บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. <u>เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย</u>

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc., New Jersy, U.S.A.

เครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) sorvall RC-5B ของบริษัท Dupont Instrument

ถังหมักขนาด 5 ลิตร กว้าง 17 เซ่นติเมตร สูง 24 เซ่นติเมตร พร้อมใบพัดแบบเทอร์ไบ (turbine impeller) เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 8.5 เซ่นติเมตร และชุดควบคุมสภาวะ (5-litre fermentor and controller) รุ่น MD-300 ของบริษัท L.E. Marubishi, Tokyo, Japan

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงลำแสงคู่ (double beam spectrophotometer) รุ่น 210-5763 ของบริษัท Hitachi Ltd., Tokyo, Japan

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bosch & Lomb

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น D 3165 ของบริษัท Hanigsen Kottermann, West Germany.

เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น Ø 70 ของบริษัท Beckman, U.S.A.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-3D ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan

เครื่องอุลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) และแผ่นกรองยูเอ็ม 10 ของบริษัท Amicon, Lexington, Massachusetts, U.S.A.

เครื่องทำระเหิดแห้ง (freeze drying machine) ของบริษัท Virtis Company Gardiner, New York.

2. จุลชีพที่ใช้ในการวิจัย

Bacillus amyloliquefaciens KA 63 โดยความเอื้อเฟื้อของรองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล

Bacillus sp. สายพันธุ์ AMY 1 โดยความเอื้อเฟื้อของ อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล

Bacillus sp. สายพันธุ์ AMY 2 โดยความเอื้อเฟื้อของ อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล

Bacillus sp. สายพันธุ์ AMY 3 โดยความเอื้อเฟื้อของ อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล

Bacillus sp. สายพันธุ์ B # 2 โดยความเอื้อเฟื้อของกรมวิทยาศาสตร์บริการ

Bacillus sp. สายพันธุ์ ASRCT B-10 โดยความเอื้อเฟื้อของกรมวิทยาศาสตร์บริการ

Bacillus sp. สายพันธุ์ ASRCT B-14 โดยความเอื้อเฟื้อของกรมวิทยาศาสตร์บริการ

Bacillus sp. สายพันธุ์ ASRCT B-15 โดยความเอื้อเฟื้อของกรมวิทยาศาสตร์บริการ

Bacillus cereus โดยความเอื้อเฟื้อของกรมวิทยาศาสตร์บริการ

3. การเก็บรักษาจุลชีพที่ใช้ในการวิจัย

เขี่ยเชื้อที่จะเก็บรักษา 1 ลูป (loop) ลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับการเก็บรักษา (38) (stock culture medium ; ภาคผนวก 1.1) บ่ม (incubate) ไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อมีการเจริญของเชื้อพอสมควรแล้วจึงเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (deep freezer)

4. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้ง

4.1 วัดความสามารถในการเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (saccharifying activity) โดยวิธีของ Bernfeld (39) ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

4.1.1 การเตรียมสับสเตรท ชั่งแป้ง (soluble starch) 2 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ (0.02 M phosphate buffer pH 6.9) ปริมาตร 30 มล. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันที่เดือดปริมาตร 70 มล. พร้อมกับคนตลอดเวลา

4.1.2 วิธีการวิเคราะห์ ปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่ทำให้เจือจางในอัตราส่วนเหมาะสมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มล. ลงในสารละลายสับสเตรทปริมาตร 0.5 มล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที นำไปหาน้ำตาลรีดิวส์ โดยวิธีของ Bernfeld (ภาคผนวก 3.1) โดยใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ

เมื่อศึกษาสภาวะเหมาะสมแล้ว ได้ทำการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังกล่าวข้างต้น ยกเว้นใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 และ บ่มสารละลายเอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ในที่นี้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดน้ำตาลมอลโตส 1 มก. ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

4.2 วัดความสามารถในการเดกซ์ตรินไนส์แป้ง (dextrinizing activity) ซึ่งปรับปรุงจาก SKB Method โดยไม่ใช้เบต้าอะไมเลส (5) มีวิธีการดังต่อไปนี้

4.2.1 การเตรียมสับสเตรท ชั่งแป้ง 6.98 กรัม ละลายในน้ำ 50 มล. เติมน้ำเดือดปริมาตร 200 มล. พร้อมกับคนตลอดเวลา เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก 2.2) ปริมาตร 35 มล. ทำปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรในขวดเตรียมสารละลาย (volumetric flask)

