บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียที่ผลิตไคติเนส ทำได้ 2 วิธี คือ

1.1 การแยกโดยใช้เหยื่อล่อ (baiting method) โดยใช้เปลือกกุ้ง นำไปฝังดินที่ อำเภองาว จังหวัดลำปาง ประมาณ 3 เดือน

1.2 การแยกโดยตรง (direct isolation) จากตัวอย่างดินในนาข้าว เก็บตัวอย่างดินจากอำเภอต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 7 อำเภอ คือ อ.เมือง อ.แม่แตง อ.แม่ริม อ. สันกำแพง อ.สันทราย อ. สันป่าตอง และ อ.หางดง

นำตัวอย่างดินที่ได้อบในตู้อบ (hot air oven) อุณหภูมิ 60°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจางโดยใช้ 1% water peptone ตัวอย่างดินที่ได้จะอยู่ในรูปของ soil suspension นำ soil suspension ปริมาตร 0.1 ml มาเพาะเลี้ยงโดยวิธีเกลี่ยเชื้อ (spread) บนอาหาร chitin agar (ภาคผนวก ก) ที่มีเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 19 °C, 26-28 °C, 30 °C, 45 °C, 55 °C และ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แยกแบคทีเรียที่ปรากฏบน chitin agar นำแบคทีเรียที่แยกได้เก็บเป็น stock culture และ working cultureใน chitin agar rmedium ที่มีส่วนผสมของเปลือกกุ้ง 2% และเก็บใน 20% glycerol เพื่อทำการศึกษาต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสในขั้นต้น

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1 จำนวน 220 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงโดยการหมักบนอาหารแข็ง (Solid Substrate Fermentation) โดยเตรียมเชื้อตั้งต้นในอาหาร nutrient broth (ภาคผนวก ก) นำมาเจือจางด้วย 1% water peptone (ภาคผนวก ก) ให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ 1x 10^6 เซลล์ โดยเทียบความขุ่นกับ Mc Farland No 0.5 มาตรฐาน (ภาคผนวก ฌ) เก็บไว้ที่มืดในอุณหภูมิห้อง ใช้เชื้อตั้งต้นปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 18 x 100 mm ที่มีเปลือกกุ้งหนัก 2 กรัม บ่มบนเครื่องเขย่า (automatic voltage stabilizer, EBA 12R,Heltich zentrifugen) ความเร็ว 155 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) เป็นเวลา 15 วัน เปรียบเทียบการย่อยเปลือกกุ้งขนาดต่าง ๆ คือ ขนาดป่นละเอียด, ขนาดกลาง (0.5-1.0 mm) และขนาดใหญ่ (1.0-3.0 mm) ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทเพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมการย่อยของเปลือกกุ้งที่มีขนาดเหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไคติเนส

รูป 5 เปลือกกุ้งขนาดอนุภาคต่าง ๆ ขนาดป่นละเอียด ขนาดกลางและขนาดใหญ่

3. การหาค่า chitinase activity และ specific activity

วัดค่าการทำงานของเอนไซม์โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Miller (1959) และปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1951)

3.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี Miller (1959)

3.1.1 เตรียม assay mixture ดังนี้

enzyme control : crude enzyme 500 µl + 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 1,000 µl

substrate control : 0.5% colloidal chitin 500 µl (ภาคผนวก ข) + 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 1,000 µl

enzyme substrate : crude enzyme 500 µl + 0.5% colloidal chitin 500 µl + 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 500 µl

3.1.2 บ่ม assay mixture ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที

3.1.3 นำ assay mixture มาเติมสาร DNS (ภาคผนวก ค) 2 ml ต้มในน้ำเดือด 15 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็นลงทันทีโดยการแช่ในอ่างน้ำแข็ง และเติม 40% Na-K-tartate 1 ml

3.1.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimasu UV 2000 Japan) โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

3.1.5 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน N-acetylglucosamine (NAG) (ภาคผนวก ง) เพื่อนำไปคำนวณหาค่า chitinase activity (ภาคผนวก จ)

เอนไซม์ 1 unit หมายถึง เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายให้ได้ N-acetylglucosamine 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที

3.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้ Lowry's Method (Lowry, 1951)

นำ crude enzyme จากข้อ 4 ปริมาตร 0.3 ml เติมสารละลาย reagent C 3 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายFolin phenol reagent 0.3 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (ภาคผนวก ง) เพื่อนำไปหาค่า specific activity

4. การวัดการทำงานของไคติเนส

4.1 เลือกแบคทีเรีย 12 ไอโซเลทที่ให้ค่า chitinase activity สูงสุดมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้งโดยใช้เชื้อตั้งต้นในรูป bacterial suspension 1 ml ใส่ลงในอาหารพื้นฐาน (Basal medium) (ภาคผนวก ก) 10 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ที่มีเปลือกกุ้งป่นละเอียดหนัก 2 กรัม เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) เป็นเวลา 15 วัน

4.2 สกัดเอนไซม์โดยใช้ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ml คนตลอดเวลาโดยใช้ magnetic stirrer บน magnetic plate ที่อุณหภูมิ 10-12 °C โดยตั้งภาชนะในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 60 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน นำมาเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสมาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป

5. การศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท

5.1 เตรียม assay mixture ดังนี้

enzyme control : crude enzyme 500 µl + 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 1,000 µl

substrate control : 0.5% colloidal chitin 500 µl + 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 1,000 µl

enzyme substrate : crude enzyme 500 µl + 0.5% colloidal chitin 500 µl + 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 500 µl

5.2 บ่ม assay mixture ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C และ 60 °C เป็นระยะเวลา 0, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50 และ 60 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปหา chitinase activity และ specific activity ตามวิธีในข้อ 4

6. การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตไคติเนสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกับการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มี เปลือกกุ้งเป็นส่วนประกอบ แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท ที่แยกได้ในอาหารเหลว Enzyme Production Medium (EPM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 25 ml ที่มี 0.5% colloidal chitin ที่เตรียมจาก crab shells เป็นสับสเตรท ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml

ชุดที่ 2 เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท ที่แยกได้ในสภาพแข็งที่มีเปลือกกุ้ง 5 กรัม เป็นสับสเตรทใสขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในชุดการทดลองที่เป็นอาหารเหลวที่อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) เป็นเวลา 5 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 155 รอบต่อนาที และเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในชุดการทดลองที่เป็นอาหารแข็งโดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) เป็นเวลา 15 วัน นำส่วนใสมาทำการหา chitinase activity และนำค่าปริมาณโปรตีนที่หาได้หาคำนวณหา specific activity

7. การบ่งบอก (Identify)ชนิดของแบคทีเรียไอโซเลท MC176

นำแบคทีเรียไอโซเลท MC176 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาโดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร chitin agar (ภาคผนวก ก) ที่มี 10% เปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอนและ nutrient agar (ภาคผนวก ก) ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท MC 176 ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง chitin agar บ่มที่อุณหภูมิ 19°C, 26-28 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C และ 60 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ทำการบ่งบอกชนิดโดยเทียบกับ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994)

8. การศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 เพื่อผลิตไคติเนสในอาหารเหลว Enzyme Production Medium (EPM) และอาหารแข็งเปลือกกุ้ง แบ่งการทดลองออกเป็นชุด ๆ ดังนี้

ชุดที่ 1 เพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารเหลว EMP (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 25 mlที่มี 0.5% colloidal chitin ที่เตรียมจาก crab shells เป็นสับสเตรท ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml

ชุดที่ 2 เพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งขนาดอนุภาคป่นละเอียด 5 กรัม และ Basal medium (ภาคผนวก ก) 10 ml เป็นสับสเตรทในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 2 ชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 0-16 วัน และทำการสกัดเอนไซม์แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น และนำมาคำนวณหาค่า chitinase activity ตามวิธีการในข้อ 3

9. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176

9.1 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไคติเนส

9.1.1 เตรียมอาหารแข็งเปลือกกุ้งป่นละเอียดหนัก 2 กรัม ผสมกับ Basal medium (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 ml และแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 9 ชุด ที่มีความเข้มข้น 0%, 0.5%, 0.7% และ 1.0% ดังนี้

ชุดที่ 1 อาหารพื้นฐานที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน
ชุดที่ 2 อาหารพื้นฐานที่มี N-acetyl-D-glucosamine
ชุดที่ 3 อาหารพื้นฐานที่มี chitosan
ชุดที่ 4 อาหารพื้นฐานที่มี chitosan เหลว
ชุดที่ 5 อาหารพื้นฐานที่มี chitosan ชนิดเกล็ดผสมกับ glycerol
ชุดที่ 6 อาหารพื้นฐานที่มี chitosan ชนิดเหลวผสมกับ glycerol
ชุดที่ 7 อาหารพื้นฐานที่มี colloidal chitinจากเปลือกกุ้ง
ชุดที่ 8 อาหารพื้นฐานที่มี swollen chitin
ชุดที่ 9 อาหารพื้นฐานที่มี ball-milled chitin

9.1.2 เตรียมเชื้อตั้งต้นตามข้อ 2 ขวดละ 1 ml บ่มที่อุณหภมิ 37°C เป็นเวลา 15 วัน

9.1.3 ทำการสกัดเอนไซม์ แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยทำการเปรียบเทียบชนิดของสับสเตรทที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ crude enzyme ที่ใช้ระหว่าง 0.5% colloidal chitin กับ 0.5% treated shrimp และนำมาคำนวณหาค่า chitinase activity

9.2 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไคติเนส

9.2.1 เตรียมอาหารแข็งเปลือกกุ้งที่มี 1% ball-milled chitin เป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้น 0.3%, 0.5%, 0.7% และ 1.0% จำนวน 6 ชุด คือ (ภาคผนวก ก)

ชุดที่ 1 อาหารพื้นฐานที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน

ชุดที่ 2 อาหารพื้นฐานที่มี $(NH_4)_2SO_4$

ชุดที่ 3 อาหารพื้นฐาน $NaNO_3$

ชุดที่ 4 อาหารพื้นฐาน peptone

ชุดที่ 5 อาหารพื้นฐาน soy bean

ชุดที่ 6 อาหารพื้นฐานที่มี urea

9.2.2 ใช้เชื้อตั้งต้นตามข้อ 9.1.2 ขวดละ 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 วัน

