่ 4.7	การแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่อัตรา 3000 รอบต่อนาที	19
รูปที่ 4.8	สารละลายเซลล์หลังจากที่นำไปปั่นเหวี่ยง สารละลายเซลล์กับเอทิลอะซิเตตจะแยกชั้นเป็น 2 ชั้น	19
รูปที่ 4.9	เก็บส่วนใส่ด้านบนของเอทิลอะซิเตต 17 มิลลิลิตร	20
รูปที่ 4.10	หลังการระเหยจะเกิดตะกอนสีเหลืองที่ก้นบีกเกอร์ นำไปชั่งหาน้ำหนักตะกอน	20
รูปที่ 4.11	กราฟแสดงแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไทโรซีเนส เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง	21
รูปที่ 4.12	กราฟแสดงผลการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซีเนสเมื่อเติม DMSO และไม่เติม DMSO	22
รูปที่ 4.13	กราฟแสดงการทดสอบแอคติวีตี้การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ 4-methylcatechol เป็น สับสเตรท	23
รูปที่ 4.14	กราฟแสดงการทดสอบแอคติวีตี้การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ DOPA เป็นสับสเตรท	25
รูปที่ 4.15	ตารางแสดงแอคติวิตี้ของสารตัวอย่างในแต่ละปริมาตร	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อ	ความหมาย
VH	เชื้อ *Vibrio harveyi*
TSB	อาหาร Tryptic soy broth
OD_{600}	การวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DOPA	Dopamine
DI	น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
mM	มิลลิโมล
µL	ไมโครลิตร
mL	มิลลิลิตร
nm	นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเมลานิน ได้มีการพัฒนาและได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจาก ผู้คนได้เร่งเห็นถึงความสำคัญเกี่ยวกับการดูแลสุขภาพผิวของร่างกาย ซึ่งทำให้เกิดการพัฒนาด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ดูแลร่างกายอย่างมาก จึงได้เกิดความคิดในการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับสกัดจาก *Vibrio harveyi* ต่อการยับยั้งการผลิตเมลานิน

ในการศึกษาผลการของสารสกัดจาก *Vibrio harveyi* ต่อการยับยั้งการผลิตเมลานิน ศึกษากระบวนการผลิตเมลานินปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อกระบวนการผลิต คือ เอนไซม์ (Enzyme) ซึ่งเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดคือ เอนไซม์ไทโรซีเนส (tyrosinase) ถูกสังเคราะห์ขึ้นใน Rough Endoplasmic Reticulum และถูกขนต่อไปที่ Golgi Body ซึ่งจะสร้างเปลือกหุ้ม tyrosinase ให้เป็นถุงไว้เรียกว่า melanosomes ซึ่ง melanin จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในส่วนนี้เอง เมื่อถูกสร้างขึ้นแล้วก็จะถูกปล่อยเข้าสู่ส่วนที่เป็น Cytoplasm ของเซลล์ Melanocyte และ ณ จุดนี้ melanin จะทำหน้าที่กรองรังสีไว้เพื่อปกป้องเซลล์ และป้องกันการกลายพันธุ์ของ DNA ซึ่งเอนไซม์ไทโรซีเนสมีหน้าที่เปลี่ยนไทโรซีน (tyrosine) ไปเป็นสารกึ่งกลาง (DOPA , DOPAquinone) จนกระทั่งได้ยูเมลานิน (eumelanin) ซึ่งมีสีเข้ม (น้ำตาล-ดำ) ถ้าเอนไซม์นี้ทำงานมากเกินไปก็จะทำให้เม็ดสีเมลานิน ถูกสร้างได้มากขึ้นและอาจจะได้เม็ดสีสีดำแบบยูเมลานินมากขึ้นทำให้เกิดรอยดำหรือฝ้า จึงมีการพยายามยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ด้วยสารบางชนิดเช่น วิตามินซี, แอลบูตีน (albutin) โดยเมลานินในมนุษย์และแมลงหรือสัตว์มีข้อปล้องทำหน้าที่ต่างกัน คือ ในกลุ่มของแมลงและกุ้งเมลานินจะเข้าไปเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน แต่ในมนุษย์ เมลานินจะแสดงออกในรูปของสีผิว สำหรับที่ผิวหนัง เม็ดสีมีความสำคัญในการให้สีกับผิวหนัง และป้องกันอันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต ส่วนในดวงตา เม็ดสีเป็นตัวทำให้ดวงตามีความมืดสนิทซึ่งมีความจำเป็นต่อการมองเห็นและยังป้องกันอันตรายของเซลล์รับสีในจอประสาทตาจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต ไม่ว่าจะเป็นฝ้า จุดด่างดำ ผิวคล้ำแดด ล้วนมีสาเหตุมาจากเม็ดสีเมลานินทั้งนั้น หากเมลานินมีจำนวนมากสีผิวก็จะเข้มขึ้น เมลานินมีจำนวนน้อยสีผิวก็จะอ่อน และหากมีมากเป็นบางบริเวณก็ก่อให้เกิดฝ้าหรือจุดด่างดำตามมานั่นเอง ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนสจากสารสกัด *Vibrio harveyi* เพื่อให้ได้วัตถุดิบที่มีประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของสารสกัดจาก *Vibrio harveyi* ต่อการผลิตเมลานิน โดยอาศัยความสัมพันธ์ในเรื่องการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition) ว่ามีผลต่อกันหรือไม่อย่างไร

1.3. ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการสร้างเมลานินโดยใช้สารสกัดจาก *Vibrio harveyi*

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของโครงการวิจัย

1. สามารถนำไปพัฒนาและต่อยอดในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ซึ่งอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง โดยส่วนใหญ่สารที่สกัดนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางจะมาจากพืช
2. สามารถนำไปศึกษาต่อเพื่อป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* ในกุ้งจากการพัฒนาด้านอาหารและยารักษาโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรีย *Vibrio species* (Higher Order Taxonomy)

การจัดกลุ่มแบคทีเรียตามหลักวิชาของการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นหมวดหมู่ *(Bacteria Taxonomy)* จัดตามพื้นฐานของความเหมือนกันหรือความสัมพันธ์กันของแบคทีเรีย *(Similarities or Relationships)* ลักษณะทาง *Phenotype* และ *Genotype* การจัดกลุ่มจะจัดเรียงจากระดับ *Kingdom* จนถึงระดับ *Subspecies*

Kingdom Bacteria
Phylum Proteobacteria
Class Gammaproteobacteria
Order Vibrionales
Family Vibrionaceae
Species Vibrio harveyi

Synonyms *Lucibacterium harveyi , Beneckea harveyi, Achromobacter harveyi, Pseudomonas harveyi, Photobacterium harveyi, Vibrio carchariae, Vibrio trachuri;* (Thompson, 2002)

Vibrio harveyi อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) ลักษณะรูปท่อนโค้งงอ (curved rod shaped) เติบโตได้ทั้งในสภาพที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนบางกลุ่มต้องการเกลือเพราะมีส่วนช่วยกระตุ้นการเติบโต มีขนาดความกว้างของเซลล์ประมาณ 0.5-0.8 μm ยาว 1.4-2.6 μm

วิบริโอสามารถเจริญจะให้โคโลนีสีเขียวหรือเหลือง ในสภาพการเจริญในอาหารเหลว (liquid media) แบคทีเรียวิบริโอจะมี polar flagellum ที่มีปลอกหุ้มเพียง 1 เส้นที่บริเวณด้านข้างของเซลล์ใช้ในการเคลื่อนที่ *Vibrio harveyi* เมื่อเจริญในอาหารแข็ง (solid media) ทดสอบ oxidase test ให้ผลบวกเกือบทั้งหมดของแบคทีเรียบางครั้งอาจพบ polar flagellum เพิ่มเป็น 3 เส้น (Baumann *et al.*, 1980) มีความต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเติบโตได้ดีทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน ได้ดีที่ความเค็ม 10-40 ส่วนในพัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วน อุณหภูมิระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส (ชลอ, 2543) อาหารเฉพาะ (selective media) ที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียสกุลนี้ คือ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS Agar)

Vibrio haveyi จัดเป็นแบคทีเรียที่มีคุณลักษณะพิเศษ คือ สามารถเรืองแสง (luminesence) ในสภาพต่างๆ เช่นเดียวกับแบคทีเรียวิบริโอหลายชนิด เช่น *V.cholerae* (biotype albensis)(ลิลาและคณะ, 2539) *V. vulnificus* บางสายพันธุ์ (Mohney et al., 1994), *V. splendidus* (Lavilla-Pitogo et al., 1990) และแบคทีเรียในสกุล *Photobacterium* เช่น *P.leiognathi* (ชัยวุฒิ, 2539), *P.phosphoreum* (Prayitno and Latchford, 1995) เนื่องจากมีเอนไซม์ลูซเฟอเรส (luciferase) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Aldehyde และ Flavin mononucleotide (FMNH2) ในรูป reduced ให้ได้น้ำ กรดอินทรีย์ และ Flavin mononucleotide และปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปพลังงานแสง มีสีเขียวแกมเหลืองออกมา มีความยาวคลื่น 490 nm. (Schmetlerer et al., 1986) ดังสมการ

$$RCHO + O_2 + FMNH_2 \xrightarrow{\text{lusiferase}} RCOOH + FMN + H_2O + Light\ (h\upsilon\ 490\ nm)$$

หมายเหตุ ; RCHO คือ อัลดีไฮด์คาร์บอนอะตอมต่อกันเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 7-9 คาร์บอนอะตอม

Vibrio spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมทั้งที่เป็นน้ำจืดและจัดเป็นกลุ่มที่เจริญได้ดีในทะเล นอกจากนี้พบอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร(Alimentary tracts)ในสัตว์หลายๆชนิด (West and Cowell, 1984) รวมถึงกุ้งทะเลบางชนิด (Yasuda and Kitao, 1980) บางชนิดดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายในสภาพแวดล้อมและบางชนิด จัดเป็นชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์และบางชนิดยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด แต่ *V. harveyi* ไม่พบการก่อโรคในมนุษย์และนอกจากนี้ยังพบว่า *V. alginolyticus* ,*V. anguillarum* ,*V. carchariae, V.cholerae* ,*V. damsela, V. ordalii* และ *V. vulnificus* จัดเป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคในปลาเช่นกัน (Austin และ Austin, 1988) และบางชนิดยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้ง penaeid อีกด้วย (Lightner, 1988)