4.2.2 วิธีการวิเคราะห์ ปิเปตสารละลายสับสเตรทปริมาตร 20 มล. ลงในหลอดทดลอง ซึ่งแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เติมสารละลายเอนไซม์ที่ทำให้เจือจางในอัตราส่วนเหมาะสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายผสมปริมาตร 1 มล. ลงในสารละลายไอโอดีนเจือจาง (ภาคผนวก 2.2) ปริมาตร 5 มล. ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ จนกระทั่งสีของสารละลายไอโอดีนไม่เปลี่ยนแปลง

ในที่นี้ 1 หน่วยเอนไซม์คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยแป้ง 1 มก. ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

5. การศึกษาประเภทของเอนไซม์

ศึกษาชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งของเอนไซม์ โดยเอล่เซ่นดิงเปเปอร์โครมาโตกราฟฟี (ascending paper chromatography) ซึ่งปรับปรุงจากวิธีของ Robyt และ French (40) มีวิธีการดังต่อไปนี้

บ่มสารละลายสับสเตรทในข้อ 4.1 กับสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นเหมาะสม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปิเปตสารละลายผสมปริมาตร 1 มล. ที่เวลา 0 5 10 20 30 60 และ 120 นาที ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที นำไปจุด (spot) ลงบนกระดาษโครมาโตแกรม วอทแมน เบอร์ 3 (whatman paper chromatogram No.3) ขนาด 15 x 20 เซนติเมตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เป่าให้แห้ง ใช้น้ำตาลกลูโคส มอลโตส และมอลโตไตรโอส (maltotriose) เข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเป็นมาตรฐาน ทำแผ่นโครมาโตแกรมเป็นทรงกระบอกใส่ลงในถังแก้วที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย ซึ่งประกอบด้วยโพรพานอล (propan-1-ol) และน้ำในอัตราส่วน 7 : 3 เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 20 เซนติเมตร นำออกมาทำให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำไปจุ่มในถาดซึ่งมีสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) ในอะซีโตน (ภาคผนวก 2.3) ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปจุ่มในถาดซึ่งมีสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมธานอล (ภาคผนวก 2.3) จนกระทั่งเกิดจุดสีดำ (black spot) ขึ้น นำไปล้างด้วยน้ำแล้วจุ่มลงในถาดที่มีสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (sodium thiosulfate) เข้มข้น 0.05 โมลาร์ จนกระทั่งสีของกระดาษส่วนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่จุดสีดำจางหายไป

6. การเลี้ยง B.amyloliquefaciens KA 63 เพื่อผลิตแอลฟาอะไมเลสในขวดแก้วทรงกรวย

เขี่ยเชื้อ 1 ลูปจากหลอดอาหารแข็งเอียง สำหรับเก็บรักษาเชื้อในข้อ 3 ลากลงบนอาหารแข็งเอียงสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (38) (inoculum agar slant ; ภาคผนวก 1.2) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเขี่ยลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (inoculum broth ; ภาคผนวก 1.2) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวย (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มล. เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาปรับค่าดูดกลืนแสง (optical density) ที่ 600 นาโนเมตร ด้วยอาหารเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์เป็น 1.00 ปิเปตสาร

แขวนลอยของเซล (cell suspension) ปริมาตร 2.5 มล. ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลส (14) (production broth ; ภาคผนวก 1.3) ปริมาตร 50 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แยกเซลและกากอาหารออกโดยการปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (supernatant) มาวิเคราะห์การทำงานของแอลฟาอะไมเลส ตามวิธีในข้อ 4.1

7. <u>การเลี้ยง B.amyloliquefaciens KA 63 เพื่อผลิตแอลฟาอะไมเลสในถังหมักขนาด 5 ลิตร</u>

เขี่ยเชื้อ 1 ลูปจากหลอดอาหารแข็งเอียงสำหรับเก็บรักษาเชื้อจากข้อ 3 ลากลงบนอาหารแข็งเอียงสำหรับทำหัวเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเขี่ยลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 50 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. 4 ขวด เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ ซึ่งปรับปรุงแล้วจากการศึกษาการผลิตในขวดแก้วทรงกรวย (ภาคผนวก 1.4) ปริมาตร 2 ลิตร (ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10) ซึ่งบรรจุในถังหมักขนาด 5 ลิตร ใช้อัตราการกวน (agitation rate) 300 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ (aeration rate) 1 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที (vvm) ใช้น้ำมันซิลิโคนอะดีคานอล (adecanol) ซึ่งทำให้เจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1 : 5 เป็นสารกำจัดฟอง (antifoamer) ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง วัดค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารโดย Dissolved Oxygen Probe เก็บตัวอย่างครั้งละ 30 มล. ที่ 9 ชั่วโมงหลังจากเติมหัวเชื้อ และทุก ๆ 3 ชั่วโมงหลังจากนั้นเป็นเวลา 42 ชั่วโมง

