บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 อ่างควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Charles Hearson and Co. Ltd. Model A 4668 ประเทศอังกฤษ

2.1.2 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Bausch and Lomb Spectronic Model 2000 และ Bausch and Lomb. Spectronic Model 20 ประเทศเยอรมัน

2.1.3 เครื่องปอกเปลือกต้นสับปะรด ออกแบบและสร้างโดย ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ ประกอบด้วยเครื่องไสไม้ติดตั้งอยู่บนแท่นเหล็กมีขาตั้ง 4 ขา สูงประมาณ 1.2เมตร ส่วนบนของเครื่องมีช่องที่ปรับความกว้างได้เพื่อให้ใบมีดปอกเปลือกต้นสับปะรดขนาดต่าง ๆ (รูปที่ 5)

2.1.4 เครื่องทื่นต้นสับปะรด สร้างในประเทศไทย เป็นตู้สี่เหลี่ยม ภายในมีมอเตอร์ขนาด 1/2 แรงม้า ต่อกับแกนหมุนและสายพาน มีใบมีดทองเหลืองติดกับแกนหมุน ส่วนบนของตู้มีช่องเจาะไว้เพื่อใส่ต้นสับปะรด (รูปที่ 6)

2.1.5 เครื่องบด (disk mill) บริษัท Shan Tung Chimoh Model FFC-23 สาธารณรัฐประชาชนจีน (รูปที่ 7)

2.1.6 เครื่องตีปั่น (blender) บริษัท Matsushita Electric Ind.Co.Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

2.1.7 เครื่องสกัดต้นสับปะรด ออกแบบและสร้างโดย ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ เป็นเครื่องที่มีมอเตอร์ขนาด 1 แรงม้า มีลูกรอกและสายพานหมุนใบพัดกวน 4 ชุด ใบพัดกวนมี 4 ใบ แต่ละใบ ยาว 4 ซม. กว้าง 1 ซม. (รูปที่ 8)

2.1.8 เครื่องบีบไฮดรอลิค (hydraulic press) สร้างโดย ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ ประกอบด้วยแท่นที่เลื่อนขึ้นลงได้ และมีกระบอกกลวงตั้งบนส่วนรองรับน้ำภายใต้แท่นมีไฮดรอลิคขนาด 8 ตัน เลื่อนขึ้นลงได้ (รูปที่ 9)

2.1.9 เครื่องบีบแบบสกรู (screw press) สร้างโดยภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รูปที่ 10)

2.1.10 เครื่องบีบด้วยมือแบบสกรู (hand screw press) สร้างในประเทศไทย (รูปที่ 11)

2.1.11 เครื่องปั่นแยก (centrifuge) บริษัท Beckman Model J-21 C ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.12 ถังกรองขนาด 30 ลิตร ออกแบบและสร้างโดย ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ สร้างขึ้นด้วยสเตนเลส มีท่อต่อสำหรับปั๊มปูญญากาศ เพื่อให้การกรองเป็นแบบกรองสูญญากาศ (รูปที่ 12)

2.1.13 เครื่องกรองแบบ filter press สร้างโดยภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รูปที่ 13)

2.1.14 ถังตกตะกอนสเตนเลสขนาด 80 ลิตร พร้อมกับใบพัดกวน ติดตั้งคอยล์เย็น (cooling coil) และเครื่องทำความเย็น ออกแบบและสร้างโดย ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ (รูปที่ 14)

2.1.15 ตู้อบแห้ง (oven dryer) บริษัท Hareus B 5050E ประเทศเยอรมัน

2.1.16 ตู้อบแห้งสูญญากาศ (vaccuum oven) บริษัท Haracus VT 5042 EK ประเทศเยอรมัน

2.1.17 ตู้อบแห้งเยือกแข็ง (freeze dryer) บริษัท Vertis Model 25 SRC ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.18 เดซิเคเตอร์ บริษัท Pyrex ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.19 เตาเผา (muffle furnace) บริษัท Thermolyne Model Furnatrol II ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.20 ตู้อบความชื้น บริษัท Crundy Equipment Ltd. Model A 4653 ประเทศอังกฤษ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 เครื่องปอกเปลือกต้นสับปะรด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 เครื่องหั่นต้นสับปะรด

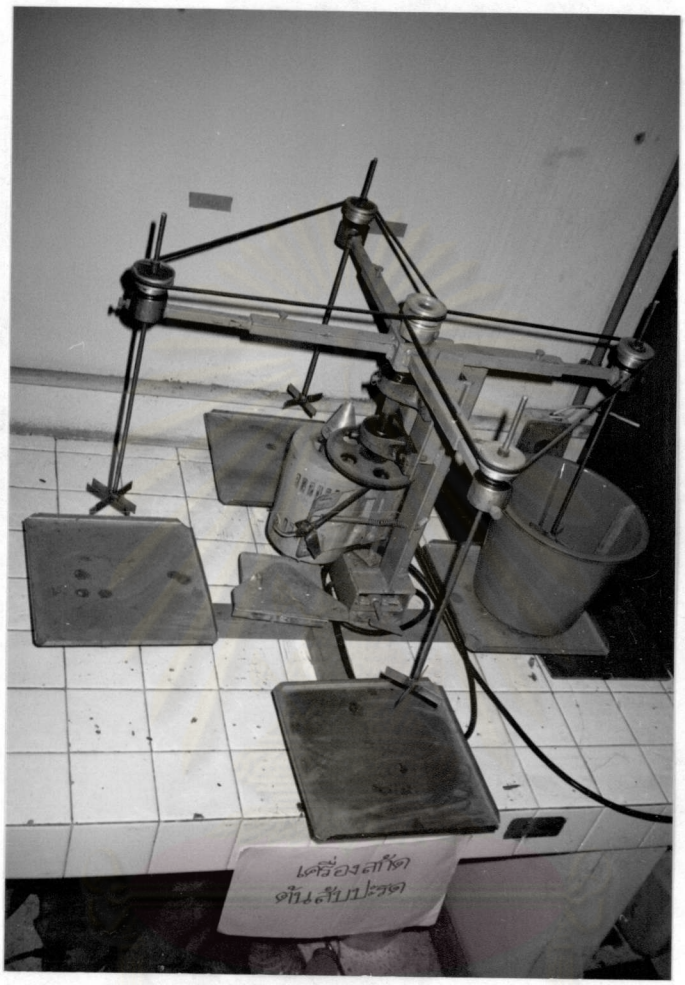
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 เครื่องบด