จากรายงานโดยทั่วไปพบว่าแบคทีเรียเรืองแสง *Vibrio* spp. ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ ได้แก่ *V. harveyi* , *V. splendidus* และบางสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *V. harveyi* นั้นมีรายงานว่าเป็นชนิดที่สร้างความเสียหายอย่างหนักต่อกุ้งในโรงเพาะและอนุบาลในแถบประเทศอาเซียนที่มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (Prayitno and Latchford, 1995) โดย

มีผลทำให้กุ้งในโรงเพาะและอนุบาลเกิดโรคที่เรียกว่า " โรคเรืองแสง " (Luminous หรือ Diamond Disease) โดยลูกกุ้งที่ป่วยเป็นโรคจะไม่ว่องไวในการว่ายน้ำ การเคลื่อนที่จะช้าลง กล้ามเนื้อบริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่องท้องจะมีสีขาวขุ่น อ่อนแอ กินอาหารน้อยลงจมลงสู่ก้นบ่อและตายภายใน 1-2 วันภายหลังจากพบอาการอัตราการตายจะเพิ่มสูงขึ้นจาก 20 เปอร์เซ็นต์และอาจถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในเวลากลางคืนจะสังเกตเห็นจุดสีเขียวระยิบระยับคล้ายแสงหิ่งห้อยลอยตัวขึ้นลงตามการเคลื่อนไหวของลูกกุ้ง (Raungpan , 1995)

2.2 ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase system; proPO system)

ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase system ; proPO system) หรือระบบ proPO เป็นระบบป้องกันตัวที่สำคัญของสัตว์กลุ่มอาร์โทรพอต ซึ่งสามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ร่างกายได้ (Söderhäll and Cerenius, 1998) โดยจดจำส่วนประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น เบตา-1,3-กลูแคนลิโพโพลีแซคคาไรด์ เปปทิโดไกลแคน และกรดลิโพทิโชอิค โดยอาศัยโมเลกุลสำหรับจดจำที่จำเพาะได้แก่ BGBP และ LGBP (Davic and Söderhäll,1990; Lee *et al.*, 2000) โมเลกุล BGBP สังเคราะห์ที่ตับในขณะที่โมเลกุล LGBP สังเคราะห์ที่เซลล์ฮีโมไซท์ เมื่อ BGBP จับกับเบตา-1,3-กลูแคน โปรตีนนี้จะไปจับตัวรับบนผิวเซลล์ของเซลล์ฮีโมไซท์ (Barracco *et al.*, 1991; Davic and Söderhäll 1992)

การที่ BGBP - glucan complex จับกับเซลล์ฮีโมไซท์สามารถชักนำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆ ตามมามากมาย เช่น การแผ่ขยายและการสลายแกรนูลของเซลล์ฮีโมไซท์(Barracco *et al.*, 1991) สนับสนุนให้เซลล์ไฮยาลินมีอัตราการกลืนกินเร็วขึ้น(Thornqvist *et al.*, 1994) การสลายเซลล์ฮีโมไซท์ชนิดกรานูลทำให้เกิดการหลั่งสารที่เป็นองค์ประกอบของระบบ proPO และสารอื่นๆที่สำคัญในการป้องกันตัวออกมาจากกรานูล ดังแสดงในรูปที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

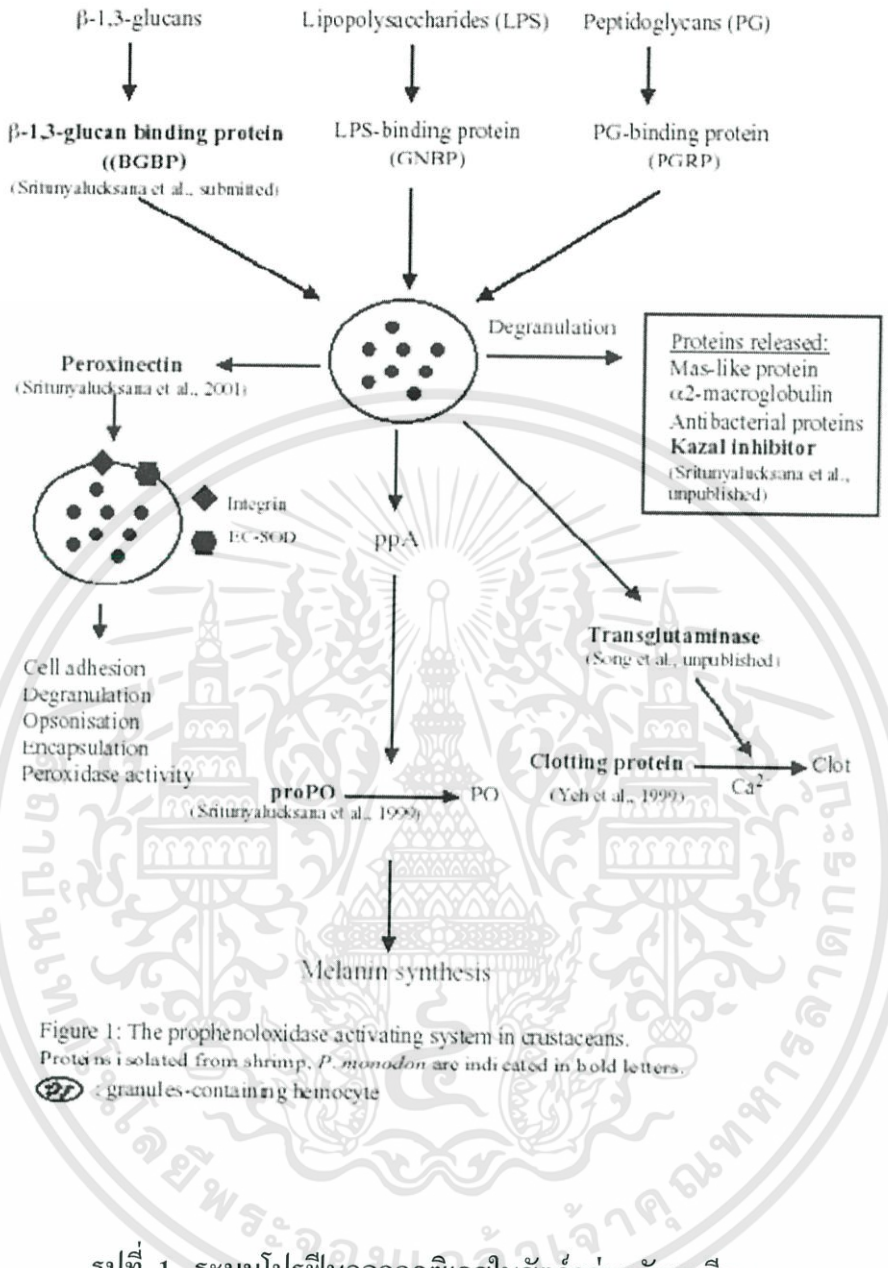


Figure 1: The prophenoloxidase activating system in crustaceans.
Proteins isolated from shrimp, *P. monodon* are indicated in bold letters.

รูปที่ 1 ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน

(Sritunyalucksana, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase activating system;proPO system) ถูกควบคุมด้วยเอนไซม์ Serine proteinase (SP) ซึ่งเรียกเอนไซม์นี้ว่า ppA (Prophenoloxidase activating enzyme) ในกุ้งนาง (crayfish) เอนไซม์ ppA เป็น trypsin-like proteinase ซึ่งถูกเก็บไว้ในรูป inactive ภายในกรานูลเมื่อมีการสลายกรานูล เอนไซม์ ppA นี้จะหลั่งออกมาพร้อมกับเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส (ProPO) และเปลี่ยนไปเป็นรูป active ที่สามารถเปลี่ยนเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส (ProPO) ไปเป็นฟีนอลออกซิเดส (PO) (Aspan and Söderhäll, 1991; Aspan *et al.*,1995)

กระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (Melanization) (Söderhäll and Cerenius, 1998) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase enzyme) เป็นเอนไซม์ที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ (Copper containing) และเป็นเอนไซม์สำคัญโดยจะเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (O-hydroxylation) ของโมโนฟีนอล (Monophenol) ให้เป็นไดฟีนอล (Diphenol) และออกซิไดซ์ไดฟีนอล (Oxidise Diphenol) ไปเป็นควิโนน (Quinone) เกิดเป็นโพลิเมอร์ของเมลานินซึ่งมีสีดำ เมลานินและสารตัวกลางในกระบวนการนี้เป็นสารที่มีพิษสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ เช่น ในกุ้งนางพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aphanomyces astaci* (Söderhäll and Ajaxon, 1982) และเพื่อป้องกันการกระตุ้นเอนไซม์ proPO ไม่ให้มากเกินไปในระบบนี้จึงมีตัวควบคุม คือ ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส (proteinase inhibitor) เช่น pacifastin, แอลฟา 2-มาโครโกลบูลิน (α 2-macroglobulin) (Hall *et al.*, 1989; Aspan *et al.*, 1990; Liang *et al.*, 1977)

นอกจากนี้ยังพบว่าตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส (Proteinase inhibitor) ยังช่วยป้องกันการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสของจุลินทรีย์ในการย่อยโปรตีนที่แข็งตัว (clotting protein) และการเจาะเพื่อการบุกรุก(penetrate)บริเวณที่เกิดบาดแผลในกุ้งนางพบว่า แอลฟา 2-มาโครโกลบูลินทำหน้าที่ดังกล่าว โดยแอลฟา2-มาโครโกลบูลินสามารถจับกับโปรตีนที่แข็งตัวซึ่งเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase) (Hall and Söderhäll, 1994)

2.3 เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase, PO)

