Quick PROTOCOL

BIOTEC NSTDA

"ENZhance Complete" Kit for industrial enzyme detection and screening

"ENZhance Complete" Components

- 10x ENZhance Reagent (pH 4, 7, 10, filter-sterilized): 40 ml each
- Substrates for cellulase, xylanase, amylase, and protease
- Agar (5 g) (Supplied by users)

Note :
- For 10 assays of each enzyme pH
- Keep ENZhance Complete kit at room temperature and dried conditions

Preparation of 1x ENZhance overlay agar

(100 ml for 10 plate assays)

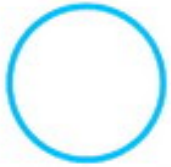
- Dissolve 0.7 g agar in 90 ml distilled water (optional: sterilized by autoclaving at 121 °C, 15 min with/ without substrate(s))
- Add 10 ml of 10x ENZhance Reagent and the target enzyme substrate(s)* when the agar mixture is cooled down to ≈50 °C.

Protocol for enzyme detection/ screening

1. Cultivate bacterial samples (pure isolates/ mixed culture) on appropriate agar medium under optimal growth conditions (e.g. at 37 °C for 18-48 hrs).
2. Overlay the bacterial culture with 1x ENZhance overlay agar containing the substrate(s) for the target enzyme(s) (≈10 ml).
3. Incubate the plate under enzyme wroking conditions. Enzyme activity can be detected after 15 min or up to 24 h depending on target enzyme activity level.
4. Detect the target enzyme activity by observing color zones or clear zones around bacterial colonies**.

Note :
- * Substrate concentration for enzyme detection
  - 0.05% chromogenic substrate for cellulase, xylanase or amylase
  - 2% substrate for protease
- ** Color zones indicate positive cellulase, xylanase or amylase activity. Clear zones indicate positive protease activity.

"ENZhance Complete" Kit for industrial enzyme detection and screening



Cultivate bacterial samples (pure isolates/ mixed culture) on appropriate agar medium under optimal growth conditions

10x ENZhance Reagent (pH 4, 7, 10)

Incubation (e.g. at 37 °C for 18-48 h)

Overlay the bacterial culture with 1x ENZhance overlay agar containing the substrate(s) for the target enzyme(s).

Incubate at enzyme working temperature 4 - 60 °C (15 min - 24 h)

• Detection of enzyme activity •

Color zones around bacterial colonies indicate positive cellulase, xylanase or amylase activity.

Clear zones around bacterial colonies indicate positive protease activity.

Note : *Dissolve 0.7% agar in distilled water (optional: sterilized by autoclaving) and add target enzyme substrate(s) and 10x ENZhance Reagent (1/10 by volume). Overlay when the mixture is cooled down to ≈50 °C. Substrates for other target enzymes of interest are applicable.

Enzyme Technology Laboratory, National Science and Technology Development Agency
113 Thailand Science Park, Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand.
Phone : (66)2-564-6700 # 3464 Fax : (66)2-564-6707 http://enzymelab.biotec.or.th

Quick PROTOCOL

BIOTEC สวทช NSTDA

"ชุดตรวจสอบเอนไซม์ ENZhance Complete" สำหรับตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย

ชุดตรวจสอบเอนไซม์ ENZhance Complete ประกอบด้วย

- 10x ENZhance Reagent (pH 4, 7, 10) : ขวดละ 40 มล.
- สารตั้งต้น (Substrate) สำหรับการตรวจสอบเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์ไซแลนเนส เอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์โปรตีเอส
- วุ้น (Agar) : ปริมาณ 5 กรัม (ไม่รวมอยู่ในชุดตรวจสอบเอนไซม์)

Note :
- ชุดตรวจสอบเอนไซม์นี้สำหรับการตรวจสอบเอนไซม์แต่ละชนิดจำนวน 10 ครั้ง
- ชุดตรวจสอบเอนไซม์นี้เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) โดยปราศจากความชื้น

การเตรียม 1x ENZhance overlay agar

(100 มล. สำหรับ 10 ปฏิกิริยาทดสอบ)

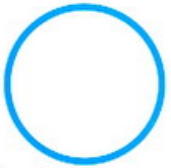
- ละลายผงวุ้น 0.7 กรัมในน้ำกลั่น 90 มล. (สามารถ sterilize ได้โดยการ autoclave ที่ 121 °C 15 นาที โดยอาจใส่สารตั้งต้นผสมหรือไม่ก็ได้)
- เติม 10x ENZhance Reagent 10 มล. และผสมสารตั้งต้นของเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบ* หลังจากที่สารละลายวุ้นอุ่น (≈50 °C)

วิธีการตรวจสอบเอนไซม์

1. เลี้ยงเชื้อบนอาหารที่เหมาะสม (ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เช่น 37 °C เป็นเวลา 18-48 ชั่วโมง)
2. เททับด้วย 1x ENZhance overlay agar ที่ผสมกับสารตั้งต้น (≈10 มล.)
3. บ่มปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ต้องการเป็นเวลา 15 นาที - 24 ชั่วโมง (ขึ้นกับระดับความสามารถและปริมาณของเอนไซม์)
4. ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้น โดยสังเกตจากวงใสหรือวงสีที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี**

Note :
- * ปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้สำหรับการตรวจสอบเอนไซม์
  - เอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์ไซแลนเนส หรือเอนไซม์อะไมเลส ใช้ในปริมาณ 0.05%
  - เอนไซม์โปรตีเอสใช้ในปริมาณ 2 %
- ** ผลการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ที่เกิดขึ้น
  - เอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์ไซแลนเนส หรือเอนไซม์อะไมเลส สังเกตได้จากวงสีที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี
  - เอนไซม์โปรตีเอส สังเกตได้จากวงใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆโคโลนี

"ชุดตรวจสอบเอนไซม์ ENZhance Complete" สำหรับตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย



เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบน
อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

10x ENZhance Reagent
(pH 4, 7, 10)

บ่มที่สภาวะที่เหมาะสม
(เช่น 37 °C 18-48 ชั่วโมง)

เททับด้วย 0.7% agar ที่ผสมกับสารตั้งต้นและ 10x ENZhance Reagent (pH 4,7,10) (ปริมาตร 1/10)*

บ่มที่อุณหภูมิที่ต้องการตวรจสอบ
(4-60 °C, 15 นาที - 24 ชั่วโมง)

• ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้น •

วงสีที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีแสดงถึง
กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์
ไซแลนเนส หรือเอนไซม์อะไมเลส

วงใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี
แสดงถึงกิจกรรม
ของเอนไซม์โปรตีเอส

Note :
- * ผสม 0.7% agar (อาจทำให้ปลอดเชื้อโดยการ autoclave) กับ 10x ENZhance Reagent (pH 4, 7, 10) (ปริมาตร 1/10) และสารตั้งต้น (สามารถเปลี่ยนไปใช้สารตั้งต้นอื่นเพื่อตรวจสอบเอนไซม์ชนิดอื่นได้) จากนั้นเททับอาหารเลี้ยงเชื้อในขณะที่ยังอุ่น (≈50 °C)

Enzyme Technology Laboratory, National Science and Technology Development Agency
113 Thailand Science Park, Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand.
Phone : (66)2-564-6700 # 3464 Fax : (66)2-564-6707 http://enzymelab.biotec.or.th