9.2.3 ทำการสกัดเอนไซม์แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยทำการเปรียบเทียบชนิดของสับสเตรทที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ crude enzyme ระหว่าง 0.5% colloidal chitin กับ 0.5% colloidal chitin ที่เตรียมจากเปลือกกุ้ง และนำมาคำนวณหาค่า chitinase activity

9.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนส

เพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งขนาดอนุภาคป่นละเอียด หนัก 5 กรัม ที่มีอาหารพื้นฐานปริมาตร 10 ml และมี 1.0% (w/v) ball-milled chitin เป็นแหล่งคาร์บอน โดยบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ อุณหภูมิห้อง (26-28°C), 37 °C, 45 °C, 50 °C และ 60 °C เป็นเวลา 14 วัน นำ crude enzyme ไปหาค่า chitinase activity และ specific activity

9.4 pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนส

เพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง หนัก 5 กรัม ที่มีอาหารพื้นฐานปริมาตร 10 ml และมี ball-milled chitin เป็นแหล่งคาร์บอน ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยมี pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 โดยใช้ 0.1M NaCl และ 0.1M HCl ในการปรับ pH นำ crude enzyme มาหาค่า chitinase activity และ specific activity

9.5 ขนาดของภาชนะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

ชั่งเปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียด 5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ml อย่างละ 2 ขวด จานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ใบ ถุงพลาสติกขนาด 8 x 12 นิ้ว ที่ไม่มีรูพรุน และถุงพลาสติกขนาด 12 x 18 นิ้ว ที่ไม่มีรูพรุนอย่างละ 2 ถุง เติมอาหารพื้นฐาน pH 7.0 (ภาคผนวก ก) 10 ml เติมเชื้อตั้งต้นลงไป 1 mlลงในขวดรูปชมพู่ขนาดต่าง ๆ จานอาหารเลี้ยงเชื้อและถุงพลาสติกขนาดต่าง ๆ นำภาชนะที่มีเปลือกกุ้ง อาหารพื้นฐาน และแบคทีเรียเริ่มต้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วันจากนั้น ทำการสกัดเอนไซม์โดยใช้ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 และตรวจวัด chitinase activity และ specific activity

9.6 สับสเตรทเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

การทดลองประกอบด้วยชุดควบคุม และชุดทดลอง ดังนี้

ชุดควบคุม : ชั่งน้ำหนักเปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียด 2.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ชั่งน้ำหนัก เปลือกถั่วลิสง เปลือกถั่วเหลือง ขี้เลื่อยไม้ฉำฉา และ ฟางข้าว อย่างละ 2.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีเปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียด อย่างละ 2 ขวด เติมอาหารพื้นฐาน pH 7.0 (ภาคผนวก ก) 10ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน ทำการสกัดเอนไซม์โดยตรวจวัด chitinase activity และ specific activity

ชุดทดลอง : ชั่งน้ำหนักเปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียด 2.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ชั่งน้ำหนัก เปลือกถั่วลิสง ขี้เลื่อยไม้ฉำฉา เปลือกถั่วเหลือง และ ฟางข้าว อย่างละ 2.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีเปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียด อย่างละ 2 ขวด เติมอาหารพื้นฐาน pH 7.0 (ภาคผนวก ก) 10 ml เติม bacteria suspension Mc farland No 0.05 ปริมาตร 1 ml ลงในขวดรูปชมพู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน ทำการสกัดเอนไซม์โดยตรวจวัด chitinase activity และ specific activity

9.7 การหาไคติเนสของอาหารแข็งเปลือกกุ้งที่มีฟางข้าวเป็นสับเสตรทเสริม

การทดลองประกอบด้วยชุดควบคุมและชุดทดลอง ดังนี้

ชุดควบคุม : ชั่งเปลือกกุ้งขนาดอนุภาคป่นละเอียด 5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml จำนวน 2 ขวด ชั่งฟางข้าว (ภาคผนวก ก) น้ำหนัก 5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml จำนวน 2 ขวด และชั่งน้ำหนักเปลือกกุ้งขนาดอนุภาคป่นละเอียด 2.5 กรัมผสมกับฟางข้าว 2.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml จำนวน 2 ขวด เติมอาหารพื้นฐาน pH 7.0 (ภาคผนวก ก) 10 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 14 วัน ทำการสกัดเอนไซม์ และตรวจวัด chitinase activity และ specific activity

ชุดทดลอง : ชั่งเปลือกกุ้งขนาดอนุภาคป่นละเอียด 5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml จำนวน 2 ขวด และชั่งฟางข้าว 5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml จำนวน 2 ขวด และชั่งน้ำหนักเปลือกกุ้งขนาดอนุภาคป่นละเอียด 2.5 กรัม ผสมกับฟางข้าว 2.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml จำนวน 2 ขวด เติมอาหารพื้นฐาน pH 7.0 (ภาคผนวก ก) 10 ml ใช้ autopipette ขนาด 1 ml ดูด bacteria suspension ที่เทียบความขุ่นกับ Mc Farland No 0.5 ปริมาตร 1 ml ลงในขวดรูปชมพู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน ทำการสกัดเอนไซม์และตรวจวัด chitinase activity และ specific activity