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสแบบ monophenol oxidase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งออร์โธ (ortho) ของสับสเตรทแบบฟีนอล (phenolic substrate) และออกซิไดซ์ไดฟีนอลไปเป็น *o*-benzoquinone โดย diphenol oxidase ปฏิกิริยาทั้งสองใช้โมเลกุลของออกซิเจนเป็นสับสเตรทร่วม (Nicolas *et al.*, 1994) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในเห็ด โดยเอนไซม์ที่ถูกค้นพบนี้จะมีจำนวนหน่วยย่อย (subunit) ที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ความต่างของจำนวนหน่วยย่อยเป็นไปตามความจำเพาะที่มีต่อสับสเตรท (Marshall *et al.*, 2000) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Phenoloxidase) เป็นเอนไซม์ที่มาจากระบบ proPO system พบในการสร้างเมลานินและตรวจพบได้ในฮีโมลิมฟ์หรือใน coelom และยังพบได้ในคิวติเคิล (cuticle) ของอาร์โทรพอด (Söderhäll and Cerenius,1998) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสามารถเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง ortho ของโมโนฟีนอลและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของฟีนอลไปเป็นควิโนน รวมทั้งเอนไซม์นี้สามารถเปลี่ยนไทโรซีน(tyrosine) ไปเป็น Dihydroxyphenylalanine (DOPA) และเปลี่ยน DOPA ไปเป็น DOPA-quinone (Sugumaran,1996) โดยปฏิกิริยาเหล่านี้เกิดในวิถีการสร้างเมลานิน พบว่าส่วนประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ในปริมาณน้อยๆ ได้แก่ เบตา-1,3-กลูแคน ลิโพโพลีแซคคาไรด์ เปปทิโดไกลแคน หรือ zymosan ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตจากผนังเซลล์ของยีสต์ urea, Ca^{2+} เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) และความร้อนสามารถกระตุ้นให้เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีแอคทิวิทีเพิ่มสูงขึ้นได้ โดยทำหน้าที่กระตุ้นในลักษณะเดียวกับ serine proteinase (Söderhäll, 1981; Leonard *et al.*,1985) ซึ่งสามารถกระตุ้นเอนไซม์โปร-ฟีนอลออกซิเดสที่ไม่ active ไปเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ active ได้และทำให้เกิดการสร้างเมลานินโดยเห็นเป็นจุดสีดำบริเวณคิวติเคิลของอาร์โทรพอด (Söderhäll and Ajaxon, 1982; Sugumaran and Kanost, 1993)

2.4 สมบัติของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

สับสเตรทของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีสับสเตรท (substrate) หลากหลายชนิดทั้งเอนไซม์ในพืชและสัตว์ดังแสดงใน ตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 สับสเตรทของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสัตว์

Source	Phenolic substrates
Crab	Catechol, L-DOPA
Clam	L-DOPA, tyrosine, hydroquinine monomethyl ether
Shrimp	Tyrosine,L-DOPA,methyl catechol, catechol,tyramine,phenol,hydroquinone,resorcinol
Lobster	Tyrosine
Cock roach	L-DOPA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 สับสเตรทของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในพืช

Source	Phenolic substrates
Apple	Catechin, Caffeic acid, 4-methy catechol, flavonol glycosiders
Apricot	Chlorogenic acid, pyrogallol, 4-methy catechol, Caffeic acid
Avocado	Pyrogallol, Caffeic acid, DOPA, Caffeic acid
Banana	Dopamine, leucodelphindin, leucocyanins
Cacao	Catechin, complex tannins, anthocyanins, leucoanthocyanidins
Coffee beans	Chlorogenic acid, Caffeic acid
Eggplant	Chlorogenic acid, Caffeic acid, coumaric acid, cinnamic acid, derivatives
Grape	Catechin, Cholorogenic acid, DOPA, Phenol
Lettuce	Tyrosine, Caffeic acid, chlorogenic acid Devivates
Mango	DOPA, Catechol, Catechin, 4-methy catechol
Mushroom	Tyrosinase, DOPA, Dopamine, Adrenaline, Noradernaline
Peach	Catehol, Gallic acid, Catechin, Dopamine
Pear	Chlorogenic acid, Catechol, Catechin, Cafferic acid
Plum	Chlorogenic acid, Catechin, Caffeic acid, Catechol,DOPA
Potato	Chlorogenic acid, Cafferic acid, DOPA, *m*-cresol
Sweet Potato	Cholrogenic acid, Caffeic acid, Caffeylamide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การจำแนกชนิดของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสามารถนำมาใช้ในการจำแนกเอนไซม์ออกเป็น 3 ชนิด คือ monophenol oxidase (EC.1.14.18.1), catechol oxidase (EC.1.10.3.1.) และ laccase (EC.1.10.3.2.)

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในแมลงแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ ชนิด laccase (E.C.1.10.3.2; *p*-diphenol: O_2 oxidoreductase) ชนิด catechol oxidase (E.C.1.10.3.1 diphenol: O_2 oxidoreductase) และชนิด tyrosinase (E.C.1.14.18.1 monophenol, L-DOPA: O2 oxidoreductase) (Barrett, 1987) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสชนิด tyrosinase มีความสามารถในการออกซิไดซ์สารพวกโมโนฟีนอลและไดฟีนอลในขณะที่ชนิด laccase และ catechol oxidase จะมีความจำเพาะสูงต่อสับสเตรทไดฟีนอล เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในคิวติเคิลของแมลงมีความสามารถในการออกซิไดซ์สารพวกไดฟีนอลเท่านั้นไม่สามารถออกซิไดซ์สารพวกโมโนฟีนอลได้แต่เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในฮีโมลิมฟ์ของแมลง 20 มีความสามารถในการออกซิไดซ์สารพวกโมโนฟีนอลส่วนเอนไซม์ในคิวติเคิลของสิ่งมีชีวิตจำพวกกุ้งสามารถออกซิไดซ์ได้ทั้งโมโนฟีนอลและไดฟีนอล

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสใน humoral fluid ของ amphioxus เป็นชนิด tyrosinase ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเซลล์ฮีโมไซท์ของกุ้ง *Penaeus californiensis* ในกุ้งนาง และในไข่ของทากน้ำจืด *Biomphalaria glabrata* (Bai *et al.*, 1997; Gollas-Galvan *et al.*, 1999; Asano and Ashida, 2001)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 โมเลกุลขนาดเล็กที่ใช้ปกป้องแบคทีเรียที่ก่อโรคในแมลง

จากงานวิจัยในการทดสอบผลของเอนไซม์ในแมลง 2 ชนิด *Xenorhabdus nematophila* , *Photorhabdus luminescence* ที่สามารถผลิตสารอินทรีย์ที่มีชื่อว่า rhabduscin,amido, glycosyl,vinyl-isonitile ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่อยู่ฟังชั่นของอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) การวิเคราะห์ได้ถูกพัฒนามาจากแบบจำลอง Roman scattering และ fluorescence microscopy ซึ่งเทคนิคในการวิเคราะห์ทั้งสองชนิดนี้มีศักยภาพอย่างมากในการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ ในงานวิจัยเป็นการตรวจสอบสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มครัสเตเชี่ยน (Crustacean)นอกจากนี้ยังสามารถพบสารอินทรีย์ชนิดนี้ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่เป็นพาหะนำโรคได้อีกด้วย จากงานวิจัยทางชีวเคมีเป็นการตรวจสอบความสามารถในการตอบสนองของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสต่อการยับยั้งการผลิตเมลานิน ซึ่งใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย fluorescence microscopy ซึ่งศักยภาพของเทคนิคนี้ คือ แม้ว่าในงานวิจัยจะใช้ปริมาณและความเข้มของสารตั้งต้นและเอนไซม์ในปริมาณและความเข้มข้นที่ต่ำ แต่การพัฒนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยไม่ได้พบกระบวนการยับยั้งการผลิตเมลานินในแมลงเพียงเท่านั้นยังพบในแบคทีเรียที่เป็นพาหะนำโรคอีกด้วย

2.6.2 Mushroom tyrosinase

tyrosinase เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในพืช สัตว์ ผลไม้ ในการทำวิจัยส่วนใหญ่จะเลือกเอนไซม์ที่มาจากเห็ดมากกว่าชนิดอื่นด้วยเหตุผล คือ สะดวก คุณสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์ที่สามารถตอบทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งปฏิกิริยามีอยู่ 2 ลักษณะ ได้แก่

1). Reduction : the reduction of monophenols (e.g. tyrosine)

2). Oxidase : the oxidation of diphenols (e.g. catechol)

จากคุณสมบัติเฉพาะตัวที่สามารถเป็นสารกระตุ้นการทำงาน (Enzyme activation) ตัวยับยั้งการทำงาน(Enzyme inhibitor) โดยคุณสมบัติเฉพาะตัวจึงทำให้เอนไซม์ไทโรซีเนสจากเห็ด เป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการสกัดและการผลิตเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์เครื่องมือและ สารเคมี

3.1 อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปต HTL LAB SOLUTION รุ่น DISCOVERY COMFORT ประเทศโปแลนด์
2. ทิปขนาดต่างๆ(Micropipette and Tips) GILSON รุ่น AUTOCLAVABLE TOWERPACK ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. ลูปเขี่ยเชื้อ (Loops Inoculate)
4. Quart Cuvette
5. หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 50mL
6. พาราฟิล์ม
7. ตะเกียง
8. ไฟแช็ค
9. ขวดรูปชมพู่ขนาด 500mL
10. บีกเกอร์ขนาด 50 mL 100 mL และ 500 mL
11. จานเพาะเชื้อ
12. กระดาษกรอง Whatman
13. ขวด Duran
14. หลอดทดลองขนาด 12 mL และ 50 mL
15. ไมโครเพลท 96 หลุม

3.2 เครื่องมือ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge)
2. เครื่อง (Incubator Shaker) WIS 30 DIHAN
3. เครื่อง Spectrophotometer 269N273008 CALIBRATION LABORATORY
4. ตู้บ่มเชื้อ Plus II incubater บริษัท Thai polymedic
5. ตู้เย็น
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง(Centrifuge)
7. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.3 สารเคมี

1. เชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639
2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB Broth Molecular biology grade ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB Agar/Amp Molecular biology grade ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave
5. เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate)
6. โซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate)
7. Tyrosinase from mushroom lyophilized powder 25KU
8. 4-Methylcatechol 98% 25g (A126510250)
9. DMSO (dimethyl sulfoxide)
10. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)
11. สารละลาย DOPA (Dopamine)
12. Phosphate Buffered Saline (PBS Buffer)
13. ฟีนิลไทโอยูเรีย

3.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (*VH* 639)

นำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + 2% NaCl (Tryptic Soy Broth + เกลือ 2%) ด้วยเทคนิค Streak plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

3.5 การสกัดสารจากเชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (VH 639)

เชื้อ *Vibrio harveyi* จะถูกเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาทีในอาหารเหลว TSB จากนั้นนำสารละลายเซลล์ 200 ไมโครลิตรที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 คืนให้เข้าสู่ระยะสเตชันนารีเฟสจะถูกนำมาบ่มต่อในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง และตรวจวัดค่าความขุ่น(OD_{600} = 0.5-0.6) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นที่ 600 นาโนเมตร สารละลายเซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงทั้งหมดจะถูกสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตโดยสัดส่วน 1:1 ทำการแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง และเก็บส่วนใสด้านบนของเอทิลอะซิเตต 18 มิลลิลิตร การเตรียมสารตัวอย่างชุดที่ 1 (Sample 1) สามารถถ่ายลงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ และทำให้แห้งได้เลยทันที ส่วนการเตรียมสารตัวอย่างชุดที่ 2 (Sample 2) ขั้นตอนสกัดจะเหมือนเตรียมสารสารตัวอย่างชุดที่ 1 จะต่างกันตรงวิธีการเก็บส่วนใสด้านบนของเอทิลอะซิเตต สารตัวอย่างชุดที่ 2 จะทำให้แห้งด้วยการเติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) กรองและทำให้แห้ง เพื่อให้ได้ของแข็งสีส้มแล้วละลายด้วย DMSO ชุดควบคุมจะทำเหมือนกับตัวอย่างแต่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (Blank 1, Blank 2)

3.6 การวิเคราะห์ความสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนสโดยใช้ 4-methylcatechol เป็นสับสเตรท

การวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ไทโรซีเนสใช้ 96-well microplates ปิเปตเอนไซม์ไทโรซีเนส 1 ไมโครลิตร(ความเข้มข้น 2 ยูนิต ต่อไมโครลิตร) และฟอสเฟตบัพเฟอร์ 189 ไมโครลิตร (100 มิลลิโมล) และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารยับยั้ง 50 ไมโครลิตรละลายใน DMSO และเติมด้วย 5 ไมโครลิตรของ 4- methylcatechol 20 มิลลิโมล นำ 96-well microplates ที่เขย่าเป็นเวลา 3 วินาที มาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุก ๆ นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ฟีนิลไทโอยูเรียจะถูกใช้เป็นตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลบวก DMSO จะถูกใช้เป็นสารควบคุมที่ให้ผลลบ ในการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนส สามารถคำนวณได้จากค่าอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา ค่าอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาสามารถคำนวณได้จากความชันของกราฟ

3.7 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งของไทโรซีเนสจากเห็ดโดยใช้ DOPA สับสเตรท

เอนไซม์ไทโรซีเนส เป็นเอนไซม์ที่สำคัญเอนไซม์หนึ่งในขบวนการผลิตเมลานิน ดังนั้นการวัดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้อาจเป็นตัวบ่งชี้ว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการสร้างเมลานินได้ การวิเคราะห์เอนไซม์ไทโรซีเนส ใช้อุปกรณ์เป็น 96-well microplates (costar 3370) และเครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (Molecular Devices FlexStation 3) ปิเปตสารละลาย DOPA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมล ปริมาตร 50 ไมโครลิตรที่เตรียมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล (พีเอช 6.8) เติมลงในสารยับยั้งปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ละลายอยู่ใน DMSO จากนั้นนำสารละลายที่ได้บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีก่อนเติมด้วยสารละลายเอนไซม์ไทโรซีเนสจากเห็ดที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ความเข้มข้น 2 ยูนิต ต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทิ้งเพลทไว้ประมาณ 3 วินาทีก่อนทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ทุก ๆ 20 วินาที ฟีนิลไทโอยูเรียจะถูกใช้เป็นตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลบวก DMSO จะถูกใช้เป็นสารควบคุมที่ให้ผลลบ อัตราเร็วเริ่มต้นคำนวณได้จากสมการเชิงเส้นในช่วง 3 นาทีแรกของการฟอร์มโดพาโครม (dopachrome formation) ในการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนสสามารถคำนวณได้จากค่าอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา ค่าอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาสามารถคำนวณได้จากความชันของกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4. 1 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (*VH* 639)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (VH 639) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + 2% NaCl (Tryptic Soy Broth + เกลือ 2%) ด้วยเทคนิค Streak plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโต แยกเป็นโคโลนี่เดี่ยว ดังรูปที่ 4.1

รูปที่ 4.1 เชื้อ *Vibio harveyi* ที่มีการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง TSB + 2% NaCl หลังบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18 -24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การสกัดสารจากเชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (VH 639)

แบคทีเรียจะถูกเพาะเลี้ยงและบ่มในตู้บ่มเชื้อ (Plus II incubate)เป็นเวลา 1 คืนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซสเซียส อัตราเขย่า 250 รอบต่อนาที ในอาหารเหลว TSB (Tryptic soy broth grade U.S.A.) จะได้สารละลายเซลล์ (Starter culture) สำหรับการสกัดสารจากเชื้อ *Vibrio harveyi* ดังรูปที่ 4.1

สารละลายเซลล์ (Starter culture) 200 ไมโครลิตรที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 คืนนำมาบ่มต่อในอาหารเหลว TSB (Tryptic soy broth grade U.S.A.) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเขย่า 250 รอบต่อนาทีและตรวจวัดความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600} 0.5-0.6) ตรวจสอบเชื้อที่มีการเจริญเติบโตสารละลายจะขุ่น ดังรูปที่ 4.2 - 4.3

สารละลายเซลล์ (Starter culture) ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงทั้งหมดจะถูกสกัดด้วยเอตทิลอะซิเตต 19 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เกิดการแยกตัวที่อัตรา 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15นาที สารละลายจะแยกออกเป็น 2 ชั้นเก็บส่วนใสชั้นบนเพื่อไประเหยแห้งจะเกิดเป็นตะกอนสีเหลืองและนำไปชั่งน้ำหนัก

รูปที่ 4.2 เชื้อ *Vibio harveyi* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB + 2% NaCl ก่อนนำไปเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 เชื้อ *Vibio harveyi* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB + 2% NaCl หลังนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

รูปที่ 4.4 สารละลายเซลล์ *Vibrio harveyi* ก่อนนำไปเขย่า 2-3 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.5 สารละลายเซลล์ *Vibio harveyi* หลังนำไปเขย่า สารละลายจะขุ่นขึ้น

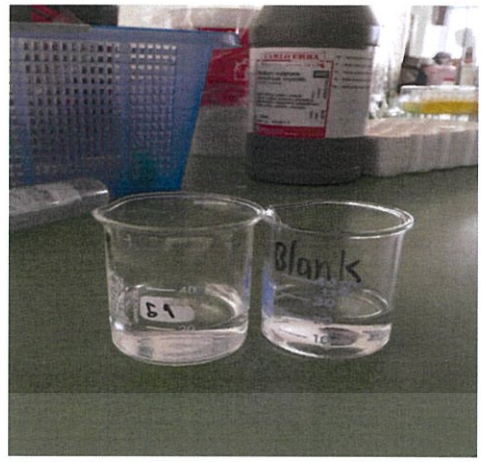
รูปที่ 4.6 สารละลายเซลล์ *Vibio harveyi* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงทั้งหมดจะถูกสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.7 การแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่อัตรา 3000 รอบต่อนาที

รูป 4.8 สารละลายเซลล์หลังจากที่นำไปปั่นเหวี่ยง สารละลายเซลล์กับเอทิลอะซิเตตจะแยกชั้นเป็น 2 ชั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



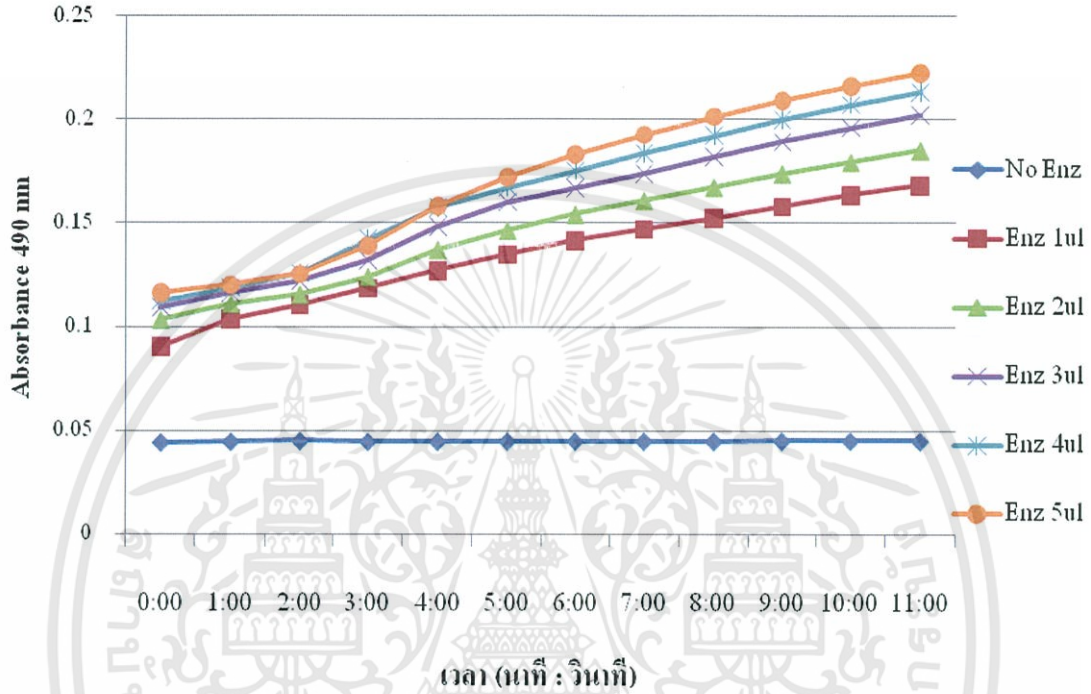
รูปที่ 4.9 เก็บส่วนใสด้านบนของเอทิลอะซิเตต 17 มิลลิลิตร