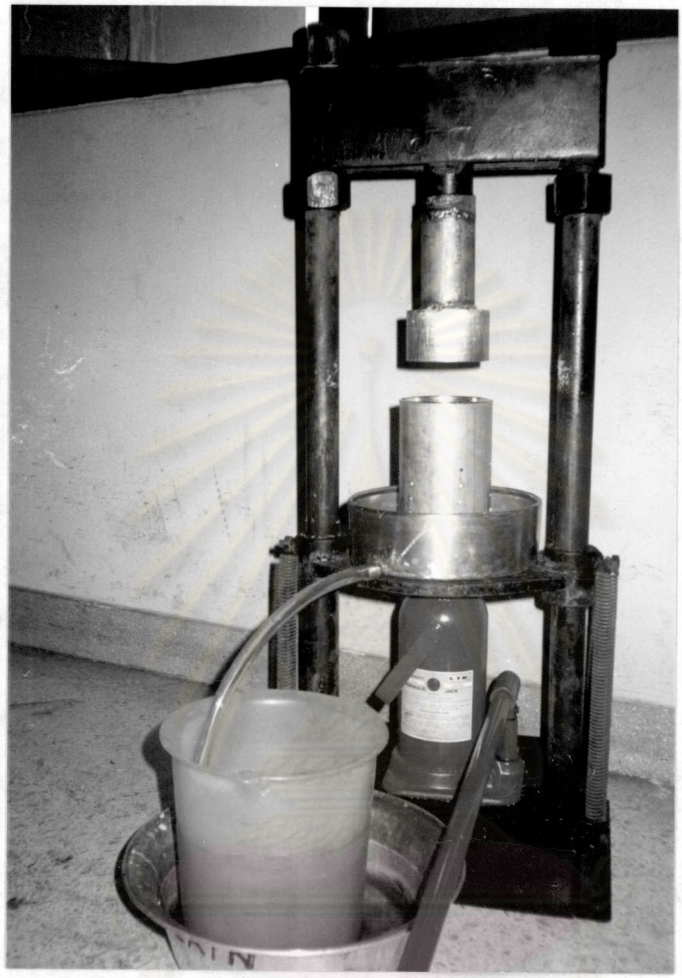
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012797



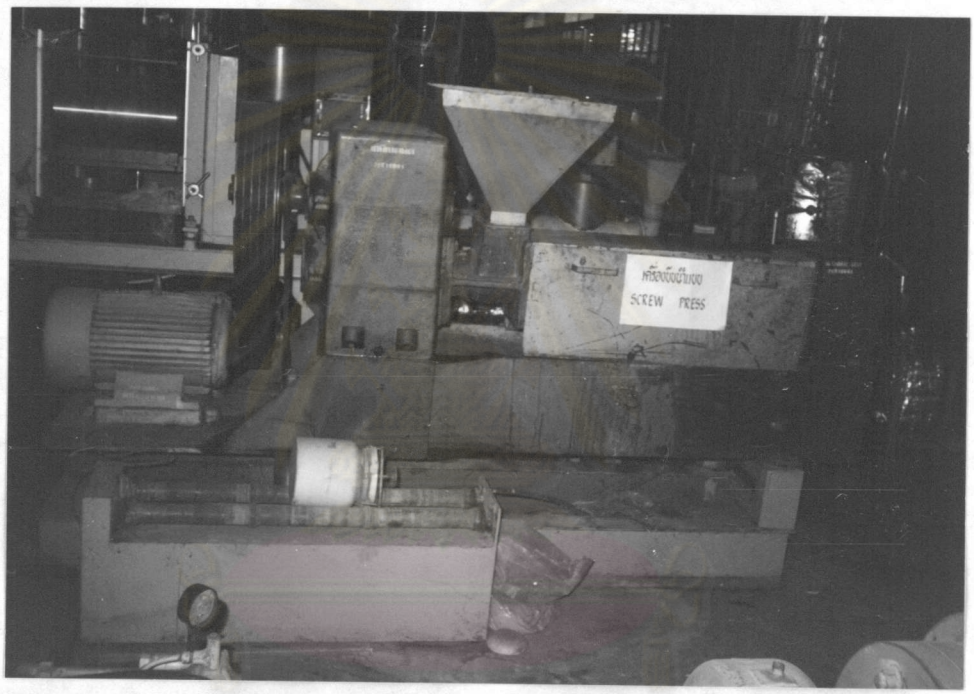
รูปที่ 8. เครื่องสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



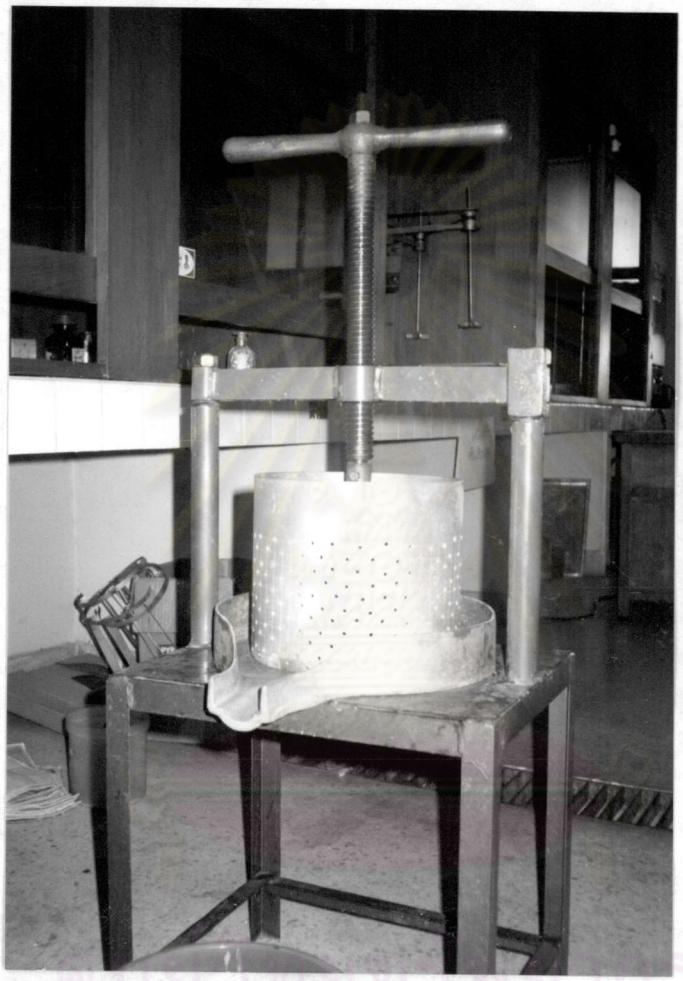
รูปที่ 9 เครื่องบีบไฮดรอลิค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 เครื่องบีบแบบสกรู