10. การเปรียบเทียบการผลิต exochitinase และ endochitinase เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในสภาพแข็งเปลือกกุ้ง

10.1 เพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งป่นหนัก 5 กรัม ผสม basal medium (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 วัน ต่อจากนั้นนำมาสกัดเอนไซม์โดยใช้ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 50 ml คนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 °C โดยตั้งภาชนะในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 60 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 คืน

10.2 เหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 6000 x g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสมาหาค่าการทำงานของไคติเนสโดยวิธีของ Miller (1959)

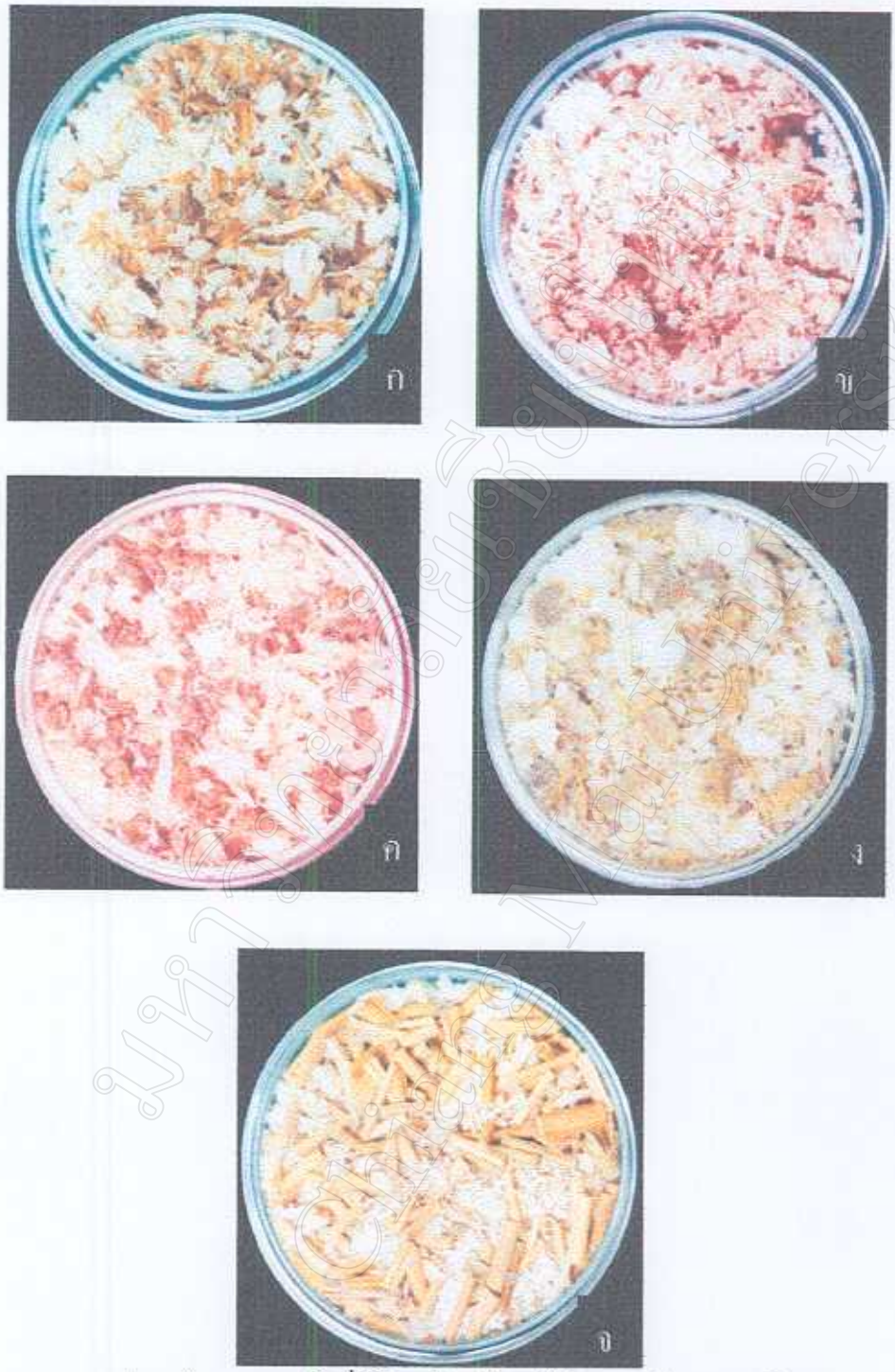
10.3 เตรียม assay mixture ดังนี้

enzyme control : crude enzyme 500 µl + 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 1,000 µl

substrate control : substrate 500 µl + 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 1,000 µl

enzyme substrate : crude enzyme 500 µl + 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 500 µl + substrate 500 µl