นำน้ำล่า (fermented broth) ที่ได้มาเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนใสที่ได้นำมาวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้

7.1 <u>วัดค่าพีเอชของอาหาร</u> โดยเครื่องวัดค่าพีเอช

7.2 <u>วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์</u> ตามวิธีในข้อ 4.1

7.3 <u>วิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด</u> (total soluble solid)

อบด้วยกระเบื้อง (porcelain crucible) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (dessicator) ชั่งน้ำหนักละเอียดถึง 0.1 มก. ปิเปตส่วนใสดังกล่าวข้างต้น 5 มล. ลงในถ้วยกระเบื้อง นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก

7.4 <u>วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์</u> โดยวิธีของ Bernfeld โดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ

7.5 <u>วิเคราะห์หาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหลือ</u> โดยการไฮโดรไลส์ด้วยกรด (acid hydrolysis) (41) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

นำส่วนใสที่ได้จากข้างต้น 5 มล. ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 250 มล. เติมกรดเกลือเข้มข้นร้อยละ 25 ปริมาตร 10 มล. และน้ำกลั่นปริมาตร 85 มล. ปิดด้วยจุกไม้คอร์ก ย่อยสลายในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ทิ้งให้เย็น เติมบรอมไธมอลบลู (brom-thymol blue) 2-3 หยด และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 โมลาร์ปริมาตร 20 มล. ทำให้เป็นกลาง (neutralization) โดยการติเตรท (titrate) กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ โดยที่จุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียว (greenish blue) วัดปริมาตรสุดท้าย นำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ตามวิธีของ Bernfeld เช่นเดียวกับข้อ 7.4 ผลที่ได้เมื่อเปรียบกับข้อ 7.4 ก็จะทราบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ที่เกิดจากแป้งมันสำปะหลังที่เหลือในอาหาร

ทำการไฮโดรไลส์ด้วยกรด แป้งมันสำปะหลังที่ใช้ในการเตรียมอาหารโดยวิธีการดังกล่าวข้างต้น ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้ใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ

ส่วนที่เป็นของแข็ง (pellet) นำมาทำการวิเคราะห์ต่อไปในข้อ 7.6 และ 7.7

7.6 <u>วิเคราะห์หาปริมาณกากถั่วเหลืองที่เหลือ</u>

อบกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 4 (whatman filter paper No.4) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักแน่นอนถึง 0.1 มก. นำของแข็งที่ได้ผ่านกระดาษกรองดังกล่าว ล้างด้วยน้ำ 2 ปริมาตร นำกระดาษกรองพร้อมกากถั่วเหลืองที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งให้

เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก ส่วนที่ผ่านกระดาษกรองนำไปวิเคราะห์ในข้อ 7.7

7.7 วิเคราะห์การเจริญ (growth)

นำส่วนที่ผ่านกระดาษกรองในข้อ 7.6 มาทำให้มีปริมาตร 100 มล. ในน้ำ วัดค่าดูดกลืนแสงเทียบกับน้ำที่ 600 นาโนเมตร

8. การศึกษาการเก็บรักษาเอนไซม์

8.1 ความคงทนของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง (pH stability)

ทำสารละลายเอนไซม์ให้เจือจาง 10 เท่าด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ ชนิดต่าง ๆ คือ อะซีเตทบัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอช 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอช 5.5 6.0 6.5 7.0 และ 7.5 ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอช 7.5 8.0 8.5 และ 9.0 ในสภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ทำให้อิ่มตัวด้วยโทลูอีน (toluene) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เจือจางจนได้ความเข้มข้นเหมาะสมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ เพื่อวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 4.1

8.2 ความคงทนของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ (thermal stability)

ทำสารละลายเอนไซม์ให้เจือจางจนได้ความเข้มข้นเหมาะสม ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ในสภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ บ่มสารละลายเอนไซม์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 30 40 45 50 55 60 65 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมินาน 30 นาที วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.1