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 เครื่องบีบด้วยมือแบบสกรู

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 ถังกรองขนาด 30 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 เครื่องกรองแบบ filter press

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 ถังหมักตะกอนสเตนเลส ขนาด 80 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.21 เครื่องย่อยและกลั่นไนโตรเจน บริษัท Büchi Model 315 ประเทศเยอรมัน

2.1.22 Klett Summerson Photoelectric Colorimeter บริษัท Arthur H. Thompas Company Model 8003 ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.23 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น

2.1.24 เครื่องนับโคโลนี (colony counter) บริษัท American Optical Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.25 พีเอช มิเตอร์ (pH meter) บริษัท Beckman Model PHM-21 ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2 สารเคมี :

2.2.1 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์แอคติวิตีโบรมิเลน (ภาคผนวก 1)

2.2.2 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณโปรตีน โดยวิธีไบยูเรท (ภาคผนวก 2)

2.2.3 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยวิธี Clegg-Anthrone (ภาคผนวก 3)

2.2.4 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Micro Kjeldahl (ภาคผนวก 4)

2.2.5 สารอาหารที่ใช้หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (ภาคผนวก 5)

2.2.6 สารเคมีที่ใช้ตกตะกอนเอนไซม์ในต้นสับปะรด (ภาคผนวก 6)

2.3 การเตรียมตัวอย่างต้นสับปะรด

ต้นสับปะรดที่ใช้เป็นต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียอายุ 2-3 ปี จากไร่สับปะรดโรงงานอาหารสยาม อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี ชั่งน้ำหนักต้นสับปะรด ปอกเปลือกด้วยเครื่องปอกเปลือกหรือด้วยมีดธรรมดา ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง ทั่นเป็นแผ่นด้วยเครื่องทั่น นำไปบดด้วยเครื่องบดแบบ

disk mill แล้วผ่านตะแกรงขนาด 30 mesh ในกรณีการสกัดแยกโดยใช้เครื่องตีปั่นแบบตั้งโต๊ะ จะใช้มีดหั่นเป็นท่อนขนาด 1" x 1"

2.4 การแยกโบรมิเลนออกจากต้นสับปะรด

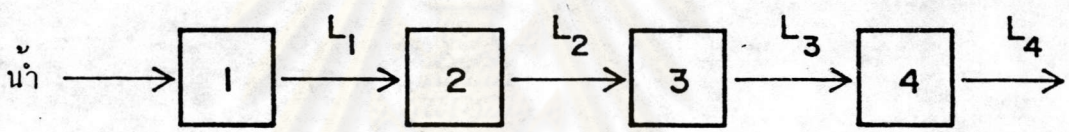
2.4.1 การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว

เตรียมตัวอย่างต้นสับปะรดตามวิธีในข้อ 2.3 นำต้นสับปะรดที่ได้ไปบดด้วยเครื่องบด นำชิ้นต้นสับปะรดซึ่งบดละเอียดแล้วลงในถังกวนของเครื่องสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรด เติมน้ำหรือตัวทำละลายลงไปในอัตราส่วนที่กำหนดและกวน คั้นน้ำออกโดยเครื่องบีบด้วยมือแบบสกรู กรองแยกเอาส่วนน้ำออกด้วยผ้ากรอง

2.4.2 การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยวิธีสกัดแบบต่อเนื่องและสวนทาง

ก่อนการสกัดแยกโบรมิเลนด้วยวิธีสกัดแบบต่อเนื่องและสวนทาง ต้องทำการทดลองเพื่อคาดคะเนจำนวนขั้นตอนที่ใช้ในการสกัดแยก โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ (ดูรูปที่ 15 ประกอบ) นำต้นสับปะรดที่บดแล้วลงในถังกวน เติมน้ำและกวนเป็นเวลานาน 5 นาที บีบน้ำจากต้นสับปะรดดังกล่าววัดปริมาตรสารละลายที่สกัดแยกได้ (L_1) นำสารละลาย L_1 ส่วนหนึ่งไปวัดแอคติวิตี ส่วนที่เหลือจะเป็นตัวทำละลายในการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรด บดชุดที่ 2 ด้วยวิธีการเหมือนตอนแรก จะได้สารละลายที่สกัดแยกได้เป็นชุดที่ 2 (L_2) นำสารละลาย L_2ส่วนหนึ่งไปวัดแอคติวิตี ส่วนที่เหลือจะเป็นตัวทำละลายในการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดบดชุดที่ 3 ด้วยวิธีการเหมือนข้างต้น จะได้สารละลายที่สกัดแยกได้เป็นชุดที่ 3 (L_3) ซึ่งสารละลาย L_3 นี้ก็จะเป็นตัวทำละลายในการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดบดชุดที่ 4 จะได้สารละลายที่สกัดแยกได้เป็นชุดที่ 4 (L_4) วิเคราะห์แอคติวิตีและปริมาณโปรตีนในสารละลายที่สกัดแยกได้จากต้นสับปะรดบด คือ L_1, L_2, L_3 และ L_4

การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยวิธีสกัดแบบต่อเนื่องและสวนทางมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ (ดูรูปที่ 16 ประกอบ) เตรียมต้นสับปะรดตามวิธีในข้อ 2.3 ต้นสับปะรดที่ได้นำไปบดด้วยเครื่องบด หลังจากนั้นนำไปสกัดแยกโบรมิเลนออกจากต้นสับปะรดในถังกวนด้วยเครื่องสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดดังนี้ แบ่งต้นสับปะรดบดเป็นสองส่วน (S) ใส่ในถังกวน 2 ถัง และผสมกับน้ำกลั่นในปริมาตรที่กำหนด กวน 5 นาที บีบน้ำออกจากกากทั้งสองส่วนด้วยเครื่องบีบด้วยมือแบบสกรู



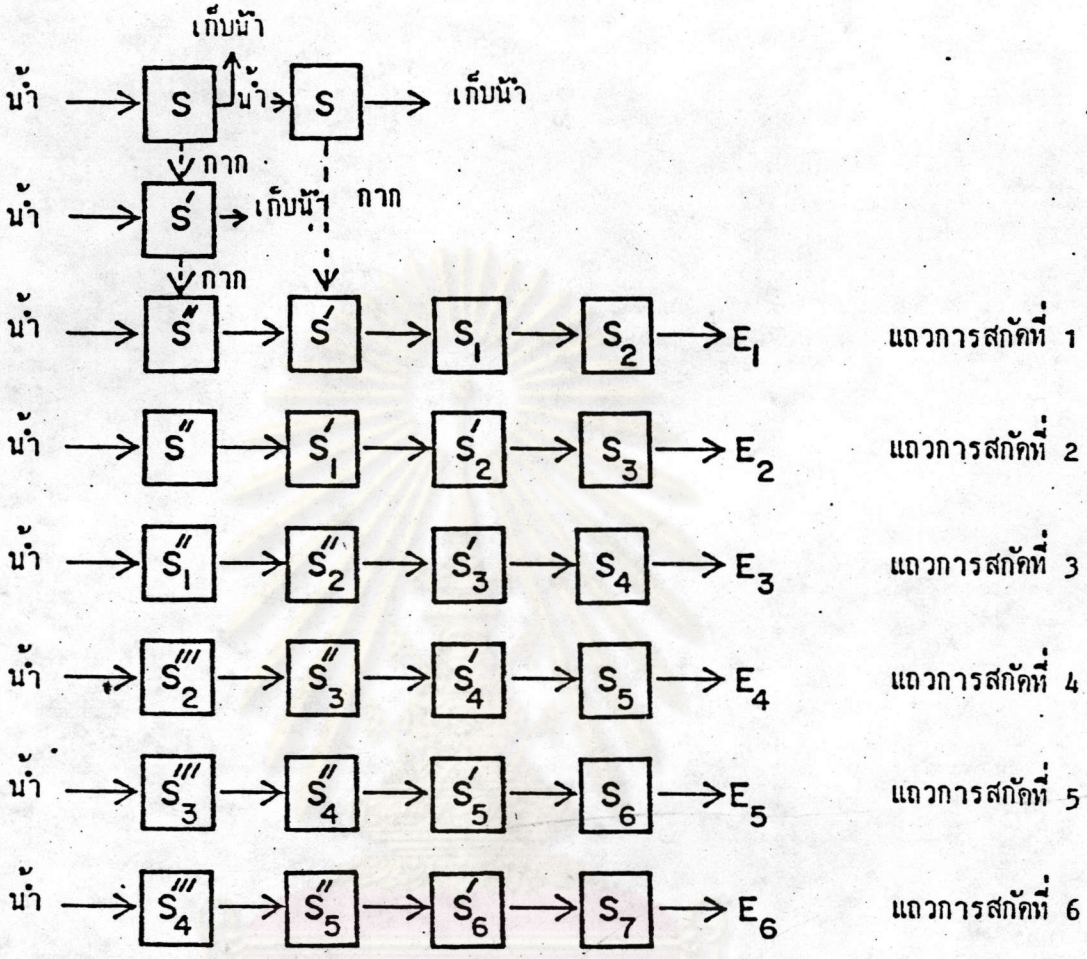
□ = ถังกวนที่ใช้สกัดแยกโบรมิเลน

n = ถังกวนหมายเลข 1 - 4

L_n = สารละลายเอนไซม์ที่สกัดแยกได้จากขั้นตอนที่ n

รูปที่ 15 แสดงขั้นตอนการสกัดในการสกัดแยกเอนไซม์แบบต่อเนื่องและสวนทาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