รูปที่ 4.10 หลังการระเหยจะเกิดตะกอนสีเหลืองที่ก้นบีกเกอร์ นำไปชั่งหาน้ำหนักตะกอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งของไทโรซีเนสจากเห็ด

จากการทดลองหาแอคติวิตี้ของไทโรซีเนส เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการนำมาใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง โดย เริ่มตั้งแต่ ไม่ใส่เอนไซม์ (No Enz) ไปจนถึงปริมาณ 5 ไมโครลิตร (Enz 5 µl)



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไทโรซีเนสเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการนำมาใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง

จากการทดสอบแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไทโรซีเนสเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการนำมาใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งสามารถคำนวณอัตราได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 อัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส

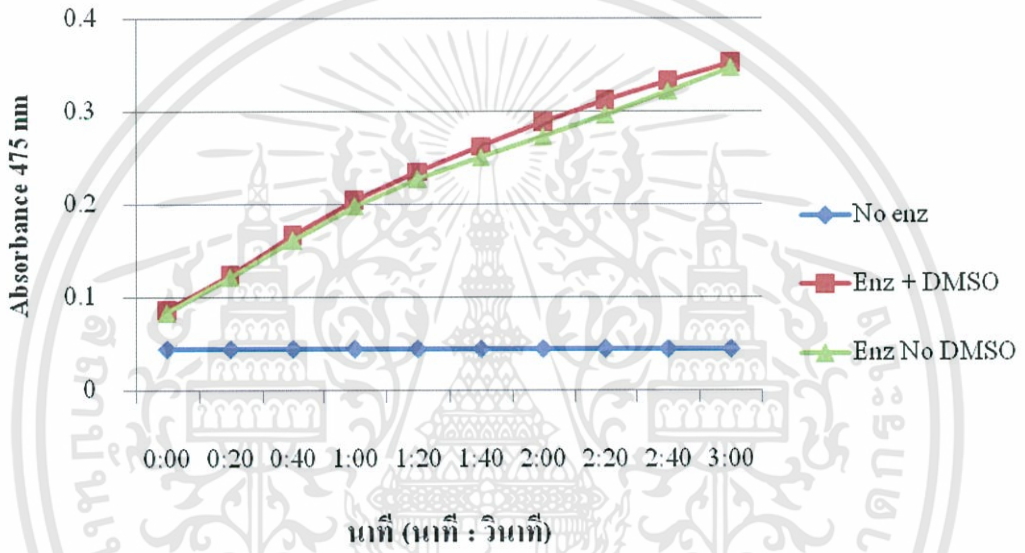
ปริมาตร (ไมโครลิตร)	อัตราเร็ว(sec^{-1})
0	0
1	5.60×10^{-3}
2	6.41×10^{-3}
3	7.06×10^{-3}
4	7.70×10^{-3}
5	8.41×10^{-3}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางแสดงอัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส จากผลที่ได้ ปริมาณเอนไซม์ที่น้อยที่สุดที่ให้กราฟเป็นเส้นตรงคือ 1 ไมโครลิตร (2 unit) ดังนั้นเราจึงใช้ปริมาณนี้ทุกการทดลองหลังจากนี้ เพราะถ้าเอนไซม์ไทโรซีเนสมีมาก ปฏิกิริยาจะเกิดเร็วเกินไป อาจส่งผลให้ตัวยับยั้งไม่สามารถยับยั้งได้

4.4 ผลการวิเคราะห์ผลการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซีเนสเมื่อเติม DMSO และไม่เติม DMSO

จากการวิเคราะห์ผลการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซีเนสเมื่อเติม DMSO และไม่เติม DMSO เพื่อทำให้ทราบว่า DMSO มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนส



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงผลการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซีเนสเมื่อเติม DMSO และไม่เติม DMSO

จากการวิเคราะห์ผลการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซีเนสเมื่อเติม DMSO และไม่เติม DMSO สามารถคำนวณอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาได้ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเมื่อเติม DMSO และไม่เติม DMSO

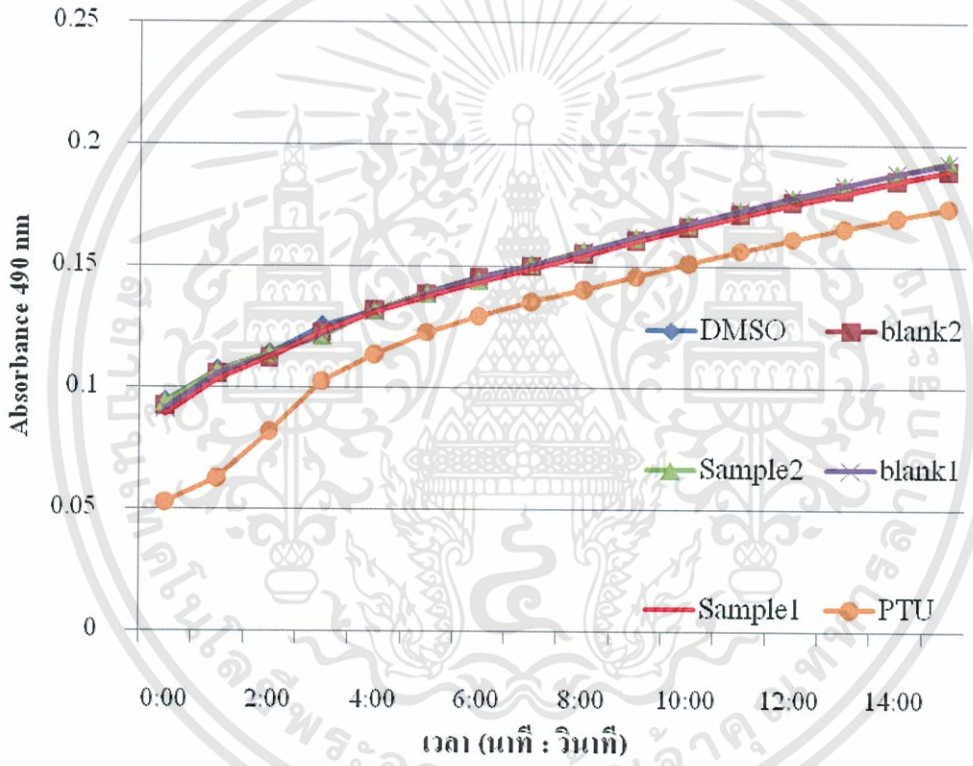
สารตัวอย่าง	อัตราเร็ว (sec^{-1})
No Enz	0.000
Enz+DMSO	3.00×10^{-2}
Enz No DMSO	3.23×10^{-2}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากตัวยับยั้ง ถูกละลายอยู่ใน DMSO เราจึงต้องทดสอบผลของ DMSO ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซีเนส จากผลที่ได้พบว่าอัตราเร็วของกลุ่มเอนไซม์ไทโรซีเนสที่มี DMSO กับเอนไซม์ไทโรซีเนส ที่ไม่มี DMSO มีค่า ใกล้เคียงกัน และมี เปอร์เซ็นต์แอคติวิตี้ เท่ากับ 92.88 ซึ่งมีค่าน้อยมาก ดังนั้นในการทดลองต่อจากนี้ต้องมี DMSO เป็นตัวควบคุม

4.5 ผลการทดสอบแอคติวิตี้การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ 4-methylcatechol เป็นสับสเตรท

จากการทดลองหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ 4-methylcatechol เป็นสับสเตรทและการใช้สารสกัด (Sample 1, Sample 2, Blank 1, Blank 2) เป็นตัวยับยั้ง โดยมี PTU เป็น positive control และมี DMSO เป็น negative control ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.13 กราฟแสดงการทดสอบแอคติวิตี้การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ 4-methylcatechol เป็น สับสเตรท

จากการทดลองหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ 4-methylcatechol เป็นสับสเตรทและการใช้สารสกัด (Sample 1, Sample 2, Blank 1, Blank 2) เป็นตัวยับยั้ง โดยมี PTU เป็น positive control และมี DMSO เป็น negative control สามารถคำนวณอัตราเร็วและ เปอร์เซ็นต์แอคติวิตี้ได้ดัง ตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ 4-methylcatechol เป็น สับสเตรท

สารตัวอย่าง	อัตราเร็ว (sec^{-1})	% Activity
DMSO	5.02×10^{-3}	100
NEG2	5.07×10^{-3}	100.9960
SAM2	5.44×10^{-3}	108.3665
NEG1	5.38×10^{-3}	107.1713
SAM1	5.20×10^{-3}	103.5856
PTU	5.13×10^{-3}	102.1912

จากตารางแสดงอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซีเนส จะเห็นว่าค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารตัวอย่างแต่ละตัวมีค่าใกล้เคียงกับตัวควบคุมทุกตัว รวมถึง PTU ซึ่งเป็น positive control ที่จะต้องให้ผลยับยั้ง 100 % ดังนั้น 4-methylcatechol จึงไม่เหมาะสมต่อการใช้เป็นสับเสตรท

4.6 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซีเนสโดยใช้ DOPA เป็นสับเสตรท