การหาชนิดของไคติเนส ทำได้โดยเปลี่ยนชนิดของ substrate ใน reaction mixture โดยหากต้องการหาค่า endochitinase สับสเตรทที่ใช้คือ 0.03% Ethylene glycol chitin และ exochitinase สับสเตรทที่ใช้คือ 0.5% colloidal chitin



รูป 7 สับสเตรทเสริมที่ใช้ร่วมกับเปลือกกุ้งในการหมักสภาพแข็ง

ก) แกลบ ข) ขี้เลื่อย ค) เปลือกถั่วเหลือง

ง) เปลือกถั่วลิสง จ) ฟางข้าว

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

นำ *Bacillus thuringiensis* MC176 มาชักนำให้เพิ่มความสามารถในการผลิตไคติเนสโดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet radiation) มีวิธีการดังนี้

11.1 โคโลนีเดี่ยวของ *Bacillus thuringiensis* MC176 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 9 ml ในหลอดทดลองขนาด 16 X 100 mm บ่มที่อุณหภูมิ 37 °c เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

11.2 นำตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 11.1 มาเจือจางโดยใช้ 1% water peptone จนถึง 10^{-4}, 10^{-5},และ 10^{-6} ตัวอย่างแบคทีเรียจะอยู่ในรูปของ bacterial suspension นำ bacterial suspension ปริมาตร 0.1 ml มาเพาะเลี้ยงโดยวิธีการเกลี่ยเชื้อ (spread) บนอาหาร chitin agar (ภาคผนวก ก) ที่มีเปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอนทำ 2 ซ้ำ โดยเปิดฝาจานอาหารไว้ใน ตู้ UV มีระยะห่างจากหลอด UV ประมาณ 30 เซนติเมตร กำลังไฟ 30 วัตต์ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°c เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แยกโคโลนีที่ปรากฏวงใส (clear zone) บน chitin agar มาเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 9 ml ในหลอดทดลองขนาด 16 X 100 mm บ่มที่อุณหภูมิ 37°c เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเพิ่มระยะเวลาในการให้รังสี UV จาก 1 ชั่วโมงเป็น 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 และ 29 ชั่วโมง ตามลำดับ

11.3 เมื่อทำครบชั่วโมงที่ 29 ของการให้รังสี UV (ครั้งที่ 10) คัดเลือกโคโลนี ที่ปรากฏวงใสบน chitin agar มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเปลือกกุ้งที่มีการปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง สกัด crude enzyme ที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติบางประการในขั้นตอนต่อไป

12. การศึกษา chitinase activity ของ crude extract

นำ *Bacillus thuringiensis* MC176 นำมาเลี้ยงในอาหารที่มี 0.5% colloidal chitin ที่เตรียมจากเปลือกกุ้งเป็นสับสเตรท นำส่วนใสมาทดสอบคุณสมบัติของ crude enzyme ดังนี้

12.1 ผลของเวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์กับสับสเตรท

ตรวจวัด chitinase activity ที่เวลาต่าง ๆ โดยวัดการทำงานของไคติเนสตามข้อ 3.3 แต่เปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ นำไปบ่มที่เวลา 0, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60 , 70, 80, 90 และ 100 นาที ที่ อุณหภูมิ 37°C นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร

12.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์

ตรวจวัด chitinase activity ที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ตามข้อ 3.3 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์เป็น 30 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C และ 60 °C เป็นเวลา 60 นาที

12.3 ผลของความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

นำ crude enzyme ปริมาตร 500 µl ทำปฏิกิริยากับ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 500 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C , 30 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C และ 60 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ 0.5% colloidal chitin ปริมาตร 500 µl จากนั้นนำไปวัดค่า chitinase activity ตามข้อ 4

12.4 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

12.4.1 บ่มเอนไซม์ปริมาตร 500 µl กับ 0.5% colloidal chitin ปริมาตร 500 µl และ 0.1 M phosphate buffer pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ปริมาตร 500 µl ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที

12.4.2 วัดค่าการทำงานของเอนไซม์โดยวิธีของ Miller (1959) โดยใช้สารละลายมาตรฐานของ N-acetylglucosamine เป็นกราฟมาตรฐาน

12.5 ผลของ pH ที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์

12.5.1 บ่มเอนไซม์ปริมาตร 500 µl กับ 0.1 M phosphate ที่มีค่า pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ปริมาตร 500 µl ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากบ่มนำเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับ 0.5% colloidal chitin บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที แล้ววัด chitinase activity

13. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

13.1 การตกตะกอนด้วย neutral salt เช่น ammonium sulfate เป็นการตกตะกอนโปรตีนแบบลำดับส่วน โปรตีนที่อยู่ในสภาพสารละลายกลุ่มประจุที่เป็น hydrophobic group และ hydrophilic group ที่กระจายบนผิวของโมเลกุลจะทำปฏิกิริยากับ ionic group ในสารละลาย เมื่อเติมเกลือเข้าไปในสารละลายโปรตีนหรือเอนไซม์นำไปละลายเกลือ และในขณะที่ความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นน้ำจะถูกกันออกจากโมเลกุลของโปรตีนทำให้ส่วน hydrophobic บนโมเลกุลของโปรตีนจับตัวกันมีขนาดใหญ่ขึ้น มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น และตกตะกอนลงมา เกลือที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ammonium sulfate [$(NH_4)_2SO_4$] เนื่องจากเกลือชนิดนี้มีค่าการละลายน้ำสูงมาก และมีค่าสัมประสิทธิ์อุณหภูมิของการละลายค่อนข้างต่ำ ในช่วง 0-30°C ทำให้สามารถใช้ตกตะกอน