n = ต้นสับปะรด 1-7 ชุด

S = ต้นสับปะรด

S_n = ต้นสับปะรดชุดที่ n

S'_n = ต้นสับปะรดชุดที่ถูกสกัด 1 ครั้ง

S''_n = ต้นสับปะรดชุดที่ถูกสกัด 2 ครั้ง

S'''_n = ต้นสับปะรดชุดที่ถูกสกัด 3 ครั้ง

E_{1-6} = สารละลายที่ถูกสกัดจากแถวการสกัดที่ 1-6

รูปที่ 16 การสกัดแยกเอนไซม์แบบต่อเนื่องและสวนทาง

เก็บส่วนน้ำที่สกัดแยกได้นี้ไว้ สกัดกากส่วนที่หนึ่งซ้ำอีกสองครั้ง นำน้ำที่สกัดแยกได้ทั้งหมดนี้ไปสกัดกากส่วนที่สองซ้ำอีกครั้ง บีบน้ำจากกากส่วนที่สองนี้ไปสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดบดใหม่ชุดที่ 1 (S_1) ส่วนกากของ S ทิ้งเป็นของเสียออกจากระบบ จากนั้นนำน้ำที่สกัดแยกได้จากต้นสับปะรดบด S_1 ไปสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดบดใหม่ชุดที่ 2 (S_2) น้ำที่สกัดแยกได้จากต้นสับปะรดบด S_2 นี้จะเป็นสารละลายที่สกัดแยกได้จากต้นสับปะรดบดชุดที่ 1 (E_1) ซึ่งเป็นการสกัดแยกครบ 1 แถวการสกัด เก็บสารละลายนี้ส่วนหนึ่งไว้วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์และหาปริมาณโปรตีน จากนั้นเริ่มต้นแถวการสกัดที่ 2 โดยนำกากชุดแรกที่ผ่านการสกัดแยกด้วยน้ำมา 2 ครั้งแล้ว (S'') มาสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่ง บีบน้ำจากกากส่วนนี้ไปสกัดแยกกากต้นสับปะรดบดชุดที่ 1 ซึ่งผ่านการสกัดแยกมาแล้วหนึ่งครั้ง (S_1') ส่วนกาก S'' ทิ้งเป็นของเสียออกจากระบบ น้ำที่สกัดแยกได้จากกาก S_1' จะเป็นสารละลายที่ใช้สกัดแยกกากต้นสับปะรดบดชุดที่ 2 ซึ่งผ่านการสกัดแยกมาแล้วหนึ่งครั้ง (S_2') จากนั้นนำน้ำที่สกัดแยกได้นี้ไปสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดบดใหม่ชุดที่ 3 (S_3) น้ำที่สกัดแยกได้จากต้นสับปะรดบด S_3 นี้จะเป็นสารละลายที่สกัดแยกได้จากต้นสับปะรดบดชุดที่ 2 (E_2) ซึ่งเป็นการสกัดครบรอบในแถวการสกัดที่ 2 ทำตามระบบนี้เรื่อยไปจนกระทั่งได้สารละลายที่สกัดแยกได้จากต้นสับปะรดชุดที่ 3-6 (E_3 - E_6)

2.4.3 <u>การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยเครื่องตีปั่นแบบตั้งโต๊ะ</u>

เตรียมต้นสับปะรดตามวิธีในข้อ 2.3 ต้นสับปะรดที่ได้นำไปหั่นเป็นแผ่นและผสมกับน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่กำหนด ตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นแบบตั้งโต๊ะด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา $2\frac{1}{2}$ นาที บีบน้ำจากกากด้วยเครื่องบีบด้วยมือแบบสกรู

2.4.4 <u>การบีบแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบแบบไฮดรอลิค</u>

เตรียมต้นสับปะรดตามวิธีในข้อ 2.3 หลังจากนั้นหั่นต้นสับปะรดเป็นแผ่นแล้วบรรจุแผ่นสับปะรดประมาณ 300 กรัมลงในช่อง จากนั้นใช้คันโยกบีบน้ำต้นสับปะรดออกมาให้ได้มากที่สุด จนกระทั่งไม่มีน้ำออกมาอีก นำน้ำต้นสับปะรดมากรองต่อด้วยผ้ากอซ

2.5 การปั่นแยกและการกรองแยกน้ำต้นสับปะรด

สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดแยกหรือบีบออกจากต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.4 จะมีความขุ่นเนื่องจากเศษเนื้อเยื่อเช่น เส้นใยหรือแป้งปะปนอยู่มาก จึงต้องปั่นแยกหรือกรองเสียก่อนตามวิธีต่อไปนี้

2.5.1 การปั่นแยก ใช้ในการผลิตเอนไซม์ระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้โรเตอร์แบบ J-A 10 ปั่นแยกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4° ซ. แล้วเก็บส่วนใสไว้

2.5.2 การกรอง

2.5.2.1 การกรองด้วยถังกรองต่อกับปั๊มปสูญญากาศ ใช้กับการผลิตเอนไซม์มีปริมาตรน้ำต้นสับปะรดตั้งแต่ 2-10 ลิตร ก่อนกรองเติมสารช่วยกรองและตัวเร่งลงในน้ำต้นสับปะรด ทิ้งให้ตกตะกอนในห้องเย็น 4°ซ. นาน 2 ชั่วโมง กรองด้วยถังกรองที่ต่อกับปั๊มปสูญญากาศผ่านกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1

2.5.2.2 การกรองด้วยเครื่องกรองแบบ filter press

ใช้กับการกรองน้ำที่สกัดแยกจากต้นสับปะรดมากกว่า 10 ลิตร ก่อนกรองเติมสารช่วยกรองและตัวเร่งลงในน้ำต้นสับปะรด เปิดปั๊มปดูดน้ำต้นสับปะรดผ่านเข้าเครื่องกรองซึ่งมีผ้ากรองเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าซ้อนกันจำนวน 9 ชั้น ปรับความดันขณะกรองให้อยู่ระหว่าง 1.5 - 2.0 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2.6 การตกตะกอนน้ำต้นสับปะรด

นำส่วนใสที่ได้จากการกรองหรือการปั่นแยกตามวิธีข้อ 2.5 มาเติมตัวเร่งชนิดต่างๆ เช่น โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ โซเดียมเบนโซเอท หรือ ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ ปรับพีเอชก่อนการตกตะกอนเท่ากับ 3.5 - 5.5 ด้วยกรดอะซีติก 2 โมลาร์ แล้วเติมสารตกตะกอนเช่น อะซีโตน กรดแทนนิค หรือ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณต่าง ๆ ที่กำหนดที่อุณหภูมิ 4°ซ. ในถังตกตะกอน แยกตะกอนเอนไซม์ด้วยวิธีการปั่นแยกหรือกรองด้วยถังกรองต่อกับปั๊มปสูญญากาศ

2.7 การทำเอนไซม์ให้แห้ง

2.7.1 การอบแห้งด้วยตู้อบแห้ง (oven dryer) อบแห้งเอนไซม์ในถาดอลูมิเนียมที่อุณหภูมิและเวลาที่กำหนดของแต่ละการทดลอง

2.7.2 การอบแห้งด้วยตู้อบแห้งสูญญากาศ (vacuum dryer) อบแห้งเอนไซม์ในถาดอลูมิเนียมภายใต้ความดันของอากาศ 0.6 มิลลิเมตรปรอท ที่อุณหภูมิและเวลาที่กำหนดของแต่ละการทดลอง

2.7.3 การอบแห้งด้วยตู้อบแห้งเยือกแข็ง (freeze dryer) อบแห้งเอนไซม์ในภาชนะสเตนเลสของตู้อบแห้ง นำไปแช่เย็นที่ -20° ซ. แล้วนำเข้าเครื่องอบแห้งนาน 14 ชม. ที่อุณหภูมิ -40°ซ. ความดัน 0.2 ทอร์