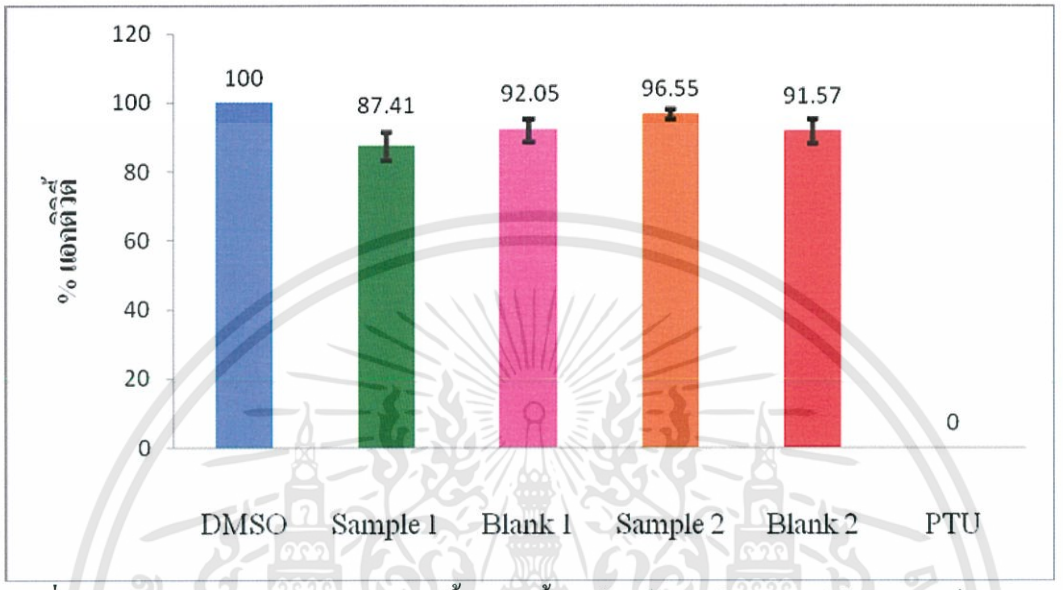
จากการทดลองหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ DOPA เป็นสับสเตรทและการใช้สารสกัด (Sample 1, Sample 2, Blank 1, Blank 2) เป็นตัวยับยั้ง โดยมี PTU เป็น positive control และมี DMSO เป็น negative control และสามารถคำนวณอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาได้ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ตารางแสดงอัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ DOPA เป็นสับสเตรท

สารตัวอย่าง	อัตราเร็วครั้งที่ 1 (sec^{-1})	อัตราเร็วครั้งที่ 2 (sec^{-1})	อัตราเร็วครั้งที่ 3 (sec^{-1})
DMSO	7.76×10^{-2}	7.23×10^{-2}	9.53×10^{-2}
Sample 1	6.44×10^{-2}	6.58×10^{-2}	8.41×10^{-2}
Blank 1	6.95×10^{-2}	6.93×10^{-2}	8.65×10^{-2}
Sample 2	7.31×10^{-2}	7.02×10^{-2}	9.09×10^{-2}
Blank 2	6.80×10^{-2}	6.82×10^{-2}	8.84×10^{-2}
PTU	0.000	0.000	0.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ DOPA เป็นสับสเตรทและการใช้สารสกัด (Sample 1, Sample 2, Blank 1, Blank 2) เป็นตัวยับยั้ง โดยมี PTU เป็น positive control และมี DMSO เป็น negative control สามารถคำนวณ เปอร์เซ็นต์แอคติวิตี้และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงการทดสอบแอคติวิตี้การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนส โดยใช้ DOPA เป็นสับสเตรท

จากตารางแสดงแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไทโรซีเนสโดยใช้ DOPA เป็น สับเสตรท จะเห็นได้ว่าค่า Sample 1 มีค่า เปอร์เซ็นต์แอคติวิตี้น้อยที่สุด แสดงว่ามีการยับยั้งมากที่สุด คือ เอนไซม์ไทโรซีเนสทำงานได้ไม่ดีนั่นเอง ค่า PTU มีค่าเท่ากับ 0 เพราะมีผลการยับยั้ง 100 % และจากค่า S.D. ที่มีค่าน้อยแสดงให้เห็นว่าข้อมูลมีความน่าเชื่อถือสูง

4.7 ตารางแสดงการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนสที่ปริมาณต่างๆของตัวยับยั้ง

จากการวิเคราะห์เอนไซม์ไทโรซีเนสในข้อ 4.6 พบว่า Sample 1 ให้ผลการยับยั้งดังนั้นเราจึงต้องการตรวจสอบว่าการยับยั้งกับปริมาณของตัวยับยั้ง โดยผลที่ได้ในการทดลองนี้ได้ปริมาตรของตัวยับยั้งตั้งแต่ 5 ถึง 30 ไมโครลิตร ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างในแต่ละปริมาตร

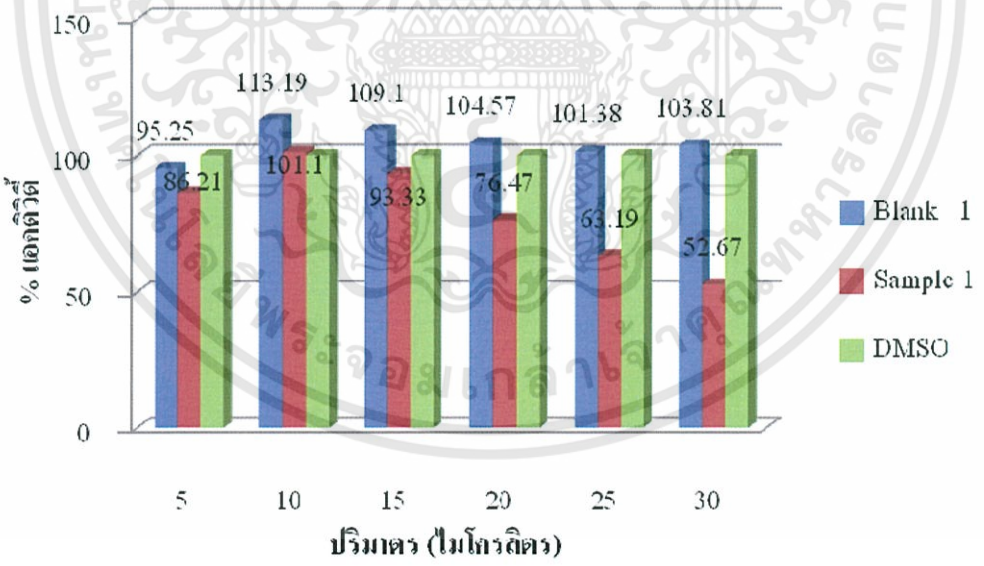
	5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร	15 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร	25 ไมโครลิตร	30 ไมโครลิตร
Blank 1	2.21×10^{-2}	2.06×10^{-2}	1.80×10^{-2}	1.60×10^{-2}	1.46×10^{-2}	1.36×10^{-2}
Sample 1	2.00×10^{-2}	1.84×10^{-2}	1.54×10^{-2}	1.17×10^{-2}	0.91×10^{-2}	0.69×10^{-2}
DMSO	2.32×10^{-2}	1.82×10^{-2}	1.65×10^{-2}	1.53×10^{-2}	1.44×10^{-2}	1.31×10^{-2}

Control เท่ากับ 0

จากตารางที่ 4.6 สามารถคำนวณ เปอร์เซ็นต์แอคติวิตี้ ได้ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 ตารางแสดงแอคติวิตี้ของสารตัวอย่างในแต่ละปริมาตร

	5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร	15 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร	25 ไมโครลิตร	30 ไมโครลิตร
Blank 1	95.25	113.19	109.10	104.57	101.38	103.81
Sample 1	86.21	101.10	93.33	76.47	63.19	52.67
DMSO	100	100	100	100	100	100



รูปที่ 4.15 ตารางแสดงแอคติวิตี้ของสารตัวอย่างในแต่ละปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า Sample 1 จะยับยั้งมากขึ้นตามปริมาตรของตัวยับยั้งที่มากขึ้น เมื่อมีปริมาณของ Sample 1 มากขึ้น การยับยั้งมีมากขึ้นจะทำให้เอนไซม์ไทโรซีเนสทำงานได้ไม่ดีนั่นเอง จากผลนี้เราใช้ DMSO เป็นตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาผลการของสารสกัดจาก *Vibrio harveyi* ต่อการยับยั้งการผลิตเมลานิน การศึกษาการยับยั้งแอคติวิตีของไทโรซีเนสของสารสกัดทำได้โดยใช้ 4-methylcatechol และ L-DOPA เป็นสับสเตรทและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไทโรซีเนส จากค่าการดูดกลืนแสง ผลการทดลองที่ได้สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนสได้ ซึ่งถ้าใช้ 4-methylcatechol , PTU ซึ่งเป็นสารตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลบวกจะไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนสได้ จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นสับสเตรท และการใช้ L-DOPA เป็นสับสเตรทจะมีสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนสได้ โดยมีการยับยั้ง 13 % ที่ 5 ไมโครลิตร และเมื่อเพิ่มปริมาตรจนเป็น 30 ไมโครลิตรจะมีการยับยั้ง 47.33 %

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในทุกขั้นตอน ควรมีความสะอาดมาก เนื่องจากจะมีการปนเปื้อนของเชื้อรา
2. ควรสกัดสารสกัดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* เพิ่มเติม เพราะเชื้อที่สกัดมีปริมาณน้อยมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย. (2556). "วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย" (ออนไลน์) . แหล่งที่มา :www.kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2391/6/223354_app1.pdf. วันที่สืบค้น 20 กันยายน 2556

Cowan , S.T. , HoH , J.G. , Liston, J. , Murray,R.G.E. , Niven,C.E. , Ravin, A.W. , and Stanier, R.Y. 1974. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. 8th ed. The Williams & Wilkins Company / Baltimore P. 1 – 1246.

Nester , E.W. , Robert,C.E. and Nester,M.T. 1995. Functional Anatomy of Prokaryotes and Eukaryote. In: Microbiology. 1st ed . Wm.C.BrownCommunications,Inc. P. 46 – 87.

Scanlan ,C.M. 1988. Introduction to Veterinary Bacteriology , 1st ed. Iowa State university.Press / Amess . P. 3 – 17.

ชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัต์. "การประยุกต์ใช้ลิควิดโครมาโทกราฟี – แมสส์สเปกโทรเมตรี" ปีที่ 2 ฉบับที่ 8 เดือนสิงหาคม 2548 (หน้า 1-14)

กิจการ ศุภมาตย์. 2543. "ระบบภูมิคุ้มกันและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ" วารสารสงขลา นครินทร์ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีปีที่ 22 ฉบับพิเศษ

"การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียผลิตสารปฏิชีวนะสกุล*Alteromonas*ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ*Vibrio*Study on Efficacy of Antibiotic-Producing Bacteria", *Alteromonas*sp. on Growth Inhibition of *Vibrio* spp.มหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์ (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) พ.ศ. 2545 ISBN 974-357-425-5

FERNAND F. FAGUTAO, HIDEHIRO KONDO, TAKASHI AOKI and IKUO HIRONO, Prophenoloxidase has a role in innate immunity in penaeid shrimp,*Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and TechnologyKonan 4-5-7, Minato, Tokyo Japan 108-8477*

An inhibitory compound produced by Pseudomonas with effectiveness on *Vibrio harveyi* Aquaculture Research, 2010, 41, 1452-1461

An inhibitory compound produced by Pseudomonas with effectiveness on *Vibrio harveyi* Aquaculture Research, 2010, 41, 1452-1461

T.J. Abraham, Antibacterial marine bacterium deter luminous vibriosis in shrimp larvae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

อรัญญา คงแก้ว. 2549. "การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสในการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค*Vibrio harveyi* ของกุ้งแชบ๊วย" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์สงขลา.

LEO WALLERSTEIN, "Enzyme Preparations from Microorganismscommercial production andindustrial application" This paper will be confined Wallerstein Laboratories, New York, N. Y.

R.O. DE FARIA *et al,* The Biotechnological Potential of Mushroom Tyrosinases ; Biotechnology of Mushroom Tyrosinases, *Food Technol. Biotechnol. 45* (3) 287–294 (2007)ISSN 1330-9862 (FTB-1932)

SUNG-YUM SEO,VINAY K. SHARMA, AND NITI SHARMA, Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects,*J. Agric. Food Chem.,* Vol. 51, No. 10, 2003, Applied Biotechnology Laboratory, Department of Biology, College of Natural Sciences,Kongju National University, Kongju 314-701, South Korea,

Association of a luminous Vibrio sp., taxonomically related to Vibrio harveyi, with Clytia Linearis (Thornely, 1900) (Hydrozoa, Cnidaria), Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 396 (2011), Page 77–82

Microorganism – Produced Enzymes in the Food Industry ; IzabelSoares, ZacariasTavora, Rodrigo PateraBarcelos and SuzymeireBaroni*Federal University of the Bahia Reconcavo Center for Health SciencesBrazil*

Mixture Toxicity of Nitrobenzene and Trinitrobenzene Using the Marine Bacterium *Vibrio harveyi* as the Test Organism , ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY 36, 189–195 (1997)ARTICLE NO. ES961499

An inhibitory compound produced by Pseudomonas with effectiveness on *Vibrio harveyi* Aquaculture Research, 2010, 41, 1452-1461

T.J. Abraham, Antibacterial marine bacterium deter luminous vibriosis in shrimp larvae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เครื่องมือ สารเคมีและอุปกรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เครื่องมือ สารเคมีและอุปกรณ์

เครื่องมือ

1. ไมโครปิเปต HTL LAB SOLUTION ประเทศโปแลนด์ รุ่น DISCOVERY COMFORT
2. ทิปขนาดต่างๆ (Micropipette and Tips) GILSON TOWERPACK ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น AUTOCLAVABLE
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge)
4. เครื่อง (Incubator Shaker) รุ่น WIS 30 DIHAN
5. เครื่อง Spectrophotometer CALIBRATION LABORATORY รุ่น 269N273008
6. ตู้บ่มเชื้อ Plus II incubater บริษัท Thai polymedic
7. ตู้เย็น
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง(Centrifuge)
9. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
10. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

อุปกรณ์

1.	ไมโครปิเปต	ขนาด	20	µL
		ขนาด	20	µL
		ขนาด	200	µL
		ขนาด	1000	µL
2.	กระบอกตวง	ขนาด	50	mL
3.	ขวดรูปชมพู่	ขนาด	250	mL
		ขนาด	500	mL
4.	บีกเกอร์	ขนาด	50	mL
		ขนาด	100	mL
		ขนาด	500	mL
5.	หลอดทดลอง	ขนาด	12	mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด 50 mL

6. แท่งแก้ว
7. ช้อนตักสาร
8. Micro centrifuge tube ขนาด 0.5 mL

สารเคมี

1. เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate)
2. โซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate)
3. Tyrosinase from mushroom lyophilized powder 25KU
4. 4-Methylcatechol 98% 25g (A126510250)
5. น้ำกลั่น Clave
6. สารละลาย DOPA (Dopamine)
7. DMSO (dimethyl sulfoxide)
8. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)
9. Phosphate Buffered Saline (PBS Buffer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารและสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารและสารเคมี

อาหารแข็ง TSB 100 mL

อาหาร TSB	3	g
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	100	mL
เกลือโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	2	g
วุ้น (agar)	1.5	g

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร TSB 3 g เกลือโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) 2 g ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และวุ้น (agar) 1.5 g เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไป 100 mL นำไป Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเหลว TSB 100 mL

อาหาร TSB	3	g
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	100	mL
เกลือโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	2	g

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร TSB 3 g เกลือโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) 2 g ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไป 100 mL นำไป Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -4°C

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8)

วิธีการเตรียม

ชั่ง NaH_2PO_4 2.4 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น จนปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายเอนไซม์ไทโรซีเนส

วิธีการเตรียม

ชั่งเอนไซม์ไทโรซีเนส 0.0012 กรัม ละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8)

สารละลาย L-DOPA

วิธีการเตรียม

ชั่งสารละลาย L-DOPA 0.0016 กรัม ละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

รายละเอียดผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

รายละเอียดผลการทดลอง

1. ผลการหาปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์ไทโรซีเนสเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง

ตารางที่ ค-1 ปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์ไทโรซีเนส

Time	No Enz	Enz 1ul	Enz 2ul	Enz 3ul	Enz 4ul	Enz 5ul
0:00	0.0445	0.0900	0.1037	0.1092	0.1125	0.1164
1:00	0.0448	0.1035	0.1113	0.1160	0.1188	0.1203
2:00	0.0452	0.1106	0.1156	0.1221	0.1257	0.1256
3:00	0.0448	0.1183	0.1242	0.1320	0.1422	0.1390
4:00	0.0449	0.1269	0.1372	0.1484	0.1574	0.1583
5:00	0.0451	0.1348	0.1467	0.1602	0.1671	0.1724
6:00	0.0451	0.1414	0.1543	0.1671	0.1751	0.1833
7:00	0.0451	0.1470	0.1609	0.1741	0.1837	0.1929
8:00	0.0451	0.1524	0.1673	0.1821	0.1921	0.2016
9:00	0.0452	0.1581	0.1739	0.1895	0.1997	0.2093
10:00	0.0453	0.1635	0.1795	0.1964	0.2070	0.2165
11:00	0.0452	0.1684	0.1852	0.2026	0.2133	0.2229

ตัวอย่างการคำนวณ ; No Enz

อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา = (0.0452-0.4510)/9

= 0.0000167

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลแสดงอัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส

ตารางที่ ค-2 อัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส

ปริมาตร (ไมโครลิตร)	อัตราเร็ว(sec^{-1})
0	0
1	5.60×10^{-3}
2	6.41×10^{-3}
3	7.06×10^{-3}
4	7.70×10^{-3}
5	8.41×10^{-3}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการทดสอบแอคติวิตี้การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีเนสโดยใช้ 4-methylcatehol เป็นสับสเตรท

ตารางที่ ค-3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย

Time	DMSO	Neg2	Sam2	Neg1	Sam1	PTU
0:00	0.0945	0.0923	0.0938	0.0914	0.0888	0.0528
1:00	0.1076	0.1057	0.1066	0.1058	0.1034	0.0628
2:00	0.1144	0.1122	0.1140	0.1131	0.1125	0.0820
3:00	0.1257	0.1228	0.1212	0.1219	0.1230	0.1030
4:00	0.1319	0.1318	0.1318	0.1314	0.1309	0.1136
5:00	0.1393	0.1386	0.1388	0.1386	0.1375	0.1229
6:00	0.1458	0.1454	0.1441	0.1449	0.1434	0.1295
7:00	0.1507	0.1499	0.1507	0.1505	0.1489	0.1354
8:00	0.1558	0.1552	0.1564	0.1562	0.1543	0.1406
9:00	0.1611	0.1607	0.1619	0.1620	0.1600	0.1460
10:00	0.1664	0.1661	0.1673	0.1674	0.1655	0.1513
11:00	0.1715	0.1714	0.1728	0.1731	0.1708	0.1565
12:00	0.1767	0.1765	0.1781	0.1785	0.1757	0.1614
13:00	0.1811	0.1811	0.1833	0.1835	0.1803	0.1658
14:00	0.1852	0.1853	0.1884	0.1882	0.1851	0.1700
15:00	0.1895	0.1893	0.1932	0.1924	0.1895	0.1742

ตัวอย่างการคำนวณ ; DMSO

อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา = (0.1895-0.1393)/10

= 0.0052

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลแสดงอัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส

ตารางที่ ค-4 อัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส

สารตัวอย่าง	อัตราเร็ว (sec^{-1})	% การยับยั้ง
DMSO	5.02×10^{-3}	100.0000
NEG2	5.07×10^{-3}	100.9960
SAM2	5.44×10^{-3}	108.3665
NEG1	5.38×10^{-3}	107.1713
SAM1	5.20×10^{-3}	103.5856
PTU	5.13×10^{-3}	102.1912

ตัวอย่างการคำนวณ ; % การยับยั้ง

% การยับยั้ง NEG2 $= (5.07 \times 10^{-3} / 5.02 \times 10^{-3}) * 100$

$= 100.9960$

3. ผลการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซีเนสเมื่อเติม DMSO กับไม่เติม DMSO

ตารางที่ ค-5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย

Time	No Enz	Enz+DMSO	Enz No DMSO
0:00	0.0453	0.0867	0.0832
0:20	0.0451	0.1249	0.1217
0:40	0.0453	0.1670	0.1618
1:00	0.0453	0.2047	0.1987
1:20	0.0454	0.2357	0.2281
1:40	0.0452	0.2629	0.2513
2:00	0.0454	0.2890	0.2738
2:20	0.0454	0.3127	0.2970
2:40	0.0452	0.3337	0.3224
3:00	0.0454	0.3531	0.3482