เอนไซม์ในอุณหภูมิที่ต่ำได้ โดยไม่เกิดการสลายตัวของโครงสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ที่สลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงได้ (ชรินทร์, 2542)

การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณ ammonium sulfate ที่เหมาะสม

นำ crude enzyme มาตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ตามลำดับดังนี้

1. แบ่ง crude enzyme ของ *Bacillus thuringiensis* MC176 ใส่หลอดทดลองขนาด 16 X 100 mm. 12 หลอด หลอดละ 1 ml แล้วนำไปทำให้เย็นที่ 4°C โดยการแช่ถาดน้ำแข็ง

2. เติม ammonium sulfate ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 และ 80% saturation ตามลำดับ (ภาคผนวก ช)

3. เขย่าเบา ๆ ให้ammonium sulfateละลายหมด

4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. นำไปเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที

6. แยกส่วนใสและตกตะกอน แล้วละลายตะกอนด้วย Tris-HCl buffer (pH 7.0) 0.2 ml

7. วัด chitinase activity ในส่วนใสและส่วนที่ละลายแล้ว

13.2 การทำไดอะไลซีส

ภายหลังจากการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ความเข้มข้นต่าง ๆ นำส่วนตะกอนที่ได้มาละลายด้วยบัฟเฟอร์ที่มีความเหมาะสมในการรักษาสภาพของเอนไซม์ และทำการไดอะไลส์เพื่อดึงเกลือที่มีความเข้มข้นสูงออกจากส่วนตะกอน การตกตะกอนด้วย ammonium sulfate โดยมีการทดลองตามขั้นตอนดังนี้

1. นำเอาตะกอนที่ผ่านการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate มาละลายในบัฟเฟอร์ โดยใช้บัฟเฟอร์ปริมาณที่น้อยที่สุดในการละลาย

2. การเตรียมถุงไดอะไลซิส

2.1 ตัดแผ่นไดอะไลส์ ให้มีขนาดความยาวประมาณ 15 เซนติเมตร ตามจำนวนที่ต้องการจะนำมาใช้

2.2 ต้มในน้ำเดือดปริมาตร 500 ml ที่ผสม 10 mM EDTA จำนวน 2 หยด นาน 15 นาที เพื่อให้ไดอะไลส์อ่อนตัวลงสามารถที่จะคลี่ออกเป็นถุงได้ ขั้นตอนนี้ต้องระมัดระวังมิให้แผ่นไดอะไลส์สัมผัสกับข้างภาชนะที่ใช้ต้ม เนื่องจากด้านข้างภาชนะร้อนมากเกินไป อาจทำให้ด้านข้างของแผ่นไดอะไลส์รั่วได้

2.3 ใช้แท่งแก้ว เขี่ยแผ่นไดอะไลส์ออกจากน้ำเดือด นำมาทดลองคลี่ให้มีลักษณะเป็นถุง หากคลี่ได้ให้นำถุงไดอะไลส์ออกจากน้ำเดือด หากคลี่ไม่ได้ให้ต้มในน้ำเดือดต่อไป

2.4 นำแผ่นไดอะไลส์ที่คลี่ได้ นำมาแช่ในน้ำกลั่นนาน 10 นาที เพื่อละลาย 10 mM EDTA ที่ตกค้างในแผ่นไดอะไลส์ออกไป เปลี่ยนน้ำกลั่นที่ใช้แช่ประมาณ 3-4 ครั้ง เมื่อถึงการแช่ครั้งสุดท้ายให้ใช้น้ำกลั่นล้างแผ่นไดอะไลส์ด้านใน ล้างจนแน่ใจว่าสะอาดและควรสวมถุงมือในการสัมผัสถุงไดอะไลส์

2.5 นำแผ่นไดอะไลส์ที่ผ่านการแช่น้ำกลั่น มามัดด้วยเส้นด้ายที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งให้มีลักษณะเป็นถุง

3. ใช้ autopipette ปริมาณ 5 ml ดูดตะกอนที่ล้างด้วยบัฟเฟอร์ เติมลงในถุงไดอะไลส์ปริมาตร 5 ml จากนั้นใช้ด้ายมัดปากถุงอีกข้างหนึ่ง นำส่วนด้ายด้านยาวที่เหลือผูกติดกับแท่งไม้หรือตัวยึด เพื่อวางลงบนภาชนะที่จะแช่สารละลายในการทำไดอะไลซีส

4. นำบิกเกอร์ขนาด 500 ml บรรจุบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10-20 mM และมี pH ที่เหมาะสมในการรักษาสภาพเอนไซม์ที่ต้องการทำ บรรจุบัฟเฟอร์ปริมาตร 450 ml ลงในบิกเกอร์ ต่อจากนั้นนำถุงไดอะไลซีสลงไปแช่