2.8 การวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน

2.8.1 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โบรมิเลนด้วยวิธีซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Kunitz (44) นำสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์แอคติวิตีมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โปตัสเซียม-ฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.6 และ 2-เมอร์แคปโตเอทธานอล 0.02 โมลาร์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ใช้ปิเปตดูดสารละลายนี้ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แช่ในอ่างน้ำซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37° ซ. นาน 10 นาที เติมสารละลายเคซีน 1% ลงไปในหลอดทดลอง 1.0 มิลลิลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติก 5% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกที่ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยเทียบกับหลอด blank ที่ใส่ 1 มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์โปตัสเซียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.6 ส่วนหลอด control เติมสารละลายไตรคลอโรอะซีติก 5% ก่อนเติมสารละลายเคซีน 1% วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน แล้วคำนวณเป็นหน่วย CDU (ภาคผนวก 1)

2.8.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของไทโรซีน

เตรียมสารละลายไทโรซีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายไทโรซีน 10 มิลลิกรัมในสารละลายกรดเกลือความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำสารละลายนี้มาเจือจางด้วยกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล ให้มีความเข้มข้นของไทโรซีนเท่ากับ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ใช้สารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มอลเป็น blank เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรกับไมโครกรัมของไทโรซีน จะได้กราฟเป็นเส้นตรง (ภาคผนวกที่ 1)

2.9 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท (45)

2.9.1 การวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดแยกได้จากต้นสับปะรด

ดูดสารละลายเอนไซม์ใส่ลงในหลอดทดลอง 1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 10% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วแช่ไว้ในน้ำแข็ง 20 นาที นำไปปั่นแยกที่ 400 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ตะกอนที่ได้นำไปเติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ 4 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้สารละลายไบยูเรทเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน (ภาคผนวก 2) แล้วคำนวณปริมาณโปรตีนที่อยู่ในสารละลายเอนไซม์

2.9.2 การหาโปรตีนในผงโบรมิเลน

ละลายผงโบรมิเลน 4.0 มิลลิลกรัมใน 1 มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์โปตัสเซียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.6 ดูดสารละลายเอนไซม์ 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมกรดไตรคลอโรอะซีติค 10% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วทำเช่นเดียวกับการวัดโปรตีนจากเอนไซม์ในน้ำต้นสับปะรด

2.10 อุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บต้นสับปะรดหลังเก็บเกี่ยวจากไร่

สุ่มตัวอย่างต้นสับปะรดซึ่งแบ่งเก็บไว้ที่ห้องเย็น 4^{C} ซ. และที่อุณหภูมิห้องอย่างละเท่า ๆ กัน นำไปสกัดแยกตามวิธี 2.4.3 แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีและวัดปริมาณของโปรตีน

2.11 การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยวิธีปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือกต้นสับปะรด

ผ่าต้นสับปะรดเป็น 2 ส่วนตามยาว ส่วนหนึ่งปอกเปลือกออก อีกส่วนหนึ่งไม่ปอกเปลือก หั่นต้นสับปะรดด้วยเครื่องหั่นแล้วบดด้วยเครื่องบด นำผงต้นสับปะรดบดทั้งสองส่วนไปสกัดในถังกวนของเครื่องสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรด (น้ำ 2 ส่วนต่อเนื้อต้นสับปะรด 1 ส่วน) บีบน้ำออกจากกาก วัดปริมาตรน้ำที่ได้ วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์และหาปริมาณโปรตีน

2.12 การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว

เตรียมตัวอย่างต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.3 ใช้ผงต้นสับปะรดบดในการทดลองครั้งละ 500 กรัม ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดดังนี้

2.12.1 การสกัดแยกด้วยน้ำกลั่น

สกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.4.1 แปรเปลี่ยนอัตราส่วนน้ำกลั่นต่อต้นสับปะรดที่เหมาะสม แล้วเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้

2.12.2 เวลาในการสกัดแยกเอนไซม์

สกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.4.1 โดยแปรเปลี่ยนเวลาสกัดแยกในช่วงระยะเวลา 1-60 นาที ใช้น้ำกลั่น 2 ส่วนต่อต้นสับปะรด 1 ส่วน

2.12.3 พีเอชที่ใช้สกัดแยกเอนไซม์

สกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.4.1 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซีเตท 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าพีเอชต่าง ๆ กันจาก 3.5 - 5.5 และสารละลายบัฟเฟอร์โปตัสเซียมฟอสเฟต 0.1 โมลาร์ พีเอชต่าง ๆ กันจาก 6.5 - 7.5 นาน 5 นาที เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้

2.12.4 สารละลายบัฟเฟอร์โปตัสเซียมฟอสเฟตและสารละลายโซเดียมคลอไรด์

สกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดตามวิธี 2.4.1 โดยใช้สารละลายบัฟ-เฟอร์โปแตสเซียมฟอสเฟต พีเอช 6.5 หรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.05 -

0.5 โมลาร์ นาน 5 นาที เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้

2.12.5 อุณหภูมิของการสกัดแยกเอนไซม์

สกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.4.1 ด้วยน้ำกลั่น แปรเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วง 10° - 60° ซ. นาน 5 นาที เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้

2.13 การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยวิธีสกัดแบบต่อเนื่องและสวนทาง

เตรียมตัวอย่างต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.3 โดยใช้ตัวอย่างต้นสับปะรด 3,000 กรัม แยกทำการสกัด 4 ครั้ง ๆ ละ 750 กรัม ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย 1,500 มิลลิลิตร แล้วศึกษาจำนวนขั้นตอนที่ใช้ในการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.4.2 เปรียบเทียบจำนวนขั้นตอนการสกัดแยกกับแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่สกัดได้

การสกัดแยกโบรมิเลนแบบต่อเนื่อง ทำตามวิธีข้อ 2.4.2 โดยสกัดแยกเอนไซม์จนครบแถวการสกัดที่ 1-6 (E_1 - E_6) เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนของสารละลายที่สกัดแยกได้จากต้นสับปะรด

2.14 การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยเครื่องตีปั่นแบบตั้งโต๊ะ