ตัวอย่างการคำนวณ ; Enz + DMSO

อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา $= (0.3531-0.289)/1$

$= 0.0888$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลแสดงอัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส

ตารางที่ ค-6 อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยา

สารตัวอย่าง	อัตราเร็ว(sec)
No Enz	0.0000
Enz+DMSO	0.0888
Enz No DMSO	0.0883

4. ผลการทดสอบแอคติวิตี้การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้ DOPA เป็นสับสเตรท

ตารางที่ ค-7 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ครั้งที่ 1

Time	PTU	Blank2	Sam2	Blank1	Sam1	DMSO
0:00	0.0433	0.1266	0.1292	0.1164	0.1105	0.1164
0:20	0.0432	0.1535	0.1576	0.1447	0.1361	0.1442
0:40	0.0431	0.1812	0.1872	0.1732	0.1627	0.1746
1:00	0.0431	0.2068	0.2148	0.1998	0.1877	0.2041
1:20	0.0431	0.2313	0.2415	0.2248	0.2109	0.2332
1:40	0.0432	0.2546	0.2666	0.2484	0.2325	0.2608
2:00	0.0431	0.2760	0.2898	0.2699	0.2524	0.2857
2:20	0.0431	0.2958	0.3112	0.2898	0.2709	0.3092
2:40	0.0432	0.3139	0.3305	0.3080	0.2881	0.3298
3:00	0.0432	0.3306	0.3485	0.3249	0.3039	0.3493
3:20	0.0431	0.3464	0.3650	0.3406	0.3186	0.3675
3:40	0.0432	0.3608	0.3803	0.3552	0.3323	0.3843
4:00	0.0433	0.3743	0.3944	0.3689	0.3453	0.4000

ตัวอย่างการคำนวณ ; DMSO

อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา = (0.3493-0.1164)/3

= 0.0776

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลแสดงอัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส

ตารางที่ ค-8 อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยา

สารตัวอย่าง	อัตราเร็ว (sec)
DMSO	0.0776
Sample 1	0.6446
Blank 1	0.0695
Sample 2	0.0731
Blank 2	0.0680
PTU	0.0000

ตารางที่ ค-9 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ครั้งที่ 2

Time	PTU	Blank2	Sam2	Blank1	Sam1	DMSO
0:00	0.0502	0.1561	0.1577	0.1473	0.1422	0.1393
0:20	0.0502	0.1839	0.1856	0.1748	0.1690	0.1691
0:40	0.0503	0.2114	0.2138	0.2030	0.1960	0.1994
1:00	0.0506	0.2375	0.2403	0.2298	0.2217	0.2271
1:20	0.0507	0.2622	0.2658	0.2553	0.2458	0.2530
1:40	0.0506	0.2849	0.2902	0.2789	0.2680	0.2772
2:00	0.0504	0.3061	0.3121	0.3003	0.2882	0.3001
2:20	0.0508	0.3256	0.3325	0.3202	0.3073	0.3201
2:40	0.0506	0.3438	0.3511	0.3383	0.3240	0.3391
3:00	0.0506	0.3608	0.3683	0.3553	0.3398	0.3564
3:20	0.0509	0.3768	0.3845	0.3709	0.3547	0.3728
3:40	0.0508	0.3911	0.3989	0.3854	0.3680	0.3876
4:00	0.0509	0.4046	0.4122	0.3986	0.3808	0.4008
4:20	0.0508	0.4170	0.4245	0.4110	0.3923	0.4135

ตัวอย่างการคำนวณ ; DMSO

อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา = (0.3564-0.1393)/3

= 0.0776

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลแสดงอัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส

ตารางที่ ค-10 อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยา

สารตัวอย่าง	อัตราเร็ว (sec)
DMSO	0.0723
Sample 1	0.0658
Blank 1	0.0693
Sample 2	0.0702
Blank 2	0.0682
PTU	0.0000

ตารางที่ ค-11 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ครั้งที่ 3

Time	PTU	Blank2	Sam2	Blank1	Sam1	DMSO
0:00	0.0544	0.1459	0.1395	0.1296	0.1144	0.1132
0:20	0.0559	0.1818	0.1753	0.1642	0.1484	0.1538
0:40	0.0567	0.2191	0.2133	0.2006	0.1827	0.1906
1:00	0.0585	0.2529	0.2482	0.2338	0.2145	0.2266
1:20	0.0604	0.2843	0.2804	0.2642	0.2440	0.2605
1:40	0.0614	0.3141	0.3105	0.2934	0.2717	0.2924
2:00	0.0616	0.3413	0.3387	0.3192	0.2978	0.3222
2:20	0.0604	0.3662	0.3650	0.3440	0.3222	0.3497
2:40	0.0615	0.3892	0.3893	0.3675	0.3449	0.3754
3:00	0.0614	0.4112	0.4122	0.3893	0.3669	0.3993
3:20	0.0607	0.4317	0.4338	0.4101	0.3871	0.4214
3:40	0.0605	0.4512	0.4538	0.4293	0.4070	0.4422
4:00	0.0603	0.4696	0.4727	0.4480	0.4243	0.4618
4:20	0.0605	0.4867	0.4906	0.4653	0.4412	0.4801
4:40	0.0592	0.5031	0.5077	0.4818	0.4572	0.4973

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณ ; DMSO

อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา = (0.3993-0.1132)/3

= 0.0953

ผลแสดงอัตราเร็วของเอนไซม์ไทโรซีเนส

ตารางที่ ค-12 อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยา

สารตัวอย่าง	อัตราเร็ว (sec)
DMSO	0.0953
Sample 1	0.0841
Blank 1	0.0865
Sample 2	0.0909
Blank 2	0.0884
PTU	0.0023

ตารางที่ ค-13 ตารางแสดงแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไทโรซีเนสโดยใช้ DOPA เป็น สับเสตรท ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

สารตัวอย่าง	(%) Activity ครั้งที่ 1	(%) Activity ครั้งที่ 2	(%) Activity ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย ทั้ง 3 ครั้ง	ค่า S.D.
DMSO	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
Sample 1	82.98	91.01	88.24	87.41	4.07
Blank 1	89.56	95.85	90.76	92.05	3.33
Sample 2	94.20	97.09	95.38	96.55	1.45
Blank 2	87.62	94.32	92.75	91.57	3.50
PTU	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารตัวอย่าง

Time	สารละลาย	5ul	10ul	15ul	20ul	25ul	30ul
0:00	Sample	0.2655	0.2350	0.2050	0.1693	0.1434	0.1295
1:00	Sample	0.3139	0.2684	0.2295	0.1964	0.1618	0.1430
2:00	Sample	0.3528	0.2993	0.2569	0.2204	0.1798	0.1589
3:00	Sample	0.3880	0.3300	0.2844	0.2420	0.1967	0.1718
4:00	Sample	0.4208	0.3558	0.3073	0.2607	0.2111	0.1832
5:00	Sample	0.4502	0.3777	0.3279	0.2769	0.2238	0.1930
6:00	Sample	0.4767	0.3980	0.3453	0.2909	0.2352	0.2016
7:00	Sample	0.5006	0.4176	0.3626	0.3035	0.2453	0.2093
8:00	Sample	0.5199	0.4366	0.3786	0.3152	0.2543	0.2159
9:00	Sample	0.5357	0.4536	0.3935	0.3259	0.2624	0.2219
10:00	Sample	0.5504	0.4679	0.4053	0.3355	0.2697	0.2276

ตารางที่ ค-15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบลงค์

Time	สารละลาย	5ul	10ul	15ul	20ul	25ul	30ul	PTU
0:00	Blank	0.3075	0.2603	0.2326	0.2092	0.1701	0.1583	0.0609
1:00	Blank	0.3597	0.3049	0.2752	0.2410	0.2009	0.1862	0.0612
2:00	Blank	0.4007	0.3405	0.3089	0.2759	0.2312	0.2134	0.0616
3:00	Blank	0.4370	0.3751	0.3417	0.3077	0.2585	0.2384	0.0618
4:00	Blank	0.4709	0.4042	0.3719	0.3348	0.2840	0.2608	0.0619
5:00	Blank	0.5023	0.4281	0.3991	0.3584	0.3052	0.2804	0.0619
6:00	Blank	0.5306	0.4505	0.4228	0.3786	0.3240	0.2978	0.0621
7:00	Blank	0.5558	0.4728	0.4436	0.3960	0.3403	0.3133	0.0619
8:00	Blank	0.5777	0.4951	0.4610	0.4113	0.3548	0.3263	0.0620
9:00	Blank	0.5970	0.5153	0.4765	0.4260	0.3671	0.3384	0.0619
10:00	Blank	0.6130	0.5311	0.4893	0.4385	0.3782	0.3485	0.0619

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ DMSO

Time	สารละลาย	5ul	10ul	15ul	20ul	25ul	30ul
0:00	DMSO	0.3239	0.2492	0.2454	0.1982	0.1751	0.1528
1:00	DMSO	0.3721	0.2921	0.2915	0.2398	0.2099	0.1831
2:00	DMSO	0.4162	0.3308	0.3331	0.2764	0.2437	0.2137
3:00	DMSO	0.4557	0.3667	0.3684	0.3092	0.2750	0.2422
4:00	DMSO	0.4894	0.4005	0.3987	0.3378	0.3032	0.2672
5:00	DMSO	0.5173	0.4289	0.4243	0.3620	0.3270	0.2887
6:00	DMSO	0.5408	0.4528	0.4465	0.3824	0.3466	0.3063
7:00	DMSO	0.5608	0.4729	0.4651	0.4000	0.3633	0.3216
8:00	DMSO	0.5828	0.4897	0.4809	0.4147	0.3772	0.3341
9:00	DMSO	0.6070	0.5045	0.4950	0.4278	0.3894	0.3450
10:00	DMSO	0.6333	0.5203	0.5071	0.4388	0.3992	0.3543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้