5. เปลี่ยนน้ำทุก ๆ 2-3 ชั่วโมง จนกว่า สารละลายภายนอกถุงไดอะไลซีสมีลักษณะใส จึงแน่ใจได้ว่าเกลือที่มากเกินความต้องการภายนอกถุงไดอะไลส์หมดแล้ว จึงนำส่วนตะกอนภายในถุงไดอะไลส์ที่ได้ มาทดลองในขั้นต่อไป

13.3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดย hydrophobic chromatography

การแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบการจับของสารในสภาพที่ไม่มีชั้ว ชนิดของเจลที่ใช้คือ butyl-toyopearl 650M โดยมีวิธีการทำ ดังนี้

การเติมเจลลงในคอลัมน์มีวิธีการทำ ดังนี้

1. ตั้งคอลัมน์ดูว่าคอลัมน์ตั้งฉากกับพื้น เติมบัฟเฟอร์เริ่มต้นลงไปพอประมาณ นำสำลีหรือใยแก้วรองไว้ที่ก้นของคอลัมน์พร้อมใช้แท่งแก้วคนยาว ๆ กดไล่ฟองอากาศจากสำลีหรือใยแก้วให้หมด

2. เทเจลที่เตรียมไว้ลงไปในคอลัมน์ผ่านกรวยแก้ว โดยมีการกวนตลอดเวลาโดยระมัดระวังให้ชั้นเจลที่กำลังเรียงตัวต้องอยู่ต่ำกว่าระดับบัฟเฟอร์อย่างน้อย 1 เซนติเมตร ตลอดเวลาในขณะเทเจลระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

3. ปล่อยให้เม็ดเจลเกิดการเรียงตัวตามแรงโน้มถ่วงของโลก ทิ้งไว้ 5-10 นาที

4. ชะบัฟเฟอร์เริ่มต้นลงไปในคอลัมน์และต่อเปิดด้านบนของคอลัมน์เข้ากับภาชนะบรรจุบัฟเฟอร์

5. ปรับปลายด้านล่างของคอลัมน์ให้มีอัตราการไหลออกของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความดัน 1 เซนติเมตร ของน้ำต่อความสูงของชั้นเจล 1 เซนติเมตร

6. ปล่อยให้เกิดการเรียงตัวของเม็ดเจล ทิ้งไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง ระมัดระวังไม่ให้มีสารละลายบัฟเฟอร์ท่วมเหนือชั้นเจลอย่างน้อย 1 นิ้ว

7. ทำการปิเปต crude enzyme ปริมาณ 150 mlใส่ลงบนผิวหน้าของชั้นเจล เปิดปลายล่างของคอลัมน์ เมื่อตัวอย่างผ่านเข้าไปในชั้นเจลหมด ให้ดูดสารละลาย 10mMTris-HCl pH 8.0 ปริมาตรเล็กน้อยชะไล่สารตัวอย่างลงมา

8. ทำการเก็บ Fraction ละ 3 ml ชะเอนไซม์ภายในคอลัมน์โดยใช้ แอมโมเนียมซัลเฟตในความเข้มข้นต่าง ๆ เริ่มจาก 0.5M, 0.4M, 0.3M, 0.2M, 0.1M และในขั้นตอนสุดท้ายชะด้วย 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0

9. นำ fraction ที่เก็บได้ทั้งหมด ไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry's method

10. นำ fraction ที่ให้ค่า A280 สูงไปตรวจสอบค่า chitinase activity โดยวิธีของ Miller

11. นำ fraction ที่มีค่าchitinase activity ทุก fraction มารวมกันเพื่อใช้เป็น sample ในขั้นตอนการแยกโปรตีนปนเปื้อนออกจากเอนไซม์ไคติเนสในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุต่อไป

13.4 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยโครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยมีวิธีการทำดังนี้

1. การทดสอบเบื้องต้นของเทคนิคไอออนโครมาโตรกราฟี (Test tube trial and error method)

1.1 เตรียมเจลโดยทำให้เจลอิ่มตัวด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.0

1.2 เตรียมหลอดทดลองขนาด 10 x 16 mm เติม DEAE–cellulofine ที่อิ่มตัวด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1.5 ml

1.3 เติม crude enzyme ที่ต้องการทดสอบลงไปปริมาตร 1 ml

1.4 ผสมให้เข้ากับเจลตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที เพื่อให้เจลนอนก้น

1.5 การตรวจสอบค่า chitinase activity ในสารละลายส่วนใส โดยวิธีของ Miller (1959)

2. การตรวจสอบค่าความแรงอิออนเริ่มต้นที่เหมาะสมในการใช้ชะไล่สารออกจากคอลัมน์

2.1 ทำการทดลองเตรียมเจล เหมือนข้อ 13.3 จากนั้นจึงชะเจลให้อิ่มตัวด้วยสารละลาย phosphate buffer 0.05 โมลาร์ ที่ pH 7.0 ปริมาตร 10 ml จำนวน 10 ครั้ง

2.2 แปรความแรงอิออนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่จาก 0.05 โมลาร์ไปเป็น 0.5 โมลาร์ ทำการล้างทั้งหมด 5 ครั้ง ครั้งละ 10 ml ทำการเพิ่มความ

เข้มข้นของเกลือทีละ 0.05 โมลาร์ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 1.0 โมลาร์

2.3 เติม crude enzyme ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากับเจลทิ้งไว้ 5-10 นาที เพื่อให้เจลเกิดการเซทตัว

2.4 ตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ในสารละลายส่วนใส โดยวิธีของ Miller (1959)

3. การเติมเจลลงในคอลัมน์มีวิธีการทำดังนี้

3.1 ตั้งคอลัมน์ดูว่าคอลัมน์ตั้งฉากกับพื้นเติมบัฟเฟอร์เริ่มต้นลงไปพอประมาณ นำสำลีหรือใยแก้วรองไว้ที่ก้นของคอลัมน์ พร้อมใช้แท่งแก้วคนยาว ๆ กดไล่ฟองอากาศจากสำลีหรือใยแก้วให้หมด

3.2 เทเจลที่เตรียมไว้ลงไปในคอลัมน์ผ่านกรวยแก้ว โดยมีการกวนตลอดเวลา โดยระมัดระวังให้ชั้นเจลที่กำลังเรียงตัวต้องอยู่ต่ำกว่าระดับบัฟเฟอร์อย่างน้อย 1 เซนติเมตร ตลอดเวลาในขณะเทเจลระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

3.3 ปล่อยให้เม็ดเจลเกิดการเรียงตัวตามแรงโน้มถ่วงของโลก ทิ้งไว้ 5-10 นาที

3.4 ชะบัฟเฟอร์เริ่มต้นลงไปในคอลัมน์และต่อเปิดด้านบนของคอลัมน์เข้ากับภาชนะบรรจุบัฟเฟอร์

3.5 ปรับปลายด้านล่างของคอลัมน์ให้มีอัตราการไหลออกของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความดัน 1 เซนติเมตร ของน้ำต่อความสูงของชั้นเจล 1 เซนติเมตร

3.6 ปล่อยให้เกิดการเรียงตัวของเม็ดเจล ทิ้งไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง ระมัดระวังไม่ให้มีสารละลายบัฟเฟอร์ท่วมเหนือชั้นเจลอย่างน้อย 1 นิ้ว

3.7 ทำการปิเปต crude enzyme ใส่ลงบนผิวหน้าของชั้นเจล เปิดปลายล่างของคอลัมน์ เมื่อตัวอย่างผ่านเข้าไปในชั้นเจลหมด ให้ดูดสารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตรเล็กน้อยชะไล่สารตัวอย่างลงมา

3.8 ตรวจสอบค่ากิจกรรมของไดติเนสในสารละลายส่วนใส ด้วยวิธีของ Miller (1959)

13.5 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย gel filtration

การเตรียม Gel filtration column

1. ทำการละลายตัวกลาง (Toyopearl HF-40W) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มากเกินพอ รอจนกระทั่งเจลอิ่มตัว

2. เติมตัวกลางลงในคอลัมน์ พร้อมกับค่อยเปิดวาล์วให้มีการไหลอย่างช้า ๆ จนกระทั่งตัวกลางมีการแพคตัวอยู่ในความสูงที่ต้องการและทำการชะด้วยบัฟเฟอร์จนแน่ใจว่า pH ที่ออกมาจากคอลัมน์มี pH เท่ากับบัฟเฟอร์ คือ เท่ากับ 8.0 จึงทำการเปิดวาล์ว

3. เติมตัวอย่างปริมาณ 10 ml ลงในคอลัมน์อย่างระมัดระวัง เพื่อป้องกันการรบกวนผิวหน้าของเจล

4. ปล่อยให้ตัวอย่างไหลผ่านคอลัมน์อย่างช้า ๆ และควรระวังมิให้ผิวหน้าเจลแห้ง

5. ชะตัวอย่างด้วย 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 โดยควบคุมอัตราการไหลให้อยู่ในช่วง 0.5-0.8 ml/min

6. เก็บตัวอย่าง fraction ละ 2.5 ml

ทำการเตรียมคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5cm ยาว100 cm) โดยใช้ Toyopearl HF-40W เป็นตัวกลางในการแยกโปรตีน เติมตัวอย่างปริมาตร 2 ml ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นแล้วลงในคอลัมน์ และชะโปรตีนด้วย 10 mM Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.0โดยควบคุมอัตราการไหลประมาณ 0.5ml/min ทำการเก็บตัวอย่าง fraction ละ 2.5 ml ตรวจสอบโปรตีนที่ 280 nm และหากิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละ fraction

13.6 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamine gel electrophoresis (SDS-PAGE) (ภาคผนวก ง)

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยสังเกตจากแถบโปรตีนที่ปรากฏ และทำการคาดประมาณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่สนใจโดยเทียบกับ Marker (Phosphorylase b (97 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carbonic anhydrase (30 kDa), Trypsin inhibitor (20 kDa), α-Lactabumin (14.4 kDa)