2.14.1 อัตราส่วนของน้ำที่ใช้ตีปั่นต้นสับปะรด

สกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดตามวิธี 2.4.3 โดยใช้ต้นสับปะรดครั้งละ 200 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วนน้ำกลั่น:ต้นสับปะรด 1:2-3:1 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนในน้ำต้นสับปะรดที่สกัดแยกได้ด้วยน้ำที่อัตราส่วนต่าง ๆ

2.14.2 เวลาตีปั่นต้นสับปะรด

สกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.4.3 โดยใช้ต้นสับปะรดครั้งละ 200 กรัม เติมน้ำกลั่น 400 มล. แล้วตีปั่นนาน 0.5 - 4 นาที เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์และหาปริมาณโปรตีนที่สกัดแยกได้จากต้นสับปะรด

2.15 การบีบต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบแบบไฮดรอลิค

บีบต้นสับปะรดตามวิธี 2.4.4 ใช้ต้นสับปะรดครั้งละ 300 กรัม โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ทดลองดังนี้

2.15.1 บดต้นสับปะรด แบ่งออกเป็นสี่ส่วน ๆ ละ 300 กรัม ส่วนที่ 1 บีบด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค ส่วนที่ 2 แช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 300 มล. นาน 2 ชม. แล้วบีบด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค ส่วนที่ 3 นำไปแช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20° ซ. 4 ชั่วโมง แล้วบีบด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค ส่วนที่ 4 แช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 300 มล. นาน 2 ชม. แล้วแช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20° ซ. 4 ชม. แล้วบีบด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค เปรียบเทียบแอคติวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ และหาปริมาณโปรตีนในน้ำต้นสับปะรดที่บีบได้จากทั้ง 4 ส่วนนี้

2.15.2 หั่นต้นสับปะรดเป็นแผ่น และทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธี 2.15.1

2.15.3 ตีปั่นต้นสับปะรด และทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธี 2.15.1

2.16 การบีบต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบแบบสกรู

ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในระดับขยายส่วน เตรียมต้นสับปะรดตามวิธี 2.3 โดยหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 1" x 1" แช่ใน 0.1% โซเดียมเบนโซเอท บรรจุลงในช่องป้อนวัตถุดิบอัตราการป้อนต้นสับปะรด 50 กก.ต่อชม. น้ำต้นสับปะรดที่ผ่านการบีบจะออกมาที่ส่วนล่างของเครื่อง เดินเครื่องย้อนกลับจะได้น้ำต้นสับปะรดที่ติดในเครื่องออกมาจนหมด วัดปริมาตรน้ำต้นสับปะรดที่บีบได้ เก็บส่วนกากไว้ เติม 0.1% โซเดียมเบนโซเอทผสมกับกากในอัตราส่วนน้ำหนักกาก : ปริมาตรเบนโซเอทเป็น 4:1, 3:1 และ 2:1 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนในน้ำต้นสับปะรดที่บีบด้วยเครื่องบีบแบบสกรูตามวิธีดังกล่าว

2.17 สารเคมีในการตกตะกอนเอนไซม์

2.17.1 การตกตะกอนด้วยอะซีโตนแบบขั้นตอนเดียว

เตรียมและสกัดแยกเอนไซม์จากตัวอย่างต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.3 และ 2.4.2 ตกตะกอนน้ำต้นสับปะรดตามวิธีทดลองข้อ 2.6 เติมอะซีโตนเย็น 4°ซ. ที่ความเข้มข้นต่างกัน ตั้งแต่ 29-75% ของปริมาตรทั้งหมดในน้ำต้นสับปะรดที่สกัดได้ 100 มิลลิลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.17.2 การตกตะกอนด้วยอะซีโตนแบบสองขั้นตอน

เตรียมและสกัดแยกโบรมิเลนจากตัวอย่างต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.3 และ 2.4.2 แล้วตกตะกอนโปรตีนในน้ำต้นสับปะรดตามวิธีทดลองข้อ 2.6 ใช้ปริมาตรน้ำต้นสับปะรด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมอะซีโตนเย็น 4° ซ. 41% ของปริมาตรทั้งหมด แยกส่วนใสแล้วนำมาตกตะกอนด้วยอะซีโตนเป็นครั้งที่สองด้วยปริมาตร 60%-80% ของปริมาตรทั้งหมด

2.17.3 การตกตะกอนด้วยกรดแทนนิค

เตรียมต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.3 บีบต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค แล้วตกตะกอนโปรตีนในน้ำต้นสับปะรดด้วยกรดแทนนิคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0.04%-0.8% โดยปริมาตรน้ำต้นสับปะรด ล้างตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตนผสมน้ำในอัตราส่วน 4:1 เพื่อกำจัดกรดแทนนิค

2.17.4 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เตรียมต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.3 บีบต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค แล้วตกตะกอนโปรตีนในน้ำต้นสับปะรดด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 30% - 90% อิ่มตัวโดยปริมาตรน้ำต้นสับปะรด แยกตะกอนเอนไซม์มาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์แล้วไดอะไลซ์ (dialyze) กับน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 4 ชั่วโมง แล้วแยกส่วนใสตกตะกอนด้วยอะซีโตนเป็นครั้งที่สอง 75% ของปริมาตรทั้งหมด แยกตะกอนมาทำแห้งภายใต้สูญญากาศ

เปรียบเทียบแอคติวิตีต่อกรัมเอนไซม์ แอคติวิตีทั้งหมด โปรตีนทั้งหมด % แอคติวิตี recovery % โปรตีน recovery และ % ผลผลิตของเอนไซม์จากผงเอนไซม์ที่ตกตะกอนได้

2.18 สภาวะในการตกตะกอนเอนไซม์

2.18.1 พีเอช

เตรียมต้นสับปะรดตามวิธี 2.3 และบีบต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบแบบไฮดรอลิค แยกส่วนใสมา 100 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชที่ค่าต่าง ๆ กันตั้งแต่ 2.5 - 6.5 ด้วยกรดอะซีติก 2 โมลาร์ ตกตะกอนด้วยกรดแทนนิคปริมาณ 0.3% (น้ำหนักโดยปริมาตร) ที่ 4° ซ. ล้างกรดแทนนิคออกจากตะกอนด้วยอะซีโตนผสมน้ำ 4 ต่อ 1 แล้วทำเอนไซม์ให้แห้ง