8.3 การเตรียมเอนไซม์เหลวเข้มข้น (concentrated enzyme)

8.3.1 การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation)

นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง B.amyloliquefaciens KA 63 ในข้อ 7 ปริมาตร 1,500 มล. วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.1 และปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ

Lowry (42) (ภาคผนวก 3.4) เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตบดละเอียดช้า ๆ พร้อมทั้งกวนเบา ๆ ตลอดเวลา จนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 40 ทิ้งไว้พร้อมทั้งกวนเบา ๆ นาน 1 ชั่วโมง นำมาเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนใสมาเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟต จนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 60 ทิ้งไว้พร้อมทั้งกวนเบา ๆ นาน 1 ชั่วโมง นำมาเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที นำตะกอนมาละลายในสารละลายทริสไฮโดร-คลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 8.5 เข้มข้น 0.01 โมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิ-โมลาร์อยู่ด้วย โดยใช้บัฟเฟอร์ปริมาตรน้อยที่สุด เหวี่ยงแยกส่วนที่ไม่ละลายด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนใสมากำจัดเกลือ (desalting) โดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเซฟฟาเดกซ์ จี-25 (sephadex G-25 column) ขนาด 4 x 40 เซนติเมตร เก็บลำดับส่วน (fraction) ละ 10 มล. นำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์โดยวิธีในข้อ 4.1 และตรวจสอบว่าปราศจากแอมโมเนียมซัลเฟต โดยนำมาหยดลงในสารละลายอิ่มตัวของแบเรียมคลอไรด์

8.3.2 <u>การทำสารละลายเอนไซม์ให้เข้มข้นโดยอุลตราฟิลเตรชัน</u> (ultra-filtration)

รวมลำดับส่วนต่าง ๆในข้อ 8.3.1 ที่มีการทำงานของเอนไซม์และปราศจากเกลือ นำมาทำให้เข้มข้นโดยผ่านเมมเบรน (membrane) สำหรับอุลตราฟิลเตรชัน ใช้ความดันกาซไนโตรเจน 60 ปอนด์/ตารางนิ้ว จนกระทั่งได้สารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาตร 15 มล. (ลดจากเริ่มต้น 100 เท่า)

8.4 <u>การเตรียมเอนไซม์ผง</u> (enzyme powder)

โดยการตกตะกอนด้วยอะซีโตน (acetone precipitation) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง <u>B.amyloliquefaciens</u> KA 63 ในข้อ 7 ปริมาตร 1,000 มล. วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.1 และปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry เติมแคลเซียมคลอไรด์ผงปริมาณร้อยละ 0.5 น้ำหนัก/ปริมาตร ค่อย ๆ

หยดอะซีโตนพร้อมทั้งกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส จนกระทั่งความเข้มข้นของอะซีโตนเป็นร้อยละ 30 นำมาเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนใสมาเติมอะซีโตน พร้อมทั้งกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส จนได้ความเข้มข้นของอะซีโตนเป็นร้อยละ 50 นำมาเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยอะซีโตน 2 ครั้ง แยกตะกอนเอนไซม์ออกจากอะซีโตน โดยการเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตะกอนที่ได้นำมาทำให้แห้งโดยทิ้งไว้ในเดซิเคเตอร์นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 4.1 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry

8.5 <u>การเตรียมเอนไซม์ระเหิดแห้ง</u> (freeze dried enzyme)

นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง <u>B.amyloliquefaciens</u> KA 63 ในข้อ 7 ปริมาตร 500 มล. วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.1 ทำระเหิดแห้ง (freeze drying) โดยการทำให้แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ -25 -5 10 องศาเซลเซียส อุณหภูมิละ 4 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส 14 ชั่วโมง นำเอนไซม์ระเหิดแห้งที่ได้มาวิเคราะห์การทำงานตามวิธีในข้อ 4.1

8.6 <u>การตรวจสอบการทำงานขณะเก็บ</u>

บรรจุเอนไซม์ในข้อ 8.3 8.4 และ 8.5 ในหลอดแก้วมีฝาปิด (vial) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) ตู้เย็น (10 องศาเซลเซียส) และตู้แช่แข็ง (-70 องศาเซลเซียส) ตรวจสอบการทำงานทุก 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน โดยเอนไซม์เหลวเข้มข้น ทำให้อิ่มตัวด้วยโทลูอีนเป็นสารกันเสีย