2.18.2 ตัวเร่งที่ใช้ก่อนตกตะกอนเอนไซม์

เตรียมต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.3 บีบต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบแบบไฮดรอลิค เติมกรด 2 โมลาร์อะซีติค แล้วปรับพีเอชเท่ากับ 4.0 เติมโซเดียมเมตาไบ-ซัลไฟท์ซิสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ โซเดียมเบนโซเอทและโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0.01-0.2 โมลาร์ เปรียบเทียบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวเร่งแต่ละชนิด

2.18.3 ตัวเร่งต่อความคงตัวของเอนไซม์ในน้ำต้นสับปะรด

เติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์หรือซิสเตอีนไฮโดรคลอไรด์หรือโซเดียมเบน-โซเอท หรือโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ ใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2.18.2 ในน้ำต้นสับปะรด และปรับพีเอชเท่ากับ 4.0 เก็บน้ำต้นสับปะรดดังกล่าวในห้องเย็นอุณหภูมิ 4^{o} ซ. นาน 0 - 15 วัน เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อเติมตัวเร่งเทียบกับน้ำต้นสับปะรดที่ไม่เติมตัวเร่งตามวันที่กำหนด

2.19 การทำให้เอนไซม์แห้ง

เตรียมเอนไซม์โบรมิเลนตามวิธีข้อ 2.3 - 2.6 โดยตกตะกอนด้วยกรดแทนนิคและทำให้แห้งด้วยวิธีการต่อไปนี้

2.19.1 อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 - 60^{o} ซ. นาน $1\frac{1}{2}$ - 4 ชม.

2.19.2 อบแห้งภายใต้สูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 - 60^{o} ซ. นาน $1\frac{1}{2}$ - $3\frac{1}{2}$ ชม.

2.19.3 อบแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -40^{o} ซ. ความดัน 0.2 ทอร์

เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้แห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ดังกล่าว

2.20 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโบรมิเลน

2.20.1 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยวิธี Anthron (46)

ชั่งผงเอนไซม์ 1.0 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมกรดเปอร์คลอริคเข้มข้น 50% ปริมาตร 13 มิลลิลิตร กวน 1 ชั่วโมงแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร ใน

I1029A223

ขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ดูดสารละลายนี้ 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ดูดสารละลายนี้ใส่ในหลอดทดลอง 2 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Anthrone 0.1% ในกรดซัลฟูริคเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด 20 นาที แล้วทำให้เย็น วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร สำหรับ blank ทำเช่นเดียวกับตัวอย่างแต่ไม่ใส่เอนไซม์

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกลูโคส ละลายกลูโคส 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ดูดสารละลายมาตรฐานใส่ในหลอดทดลองให้มีปริมาตร 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Anthrone เข้มข้น 0.1% ใน กรดซัลฟูริคปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าและต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 20 นาที แล้วทำให้เย็น วัดสีของสารละลายมาตรฐานกลูโคสด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

2.20.2 <u>การหาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Micro-Kjeldahl</u> (47)

ชั่งผงโบรมิเลน 0.5 กรัม ใส่ "missouri" catalyst (ประกอบด้วย $CuSO_4$ ต่อ K_2SO_4 เท่ากับ 5 ต่อ 95) ปริมาณ 7 กรัม เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร อุ่นเครื่องย่อย 10 นาที และใช้เวลาย่อยตัวอย่าง 40 นาที หรือจนกระทั่งสารละลายมีฟ้าใส ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 32% ปริมาตร 70 มิลลิลิตร แล้วกลั่นด้วยเครื่องกลั่น Buchi-distilation-system ประมาณ 4-5 นาที เก็บ distillate ประมาณ 200 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ 3 หยด แล้วไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริค 0.1 นอร์มอล

2.20.3 <u>เปอร์เซ็นต์ความชื้นและเปอร์เซ็นต์เถ้า</u> (47)

ชั่งผงโบรมิเลน 2 กรัม ในภาชนะหาความชื้นที่อบแห้งแล้ว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 110° ซ. นาน 3 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ 1 ชั่วโมง นำออกมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง และนำไปอบต่อจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

ชั่งผงโบรมิเลน 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องทนไฟที่เผาจนแห้งและชั่งน้ำหนักคงที่ เผาถ้วยกระเบื้องในตู้ควันด้วยตะเกียงบุนเสน เมื่อเกิดเถ้าที่มีลักษณะฟูสีขาวนำไปเผาต่อในเตาเผาอุณหภูมิ 650° ซ. นาน 3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 200°ซ. แล้วทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์เถ้า

2.20.4 % Insoluble solid

ชั่งโบรมิเลนให้ได้น้ำหนัก 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วเขย่าประมาณ 20 นาที เพื่อให้เอนไซม์ละลาย กรองสารละลายนี้แล้วแบ่งมาวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Klett Summerson ใช้ตัวอย่างโบรมิเลนเข้มข้น 0.2% เป็น blank เทียบค่าระหว่าง Klett unit และ % insoluble จากตารางของ Klett Summerson

2.20.5 การหาแบคทีเรียทั้งหมด (47)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในภาคผนวก 5 หลังจากอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว ที่ 121°ซ. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อให้หนาประมาณ 0.5 ซม. ทิ้งให้แข็งตัวและคว่ำจานเพาะเชื้อแล้วอบให้ไอน้ำระเหยจนหมด เตรียมตัวอย่างโบรมิเลนเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. และทำเจือจางให้เป็น 10^{-2} ถึง 10^{-6} เท่า ดูดสารละลายตัวอย่างดังกล่าวใส่ลงในจานเพาะเชื้อตัวอย่างละ 0.1 มล. แล้วเกลี่ยให้ทั่วบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 3 วัน ตรวจผลนับตัวอย่างจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนับโคโลนี คำนวณหาแบคทีเรียทั้งหมดเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมผงโบรมิเลน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย