การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตนิวทรัลโปรติเอสทนร้อนจาก *Bacillus cereus* และลักษณะสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วน

นางสาวอภิรดี อุดมสิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3732-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMIZATION FOR THE PRODUCTION OF THERMORESISTANT NEUTRAL PROTEASE FROM *Bacillus cereus* AND CHARACTERIZATION OF PARTIALLY PURIFIED ENZYME

Miss Apiradee Udomsin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-3732-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตนิวทรัลโปรติเอสทนร้อนจาก *Bacillus cereus* และลักษณะสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วน
โดย	นางสาวอภิรดี อุดมสิน
สาขาวิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิรดี อุดมสิน: การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตนิวทรัลโปรติเอสทนร้อนจาก *Bacillus cereus* และลักษณะสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วน (OPTIMIZATION FOR THE PRODUCTION OF THERMORESISTANT NEUTRAL PROTEASE FROM *Bacillus cereus* AND CHARACTERIZATION OF PARTIALLY PURIFIED ENZYME)
อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์
127 หน้า. ISBN 974-17-3732-7

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสทนร้อนที่แยกได้จากดินบริเวณบ่อน้ำร้อนในประเทศไทย แบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกชนิดนี้ถูกจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมี และยืนยันผลด้วยวิธี 16S rRNA gene จากการทดลองพบว่าภาวะที่ดีที่สุด คือ การใช้ Raja's medium ซึ่งมีสูตรอาหารดังนี้ $CaCl_2.2H_2O$ 0.1 กรัม, K_2HPO_4 0.06 กรัม, $MgSO_4 .7H_2O$ 0.05 กรัม, NaCl 0.045 กรัม และ Peptone 0.5 กรัม% (w/v) ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C, pH 7.0, ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 0.5% (v/v) ซึ่งมีส่วนประกอบในอาหาร คือ 0 กรัม% glucose (w/v), 0.5 กรัม% peptone (w/v) ภายใต้การเลี้ยงในขวดเขย่าขนาด 1 ลิตรซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที และภาวะที่ดีที่สุดในการหาแอคติวิตีของโปรติเอส โดยใช้ azocasein คือที่อุณหภูมิ 55 ^{o}C, pH 7.0 ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ ซึ่งมีค่าแอคติวิตีสูงที่สุดเท่ากับ 5.69 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเซฟาเดกซ์ จี-75 คอลัมน์โครมาโตรกราฟี พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 34,700 ดาลตัน ส่วนการหาหน่วยย่อยของเอนไซม์ด้วยวิธี Substrate – Containing SDS Zymogram gel พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 44,700 ดาลตัน แคลเซียมอิออนสามารถเร่งการทำงานของ crude enzyme ได้และสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คือ EDTA นิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *B. cereus* สามารถย่อยสับสเตรททั้ง casein หรือ azocasein ได้ดีกว่านิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *B.subtilis* TISTR 25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....-.....

4372477023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: *Bacillus cereus* / PROTEASE / OPTIMIZATION / SCREENING/ PURIFICATION

APIRADEE UDOMSIN: OPTIMIZATION FOR THE PRODUCTION OF THERMORESISTANT NEUTRAL PROTEASE FROM *Bacillus cereus* AND CHARACTERIZATION OF PARTIALLY PURIFIED ENZYME. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. NAPA SIWARUNGSON. 127 pp. ISBN 974-17-3732-7

Bacillus cereus was isolated as a mesophilic bacteria which produced thermoresistant protease among 63 soil samples. The isolated bacteria was selected and identified by using biochemical characterization. And the test was confirmed with 16S rRNA gene. It was found that the best conditions were used Raja's medium ($CaCl_2.2H_2O$ 0.1 g, K_2HPO_4 0.06 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 g, NaCl 0.045 g, peptone 0.5 g% (w/v)) at 37^0C, pH 7.0, 0.5% (v/v) initial inoculum size, 0% (w/v) glucose in shaking flask culture 1,000 ml and were shaked with the speed of 200 rpm. The protease was exhibited maximum activity towards azocasein at 55^0C, pH 7.0 and the enzyme production was reached its maximum level of 5.69 U/mg protein after 48 hours. The protease had an apparent molecular weight of 34,700 Dalton by Sephadex G - 75 gel - filtration chromatography. And the protease had molecular weight of 44,700 Dalton by Substrate-Containing SDS Zymogram gel. The activity, crude enzyme, was considerably increased by addition of Ca^{2+}. Enzyme activity was inhibited by EDTA. The data clearly indicated that protease from *Bacillus cereus* was likely neutral protease. Neutral protease from *B.cereus* that could hydrolyse substrate , casein or azocasein, better than the protease from *B.subtilis* TISTR25.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study Programme of Biotechnology Student's signature.....

Academic year 2003 Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ ที่ได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำ และ ข้อคิดเห็นต่างๆ และความช่วยเหลือทุกด้านตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ ที่ได้กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิราภรณ์ ธนียวัน ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ใช้ในการวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บรักษาเชื้อแบบแห้ง

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีทางชีวเคมี

ขอขอบคุณนิสิตหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต ในภาควิชาชีวเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจ

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และขอขอบคุณ ญาติพี่น้อง ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจแก่ผู้เขียนจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญรูป..... ฎ
คำย่อ..... ณ

บทที่

1. บทนำ..... 1
ชนิดและสมบัติของเอนไซม์โปรติเอส 5
การผลิตโปรติเอสและความสำคัญของเอนไซม์ต่อเซลล์ 10
ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์..... 12
การทำให้โปรติเอสมีความบริสุทธิ์บางส่วนและศึกษาสมบัติของเอนไซม์ 15
วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 17
2 ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์
ครุภัณฑ์..... 18
เคมีภัณฑ์.....19
แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....20
3 วิธีดำเนินงานวิจัย
การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรติเอสจากตัวอย่างดิน.....21
การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้วิธี Azocasein hydrolysis.....22
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของโปรติเอส.....22
การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือก.....23
การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรีย..... 29
การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรีย.....29
การศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม..... 29

หน้า

การศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสม.....29
การศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสม.....29
การศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตนที่เหมาะสม.....30
การศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสม.....30
การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ.....30
ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน.....31
การศึกษาสมบัติของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน.....32
การศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี จลนศาสตร์ของโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน 36
การศึกษาอุณหภูมิการเก็บรักษาเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ.....38
4 ผลการทดลอง
การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรติเอสทนร้อนจากตัวอย่างดินในประเทศไทย....39
ผลการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์โดยวิธี Azocasein hydrolysis.....40
ผลการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย.....49
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอส
- ผลการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด.....56
- ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ 58
- ผลการหาค่า pH ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์.....60
- ผลของการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม.....62
- ผลการหาความเร็วรอบที่เหมาะสม.....64
- ผลการความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสม.....66
- ผลการหาความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตนที่เหมาะสม.....68
- ผลการหาความเข้มข้นของแคลเซียมที่เหมาะสม 70
-ผลของระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ.....72
การเตรียมเอนไซม์โปรติเอสและทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 74
ผลการศึกษาสมบัติของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน.....76
ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี จลนพลศาสตร์ ของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน.....84
5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง.....100

หน้า

รายการอ้างอิง 110
ภาคผนวก 115
กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford..... 121
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไทโรซีน 126
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 127

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่		หน้า
1	การใช้ประโยชน์ของโปรติเอสในทางอุตสาหกรรม	2
2	แหล่งที่มาของโปรติเอส	4
3	การจำแนกชนิดของโปรติเอส	6
4	แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทยมีทั้งหมด 12 สายพันธุ์	43
5	ขนาดวงใสของแบคทีเรียจากการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสครั้งที่ 1	44
6	ขนาดวงใสของแบคทีเรียจากการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสครั้งที่ 2	45
7	ขนาดวงใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดสอบโปรติเอสที่บ่มไว้ในช่วงอุณหภูมิ 37 °C – 100 °C	46
8	ขนาดวงใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดสอบโปรติเอสที่บ่มไว้ในช่วง pH 7.0 - 12.0	47
9	สรุปผลการทำให้เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์	75
10	สรุปค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสจาก *B.cereus* และ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อใช้ casein หรือ azocasein เป็นสับสเตรท	93
11	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอส (Efficiency) ที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus* และ *B. subtllis* TISTR25	93
12	ผลของไอออนของโลหะต่อแอคติวิตีของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus*	98

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ หน้า

1 การเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนโดยโปรติเอส 1
2 แผนภูมิวงกลมแสดงส่วนแบ่งทางการตลาดของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆที่ใช้ในอุตสาหกรรม.....3
3 ระยะต่างๆในการเจริญของสปอร์ 11
4 ลำดับกรดนิวคลีอิกที่จำเพาะของ Primers แต่ละชนิดใน 16 S RNA gene โดยทิศทางการเพิ่มจำนวนลำดับเบสจะเป็นไปตามทิศทางของลูกศร.....27
5 โคโลนีที่เกิดจากการ spread บน nutrient agar plate 42
6 การเกิดวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar plate.....42
7 การเกิดวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar plate จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสครั้งที่ 2..... 42
8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55°C โดยการหาแอคติวิตีจำเพาะในช่วงอุณหภูมิ 37°C-100°C 48
9 ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ pH 7.0 โดยการหาแอคติวิตีจำเพาะในช่วง pH 7.0-12.0 (Phosphate buffer 0.1 M pH 6.0-7.0, Tris-HCl 0.1 M pH 7.0-10.0 และ M Glycine-NaOH 0.1 pH 10.0-12.0) 48
10 การย้อมสีแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 โดยกล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) ที่มีกำลังขยาย 100 เท่า..... ...49
11 ภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Electron microscope) ที่มีกำลังขยาย 7,500 เท่า 50
12 ภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Electron microscope) ที่มีกำลังขยาย 15,000 เท่า..... 50
13 ภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Electron microscope) ที่มีกำลังขยาย 20,000 เท่า 50
14 แสดงการเกิด Hemolysis ใน Blood agar 51
15 แสดงภาพการทดสอบ Lecithinase test ของแบคทีเรียชนิดที่ 6 ซึ่งเกิด zone ขุ่นรอบๆโคโลนีของเชื้อ 52
16 แสดงทิศทางการเพิ่มจำนวนลำดับเบสของลำดับกรดนิวคลีอิกที่จำเพาะของ Primer แต่ละชนิดใน 16S rRNA gene 54

รูปที่		หน้า
17	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6	55
18	อัตราการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง Nutrient broth และ Raja's medium	57
19	การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด คือ Raja's medium และ Nutrient broth	57
20	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ Raja's medium และ Nutrient broth	58
21	อัตราการเจริญของเชื้อ *B.cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่อุณหภูมิ 37°C, 45 °C และ 50 °C	59
22	การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium และ ที่อุณหภูมิ 37°C, 45 °C และ 50 °C	59
23	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่อุณหภูมิ 37°C, 45 °C และ 50 °C	60
24	อัตราการเจริญของเชื้อ *B.cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ pH 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0	61
25	การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ pH 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0	61
26	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่pH 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0	62
27	อัตราการเจริญของเชื้อ *B.cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5%, 1.0%, 1.5%.2.0% (v/v)	63
28	การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5%, 1.0%, 1.5%.2.0% (v/v)	63
29	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5%, 1.0%, 1.5%.2.0% (v/v)	64
30	อัตราการเจริญของเชื้อ *B.cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ความเร็วรอบ 200, 250 และ 300รอบต่อนาที	65
31	การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ความเร็วรอบ 200, 250 และ 300รอบต่อนาที	65

รูปที่		หน้า
32	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ความเร็วรอบ 200, 250 และ 300รอบต่อนาที	66
33	อัตราการเจริญของเชื้อ *B.cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0, 0.25, 0.50 และ 0.75 กรัม% (w/v)	67
34	การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0, 0.25, 0.50 และ 0.75 กรัม% (w/v)	67
35	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0, 0.25, 0.50 และ 0.75 กรัม% (w/v)	68
36	อัตราการเจริญของเชื้อ *B.cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตน 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัม% (w/v)	69
37	การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตน 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัม% (w/v)	69
38	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium medium ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตน 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัม% (w/v)	70
39	อัตราการเจริญของเชื้อ *B.cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน 0, 0.05, 0.10, 0.15 กรัม% (w/v)	71
40	การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน 0, 0.05, 0.10, 0.15 กรัม% (w/v)	71
41	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน 0, 0.05, 0.10, 0.15 กรัม% (w/v)	72
42	อัตราการเจริญของเชื้อ *B.cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง	73
43	การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง	73
45	ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง	74
46	รูปแบบการแยกโปรตีนในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี- 75	76

รูปที่		หน้า
47	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Kav และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสโดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี- 75 (ขนาด 83.5x 1.15 ซม.	77
48	การแยกโปรตีนของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนจากนิวทรัลโปรติเอสที่ได้จาก *B.cereus* จากคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 แยกโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส	79
49	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Relative mobility และ log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสจาก *B.cereus* (จุด A-D) แทนแถบโปรตีนที่1 - 4 โดยวิธีเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส	80
50	รูปแบบของโปรตีนของนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus* แยกโดยเอสดีเอส - พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส pH 7.0	81
51	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Relative mobility และ log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสจาก *B.cereus* โดยวิธี Substrate-Containing SDS Zymogram gel	82
52	รูปแบบมาตรฐานและนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus* แยกโดยวิธี Substrate-Containing SDS Zymogram gel	83
53	ผลของอุณหภูมิต่อค่าแอคติวิตีจำเพาะของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus*	85
54	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus*	85
55	pH ที่เหมาะสมในการทำงานของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus*	87
56	pH ต่อความเสถียรของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus* เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55°C ใน 0.1 M Phosphate pH 6.0 , 0.1 M Tris-HCl pH 7.0 และ 0.1 M Glycine-NaOH pH 10.0	87
57	Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus* เมื่อใช้ casein เป็นสับสเตรท วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55°C, pH 7.0	89
58	Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus* เมื่อใช้ azocasein เป็นสับสเตรท วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55°C, pH 7.0	90

รูปที่ หน้า

59 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.subtilis* TISTR25 เมื่อใช้ casein เป็นสับสเตรท วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55 °C, pH 7.0.....91

60 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.subtilis* TISTR25 เมื่อใช้ azocasein เป็นสับสเตรท วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55 °C, pH 7.0.....92

61 ผลของแคลเซียมอิออนต่อการทำงานของ crude enzyme และ นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus* ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนคือ 10,20,30, 40 และ 50 mM 95

62 ผลของแคลเซียมอิออนต่อการทำงานของ crude enzyme และ นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. subtilis* TISTR25 ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนคือ 10,20,30, 40 และ 50 mM.....95

63 ผลการยับยั้งการทำงานของ crude enzyme และนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus* ที่ความเข้มข้นของ EDTA คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 mM.....97

64 ผลการยับยั้งการทำงานของ crude enzyme และ นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. subtilis* TISTR25 ที่ความเข้มข้นของ EDTA คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 mM.....97

65 การเก็บรักษาสารละลายเอนไซม์ที่เติม glycerol 10% ที่ภาวะต่างๆ คือที่อุณหภูมิ –20°C, 0 °C, 4 °C และอุณหภูมิห้อง เอนไซม์ผง และสารละลายเอนไซม์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลา 1 เดือน นำมาวัดแอคติวิตีจำเพาะที่เหลืออยู่ทุกๆ 7 วัน.....99

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

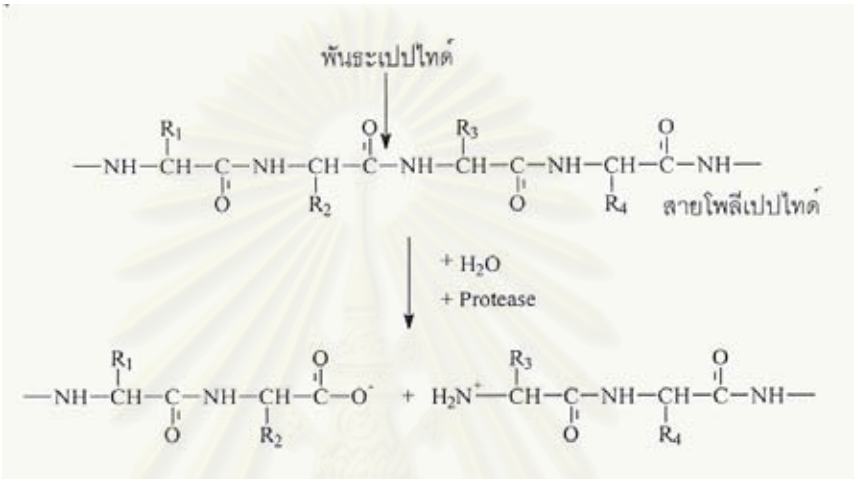
^{o}C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
μg	=	ไมโครกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
rpm	=	รอบต่อนาที
v/v	=	ปริมาตรต่อปริมาตร
w/v	=	น้ำหนักต่อปริมาตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
M	=	โมลาร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

โปรติเอส (Protease) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ของโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโน (Ward, 1983) โปรติเอสมีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เปปติเดส โปรตีเนส และ เอนไซม์โปรติโอไลติค เป็นต้น ซึ่งมีสมการแสดงปฏิกิริยาดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 การเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนโดยโปรติเอส

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์มากเป็นอันดับ 1 ใน 3 ของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมทั้งหมด โดยโปรติเอสามารถนำไปใช้ได้มากมาย เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง อาหาร เครื่องดื่ม เบียร์ ยา และอุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอก เป็นต้น แสดงดังตารางที่ 1.1

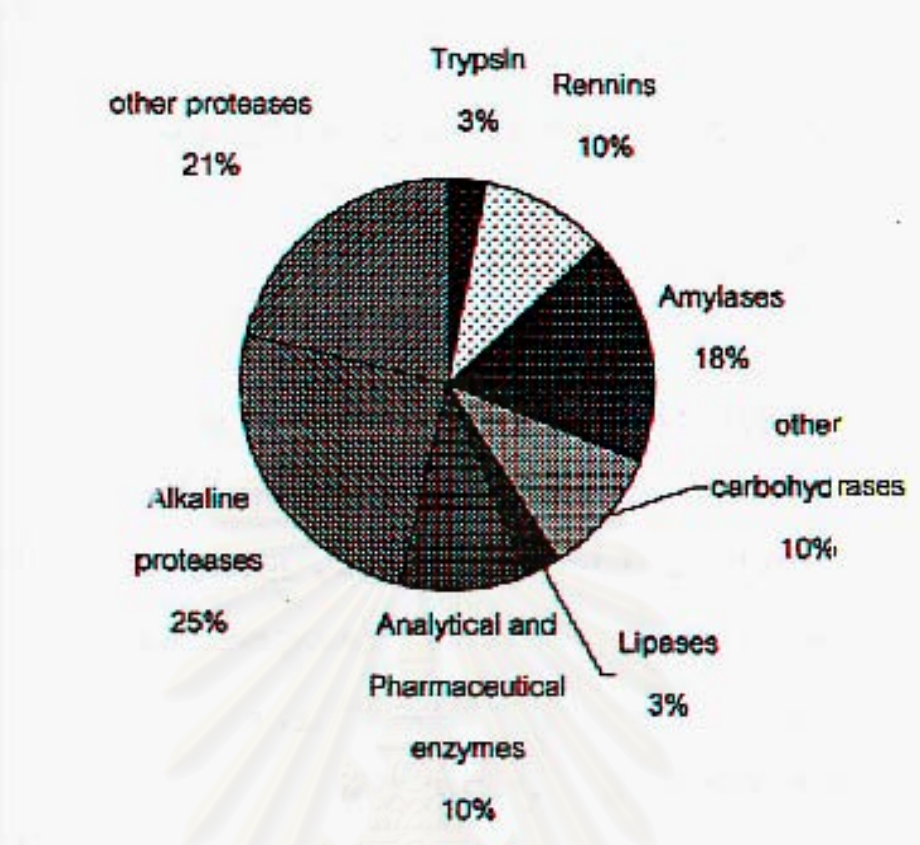
โปรติเอส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารจำพวกโปรตีน แหล่งที่มาของโปรติเอส พบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลชีพ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันทางด้านความจำเพาะต่อสับสเตรท บริเวณเร่ง กลไกในการเร่งปฏิกิริยา ช่วงความเป็นกรด-ด่างและ อุณหภูมิในการทำงาน เสถียรภาพของเอนไซม์ ในทางการค้าพบว่ากลุ่มเอนไซม์โปรติเอสมีส่วนแบ่งการตลาดถึง 60% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น (Ward, 1983) แสดงดังรูปที่ 1.2 แหล่งของโปรติเอสที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ โปรติเอสจากจุลชีพ ซึ่งจุลชีพที่มีการใช้ในทางอุตสาหกรรมมากเป็นอันดับหนึ่ง ได้แก่ โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* และ alkalophilic *Bacillus* ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารซักฟอก เอนไซม์จากจุลชีพมีปริมาณการใช้รองลงมา ได้แก่ โปรติเอสจากรา *Mucor* spp. และ *Aspergillus oryzae* ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร (Ward, 1983; Aunstrup, 1980)

ตารางที่ 1.1 การใช้ประโยชน์ของโปรติเอสในทางอุตสาหกรรม

ประเภทของอุตสาหกรรม	ขบวนการที่ใช้	แหล่งของเอนไซม์
1. baking and Milling	bread baking	fungal
2. brewing	chillproofing	papain, bromelain, pepsin, fungal, bacteria
3. cereals	condiments	papain, bromelain, pepsin, fungal, bacteria
4. dairy	milk prevention of oxided flavor milk protein hydrolysate evaporate milk, stabilization	pancreatin. papain, bromelain, pancreatin, bacteria, fungal pancreatin, pepsin, bromelain, fungal
5. animal feeds	pig starter ration poultry ration, cattle ration	pepsin, pancreatin, bacteria,fungal bacterial, fungal
6. meat, fish	meat tenderizing, tenderizing casings, condensed fish soluble	papain, bromelain, fungal, bacteria
7. pharmaceutical and clinical	digestive aids	papain, bromelain, fungal, bacteria
8. leather	bating unhairing	bacteria, pancreatin, fungal bacteria, fungal, papain
9. laundry	spot removal	bacteria, pancreatin, fungal
10.photographic	recovery of silver from spent film	bacteria
11. textile	desizing fibrics	bacteria, fungal, pancreatin

ที่มา : Miller และ Litsky (1976)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.2 ส่วนแบ่งทางการตลาดของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Mala และคณะ, 1998)

การนำโปรติเอสมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มีการใช้งานและแหล่งที่มาของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1.2) โดยโปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ถูกค้นพบเป็นชนิดที่สองของโลก หลังจากการพบ amylase ในปี ค.ศ. 1814 Wurt ค้นพบโปรติเอสชนิดแรก คือ ปาเปนในยางมะละกอ ในปี ค.ศ. 1905 Rohm ได้นำ pancreatic protease มาใช้ในการฟอกหนังและกำจัดขนที่ติดอยู่กับหนัง และได้เริ่มนำมาใช้เป็นสารซักล้าง (detergent) เป็นครั้งแรก เมื่อปี ค.ศ. 1973 และในปี ค.ศ. 1971 คณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ได้ให้คำประกาศรับรองเอนไซม์นี้สามารถใช้ร่วมกับสารซักล้างโดยไม่มีอันตราย นอกจากนี้ในธรรมชาติโปรติเอส ยังมีหน้าที่อีกมากมาย เช่น การสร้างสปอร์ การงอกของสปอร์ การประกอบเป็นอนุภาคของไวรัส กระตุ้นไวรัสทำให้สิ่งมีชีวิตอื่นมีอาการของโรค การจับตัวของเลือด ควบคุมความดันเลือด การแสดงออกของยีน กระตุ้นการเปลี่ยนโปรตีนให้อยู่ในรูปที่พร้อมจะทำงาน และช่วยให้สารที่เซลล์สร้างขึ้นหลั่งออกนอกเซลล์ได้ จะเห็นได้ว่า โปรติเอสมีการนำไปใช้อย่างมากมาย แต่ที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์มักเป็นแหล่งเอนไซม์ที่ได้จาก จุลชีพ เพราะเลี้ยงง่าย และเติบโตได้รวดเร็ว

ตารางที่ 1.2 แหล่งที่มาของโปรติเอส (Mala และคณะ, 1998)

แหล่งที่มา	ชนิดของเอนไซม์	คุณสมบัติ
1. พืช	papain จากมะละกอ	มีช่วงการทำงานระหว่าง pH 5.0-9.0 สามารถคงสภาพได้ถึงอุณหภูมิ 80 °C หรือ 90 °C
	bromelain จากสับปะรด	มีช่วงการทำงานระหว่าง pH 5.0-9.0 อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 70 °C เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์
	keratinases พบได้ในพืชบางชนิด	ทำหน้าที่ย่อยผมหรือขนและสามารถป้องกันการอุดตันของระบบท่อน้ำทิ้งได้
2. สัตว์	trypsin (MW = 23,300)	เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยอาหารบริเวณลำไส้เล็ก โดยจะย่อยพันธะบริเวณ carboxyl groups โดยมีกรดอะมิโนบริเวณเร่งคือ lysine และ arginine
	chymotrypsin (MW=23,800)	เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์บริเวณหมู่คาร์บอกซิล มักใช้ผสมในอาหารที่มีส่วนประกอบของนมสำหรับผู้ที่มีอาการแพ้โปรตีนจากน้ำนมและเป็นเอนไซม์ที่มีราคาค่อนข้างสูง
	pepsin (MW =34,500)	เป็นพวก acidic protease มักพบในกระเพาะของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่
	rennin (MW =30,700)	มักใช้ในอุตสาหกรรมนม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แหล่งที่มา	ชนิดของเอนไซม์	คุณสมบัติ
3. จุลชีพ	แบคทีเรีย	ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมมักพบเป็น neutral และ alkaline โดยจุลชีพเป็นสายพันธุ์บาซิลัส
	รา	มีการใช้แพร่หลายมากกว่าแบคทีเรีย เช่น *Aspergillus* ผลิตทั้ง acid, neutral และ alkaline protease
	Viruses	protease จาก virus มีความสำคัญต่อหน้าที่และกระบวนการทำงานของโปรตีนในไวรัสซึ่งมักเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค เอดส์ และมะเร็ง

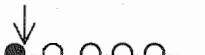
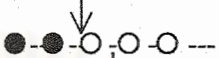
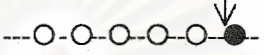
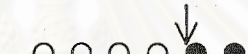
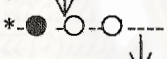
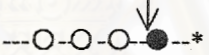
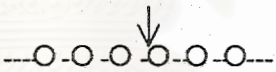
ปัจจุบันได้มีการใช้โปรติเอสในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมทั้งมีการนำโปรติเอสไปใช้ทางการแพทย์ เช่น ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง มาลาเรีย และเอดส์ ได้มีการนำโปรติเอสที่ผ่านการตัดต่อยีน โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณ และคุณภาพของเอนไซม์ (Branislav และคณะ, 2000) ทำให้สามารถนำไปใช้งานที่หลากหลายมากขึ้น

ชนิดและสมบัติของเอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน แบ่งได้ 2 กลุ่ม ตามตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลส์คือ เอกโซเปปติเดส (exopeptidase) จะย่อยพันธะเปปไทด์จากด้านนอกเข้ามาและเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) จะย่อยภายในสายพอลิเปปไทด์ เอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส โดยโปรติเอสที่ผลิตได้สามารถแบ่งออกได้แสดงดังตารางที่ 1.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.3 การจำแนกชนิดของโปรติเอส (Mala และคณะ, 1998)

ชนิดของโปรติเอส	บริเวณที่จำเพาะ	EC
Exopeptidase		
Aminopeptidase		3.4.11
dipeptidyl peptidase		3.4.14
tripeptidyl peptidase		3.4.14
Carboxypeptidase		3.4.16-3.4.18
serine type protease		3.4.16
metalloprotease		3.4.17
cysteine type protease		3.4.18
peptidyl dipeptidase		3.4.15
dipeptidase		3.4.13
Omega peptidase		3.4.19
		3.4.19
Endopeptidase		3.4.21-3.4.34
serine protease		3.4.21
cysteine protease		3.4.22
aspartic protease		3.4.23
metalloprotease		3.4.24
endopeptidases of unknown catalytic mechanism		3.4.99

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โปรติเอสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส จัดเป็น 4 กลุ่ม (Mala และคณะ, 1998)

1. ซีรีนโปรติเอส (serine protease) EC.3.4.21.14

เอนไซม์ชนิดนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า alkaline protease เนื่องจากมีหมู่กรดอะมิโนเซรีนอยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย 3,4 –dichloroisocoumarin, (3,4-DCI), L-3-carboxytrans 2,3-epoxypropyl-leucylamido (4-guanidine) butane (E.64), diisopropylfluoro-phosphate (DFP), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ tosyl-L-lysine chloromethyl-ketone (TLCK) โดยการจับกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนเซรีนที่อยู่บริเวณเร่ง ส่วน EDTA ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้ได้ (Hideto และคณะ, 1989) ช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาอยู่ระหว่าง pH 7.0 - 11.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 60-70 องศาเซลเซียส (Outtrup และ Boyce, 1990) แคลเซียมไอออนทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น (Helen และคณะ, 2000) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 18,000 – 35,000 ดาลตัน (Mala และคณะ, 1998)

แอลคาไลน์โปรติเอสผลิตได้ทั้งในเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะในแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus spp.* เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* และ alkalophilic *Bacillus* ซึ่งเอนไซม์จะถูกสร้างและถูกปล่อยออกเป็นอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Extracellular enzyme) และอาจสร้างไปพร้อมๆกับนิวทรัลโปรติเอส หรือ อาจจะมีการสร้างนิวทรัลโปรติเอสก่อนการสร้างแอลคาไลน์โปรติเอสก็ได้ (Halpern , 1981) เซรีนโปรติเอสสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ serine alkaline protease และ subtilisins

1.1 serine alkaline protease สามารถผลิตได้จาก แบคทีเรีย ยีสต์ และรา เป็นต้น สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คือ DFP และ potato protease inhibitor แต่ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย tosyl-L- phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) หรือ TLCK สำหรับ pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของ alkaline protease คือ pH 9.0 และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15,000 - 30,000 ดาลตัน โดยแบคทีเรียที่ผลิต alkaline serine protease เช่น *Arthrobacter, Streptomyces* และ *Flavobacterium spp.* เป็นต้น

1.2 Subtilisins เอนไซม์นี้มักพบการสร้างในแบคทีเรียสกุลบาซิลัส เราสามารถแบ่ง Subtilisins ออกได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 Subtilisin Carlsberg พบครั้งแรกโดย Linderstrom และ Ottesen ในปีค.ศ. 1947 ที่ห้องปฏิบัติการเมือง Carlsberg (Aunstrup, 1979) ผลิตได้จาก *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus pumilus* เอนไซม์นี้มีลักษณะเป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวประกอบด้วยกรดอะมิโน 274 ตัว เนื่องจากไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนหรือซิสทีน ดังนั้น

จึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ โครงสร้างตติยภูมิเป็นรูปทรงกลม (spherical) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 นาโนเมตร บริเวณเร่งประกอบด้วย เซรีนตำแหน่งที่ 221 ฮีสติดีนตำแหน่งที่ 64 และแอสพาเตทตำแหน่งที่ 32 มีความจำเพาะต่อสับสเตรต กว้าง (broad specificity) จะไฮโดรไลส์โปรตีนพันธะเปปไทด์เป็นส่วนใหญ่และเอสเทอร์บางส่วน ในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โปรตีนไม่จำเป็นต้องมีตัวกระตุ้น (Activators) รวมทั้งไม่ต้องมีแคลเซียมอิออนในการช่วยให้เอนไซม์เสถียรเหมือนกับแอลคาไลน์โปรติเอสชนิดอื่นๆ เอนไซม์มีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อยู่ระหว่าง pH 8.0 - 9.0 เอนไซม์มีความเสถียรในช่วง pH 5.0 - 11.0 แต่ที่ pH ต่ำกว่า 5.0 หรือ สูงกว่า 11.0 แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงซึ่งคาดว่าเอนไซม์จะเกิดการย่อยตัวเอง (Autodigestion)โดยโมเลกุลจะคลายรูป (unfold) (Ward, 1983) และเอนไซม์ยังคงมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส

กลุ่มที่ 2 Subtilisin BPN' (Bacterial Protease Nagarase) หรือ Subtilisin NOVO ซึ่งผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 ตัว การเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายกับ Subtilisin Carlsberg ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ (Pero และ Sloma, 1993) โดยมีกรดอะมิโนเพียง 58 ตัวเท่านั้นที่แตกต่างกัน ในโมเลกุลไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีน ดังนั้นจึงไม่มีพันธะได-ซัลไฟด์ บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยเซรีนตำแหน่งที่ 221 ฮิสติดีนตำแหน่งที่ 64 และแอสพาเตทตำแหน่งที่ 32 (Outtrup และ Boyce, 1990) มีอะลานีนอยู่ปลายทางด้านอะมิโนและกลูตามีนอยู่ปลายทางด้านคาร์บอกซิล แคลเซียมไอออนช่วยทำให้เอนไซม์เสถียรมากขึ้นโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูงหรือที่ pH สูงหรือต่ำมากๆ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์และเอสเทอร์แตกต่างจาก Subtilisin Carlsberg (Ward, 1983)

2. แอสพาติกโปรติเอส (Aspartic protease) EC 3.4.23

เอนไซม์ชนิดนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า แอซิดิกโปรติเอส (acidic protease) เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนแอสพาติกอยู่บริเวณเร่ง พบมากในเซลล์สัตว์ รา เช่น *Aspergillus oryzae, Penicillium*, *Rhizopus* และยีสต์เป็นต้น ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ pH 3.0 - 4.0 สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คือ pepstatin, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ DFP เอนไซม์ชนิดนี้ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามลักษณะโครงสร้าง (Matsubara และ Feder, 1971) ได้ดังนี้

2.1 rennin-like acid protease จุลชีพที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตโปรติเอสในเชิงการค้า ได้แก่ *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* และ *Endothia paraditica* นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทำเนยแข็ง

2.2 pepsin-like acid protease นำไปใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของแป้งที่ใช้ในการทำขนมปัง และ ใช้ย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองในอุตสาหกรรมทำซีอิ๊ว (soy sauce) *Aspergillus oryzae* เป็น
จุลชีพที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรม เอนไซม์ชนิดนี้เป็น endoprotease มีช่วงการทำงานที่เหมาะสม มีค่า pH 4 - 4.5

3. ซิสเตอีนโปรติเอส (cysteine protease) EC 3.4.22

เอนไซม์ชนิดนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ไทออลโปรติเอส (thiol protease) เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนซีสเตอีนอยู่บริเวณเร่งโดยซิสเตอีนและไฮโดรเจนไซยาไนด์สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ สารออกซิไดส์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pH ที่เหมาะสมคือ pH ที่เป็นกลาง เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ ปาเปน ไฟซิน และโปรมีเลน มักผลิตได้จากพืชและมีจุลชีพบางชนิดที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้แก่ *Clostridium spp.* และ *Streptococcus spp.* (Ward, 1983) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 32,000 - 50,000 ดาลตัน

4. เมทัลโลโปรติเอส (metalloprotease) EC 3.4.24

เอนไซม์ชนิดนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า นิวทรัลโปรติเอส (neutral protease) เป็นเอนไซม์ที่มีอิออนของโลหะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ มักพบที่บริเวณเร่ง เอนไซม์ชนิดนี้พบทั่วไปในแบคทีเรียและราโดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลัสหลายชนิด เช่น *Bacillus megaterium, Bacillus cereus* และ *Bacillus thermoproteolyticus* ซึ่งจะผลิตเฉพาะนิวทรัลโปรติเอสเท่านั้น (Prist, 1977) แต่ใน *Bacillus subtilis* พบว่ามีการผลิตทั้งนิวทรัลโปรติเอสและแอลคาไลน์โปรติเอส นอกจากนี้ยังมี *Bacillus thuringenesis, Bacillus pumilus* และ *Bacillus polymyxa* (Griffin และ Forgaty, 1973) เป็นต้น นิวทรัลโปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีอิออนของสังกะสีอยู่ที่บริเวณเร่งแอคติวิตีของเอนไซม์สูงเมื่อใช้สับเสตรตสังเคราะห์ FAGLA (furylacrolylglycyl leucinamide) ที่ pH เป็นกลาง พบว่าแคลเซียม (Ca^{2+}) จะทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับกรดอะมิโนไลซีนและถูกยับยั้งด้วยสารประเภท chelating agents เช่น ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1,10-Phennanthroline (Pero และ Sloma, 1993) ซึ่งยับยั้งเอนไซม์โดยการดึงอะตอมของสังกะสีออก แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย di-isopropryl fluorophosphate (DFP) , sulfhydryl reagent, soybean trypsin inhibitor และ potato protease inhibitor ความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7 - 8 โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท มีความเสถียรในช่วง pH 5 - 10 (Endo, 1962) เอนไซม์สำคัญได้แก่ thermolysin จาก *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งมีสมบัติเด่น คือ มีความเสถียรสูง เช่น เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ยังมีแอคติวิตีของเอนไซม์เหลือถึง 50 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากใน

โครงสร้างของเอนไซม์มีแคลเซียมอิออน 4 อะตอม (Endo, 1962) เมื่อเทียบกับนิวทรัลโปรติเอสจาก *B.amyloliquefaciens* ซึ่งแอคติวิตีของเอนไซม์จะเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มที่ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เนื่องจากมีแคลเซียมอิออน 2 อะตอมในโครงสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้ การผลิต thermolysin จาก *Bacillus stearothermophilus* KP 1236 พบว่าเอนไซม์มีอุณหภูมิที่สูงในการทำงานของเอนไซม์คือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 และเอนไซม์ยังมีความเสถียรเป็นเวลาถึง 10 นาที เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส (Yukio และคณะ, 1987) นอกจากนี้ยัง พบนิวทรัลโปรติเอสในรา พวก *Aspergillus oryzae* อีกด้วย นิวทรัลโปรติเอสนิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมมากมาย เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง เบียร์ ซีอิ้ว น้ำปลา การผลิตสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) อุตสาหกรรมผลิตเนยแข็งและขนมปังต่างๆ นอกจากนี้มีผู้ศึกษาถึงสมบัติของนิวทรัลโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* พบว่าช่วยปรับปรุงคุณภาพของขนมปังประเภท cracker และ biscuit ทำให้แป้งเป็นแผ่นบางโดยไม่ฉีกขาด และช่วยลดฟองอากาศที่เกิดระหว่างการอบ (Barrett, 1979; Aunstrup, 1980) และเมื่อใช้เอนไซม์นี้ร่วมกับไลเปส (Lipase) ในการทำเนย พบว่าช่วยเพิ่มรสชาติของเนยแข็งและไม่ทำให้เกิดรสขม (Godfrey และคณะ 1983)

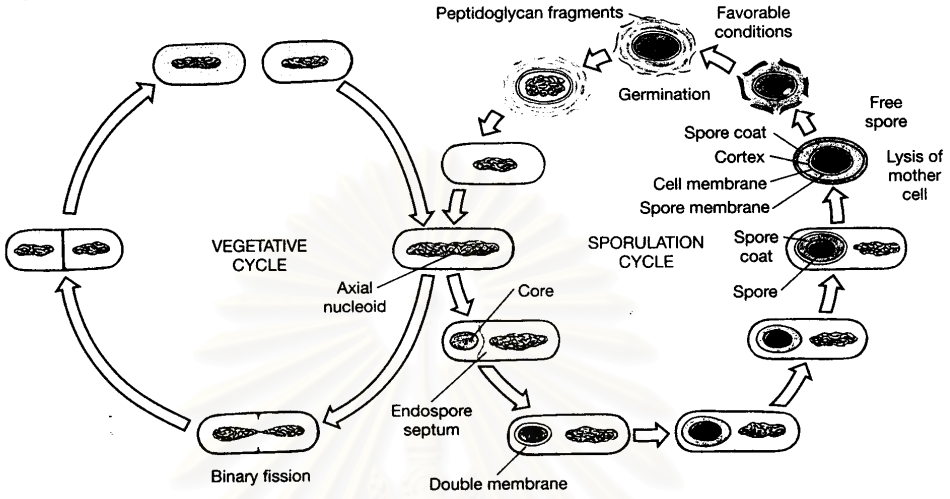
การผลิตโปรติเอสและความสำคัญของเอนไซม์ต่อเซลล์

การสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม *Bacillus spp.* จะเกิดขึ้นในช่วงปลายการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณ (exponential phase) หรือ logarithmic phase) หรือในระยะแรกของการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) โดยพบในลักษณะของเอนไซม์ที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) เป็นเอนไซม์ที่ปล่อยออกจากเซลล์และพบอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Markkanen และ Bailey, 1974; Priest, 1977) วิธีที่เชื้อปล่อยเอนไซม์ออกนอกเซลล์มีสมมติฐานที่เป็นที่ยอมรับมากที่สุดคือ signal hypothesis สมมติฐานนี้เสนอว่า การสังเคราะห์เอนไซม์เกิดที่ไรโบโซม สารตั้งต้น (precursor) ของเอนไซม์จะมีกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิคที่บริเวณปลายด้านอะมิโนของสายพอลิเปปไทด์ทำหน้าที่เป็น leading (signal) sequence ทำให้สายเปปไทด์ที่ถูกสร้างขึ้นมาผ่านออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จากนั้น signal sequence จะถูกตัดออกโดยเอนไซม์เปปติเดสที่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์และส่วนโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ก็จะพับ (fold) อยู่ในโครงรูป (conformation ที่เสถียร (Ward, 1985; Sheerler และ Bianchi, 1987)

ในธรรมชาติ โปรติเอสของ *Bacillus spp.* มีบทบาทที่สำคัญคือช่วยไฮโดรไลส์ สับสเตรทที่เป็นพอลิเปปไทด์สายใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็กทำให้เซลล์สามารถดูดซึมเป็นอาหารได้นอกจากนี้เอนไซม์จากจุลชีพยังมีบทบาทที่ซับซ้อนอย่างอื่น ได้แก่

1. บทบาทในการสร้างสปอร์

–



รูปที่ 1.3 ระยะต่างๆในการเจริญของสปอร์

การเกิดสปอร์ถูกกระตุ้นโดยการขาดแคลน (starvation) แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และบางครั้งเกิดจากการขาดแคลนฟอสเฟต มีหลักฐานแสดงให้เห็นว่าการสร้างเอนไซม์แอลคาไลน์
โปรติเอสเกี่ยวข้องกับการเกิดสปอร์ โดยมิวแตนท์ของ *B. subtilis* ที่ไม่สร้างเอนไซม์จะไม่สามารถสร้างสปอร์ และ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ซึ่งเป็นสารยับยั้งของแอลคาไลน์โปรติเอสไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ แต่ยับยั้งการสร้างสปอร์ สำหรับนิวทรัลโปรติเอสไม่มีความจำเป็นในการสร้างสปอร์เพราะมิวแตนท์ที่ขาดเอนไซม์นี้ยังสามารถสร้างสปอร์ได้ (Piggot และ Coote, 1976; Dancer และ Mandelstam, 1975) นอกจากนี้ยังปรากฏว่าเอนไซม์โปรติเอสยังเกี่ยวข้องกับการงอก (germination) ของสปอร์ โดยการเตรียมกรดอะมิโนซึ่งสปอร์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ในระยะแรกเริ่ม (early part of germination) (Ward, 1983) อย่างไรก็ดีมีงานวิจัยของนักวิจัยบางกลุ่มที่คัดค้านบทบาทของเอนไซม์ในแง่นี้โดยเสนอว่าโปรติเอสที่อยู่นอกเซลล์ไม่มีความจำเป็นในการสร้าง สปอร์ของ *Bacillus* (Maurizi และ Switzer, 1980)

2. บทบาทในการควบคุมการ turnover ของผนังเซลล์

มีรายงานว่าอัตราการ turnover ของ peptidoglycan(ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์) ในระยะการเจริญทวีคูณ (exponential growth) ขึ้นกับเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่นอกเซลล์ (Jolliffe และ คณะ, 1980) โดยพบว่าในมิวแตนท์ของ *B.subtilis* ที่ไม่สร้างโปรติเอส อัตราการ turnover ของ peptidoglycan มีมากกว่าในสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ในขณะที่สายพันธุ์ที่สร้างโปรติเอสมากกว่าปกติ (hyperprotease-producing strains) มีอัตราการ

turnover ของ peptidoglycan มีมากกว่าในสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ในขณะที่สายพันธุ์ที่สร้างโปรติเอสมากกว่าปกติ (hyperprotease- producing strains) จะมีอัตราการ turnover ของ peptidoglycan ต่ำ และอัตราการ turnover ของ peptidoglycan ในสายพันธุ์ที่ไม่สร้างโปรติเอสลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อรวมกับสายพันธุ์ที่สร้าง โปรติเอสมากกว่าปกติ การเติม PMSF ซึ่งเป็นตัวยับยั้งแอลคาไลน์โปรติเอสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ที่สร้างโปรติเอสมากจะเพิ่มอัตรา turnover ของผนังเซลล์ และเมื่อเติม subtilisin ซึ่งเป็นแอลคาไลน์โปรติเอสสกัดจาก *B .subtilis* ลงในสายพันธุ์ที่ไม่สร้างโปรติเอสจะพบว่าการเกิดการ turnover ของผนังเซลล์ลดลง ผลการทดลองเหล่านี้สนับสนุนว่าการ turnover ของผนังเซลล์ใน *B. subtilis* น่าจะถูกควบคุมโดยโปรติเอสที่อยู่นอกเซลล์

3. บทบาทในการไฮโดรไลส์เอนไซม์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ให้อยู่ในสภาพที่ทำงานได้ (active form) โดยตัด signal sequence ออกจากเอนไซม์

บทบาทในการเปลี่ยน inactive precursor form ของเอนไซม์บางชนิดให้เป็น active enzyme มีรายงานโดย Aiyappa และคณะ (1997) ว่า แอลคาไลน์โปรติเอสที่อยู่นอกเซลล์ จาก *B. licheniformis* 749 สามารถเปลี่ยนเพนนิซิลิเนสที่เกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งอยู่ในรูปของ precursor form ให้เป็นรูปแบบที่เป็นอิสระ (free exoenzyme) ซึ่งแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ นอกจากนี้ Drapeau (1978) ยังได้รายงานว่า metalloprotease จาก *Staphylococcus aureus* V8 มีบทบาทในการเปลี่ยน inactive precursor ของโปรติเอสอีกชนิดหนึ่งซึ่งสร้างโดยตัวของมันเองระหว่างกระบวนการขนส่งให้เป็น active enzyme นอกเซลล์

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์

ปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลชีพซึ่งมีผลต่อการเจริญและการสร้างโปรติเอสของจุลชีพคือ

1. อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน

กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลชีพสามารถนำไปใช้ได้โดยง่ายในช่วง stationary phase เมื่อแหล่งอาหารและพลังงานลดน้อยลง เชื้อจะเริ่มสร้างสปอร์พร้อมๆกับการสร้างเอนไซม์ แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณกลูโคสที่มากเกินไป กลูโคสจะกดการทำงานของการควบคุมการสร้างเอนไซม์ (catabolite repression) (Doi, 1973; Bernlohr, 1964; Hubner และคณะ, 1993) นอกจากนี้ได้มีผู้ศึกษาถึงผลการเติมกลูโคสลงไปในช่วง stationary phase ของการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 พบว่าหลังการเติมกลูโคส 2% ลงไป 1 ชั่วโมง แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสจะลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการเติมกลูโคสในช่วงการถ่ายเชื้อซึ่งลดลงอย่างมาก และการสร้างแอลคาไลน์โปรติเอสยังขึ้นกับปริมาณของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย นอกจากนี้

ยังได้มีผู้ศึกษาถึงปริมาณของกลูโคสที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ให้มีปริมาณสูงที่สุด (Adin. และ Ellaiah, 2002) สำหรับการศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนในวัตถุดิบต่างๆ (เกษม, 2536) ได้ศึกษาการใช้วัตถุดิบราคาถูกหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าอาหารที่มีแป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงกว่าสูตรอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน Fujiwara และ Yamamoto (1985) ได้ใช้วัตถุดิบราคาถูกหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าการเลี้ยง *Bacillus spp.* B21-2 โดยใช้แป้งและกลูโคส พบว่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้มีค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับการใช้แลคโตส, ซูโครส และกลีเซอรีนเป็นแหล่งคาร์บอน

2. อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน

สารประกอบไนโตรเจนจะถูกย่อยสลายเพื่อผลิตกรดอะมิโน, กรดนิวคลีอิค, โปรตีน และส่วนประกอบของผนังเซลล์ การผลิตโปรติเอสจะขึ้นกับปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างโปรติเอสจะถูกกดดัน (repress) เมื่อมีกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ในอาหารมากเกินไป โดยกรดอะมิโนแต่ละชนิดมีความสามารถในการกดดันการสร้างเอนไซม์ได้ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเชื้อด้วย ใน *Bacillus spp.* กรดอะมิโนชนิดเดียวกันจะมีผลต่อการกดดันการสร้างเอนไซม์ได้ต่างกัน (Chaloupka และ Kreckova, 1968) บางครั้งกรดอะมิโนหรือเปปไทด์หลายชนิดอยู่ร่วมกันก็มีผลต่อการกดดันการสร้างเอนไซม์ได้มากกว่ากรดอะมิโนชนิดเดียว (Jaroslav และคณะ, 1987) สนธยา (2533) ได้ทำการศึกษาผลของกรดอะมิโนผสมระหว่าง กลูตาเมท แอสปาเตทและแอสปาราจีน เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ามีผลต่อการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *B. subtilis* TISTR 25 ทำให้มีการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสได้สูงกว่ามีกรดอะมิโนชนิดเดียวเสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะมิโนการเจริญของเชื้อจะสูงขึ้นแต่การผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสกลับลดต่ำลง แสดงว่าชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ (Reilly และ Day, 1983) ได้ศึกษาการผลิตโปรติเอสจาก *Aeromonas hydrophila* โดยใช้วัตถุดิบหลายชนิดเป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น เคซีน, casamino acid, proteose, peptone, neopeptone, tryptose และไม่ใช้วัตถุดิบใดๆเลย พบว่าการไม่ใช้วัตถุดิบใดๆเลยเป็นแหล่งไนโตรเจนการเจริญของเชื้อจะต่ำมาก แต่จะมีการเจริญผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสในปริมาณมาก เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบอื่นๆ พบว่าการเจริญของเชื้อสูงมากแต่การผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสกลับมีปริมาณต่ำลงอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่ไม่เหมาะสมมีผลต่อการกดดันการสร้างโปรติเอสได้ นอกจากนี้ (Fujiwara และ Yamamoto, 1987) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส *Bacillus spp.* B21-2 โดยใช้วัตถุดิบราคาถูกหลายชนิด

เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า Bonito extract และกากถั่วเหลือง สามารถเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสได้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบอื่นๆ นอกจากนี้มีผู้ศึกษาถึงปริมาณที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus spp.* พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากถั่วเหลืองบดในปริมาณมาก ทำให้การละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง เชื้อเจริญได้น้อยจึงผลิตโปรติเอสได้ลดลง (จำนงค์ และ คณะ, 2003)

3. อิทธิพลของฟอสเฟต

ฟอสเฟตมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (DNA, RNA)และโปรตีน การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต, การหายใจของเซลล์รวมทั้งควบคุมระดับ ATP ในขบวนการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส ฟอสเฟตจะมีส่วนช่วยในการเพิ่มความเสถียรของ mRNA โดยการยับยั้งการทำงานของ RNase และช่วยให้เอนไซม์ที่สร้างขึ้นถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ดีขึ้นแต่ถ้าเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์ด้วยปริมาณฟอสเฟตที่มากเกินไป จะมีผลยับยั้งการเจริญและกดดันการสร้าง
โปรติเอสได้ (Moon และ Parulekar, 1991)

4. อิทธิพลของไอออนโลหะ

ไอออนของโลหะมีส่วนสำคัญในการเจริญและสร้างเอนไซม์ในเชื้อสกุล *Bacillus* เช่นแมกนีเซียมไอออนมีความสำคัญและจำเป็นต่อการเจริญ การแบ่งตัว ขนาดและรูปร่างของเชื้อ มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมกนีเซียมมากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญและกดดันการสร้างเอนไซม์ (Wabb, 1949)

ส่วนไอออนชนิดอื่นๆ เช่น แมงกานีสและเหล็ก พบว่าเป็น cofactor สำหรับเอนไซม์หลายชนิดในขบวนการเมตาบอลิซึมของไนโตรเจนโดยมีกลูตามีนซินทิเตสเป็นเอนไซม์สำคัญในการใช้ไนโตรเจนจากอนินทรีย์ไนโตรเจน (John, 1991) แคลเซียมอิออนมีส่วนช่วยในการเพิ่มความเสถียรให้กับเอนไซม์ในที่อุณหภูมิสูงๆ (Raja Noor และ คณะ, 1993)

5. อิทธิพลของภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการหมัก

ภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อหรือเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตโปรติเอสได้แก่

5.1 ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นมีผลต่อกระบวนการขนส่งสารผ่านเซลล์เมมเบรน (Roger และ Bernard, 1972) ได้เลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยเริ่มต้นที่ pH ต่างๆ ตั้งแต่ 5 - 12 พบว่า pH ที่เหมาะสมคือ 7.5 - 9.5 จะผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสได้ดีที่สุด (Moon และ Parulekar, 1991) พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus firmus* ในอาหารที่มี pH 7.7 มีผลทำให้เชื้อมีการผลิตโปรติเอสได้สูงสุด

5.2 อุณหภูมิ อุณหภูมิในการเลี้ยงต้องเหมาะสมเชื้อจึงมีการผลิตเอนไซม์ออกมา อุณหภูมิมีความสำคัญต่อการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงการละลายของออกซิเจนจะต่ำ (Jaroslave และคณะ, 1991) ได้ทำการศึกษาใน *Bacillus megaterium* โดยอุณหภูมิจะมีผลต่อการถอดรหัสของ mRNA ในการผลิตโปรติเอส

5.3 อัตราเร็วในการกวนและอัตราการให้อากาศ ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อที่เลี้ยง ขนาดของถังหมัก และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะขึ้นอยู่กับอัตราการกวนและการให้อากาศภายในถังหมัก ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่พอเหมาะจะมีผลให้จุลินทรีย์เจริญและสร้างเอนไซม์ได้ ถ้าปริมาณออกซิเจนต่ำจะทำให้เชื้อใช้กลูโคสไม่สมบูรณ์ทำให้อัตราการเจริญของเชื้อลดลง (Moon & Parulekar, 1991) จากการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* แบบ Fed - batch โดยควบคุมปริมาณออกซิเจนให้ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสได้สูงกว่าการไม่ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจนถึง 4.6 เท่า (Giesecke และคณะ, 1991)

การทำให้โปรติเอสมีความบริสุทธิ์บางส่วนและศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์

การทำให้โปรติเอสมีความบริสุทธิ์มากขึ้นทำให้สามารถนำไปใช้ในงานที่หลากหลายมากขึ้น ซึ่งมีผู้ได้ศึกษาเกี่ยวกับการทำให้โปรติเอสมีความบริสุทธิ์ดังนี้

Takii และคณะ (1987) ศึกษาการแยกนิวทรัลโปรติเอสและสมบัติของโปรติเอสจากจุลินทรีย์ทนร้อนคือ *Bacillus stearothermophilus* KP 1236 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดิน ภาวะที่เหมาะสมในการเจริญคือ ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส โปรติเอสมีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส , pH 7.0 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เอสดีเอสพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟลิซิสพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 33,000 ดาลตัน

Durham และคณะ (1987) ศึกษาการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus spp.* สายพันธุ์ GX6638 (ATCC 53278) ซึ่งแยกได้จากดินพบว่าประกอบด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส 3 ชนิด จากการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตรกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุ โปรติเอส 2 ชนิดที่สามารถมีแอคติวิตีสูงที่ภาวะด่าง และเสถียรที่อุณหภูมิสูงได้ ชนิดแรกคือ HS มีน้ำหนักโมเลกุล 36,000 ดาลตัน ส่วนชนิดที่สองคือ AS มีน้ำหนักโมเลกุล 27,500 ดาลตัน โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ที่ pH 8.0-12.0 และอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

Manachimi และคณะ (1988) ศึกษาการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โปรติเอส จาก *Bacillus thermoruber* ซึ่งแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตรกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุ คือ DEAE-Sephadex A-50 และ

แอฟฟินิตีโครมาโตรกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุ คือ DEAE-Sephadex A-50 และแอฟฟินิตีโครมาโตรกราฟี คือ α-casein affinity chromatography พบว่า โปรติเอสที่ได้ประกอบด้วย พอลิเปปไทด์สายเดี่ยว มีน้ำหนักโมเลกุล 39,000± 800 ดาลตัน ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสคือ pH 9.0 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สารยับยั้งของเอนไซม์คือ PMSF และ EDTA เอนไซม์จะมีความเสถียรมากขึ้นในภาวะที่มีแคลเซียมอิออน

Takami และคณะ (1989) ศึกษาแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus spp.*NO. AH-101 ซึ่งแยกได้จากดิน ซึ่งภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ ที่ pH 12.0 - 13.0 และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะเสถียรในภาวะที่มีแคลเซียมอิออน และสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ PMSF เอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 30,000 ดาลตัน การแยกให้บริสุทธิ์ใช้วิธีโครมา-โตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

Zaliha และคณะ (1994) พบว่าแบคทีเรียทนร้อน คือ *Bacillus stearothermophilus* F1 สามารถแยกให้บริสุทธิ์โดยการใช้วิธีการทางความร้อน, อุลตราฟิลเตรชัน และ เจลฟิลเตรชัน พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอส 33,500 ดาลตัน โดยการใช้วิธีเอสดีเอสพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส และมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 20,000 ดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตรกราฟี ภาวะที่เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุดคือที่ pH 9.0 โดยเอนไซม์จะเสถียรเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 70 องศาเซลเซียส จะมีช่วง pH ที่เหมาะสมที่ 8.0 - 10.0 ในสภาวะที่มีแคลเซียมอิออนเอนไซม์จะมีความเสถียรมากขึ้น

ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ (2532) พบว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตได้ทั้งนิวทรัลโปรติเอสและแอลคาไลน์โปรติเอสมีช่วงการทำงานในระหว่าง pH 7.0-11.0 และมีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 8.0 และ pH 10.5 นอกจากนี้การผลิต โปรติเอสสามารถถูกชักนำโดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย 1 เปอร์เซ็นต์กลูตาเมท pH 6.0 และพบว่าการผลิตโปรติเอสถูกกดดันในภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และแยกโดยซีเอ็ม-เซลลูโลสคอลัมน์โครมาโตร- กราฟี พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.3 เท่า โดยพบว่า เอนไซม์เป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว ไม่มีหน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 27,000 ดาลตัน ความเป็นกรด - ด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ pH 8.0 และ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไฮโดรไลส์ได้ทั้งสับสเตรทธรรมชาติและสังเคราะห์

อุดมลักษณ์ ธิติรักษ์พาณิชย์ (2533) แยกเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40 - 70% แล้วผ่านคอลัมน์ โครมาโตรกราฟี 2 ชนิด คือ ซีเอ็ม เซลลูโลส และ เซฟาเดกซ์ จี 75 และทดสอบความบริสุทธิ์โดยเทคนิค พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส ได้แถบโปรตีนแถบเดียว และหาหน่วยย่อยโดยวิธี เอสดีเอส พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส พบว่า

เอนไซม์เป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว มีขนาดโมเลกุล 37,000 ดาลตัน สภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนดีที่สุดที่pH 7.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นิวทรัลโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถย่อย สับสเตรทที่เป็น tripeptide ขึ้นไป เอนไซม์ถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยสารคีเลตติ้ง EDTA และ Phenanthroline

จากงานวิจัยนี้ถือเป็นแนวทางหนึ่งในการค้นคว้าวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับ ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอส การแยกให้บริสุทธิ์บางส่วนและศึกษาสมบัติของเอนไซม์จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทยเพื่อเป็นแนวทางเลือกใหม่ในการหาจุลินทรีย์ที่มีสมบัติที่ดี เหมาะสม สามารถนำไปใช้งานได้มากขึ้น เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับโปรติเอสที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่มีอยู่เดิมซึ่งนับว่ามีประโยชน์ต่องานวิจัยและยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาห-กรรมได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตโปรติเอสทนร้อนที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสจาก *Bacillus cereus*
3. ศึกษาวิธีการที่ทำให้โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน
4. ศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์

2.1 ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์	**รุ่นที่ผลิต**	บริษัท/ประเทศที่ผลิต
1. เครื่องวัดและบันทึกการดูดกลืนแสง (UV spectrophotometer)	Spectronic Gene SYS 8	BECTHAI/Thailand
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	Spectronic 20 D	Baush & Lomb/U.S.A.
3. เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated microcentrifuge)	Sigma 2MK	Sigma Laboratory/Western Germany
4. เครื่องเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge)	H-103 N series	Kokusan/Japan
5. เครื่องอบนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)	HA-30	Hirayama Manufacturing Cooperation/Japan
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)	Heraeus Type B 5050 E	Heraeus/Germany
7. เครื่องเขย่าให้อากาศควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (Gyrotary water bath shaker)	G76D	New Brunswick Scientific Co.,Inc., Edison, N.J/U.S.A.
8. เครื่องเขย่าให้อากาศควบคุมอุณหภูมิได้ (controlled environment incubator shaker) Phycotherm Model G 760	G760	New Brunswick Scientific Co.,Inc., Edison, N.J/U.S.A.
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH- meter)	PHM 83 Autocal	Radiometer, Copenhagen/ Denmark
10. เครื่องชั่งสาร	Mettler AE200	Mettler Instrument AG/ Switzerland
11. เครื่องชั่งสาร	Sartorius LC6205	Sartorius/ Germany
12.เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน (Kjeldatherm)	-	BUCHI/Switzerland

ครุภัณฑ์	รุ่นที่ผลิต	บริษัท/ประเทศที่ผลิต
13. เครื่องระเหยน้ำอุณหภูมิต่ำ (lyophilizer)	Lyph-Lock 1L	LABCONCO/U.S.A.
14. เครื่องแช่แข็ง (freezer)	Model SF-C95	Sanyo / Japan
15. เครื่องกรอง (ultrafiltration)	Model Ampicon PM-10, membrane และ Microconcentrator Model Centricon™ 10 Amicon Division	W.R. Grace & Co./U.S.A.
16. เครื่องกวนสาร (stirrer)	Figherbrand	Fisher Scientific/England

2.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัท / ประเทศที่ผลิต
agar	Scharlau/Spain
ammonium sulfate	CARLO ERBA/Italy
azocasein	Sigma Chemical Co.,Ltd./U.S.A.
bovine serum albumin (BSA)	Sigma Chemical Co.,Ltd./U.S.A.
calcium chloride dihydrate	Merck AG. Darmstadt/German
casein hammerstein	BDH Laboratory Chemicals Division/England
dialysis tubing 25 mm	Sigma Chemical Co.,Ltd./U.S.A.
ethanol	Scharlau/Spain
ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	Sigma Chemical Co.,Ltd./U.S.A.
glucose	Fluka AG. Buch/Switzerland
hydrochloric acid	Merck AG. Darmstadt/German
magnesium sulfate	CARLO ERBA/Italy
peptone from meat	Merck AG. Darmstadt/German
potassium hydrogen phosphate	CARLO ERBA/Italy
potassium hydroxide	Usb/U.S.A.
sephadex G – 75	Pharmacia Biotech/Sweden

สารเคมี	บริษัท/ประเทศที่ผลิต
skim milk	DIFCO/U.S.A.
sodium chloride	LAB – SCAN/Ireland
sodium dodesyl sulphate	Sigma Chemical Co.,Ltd./U.S.A.
toluene	BDH Laboratory Chemicals Division/England
trichloroacetic acid (TCA)	CARLO ERBA/Italy
tris - (hydroxymethyl) – aminomethane	UNIVAR/Australia
yeast extract	Scharlau/Spain

2.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Bacillus cereus ซึ่งคัดเลือกได้จากบ่อน้ำเค็มร้อน จังหวัดกระบี่ สามารถผลิตนิวทรัลโปรติเอส และหลั่งออกมานอกเซลล์ได้ การคัดเลือกแบคทีเรียกล่าวถึงในบทที่ 3 และ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย TISTR (Thailand Institute of Scientific and Technological Research) Culture Collection เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรติเอสจากตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณบ่อน้ำพุร้อน บ่อน้ำทิ้งยางพารา และบ่อเลี้ยงกุ้ง จากดินในประเทศไทย ดังนี้ (ภาคเหนือ: เชียงใหม่, เชียงราย, แม่ฮ่องสอน, ลำปางและตาก ภาคกลาง: ราชบุรี และกาญจนบุรี ภาคตะวันออก: จันทบุรี และระยอง ภาคใต้: ระนองและกระบี่) รวมทั้งสิ้น 63 ตัวอย่างดิน

3.1.1 การคัดเลือกแบคทีเรียครั้งที่ 1 (primary screening)

ชั่งตัวอย่างดินที่เก็บได้น้ำหนัก 1 กรัม จากนั้นนำดินไปทำให้เจือจางในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9 มิลลิลิตร และนำไป spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ NA (ภาคผนวก ฉ ข้อ 1)โดยใช้สารละลายตัวอย่างดินคือ 10 μl, 100 μl, 500 μl ใน NA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 17 ชั่วโมง หลังจากนั้นเขี่ยโคโลนีที่แยกได้ไปทำให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ถ่ายเชื้อลงบน Skim milk (ภาคผนวก ฉ ข้อ 2) แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเก็บแบคทีเรียที่ให้วงใสที่แยกได้ไปทดลองขั้นต่อไป

3.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียครั้งที่ 2 (secondary screening)

แบคทีเรียที่ให้วงใสจากการคัดเลือกแบคทีเรียครั้งที่ 1 (primary screening) มาเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตโปรติเอส (ภาคผนวก ฉ ข้อ 3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 17 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที นำส่วนใสมาจำนวน 20 μl มาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำมาหยอดลงในหลุมบน skim milk agar plate ที่เจาะหลุมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง เพื่อหาภาวะในการทดสอบการทำงานของเอนไซม์

3.1.3 การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้วิธี Azocasein hydrolysis (Rajar, 1994)

หลังจากทราบภาวะที่เหมาะสมเพื่อเป็นแนวทางในการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสครั้งที่ 2 (secondary screening) โดยนำแบคทีเรียที่ให้วงใส มาหาแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยบ่มส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ 0.1 มิลลิลิตรกับ azocasein solution 0.2%

1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ฉ ข้อ 4), Tris-HCl 0.1 M ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตรโดยใช้อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมของการหาค่าแอคติวิตี โดยได้ข้อมูลมาจากข้อ 3.1.2 โดยบ่มเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 10 % trichloroacetic acid (ภาคผนวก ฉ ข้อ 5) ก่อนใส่ส่วนใสของเอนไซม์แล้วจึงนำไปบ่มโดยใช้อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมตามที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตรมีค่าเพิ่มขึ้น 0.1 หน่วยต่อนาทีภายใต้ภาวะที่กำหนด

3.1.5 การหาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของโปรติเอส

การหาภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของโปรติเอส โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ, ความเป็นกรด- ด่าง และอัตราการเขย่า โดยนำจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอสมาเลี้ยงในอาหารเหลว (Raja medium)ในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที แล้วเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เพื่อนำส่วนใสมาหาแอคติวิตีของโปรติเอสที่อุณหภูมิและ pH โดยวิธี azocasein hydrolysis ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น และวิธีการคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์ (3.1.5.1) ดังนี้

3.1.5.1 การคำนวณค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป	0.1 หน่วย	เทียบได้กับแอคติวิตี	0.1	หน่วย
ดังนั้น ถ้าค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนไป	1 หน่วย	เทียบได้กับแอคติวิตี	10	หน่วย ----- (1)

ใช้ปริมาณเอนไซม์	100 μl	คิดเป็น	1	หน่วย
ถ้าใช้ปริมาณเอนไซม์	1,000 μl	คิดเป็น	10	หน่วย -----(2)

ค่าการดูดกลืนแสงสุทธิ = ค่าการดูดกลืนแสงของ Sample - ค่าการดูดกลืนแสงของ control

Unit activity = [ค่าการดูดกลืนแสงสุทธิ x (1) x (2)] / เวลา

มีหน่วยเป็น U/ml/min

specific activity = Unit activity/ mg protein

มีหน่วยเป็น U/mg protein

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือก

3.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.2.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

เพื่อดูการติดสีแกรม รูปร่าง ลักษณะ และการเรียงตัวของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังสามารถดูตำแหน่งของสปอร์ในเซลล์แบคทีเรียได้ ซึ่งสามารถนำไปจำแนกชนิดได้อย่างคร่าวๆ

3.2.1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscope)

เพื่อดูขนาดความกว้าง ยาว ของแบคทีเรีย ซึ่งเรียกว่า scanning electron microscope (SEM) ซึ่งสามารถดูภาพวัตถุได้ถึง 3 มิติ และได้ภาพขยายถึง 75,000-10,000 เท่า

3.2.2 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) ได้รับความอนุเคราะห์การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งการทดสอบมีดังนี้คือ

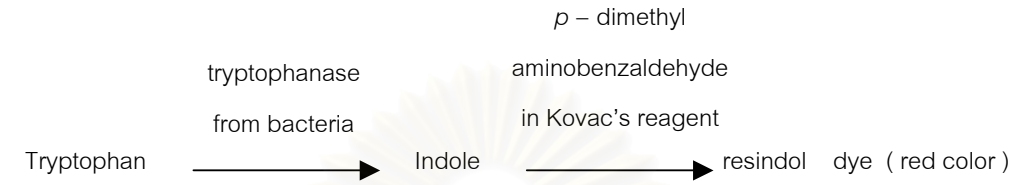
3.2.2.1 ลักษณะการเกิด hemolysis ใน blood agar โดยดูลักษณะการเกิด hemolysis ซึ่งเกิดจากการลักษณะย่อยเม็ดเลือดแดงว่าเป็นแบบ α- hemolysis มีลักษณะเป็นสีเขียว, β มีลักษณะเป็นวงใสโดยสมบูรณ์ หรือ γ-hemolysis แสดงว่าไม่เกิดการย่อยเม็ดเลือดแดง

3.2.2.2 การทดสอบการใช้น้ำตาลใน TSI agar

หลักการ ในอาหาร TSI ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิดคือ glucose 0.1%, lactose 1% และ sucrose 1% เนื่องจากที่ผิว slant มีเชื้อมากกว่าบริเวณอื่น น้ำตาล glucose ที่ slant จึงถูกใช้หมดเร็วกว่า ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาล lactose และ/ หรือ sucrose ก็จะหันไปใช้โปรตีนที่มีอยู่ในอาหารทำให้ slant มีความเป็นด่าง (เปลี่ยนสี phenol red เป็นสีแดง) ส่วนที่ butt สามารถหมักย่อยน้ำตาล glucose ได้ดีในสภาพที่ไม่มีอากาศ อาหารเลี้ยงเชื้อจึงมีความเป็นกรด (เปลี่ยนสี phenol red เป็นสีเหลือง) (ปฏิกิริยาใน TSI เป็น K/A)

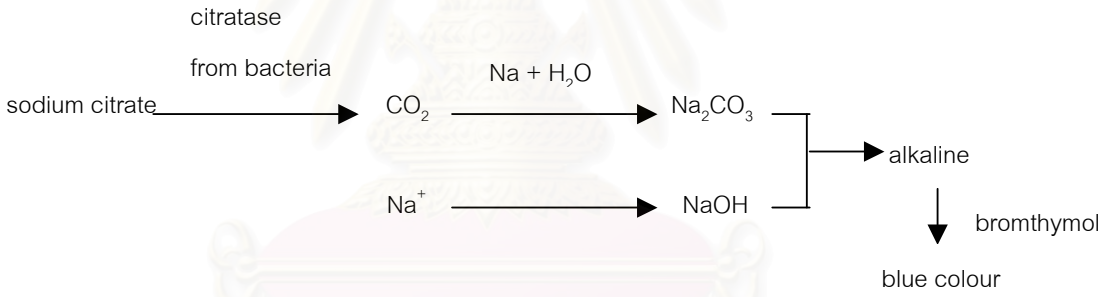
3.2.2.3 การทดสอบ motility การตรวจพิสูจน์ motility ของเชื้อกลุ่มที่ไม่ย่อยน้ำตาล โดยดูการเจริญนอกรอย semisolid agar slab

3.2.2.4 การทดสอบ Indole test แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ tryptophanase จะสามารถผลิตindole จาก tryptophan ซึ่งตรวจสอบได้โดยทำปฏิกิริยากับ *p*- dimethylaminobenzaldehyde ในน้ำยา Kovac ได้ผลผลิตเป็นสีแดงเกิดขึ้น



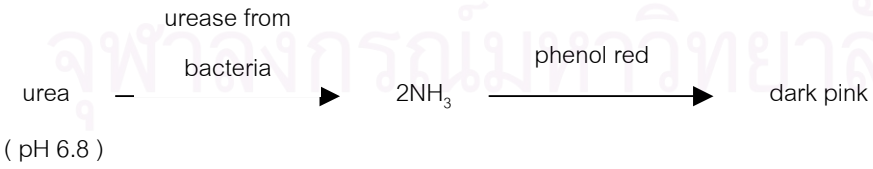
3.2.2.5 การทดสอบ citrate test

. หลักการ เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อในการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนในขบวนการ metabolism และให้ผลผลิตเป็นด่าง ซึ่งจะเปลี่ยนสี indicator เป็นสีน้ำเงิน



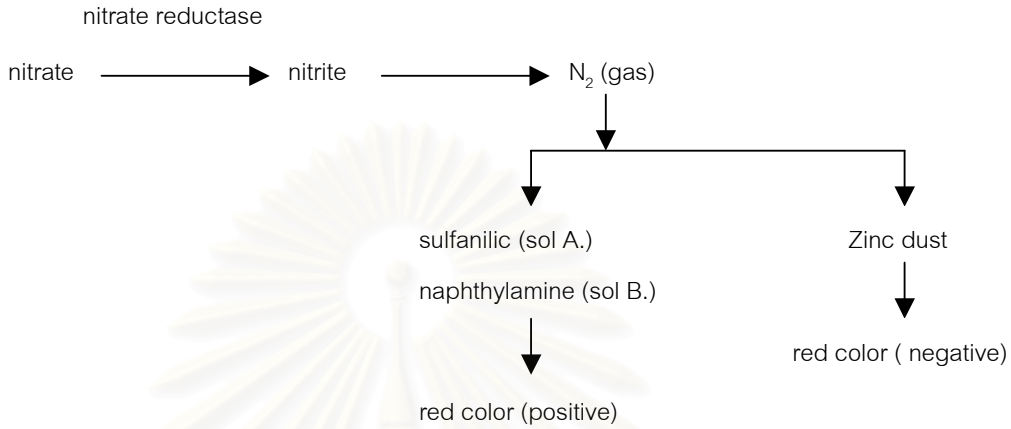
3.2.2.6 การทดสอบเอนไซม์ urease

หลักการ แบคทีเรียที่มี urease สามารถย่อย urea ได้ ammonia และ carbonate ซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่าง เปลี่ยนสี indicator เป็นสีชมพูแดง



3.2.2.7 การทดสอบ nitrate test

หยด nitrate solution A และ B โดยหยดลงในอาหารทดสอบ nitrate broth



ถ้าเกิดสีแดงภายใน 1 – 2 นาที แสดงว่า nitrate ถูก reduce เป็น nitrite แต่ถ้าไม่เกิดสีแดงขึ้น (อาจเกิดจากเชื้อนั้นใช้ nitrite ต่อ) จึงต้องทดสอบว่ามี unreduced nitrate เหลืออยู่หรือไม่ โดยการเติม zinc dust ไป reduce nitrate เป็น nitrite ถ้าสีของน้ำยาที่เติมลงไปยังคงไม่มีสี แสดงว่าผลการทดลองเป็นบวก แต่ถ้าเกิดสีแดง แสดงว่ามี nitrate เหลืออยู่ผลจึงเป็นลบ

3.2.2.8 การทดสอบ esculin hydrolysis

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการย่อย glycoside esculin เป็น esculetin และ glucose ได้โดย esculin solution 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ใส่เชื้อปริมาณมากพอบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ถ้าเชื้อสามารถย่อย glucoside esculin ได้เป็น esculetin จะทำปฏิกิริยากับ ferric ammonium citrate เกิดสารสีดำ

3.2.2.9 การทดสอบ Voges- Proskauer Test (VP)

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการสร้างสาร acetyl-methyl carbinol (acetoin) จาก glucose สารนี้มีฤทธิ์เป็นกลาง จะถูก oxidise โดย KOH และ O_2 ได้ diacetyl แล้ว diacetyl ที่ได้นี้ถ้ามี α- naphtol (catalyst) และกรดอะมิโน arginine (เหลือจากอาหาร peptone) หรือ creatine อยู่ด้วยจะเกิดเป็น complex สีแดงส้มขึ้น

3.2.2.10 การทดสอบ gelatin liquefaction

หลักการ gelatinase ซึ่งเป็นเอนไซม์จะย่อย gelatin ผลการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อจะเหลว

3.2.2.11 การทดสอบ lecithinase test

หลักการ lecithinase เมื่อ hydrolyse lecithin แล้วผลิตภัณฑ์สุดท้าย เป็น diglyceride และ phosphorylcholine ก่อให้เกิดความขุ่นขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากไม่ละลายน้ำ ผลบวกเกิดโซนขุ่นรอบโคโลนี

3.2.2.12 การทดสอบ carbohydrate fermentation test

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาลเพื่อเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน ถ้าเชื้อสามารถใช้น้ำตาล จะทำให้เกิดกรด phenol red ซึ่งเป็น indicator จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

3.2.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rRNA gene โดยนำเซลล์แบคทีเรียมาสกัด DNA ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (ข้อ 3.2.3.1) แล้วนำมาทำ PCR 30 รอบ (ข้อ 3.2.3.2) โดยใช้ primer A (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG), primer D (CAG CAG CCG CGG TAA TAC) และ primer H^{o} (AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA) (Edwards และ คณะ, 1989) แล้วนำเอาผลิตภัณฑ์ PCR มาทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง DNA sequencer แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน BLAST Programme ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/)

3.2.3.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย มีขั้นตอนการสกัดดังนี้

1. เลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำเชื้อที่เลี้ยงมาปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด eppendoffs จากนั้นนำมาปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาละลายใน SET buffer (ภาคผนวก ก. ข้อ 1) 100 μl แล้วเติม SET buffer อีก 350 μl ปั่นให้เข้ากัน

2. เติม 5 μl ของ lysozyme (10 mg/ml)(ภาคผนวก ก. ข้อ 3) กับ 5 μl ของ RNase (20 mg/ml)นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 20 μl ของ 10 % SDS (ภาคผนวก ก. ข้อ 4) และ 5 μl ของ proteinase K (20 mg/ml)ทำให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา

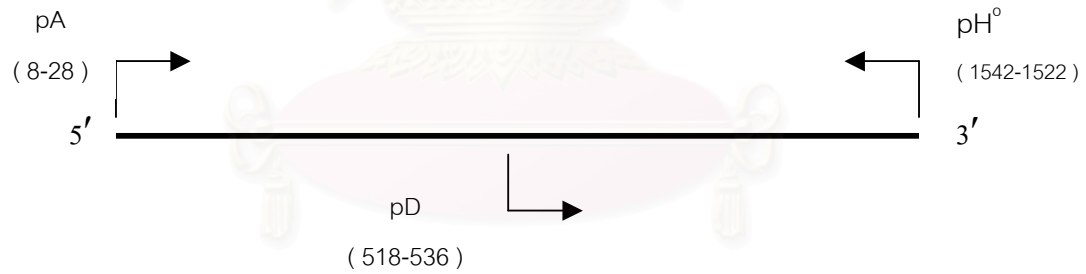
3. เติม 50 μl ของ 5.0 M sodium-acetate (ภาคผนวก ก. ข้อ 5) เขย่าให้เข้ากันเบาๆบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน แล้วเติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol เท่ากับปริมาตรสุดท้าย เขย่าให้เข้ากันปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 20 นาที

4. นำสารละลายส่วนใสด้านบนไปใส่ในหลอดใหม่ จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ได้ เขย่าเบาๆ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 - 60 นาที ปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

5. เก็บส่วนที่เป็นตะกอนของดีเอ็นเอที่สกัดได้ แล้วเติม ethanol 70% ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตรระเหย ethanol 70% ออกจากตะกอนดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือ 50 องศาเซลเซียส ละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย TE buffer ปริมาตร 50 μl ปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ –20 องศาเซลเซียส

3.2.3.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้วิธี PCR ไพร์เมอร์ที่ใช้มีดังนี้คือ

1. primer A (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG)
2. primer D (CAG CAG CCG CGG TAA TAC)
3. primer H^{o} (AAC GAG GTG ATC CAG)



รูปที่ 3.1 แสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะของไพร์เมอร์ แต่ละชนิดใน 16 S rRNA geneโดยทิศทางการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจะเป็นไปตามทิศทางของลูกศร

Master mix PCR ที่ใช้ในการทดลองคือ

10x PCR buffer	ปริมาตร	15	μl
$MgCl_2$ 25mM	ปริมาตร	9	μl
dNTP 10mM	ปริมาตร	3	μl
primer A (10 pmol/ml)	ปริมาตร	3	μl

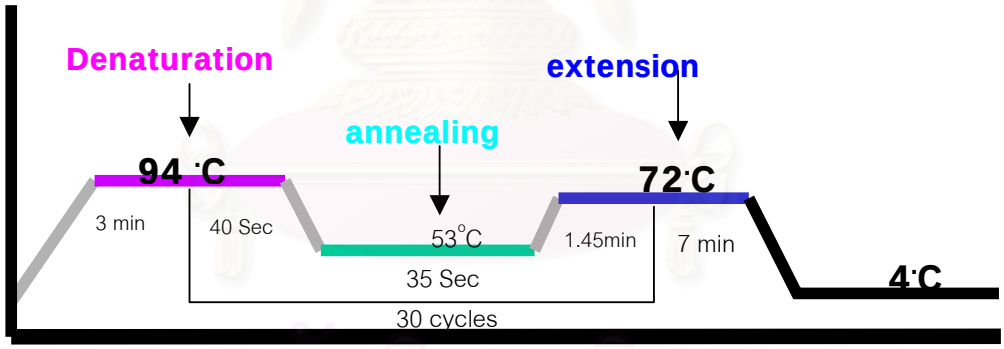
primer H°: (10 pmol/ml)	ปริมาตร	3	µl
5U/µl *Taq* DNA polymerase	ปริมาตร	1.2	µl
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	ปริมาตร	112.8	µl
	ปริมาตรรวม	147	µl

ทำ 3 หลอด คือ หลอดควบคุม และตัวอย่างอีก 2 หลอด โดยใส่ดีเอ็นเอแม่แบบ หลอดละ 1 µl แล้วใส่ Master mix หลอดละ 49 µl รวมปริมาตรแต่ละหลอดคือ 50 µl จากนั้นใช้เครื่อง PCR analyzer สภาวะที่ใช้มีดังนี้

หมายเหตุ สำหรับการใช้ primer D (10 pmole/ml) และ primer A (10 pmole/ml) ใช้กรรมวิธีและภาวะเช่นเดียวกัน

Denaturation	94 °C
Primer annealing	53 °C
Primer extension	72 °C
Final extention	72 °C

30 cycles



จากนั้นนำ PCR productที่ได้มาทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง DNA sequencer แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล BLAST Programme

3.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตโปรติเอส

3.3.1 การเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคือ Raja's medium (ภาคผนวก ฉ. ข้อ 3) และ Nutrient broth (ภาคผนวก ฉ. ข้อ 6)

นำอาหารทั้ง 2 ชนิดมาเลี้ยงแบคทีเรีย ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส , pH 7.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบ / นาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่ง 72 ชั่วโมง วัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

. 3.3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.1 จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 37 องศาเซลเซียส, 45 องศาเซลเซียสและ 50 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่ง 72 ชั่วโมง วัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

3.3.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.1 จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2 ที่ pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบ / นาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่ง 72 ชั่วโมง วัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

3.3.4 การศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.1 จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2 pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆดังนี้คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% (v/v) ความเร็วรอบ 250รอบ/นาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่ง 72 ชั่วโมง วัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

3.3.5 การศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.1 จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2 pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4 เขย่าที่ความเร็วรอบ 200, 250 และ 300 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่ง 72 ชั่ว-โมง วัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

3.3.6 การศึกษาปริมาณของกลูโคสที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.1 จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2 pHที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4 เขย่าที่ความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอนความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 0 ,0.25 , 0.5, 0.75 และ 1.0 g% (w/v) คือ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่ง 72 ชั่วโมง วัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

3.3.7 การศึกษาปริมาณของเปปโตนที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.1 จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2 pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4 เขย่าที่ความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5 ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.6 ที่ปริมาณของเปปโตนซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนต่างๆดังนี้คือ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 g% (w/v) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่ง 72 ชั่วโมง วัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

3.3.8 การศึกษาปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.1 จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2 pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4 เขย่าที่ความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5 ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.6 ปริมาณไนโตรเจนจากข้อ 3.3.7 ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่างๆ ดังนี้คือ 0, 0.1, 0.2 และ 0.3 g% (w/v) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่ง 72 ชั่วโมง วัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

3.3.9 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.1 จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2 pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4 เขย่าที่ความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5 ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.6 ความเข้มข้นของเปปโตนจากข้อ 3.3.7 ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์จากข้อ 3.3.8 เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง จนกระทั่ง 72 ชั่วโมง วัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

3.4 ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

ในการเตรียมเอนไซม์ปริมาณมาก เลี้ยงเชื้อในทำนองเดียวกับข้อ 3.3.1.1 ในภาวะที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษาจาก ข้อ 3.3 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 ml หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกเก็บส่วนน้ำใส เรียกสารละลายนี้ว่า crude enzyme นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.4.1 การทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกมาแล้วมาทำ ultrafiltration โดยลดปริมาตรให้เหลือ 1 ใน 3 โดยกรองผ่านเมมเบรนที่มี molecular weight cut off 10,000

3.4.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งบดละเอียดลงใน crude enzyme อย่างช้าๆ ให้ได้เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด 80 เปอร์เซ็นต์ (516 มิลลิกรัมต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร) โดยค่อย ๆ เติมทีละน้อยคนเบาๆ จนแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมด แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน นำมาเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเอามาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายในสารละลาย Tris-HCl 0.1 M pH 7.0

3.4.3 การขจัดเกลือออกจาก crude enzyme โดยวิธีไดอะไลซิส

นำสารเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต บรรจุลงในถุงไดอะ-ไลซิส นำไปไดอะไลซ์ใน Tris-HCl 0.1 M pH 7.0 ใช้บัฟเฟอร์ ปริมาตร 10 เท่าของสารละลายที่ได้จากการละลายตะกอนในข้อ 3.4.2 เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาวัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของโปรติเอส

3.4.4 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 ml ผสมกับสารละลายโปรตีนรีเอเจนต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

3.5 การศึกษาสมบัติของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน

3.5.1 การตรวจหาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ น้ำหนักโมเลกุลและหน่วยย่อยของเอนไซม์

3.5.1.1 วิธีแยกโปรตีนด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิสชนิดไม่ต่อเนื่อง (Disc polyacrylamide gel electrophoresis)

3.5.1.1.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

เตรียม seperating gel 7.0 % (2 แผ่น) (วิธีเตรียมสารละลายตามภาคผนวก ข.)โดยใช้สารละลาย 30 % อะคริลาไมด์ 2.33 มิลลิลิตร, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, น้ำกลั่น 5.15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10% 50 ไมโครลิตรและ TEMED 5 ไมโครลิตรให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำมาบรรจุในแผ่นแก้วคู่ขนานขนาด 1.50 mm x 16 x 18 cm (ระหว่างแผ่นแก้วมี spacer คั่นอยู่) จนสารละลายมีความสูง 12 cm จากนั้นค่อยๆ หยดน้ำกลั่นลงบนผิวเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน เทน้ำกลั่นออกจากหน้าเจล จากนั้นเตรียม stacking gel โดยผสมสารละลาย 30 % อะคลิลาไมด์ 0.835 ml, Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2.9 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10% 25 ไมโครลิตร, TEMED 5 ไมโครลิตร แล้วเติมสารผสมนี้ลงในแผ่นแก้วคู่ขนานที่มี comb อยู่ ทิ้งให้เจลแข็งตัวประมาณครึ่งชั่วโมง จากนั้นค่อยๆดึง comb ออก ล้างผิวเจลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เตรียมนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.1.2.2 การทำอิเลกโทรโฟริซิส

ใส่แผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่สารละลายทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.3 ลงในอ่างบัฟเฟอร์ จนท่วมแผ่นเจลทั้งสองข้าง นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมไว้ไปหยอดลงบนหลุมเจล (wells) ปริมาณต่อหลุมประมาณ 10-100 μg และปริมาตรที่หยอดประมาณ 15-30 μl แล้วผ่านกระแสไฟฟ้า ขนาด 20 มิลลิแอมแปร์/แผ่นเจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน จนกระทั่งแถบสีตามรอยเคลื่อนไปจนถึงระยะอีก 1 เซนติเมตร จากปลายล่างของแผ่นเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

3.5.1.2.3 วิธีย้อมสีโปรตีนในแผ่นพอลิอะคริลาไมด์เจล

แกะแผ่นเจลจากแผ่นกระจกแล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีนทิ้งไว้ค้างคืนจากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีนจนกระทั่งแผ่นเจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอย่างชัดเจน เก็บแผ่นเจลที่ได้ไว้ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน

3.5.2 เซฟาเดกซ์ จี-75 เจลฟิลเตรชันคอลัมน์

แช่เซฟาเดกซ์ จี-75 ปริมาณ 25 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นจึงต้มด้วย Tris-HCl 0.01 M pH 7.0 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 20 มิลลิ-โมลาร์ปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นนำไปทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปไล่ฟองอากาศออกโดยใช้ pump จากนั้นนำเจลมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 94 x 1.25 เซนติเมตร ให้ได้เจลสูง 83 เซนติเมตร ผ่านสารละลาย 0.01 M Tris-HCl pH 7.0 ที่มี 20 mM แคลเซียมคลอไรด์ อีกประมาณ 15 ชั่วโมง ด้วยอัตราการไหล 10 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยสารละลายบลูเดกซ์แทรน 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และโปแตสเซียมไดโครเมท 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ bovine serum albumin (BSA) น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน, ovalbumin น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน, lysozyme น้ำหนักโมเลกุล 14,300 ดาลตัน และ cytochrome c น้ำหนักโมเลกุล 12,384 ดาลตัน ในปริมาณ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เก็บสารละลายซึ่งแยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตร ติดต่อกันโดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดปริมาตรที่สารละลายโปรตีนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ นำไปคำนวณค่า K_{av} ดังนี้

$$K_{av} = V_e - V_0 \,/\, V_t - V_0$$

V_e คือ elution volume ของโปรตีนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์

V_0 คือ void volume ของคอลัมน์ที่วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายบลูเดกซ์แทรนผ่านออกมา

V_t คือ bed volume ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่ (total volume) ที่วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมทผ่านออกมา

3.5.3 เอสดีเอส - พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

3.5.3.1 การเตรียมเอสดีเอส - พอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

เตรียม seperating gel 12.5 % (2 แผ่น) โดยใช้ acrylamide solution 30 % ปริมาตร 4.17 มิลลิลิตร ผสมกับ solution B (Tris-HCl 2 M pH 8.8 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร, SDS 10% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 21 มิลลิลิตร) จากนั้นเติมน้ำกลั่น 3.33 มิลลิลิตร, แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10% 50 ไมโครลิตร, TEMED 5 ไมโครลิตร และเตรียม stacking gel 10 % โดยใช้ acrylamide solution 30 % 670 ไมโครลิตร, ผสมกับ solution C (Tris-HCl 1.0 M pH 6.8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร, SDS 10% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 46 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2.3 มิลลิลิตร, แอมโมเนียมซัลเฟต 10% 30 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ phosphorylase b น้ำหนักโมเลกุล 97,000 ดาลตัน, albumin น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน, ovalbumin น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน, carbonic anhydrase น้ำหนักโมเลกุล 30,000 ดาลตัน, trypsin inhibitor น้ำหนักโมเลกุล 20,100 ดาลตัน, α - lactalalbumin น้ำหนักโมเลกุล 14,400 ดาลตัน

3.5.3.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์

ใช้ standard 200 ไมโครลิตรกับ sample buffer (Tris-HCl 1 M, SDS 10%, glycerol 50% (v/v), DTT 0.1 M และ bromophenol blue 1% pH 6.8 ส่วนสารละลายตัวอย่างใช้สารละลายตัวอย่างและสีตามรอยในอัตราส่วน 4:1 (ความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ในช่วง 0.5 - 1.0 mg/ml) นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.5.3.2.1 การทำอิเลกโทรโฟลิซิส

วิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1.2.2 แต่เปลี่ยนสารละลายทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ที่เติม SDS ลงไปด้วย และปริมาตรโปรตีนที่ใช้ 1-20 ไมโครลิตร/หลุม

การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

วัดระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่และระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่ในแผ่นเจลแล้วคำนวณหา mobility ดังนี้

relative mobility = ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่/ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่

คำนวณค่า relative mobility ของนิวทรัลโปรติเอสแล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน

3.5.4 การเตรียม substrate - containing SDS zymogram gel

เพื่อใช้ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสโดยใช้ casein เป็น substrate โดยเป็นวิธีการนำ เอสดีเอส - พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิสมาประยุกต์ใช้โดยเติม casein ลงไปด้วยเพื่อเป็นการยืนยันแถบที่มีโปรติเอสแอคติวิตีโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 3.5.3

seperating gel 12% : 10 ml สำหรับ minislabs

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
acrylamide-bisacrylamide, 30%:0.8%	4
Tris-HCl 1.5 M buffer (pH 8.8)	2.5
casein (0.012 กรัม/มิลลิลิตร)	1
SDS 10 %	0.1
Ammonium sulfate 10% (w/v)	0.1
TEMED	0.04
น้ำกลั่น	2.3
ปริมาตรรวม	10

Stacking gel 5% : 2 ml สำหรับ minislabs

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ml)
acrylamide-bisacrylamide, 30%:0.8%	0.33
Tris-HCl 1.0 M buffer (pH 6.8)	0.25
SDS 10 %	0.02
Ammonium sulfate 10% (w/v)	0.02
TEMED	0.002
น้ำกลั่น	1.38
ปริมาตรรวม	2 ml

การเตรียมสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.5.3.2 ส่วนการทำอิเลกโทรโฟริซิสเช่นเดียวกับข้อ 3.5.3.2.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.4.1 ขั้นตอนการทำ Zymogram reaction

หลังจากขั้นตอนการทำอิเลกโทรโฟริซิสแล้วให้นำเจล มาบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าตลอดเวลาใช้ Triton X-100 2.5 % กับ Tris-HCl pH 7.4 จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเพื่อล้าง Triton X-100 ออก และนำไปบ่มใน Zymogram reaction buffer (30 mM Tris-HCl , pH 7.4, NaCl 200 mM, CaCl 10 mM, Brij - 35) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย้อมด้วยสีย้อม (Comassie brilliant blue 0.5%) เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง และ destain ด้วย destaining solution (methanol 10% และ acetic acid 5 %) ปริมาตร 100 ml เป็นเวลา 20 นาที ขึ้นไป

3.6 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี จลนศาสตร์ของโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน

3.6.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.1.4 ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 37 องศาเซลเซียส ถึง 90 องศาเซลเซียส

3.6.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ (thermal stability)
นำเอนไซม์มาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆในช่วงระหว่าง 55 องศาเซลเซียส ถึง 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือตามวิธีในข้อ 3.1.4

3.6.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์กับสับสเตรทในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 6.0 - 7.0 (phosphate - buffer 0.1 M), pH 7.0 - 10.0 (Tris-HCl buffer 0.1 M), pH 10.0-12.0 (Glycine-NaOH 0.1 M)จากนั้นวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.1.4

3.6.4 การศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ (pH stability)

นำเอนไซม์มาบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ คือ 8.0, 10.0 และ 11.0 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ในข้อ 3.3.3 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีที่เหลือ

3.6.5 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

3.6.5.1 ใช้ casein ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติ เตรียมที่ความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 10

มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามข้อ 3.1.4 และ หาค่า K_m , V_{max} ของสับสเตรทโดยอาศัยการพลอตแบบ Lineweaver-Burk plot

3.6.5.2 ใช้ azocaseinซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์ เตรียมที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามข้อ 3.1.4 และ หาค่า K_m , V_{max} ของสับสเตรทโดยอาศัยการพลอตแบบ Lineweaver-Burk plot

3.6.6 การศึกษาผลของตัวเร่งการทำงาน ตัวยับยั้ง และไอออนของโลหะ ต่อการทำงานของโปรติเอส

3.6.6.1 การศึกษาผลของตัวเร่งการทำงานของโปรติเอส

บ่มสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร กับ Tris-HCl buffer 0.1 M pH 7.0 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร กับแคลเซียมอิออน ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 mM เป็นเวลา 20 นาที ที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นำไปหาแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.1.4 โดยทำเทียบกับ crude enzyme ที่มาจาก *B. cereus* สำหรับเอนไซม์จาก *B.subtilis* TISTR 25 ก็ทำเช่นเดียวกัน

3.6.6.2 การศึกษาผลของตัวยับยั้งโปรติเอส

บ่มสารละลายเอนไซม์ 0.1 ml กับ 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.0 ปริมาตร 0.9 ml กับ EDTA ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0, 2,4,6,8 และ 10 mM เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 55 ^{o}C นำไปหาแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.1.4 โดยทำเทียบกับ Crude enzyme ที่มาจาก *B.cereus* สำหรับเอนไซม์จาก *B.subtilis* TISTR 25 ก็ทำเช่นเดียวกัน

3.6.6.3 การศึกษาผลของไอออนของโลหะ

บ่มสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร กับ Tris-HCl 0.1 M buffer pH 7.0 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตรที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารชนิดใดชนิดหนึ่งต่อไปนี้ คือ $ZnSO_4.7H_2O$, $CoCl_2.6H_2O$, $NaNO_2$, $Ni(NO_3)_2.6H_2O$, $Co(NO_3)_2.6H_2O$, $MnSO_4.H_2O$. $FeSO_4.7H_2O$, $MgCl_2$, $CaCl_2.2H_2O$, $MgSO_4$, $HgCl_2$, $Cu_2SO_4.5H_2O$, LiCl, $FeCl_3.6H_2O$ อย่างละ 10 mM เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสนำไปหาแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.1.4

3.7 การศึกษาอุณหภูมิของการเก็บรักษาเอนไซม์ที่ภาวะต่างๆ

ศึกษาการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปผงที่อุณหภูมิห้อง สารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และสารละลายเอนไซม์ที่เติม glycerol 10% โดยเก็บที่อุณหภูมิต่างๆดังนี้ –20 องศาเซลเซียส, 0 องศาเซลเซียส, 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน แล้วจึงนำมาวัดแอคติวิตีที่เหลือตามข้อ 3.1.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรติเอสทนร้อนจากตัวอย่างดินในประเทศไทย

ขั้นตอนแรกในการเก็บตัวอย่างดิน คือ การวาดรูปของสถานที่และแหล่งที่เก็บตัวอย่างดินและรายละเอียดอื่นๆ เช่น ตัวอย่างดินนั้นห่างจากขอบบ่อกี่เมตร ขุดลึกลงไปเท่าใด หรือขุดจากบริเวณใด ซึ่งจากรูปที่ 4.1 แสดงดังข้างล่างนี้แสดงถึงการเก็บตัวอย่างดินบริเวณบ่อน้ำทิ้งยางพารา จ. ระยอง โดยเป็นการเก็บดินบริเวณขอบบ่อ

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรติเอสทนร้อนจากตัวอย่างดินบริเวณน้ำพุร้อน บ่อน้ำทิ้งยางพารา บ่อเลี้ยงกุ้ง (ภาคเหนือ : เชียงใหม่, เชียงราย, แม่ฮ่องสอน, ลำปางและตาก ภาคกลาง : ราชบุรีและกาญจนบุรี ภาคตะวันออก : จันทบุรีและระยอง ภาคใต้ : ระนองและกระบี่ รวมทั้งสิ้น 63 ตัวอย่างดิน) โดยชั่งตัวอย่างดินน้ำหนัก 1 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วนำไป spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อคือ nutrient agar (meat extract 0.5 %, peptone 1%, NaCl 0.5%, agar 2%, pH 7.0 โดยใช้ปริมาณของสารละลายตัวอย่างดิน คือ 10 μl, 100 μl และ 500 μl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง การ spread plate แสดงดังรูปที่ 4.2 หลังจากนั้นเขี่ยโคโลนีที่เกิดขึ้นลงบน nutrient agar เพื่อทำเป็น master plate หรือ streak เชื้อให้เกิดเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียโดยใช้เกณฑ์ลักษณะโคโลนีได้ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 4.1

4.1.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสครั้งที่1

หลังจากได้เชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ จาก nutrient agar ซึ่งเป็น master plate แล้ว จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นแล้ววัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่า แบคทีเรียที่ให้ขนาดวงใสใหญ่ที่สุดมีทั้งหมด 3 ชนิด คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6, แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 11 และ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12 ซึ่งทั้ง 3 ชนิดมีขนาดวงใส 0.16 $cm.^2$ แสดงผลดังตารางที่ 4.2

4.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสครั้งที่ 2

หลังจากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 12 ที่ให้วงใสจากการคัดเลือกครั้งที่ 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth ที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย ขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดที่เลี้ยงเชื้อไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อ

นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ และ pH ต่างๆ จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 20 μl มาใส่บนหลุมของอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar plate เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดส่วนใสที่เกิดขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.4 เพื่อนำไปเทียบกับครั้งที่ 1 เพื่อดูการทำงานของเอนไซม์สำหรับเป็นแนวทางในการนำไปทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในเชิงคุณภาพ จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีช่วงการทำงานของอุณหภูมิที่สูง และ pH ในช่วงที่กว้าง คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2, แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 5 และแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 ซึ่งสามารถให้วงใสได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 37 องศาเซลเซียส ถึง 90 องศาเซลเซียส และ pH ในช่วงระหว่าง pH 7.0 - 12.0 ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.4 และ ตารางที่ 4.5

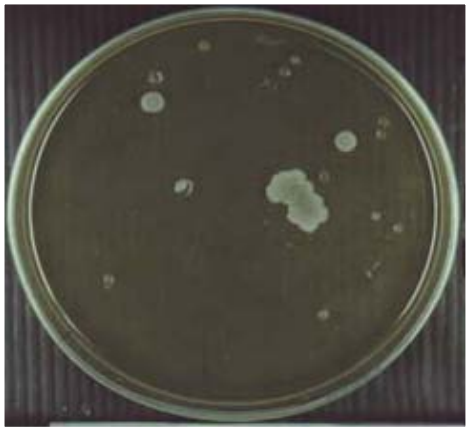
4.1.4 การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้วิธี azocasein hydrolysis (Raja Noor, 1994)

หลังจากทราบภาวะที่เหมาะสมอย่างคร่าวๆจากข้อ 4.1.1 - 4.1.3 สามารถเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 ซึ่งมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ มาทดสอบหาแอคติวิตีของเอนไซม์โดยวิธี azocasein hydrolysis (Raja Noor, 1994) ซึ่งเป็นการหาแอคติวิตีของเอนไซม์เชิงปริมาณ วิธีการทดลองดังข้อ 3.1.4 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของโปรติเอสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 4.5 และ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานคือที่ 7.0 ดังรูปที่ 4.6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.1 การเก็บตัวอย่างดินบริเวณขอบบ่อน้ำทิ้งยางพารา จ. ระยอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 โคโลนีที่เกิดจากการ spread บน nutrient agar plate

รูปที่ 4.3 การเกิดวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar plate จากการการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสครั้งที่ 1

รูปที่ 4.4 การเกิดวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar plate จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสครั้งที่ 2

ตารางที่ 4.1 แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทยมีทั้งหมด 12 สายพันธุ์ ดังนี้

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	แหล่งที่มาของตัวอย่างดิน
1. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 1	ดินจาก อ. ฝาง จ. เชียงใหม่
2. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2	ดินจากบ่อคลึง จ. ราชบุรี
3. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 3	ดินจาก จ. ยะลา
4. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 4	ดินจากบ่อคลึง ห่างจากขอบบ่อ 1 เมตร จ. ราชบุรี
5. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 5	ดินจากบ่อคลึง จ. ราชบุรี
6. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6	ดินจากก้นบ่อน้ำเค็มร้อน จ. กระบี่
7. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 7	ดินจากบ่อคลึง จ.ราชบุรี
8. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 8	ดินจากก้นบ่อน้ำเค็มร้อน จ. กระบี่
9. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 9	ดินจากสันกำแพง ห่างจากขอบบ่อ1 เมตร จ. เชียงใหม่
10. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 10	ดินจากบ่อคลึง ห่างจากขอบบ่อ1 เมตร จ. ราชบุรี
11. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 11	ดินจ. ยะลา
12. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12	ดินจากบ่อหินดาด ห่างจากขอบบ่อ2 เมตร จ. กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ขนาดวงใสของแบคทีเรียจากการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสครั้งที่ 1

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย มม.	พื้นที่วงใส (ซม.^{2})
1. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 1	20.5	0.03
2. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2	21.0	0.03
3. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 3	19.0	0.03
4. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 4	20.5	0.03
5. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 5	22.5	0.04
6. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6	23.0	0.04
7. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 7	21.5	0.03
8. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 8	18.5	0.03
9. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 9	22.5	0.03
10. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 10	22.5	0.04
11. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 11	23.0	0.04
12. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12	23.0	0.04

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ขนาดวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดสอบเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อที่คัดเลือกได้

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มม.)	พื้นที่วงใส (ซม.^{2})
1. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 1	25.0	0.05
2. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2	26.5	0.05
3. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 3	25.0	0.05
4. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 4	28.0	0.06
5. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 5	25.0	0.05
6. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6	28.0	0.06
7. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 7	25.0	0.05
8. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 8	25.0	0.05
9. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 9	25.5	0.05
10. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 10	25.5	0.05
11. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 11	26.0	0.05
12. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12	20.5	0.03

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ขนาดวงใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดสอบโปรติเอสที่บ่มไว้ ในช่วงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถึง 100 องศาเซลเซียส

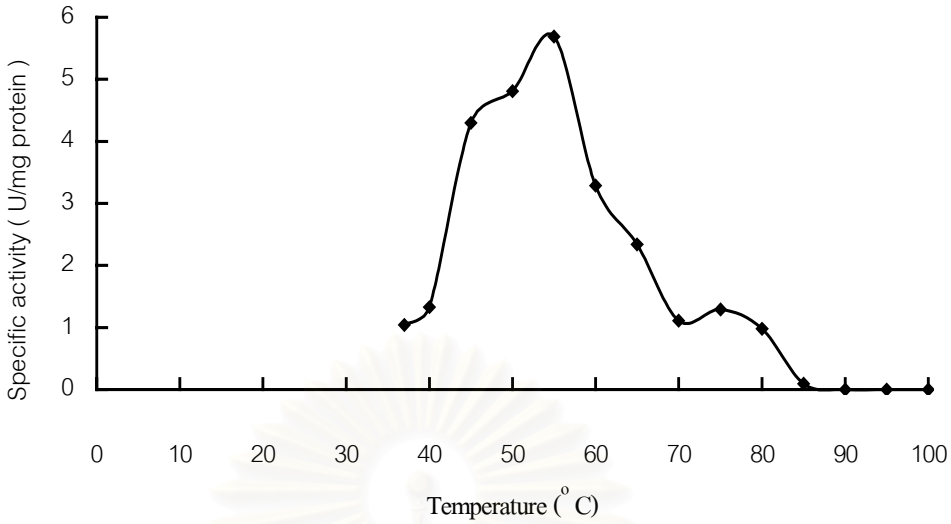
สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ขนาดของวงใส (ซม.^{2})ที่อุณหภูมิต่างๆ							
	37^{o}C	40 ^{o}C	50 ^{o}C	60 ^{o}C	70 ^{o}C	80 ^{o}C	90 ^{o}C	100 ^{o}C
1.สายพันธุ์ที่ 1	0.03	0.03	0.02	0.02	-	-	-	-
2.สายพันธุ์ที่ 2	0.03	0.04	0.01	0.03	0.02	0.02	0.02	-
3.สายพันธุ์ที่ 3	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	-	-
4.สายพันธุ์ที่ 4	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	-	-
5.สายพันธุ์ที่ 5	0.04	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	-
6.สายพันธุ์ที่ 6	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02	-	-
7.สายพันธุ์ที่ 7	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	-	-
8.สายพันธุ์ที่ 8	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	-	-
9.สายพันธุ์ที่ 9	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	-	-
10.สายพันธุ์ที่ 10	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	-	-
11.สายพันธุ์ที่ 11	0.04	0.04	0.03	0.03	0.02	0.03	-	-
12.สายพันธุ์ที่ 12	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

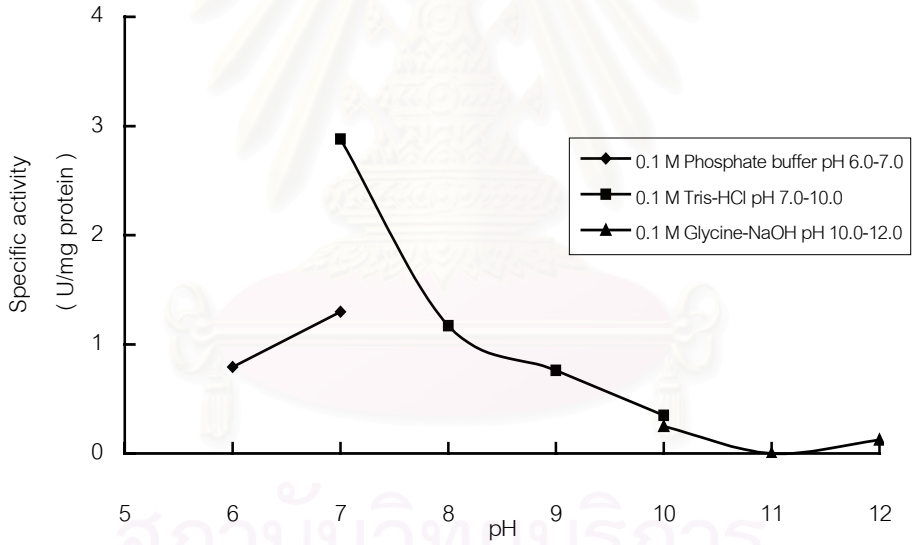
ตารางที่ 4.5 ขนาดของวงใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดสอบโปรติเอสที่บ่มไว้ในช่วง pH 7.0 - 12.0

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ขนาดของวงใส (ซม.^{2}) ที่ pH ต่างๆ									
	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0	pH 10.0	pH 11.0	pH 12.0
1.สายพันธุ์ที่ 1	0.02	0.01	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04
2.สายพันธุ์ที่ 2	-	-	-	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.01	-
3.สายพันธุ์ที่ 3	0.01	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	-
4.สายพันธุ์ที่ 4	0.02	0.03	0.03	0.04	0.04	0.040	0.04	0.04	0.04	0.01
5.สายพันธุ์ที่ 5	0.01	0.02	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	-
6.สายพันธุ์ที่ 6	0.02	0.02	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	-
7.สายพันธุ์ที่ 7	0.02	0.02	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	-
8.สายพันธุ์ที่ 8	0.02	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02
9.สายพันธุ์ที่ 9	0.02	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.01
10.สายพันธุ์ที่ 10	0.02	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	-
11.สายพันธุ์ที่ 11	0.03	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	-
12.สายพันธุ์ที่ 12	-	0.02	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04		-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอสที่ pH 7.0 จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6



รูปที่ 4.6 ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของโปรติเอสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

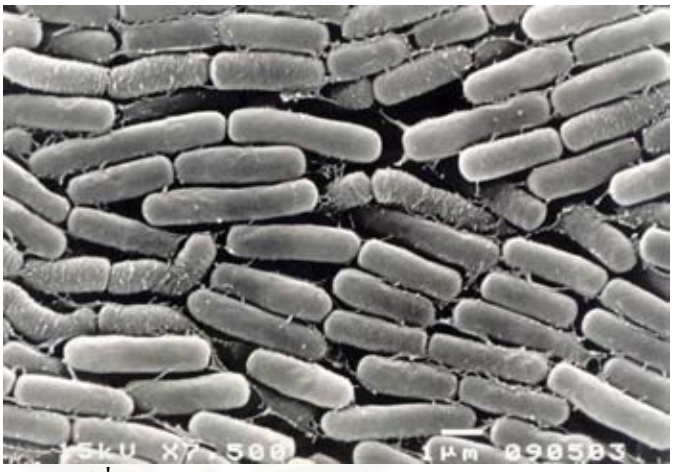
ก) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (ภาคผนวก ฉ ข้อ 1) ให้ได้อายุ 18 - 24 ชั่วโมงนำมาจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีของ Bergey (Sneath และ คณะ, 1986) พบว่าการย้อมสีแกรม (gram stain) แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 ให้ลักษณะการติดสีแบบแกรมบวก คือ ติดสีน้ำเงิน มีรูปร่างแบบแท่ง มีสปอร์ ลักษณะดังรูปที่ 4.7

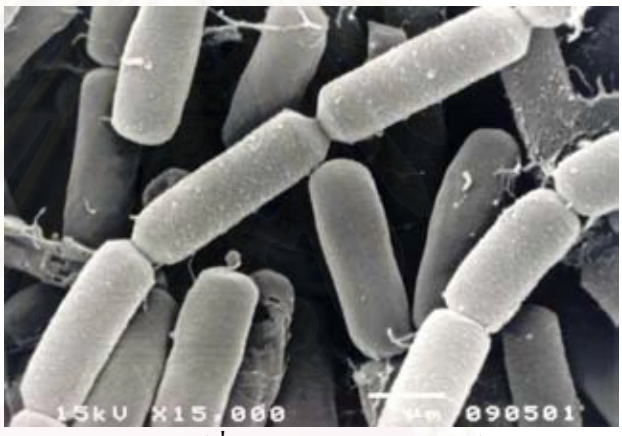
รูปที่ 4.7 การย้อมสีแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) ที่มีกำลังขยาย 100 เท่า

ข) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscope)

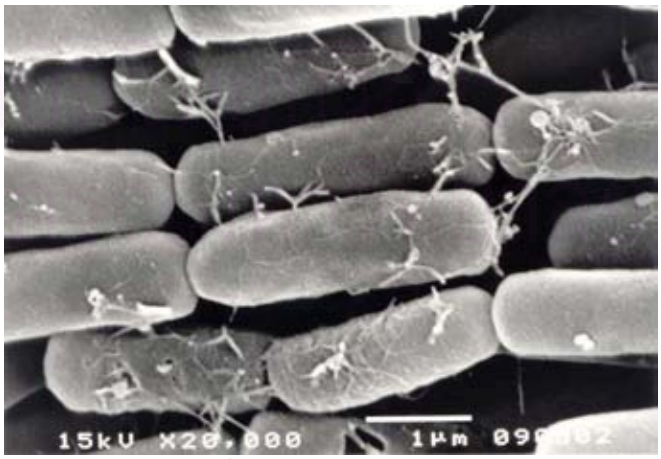
เพื่อดูขนาดความกว้าง ยาว ของแบคทีเรีย จากการใช้ scanning electron microscope (SEM) ซึ่งสามารถดูภาพวัตถุได้ถึง 3 มิติ จากรูปที่ 4.8 - 4.10 แสดงขนาดภาพของแบคทีเรียชนิดที่ 6 มีขนาด 7,500, 15,000 และ 20,000 เท่า ตามลำดับ พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 จำแนกตามวิธีของ Bergey (Sneath และ คณะ, 1986) มีขนาดเซลล์มีความกว้าง 1.0 - 1.2 μm และ ยาว 3 - 5 μm



รูปที่ 4.8 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscope) ที่มีกำลังขยาย 7,500 เท่า



รูปที่ 4.9 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscope) ที่มีกำลังขยาย 15,000 เท่า

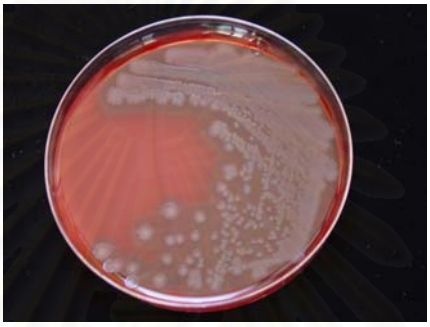


รูปที่ 4.10 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscope) ที่มีกำลังขยาย 20,000 เท่า

4.2.2 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test)

ได้รับความอนุเคราะห์การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ผลการทดสอบดังนี้

ก) ลักษณะการเกิด hemolysis ใน blood agar ดูลักษณะการเกิด hemolysis พบว่าเป็นแบบ β - hemolysis มีลักษณะดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 การเกิด hemolysis ใน blood agar ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6

ข) ดูลักษณะการย่อยน้ำตาล 3 ชนิดโดยใช้ Triple sugar iron agar (TSI agar) คือ glucose 0.1%, lactose 1%, sucrose 1% พบว่า ปฏิกิริยาเป็น K/A และไม่สร้าง H_2S เนื่องจากบริเวณผิวหน้าของ slant ที่มีปริมาณเชื้อมากกว่าบริเวณอื่นมีการใช้น้ำตาล glucose ไปจนหมดแล้วแต่เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาล lactose หรือ sucrose ได้จึงหันไปใช้โปรตีนที่มีอยู่ในอาหารทำให้ slant มีความเป็นด่าง (เปลี่ยนสี phenol red เป็นสีแดง) ส่วนบริเวณก้นหลอด (butt) เชื้อสามารถใช้น้ำตาล glucose ในสภาพที่ไม่มีอากาศได้ดีจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรด (เปลี่ยนสี phenol red เป็นสีเหลือง) และเชื้อนี้ไม่สร้าง H_2S เนื่องจากไม่เกิดตะกอนสีดำที่ก้นหลอด

ค) การทดสอบ motility ซึ่งสามารถตรวจดูการเจริญนอกรอย semisolid agar slab พบว่ามีการเจริญออกไปตามนอกรอยที่ slab ไว้ แสดงว่ามี motility เกิดขึ้น

ง) การทดสอบ citrate พบว่าเชื้อมีความสามารถในการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนในขบวนการ metabolism และให้ผลผลิตที่เป็นด่างซึ่งสามารถเปลี่ยนสี indicator เป็นสีน้ำเงินได้

จ) การทดสอบ urease พบว่าเชื้อไม่สามารถย่อย urea ได้ดังนั้นสีของ urea จึงเหมือนเดิม

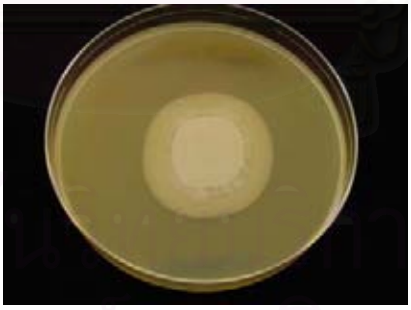
ฉ) การทดสอบ nitrate พบว่าผลการทดสอบเป็นบวก คือ หลังจากทำการทดสอบตามข้อ 3.2.2.7 แล้วเกิดสีแดงภายใน 1 - 2 นาที แต่ไม่มี N_2 (gas) เกิดขึ้น

ช) การทดสอบ esculin hydrolysis พบว่าเกิดสารสีดำขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถ hydrolyse glycoside esculin เป็น esculetin ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ ferric ammonium citrate ได้สารสีดำเกิดขึ้น

ซ) การทดสอบ Voges - Proskauer (VP) พบว่าไม่เกิดวงสีชมพูเกิดขึ้นหลังจากทำการทดสอบตามข้อ 3.2.2.9 แสดงว่าเชื้อไม่มีความสามารถในการสร้างสาร acetyl - methyl carbinol (acetoin) จาก glucose ได้

ฌ) การทดสอบ gelatin liquefaction พบว่าเชื้อสามารถผลิต gelatinase ซึ่งสามารถย่อย gelatin ได้ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหลังทำตามข้อ 3.2.2.10

ญ) การทดสอบ lecithinase test พบว่าเกิด zone ขุ่นรอบๆโคโลนีแสดงว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ lecitinase ได้คือเมื่อ hydrolyse lecithin แล้วได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น diglyceride และ phosphorylcholine ก่อให้เกิดความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากไม่ละลายน้ำแสดงดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 การทดสอบ lecithinase test ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6
ซึ่งเกิด zone ขุ่นรอบๆ โคโลนีของเชื้อ

ฎ) การทดสอบ carbohydrate fermentation test พบว่าน้ำตาลที่เชื้อสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน คือ glucose แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล mannitol, xylose และ arabinose ได้

จากผลการทดลองจากข้อ 4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ 4.2.2 การทดสอบทางชีวเคมีตามวิธีของ Bergey (Sneath และ คณะ, 1986) สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้เป็น *B. cereus* จากการทดสอบทางชีวเคมีตามข้อ 4.2.2 ข้อ ก - ฎ สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 โดยใช้วิธีทางชีวเคมี

การทดสอบลักษณะของแบคทีเรีย	ผลที่ได้จากการวิเคราะห์
1.การย้อมสีแกรม	แกรมบวก มีสปอร์
2.ชนิดของการเจริญเติบโตบน Blood agar (24 hours)	β - hemolysis (large)
3. TSI	K/A
4. H_2S	-
5. motility	+
6. indole	-
7. citrate	+
8. urease	-
9. nitrate	+
10. N_2 gas	-
11. esculin	+
12. VP	+ / W
13. gelatinase	+
14. egg yolk agar (lecithinase test)	+
15. sugar base	-
16. glucose / gas	+
17. mannitol	-
18. D- xylose	-
19. L- arabinose	-

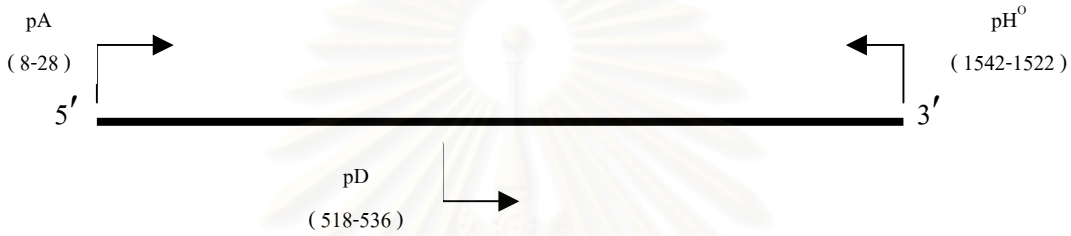
4.2.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rRNA gene

เพื่อเป็นการยืนยันผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียชนิดที่ 6 ที่ได้จากข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 มาสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (ข้อ 3.2.3.1)แล้วนำมาทำ PCR (ข้อ 3.2.3.2)โดยไพรเมอร์ที่ใช้มีดังนี้

primer A (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG)

primer D (CAG CAG CCG TAA TAC)

primer H^{o} (AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA)



รูปที่ 4.13 ทิศทางการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของไพรเมอร์แต่ละชนิดใน 16 S rRNA gene

จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นของดีเอ็นเอได้ขนาด 1,500 bp จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rRNA gene ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลโดยใช้ BLAST program ซึ่งจากการเปรียบเทียบแล้วพบว่าใกล้เคียงกับ *Bacillus cereus* ATCC 1479 มีความคล้ายคลึงกันถึง 99% แสดงดังรูปที่ 4.14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GNANGCTGGCGGCGTGCCTATCATGCAAGTCGCAGCGAATGGATTAA
GAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT
ACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTT
CGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTANCTAGTTGGTGA
GGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACNAAAGTCTGACGGAGCA
ACGCCGCGTGAGTGATGAANGCTTTCGGGTCGNAAAACTCTGTTGTT
AGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGNAC
CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCANCAGCCGCGNTAAT
ACGTAGGTGTGCANGCGTTATCCNNAATTATTGGGCGTAAAGCGCCN
CGCAAGNTGGTTTCTTAAGCTCTGATGNGAAAGCCCNCGNCNCNACC
GTGGAAGGGTCATTGNAAACNGGGAGAACTTCNAGTNCAGAAGAGG
AAAGAAAATNNNATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATAT
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACAC
TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCC
TTTAGTGNTGAAGTTAACGCATTAAGCACTNCCGCCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGCTGAAACTTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
CGGTGGANCATGTGGTTTAATTNGAAGCAACNCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTANANATAGGGCTTCTCCTTCGG
GAGCANAGATGACNNGTGGTGCATGGTTGTCNTCAGCTCNTGTCGTG
AGATGTTGGGTTAANTCCCGCAACGAAGCGCAACCCTTTGATCTTAG
CTTGCCATCATTANGATTNGGCACTCTAANGTGACTNCCCGGTTNAC
AANCCGGTTANGAATNGTNGNNTANNACNCTCAAATCNTCATGCCCC
TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCT
GCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCG
GATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAAT
CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
CCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGT
AACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGGA
AGTCGAACAAGGAGCCGnCGA

รูปที่ 4.14 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16 S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 บริเวณที่ขีดเส้นใต้เป็นบริเวณซ้อนกันของลำดับเบส เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยไพรเมอร์ต่างชนิดกัน

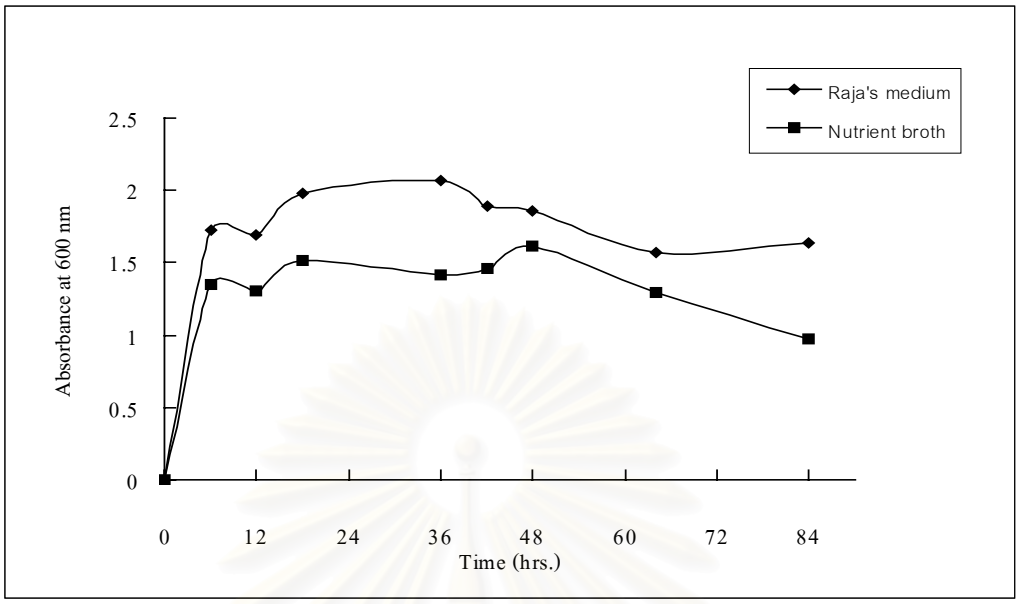
4.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตโปรติเอส

เมื่อทราบชนิดของเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ 6 ว่าคือ *B. cereus* จากผลการทดลองที่กล่าวแล้วข้างต้น จึงหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสของ *B. cereus* ซึ่งคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม, อุณหภูมิ, ความเป็นกรด - ด่าง, ปริมาณเชื้อเริ่มต้น, ความเร็วรอบในการเขย่า, แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น

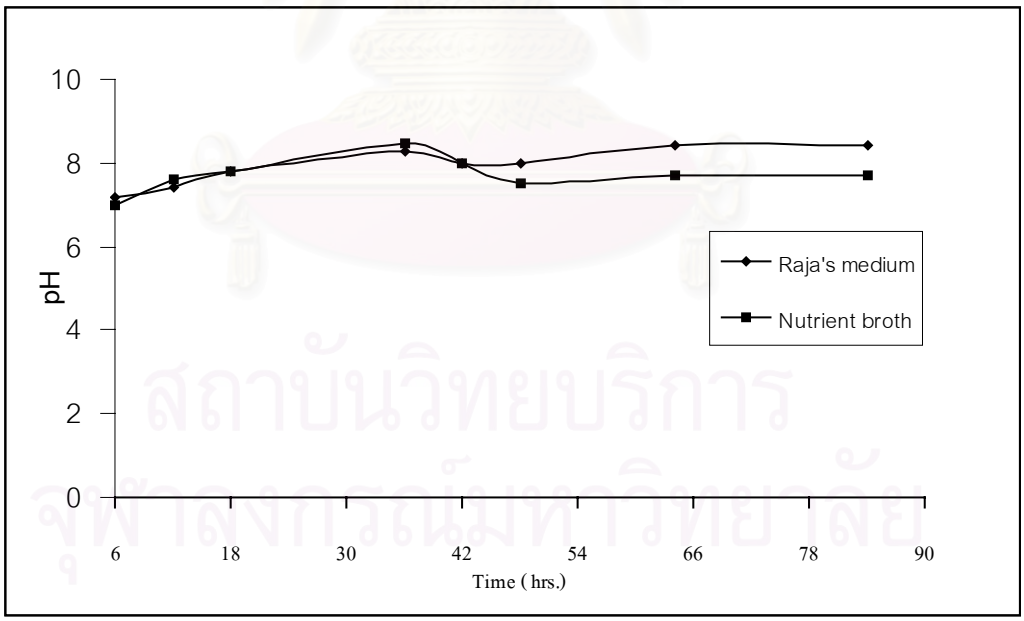
4.3.1 การทดสอบชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง Nutrient broth และ Raja's medium

การหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *B. cereus* เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ Nutrient broth และ Raja's medium ซึ่งจากรูปที่ 4.15 พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรก *B. cereus* มีการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ลักษณะการเจริญเติบโตหลัง 12 ชั่วโมงมีรูปแบบเพิ่มขึ้นเล็กน้อย คงที่ และลดลงในที่สุด ส่วนการเปลี่ยนแปลง pH จากรูปที่ 4.16 ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังมีการเจริญของเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมมากนักในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดคือเมื่อเริ่มเลี้ยง pH มีค่าเท่ากับ 7.0 หลังจาก 12 ชั่วโมงแรกมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในอาหารทั้ง 2 ชนิด และจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมี pH มากกว่า pH เริ่มต้นประมาณ 1 หน่วยในชั่วโมงที่ 36 สำหรับการสร้างเอนไซม์นั้นพบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกยังไม่มีการสร้างเอนไซม์แต่จะเริ่มสร้างเมื่อมีอัตราการเจริญของเชื้อคงที่ และมีการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 แอคติวิตีของเอนไซม์ใน Raja's medium มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 21.87 U/mg protein ส่วนใน Nutrient medium มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 4.57 U/mg protein ดังรูปที่ 4.17 ตามลำดับ ดังนั้นเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อที่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตเกิดได้อย่างรวดเร็วและสามารถให้เอนไซม์ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะที่ดีกว่าคืออาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ซึ่งจะได้หาปริมาณสัดส่วนแร่ธาตุที่เหมาะสม และภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

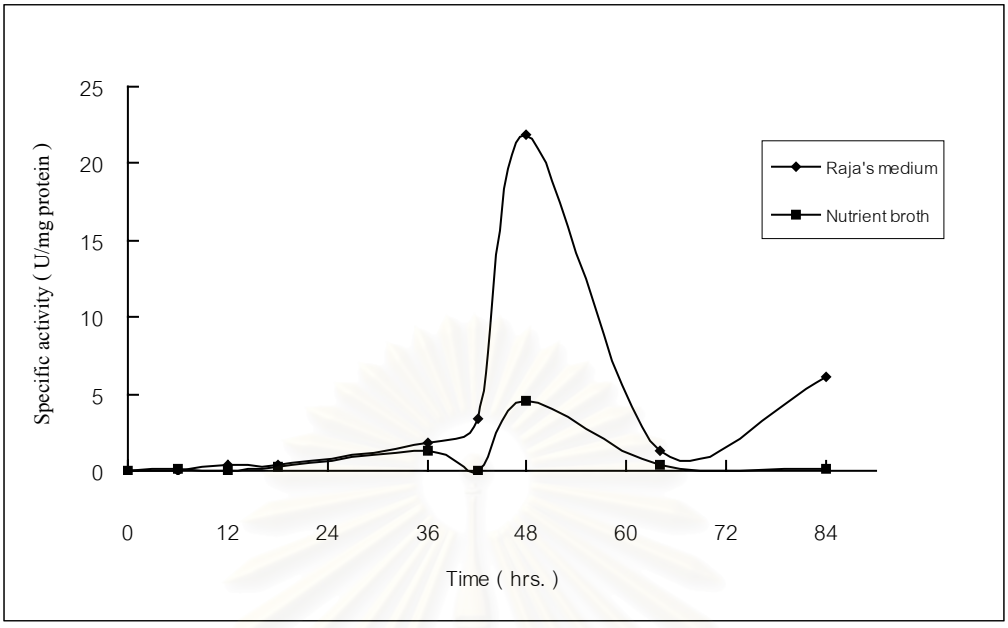


รูปที่ 4.15 อัตราการเจริญของเชื้อ *B.cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ Raja's medium และ Nutrient broth



รูปที่ 4.16 การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ Raja's medium และ Nutrient broth

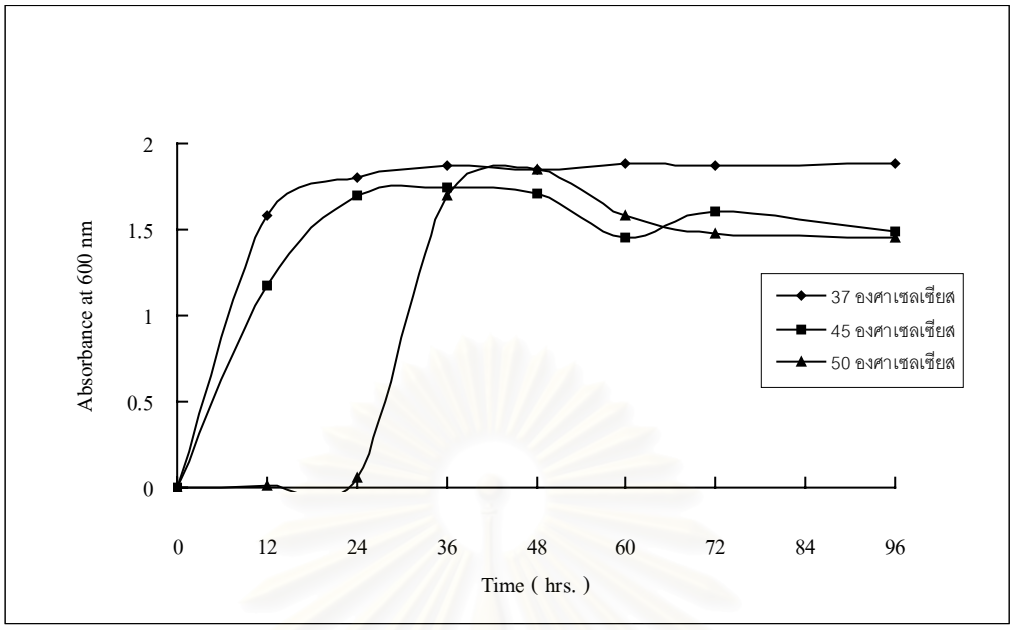
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



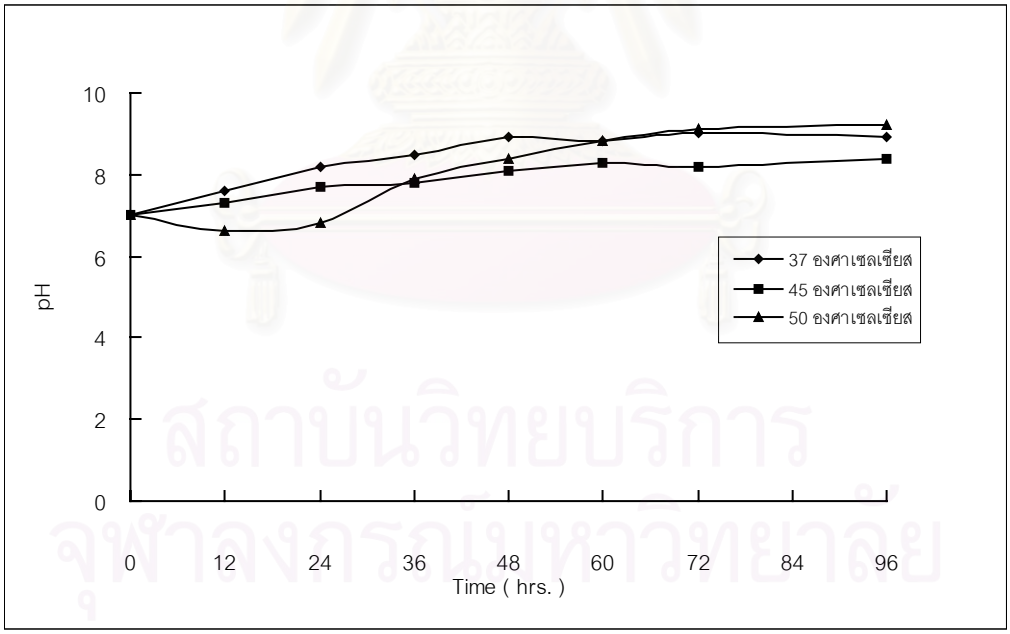
รูปที่ 4.17 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ Raja's medium และ Nutrient broth

4.3.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium

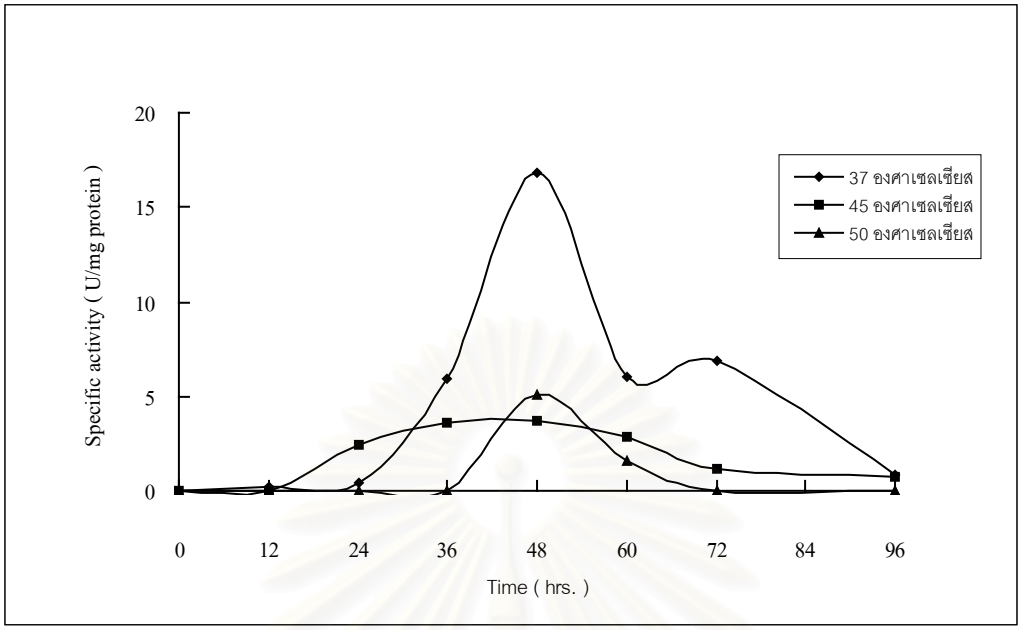
การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ *B. cereus* โดยนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium จากนั้นนำไปเลี้ยงในอุณหภูมิต่างๆกัน คือ 37 องศาเซลเซียส, 45 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า อัตราการเจริญของเชื้อสูงสุดในช่วง 0 - 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อจะมีการเจริญเติบโตได้เร็วและดีกว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส แสดงดังรูปที่ 4.18 ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่า pH พบว่าค่า pH จากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงดังรูปที่ 4.19 สำหรับการผลิตโปรติเอสนั้นพบว่าอุณหภูมิที่สามารถทำให้เกิดการผลิตโปรติเอสจาก *B. cereus* ได้มากที่สุดคือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเริ่มผลิตโปรติเอสหลังจากที่เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตคงที่ ค่าแอคติวิตีจำเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 16.82 U/mg protein ส่วนค่าแอคติวิตีจำเพาะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 3.70 U/mg protein และ 5.10 U/mg protein ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.18 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหาร Raja's medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 45 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส



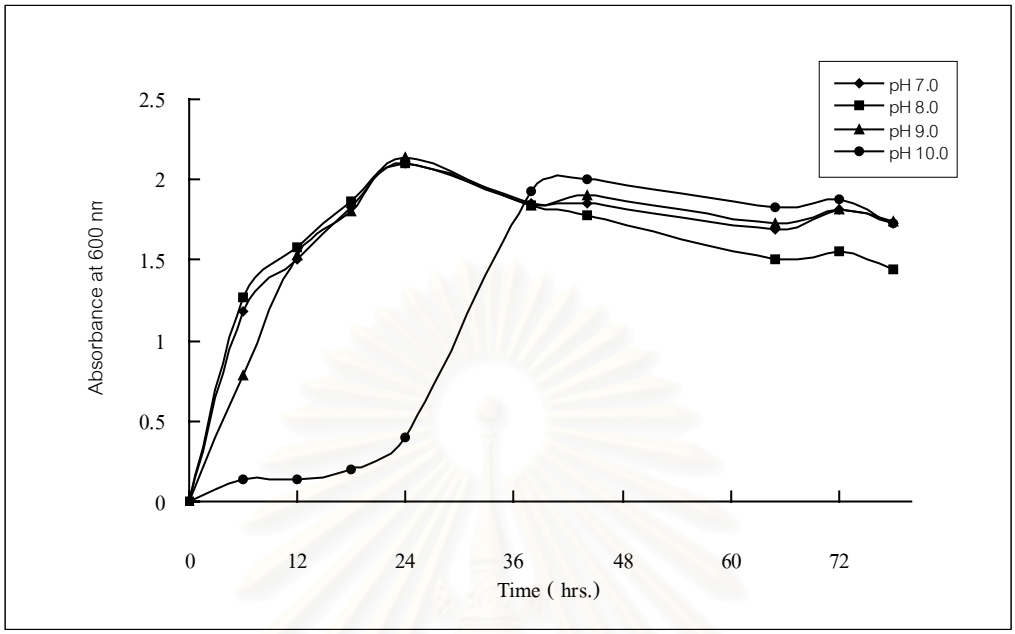
รูปที่ 4.19 การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหาร Raja's medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 45 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส



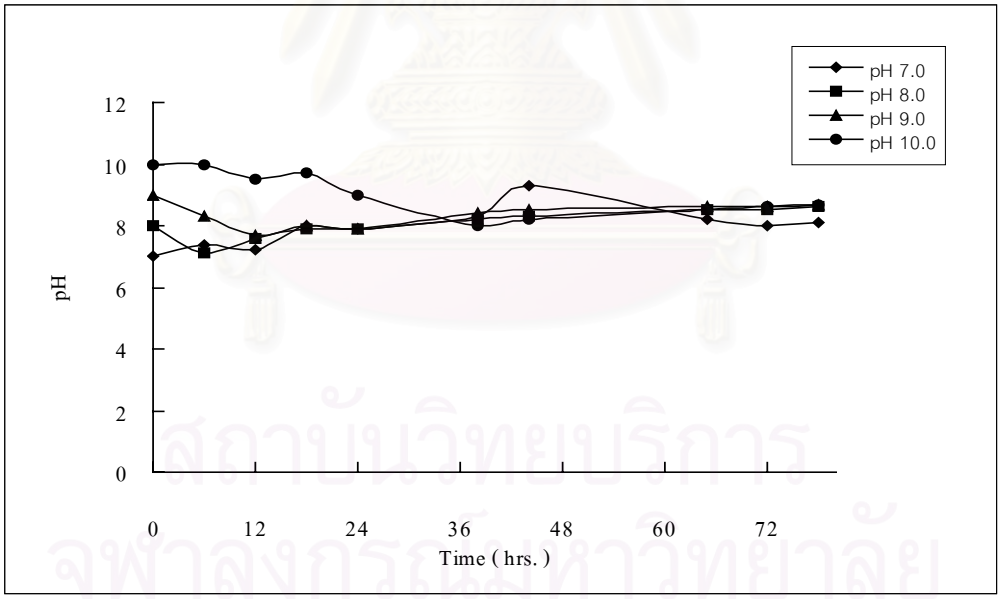
รูปที่ 4.20 การเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหาร Raja's medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส , 45 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส

4.3.3 การหาค่า pH ที่เหมาะสมในอาหาร Raja's medium

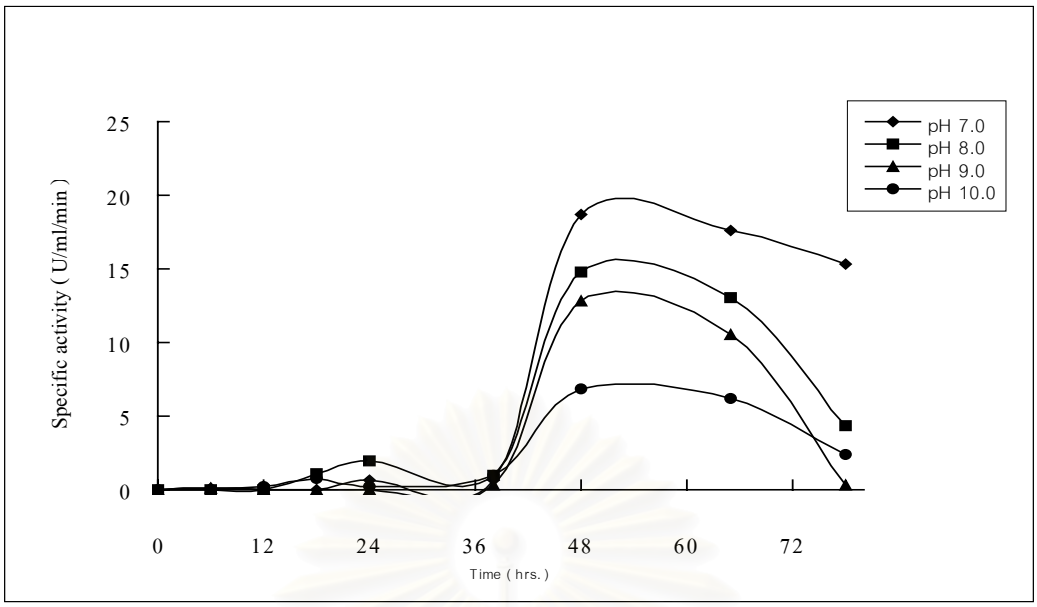
การหาค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ *B. cereus* เพื่อผลิตโปรติเอสพบว่าเชื้อสามารถมีการเจริญเติบโตได้ที่ pH 7.0, 8.0, 9.0 อัตราการเจริญสูงสุดช่วง 0 – 12 ชั่วโมง ส่วนที่ pH 10.0 เชื้อมีการเจริญเติบโตช้า แสดงดังรูปที่ 4.21 การเปลี่ยนแปลงของ pH พบว่า pH 7.0, 8.0, 9.0 มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของ pH เพิ่มขึ้นหลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนที่ pH 10.0 มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงในทางลดลง แสดงดังรูปที่ 4.22 สำหรับการสร้างเอนไซม์นั้นพบว่าเริ่มมีการสร้างเอนไซม์เมื่อเชื้อมีอัตราการเจริญคงที่คือหลังจาก 24 ชั่วโมง โดยมีการสร้างเอนไซม์ที่มีค่าแอคติวิตีสูงที่สุดที่ pH 7.0 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 18.75 U/mg protein ส่วนที่ pH 8.0, 9.0 และ 10.0 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 14.80, 12.79 และ 6.88 U/mg protein ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.21 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหาร Raja's medium ที่ pH 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0



รูปที่ 4.22 การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหาร Raja's medium ที่ pH 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0

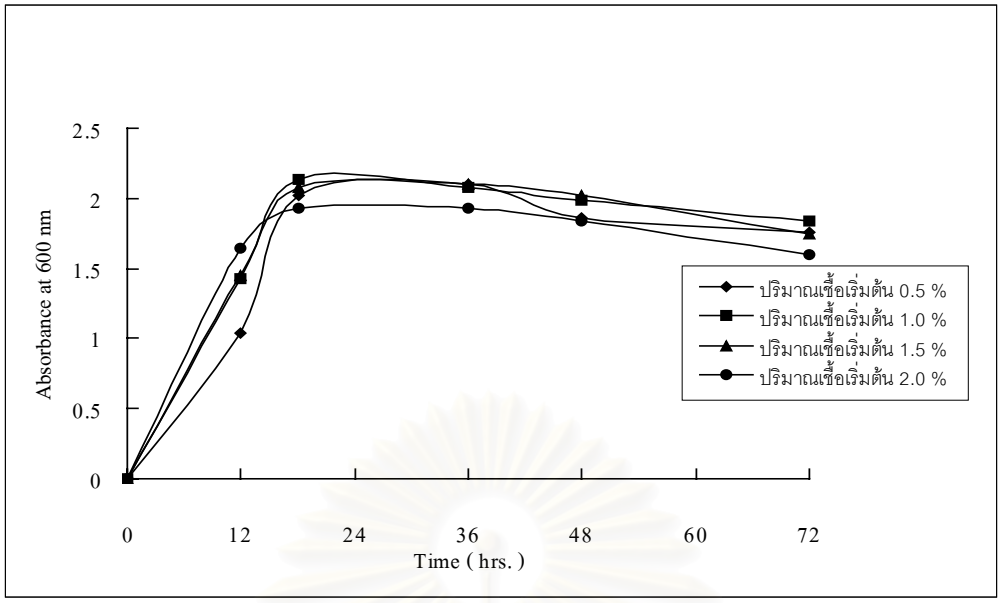


รูปที่ 4.23 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหาร Raja's medium ที่ pH 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0

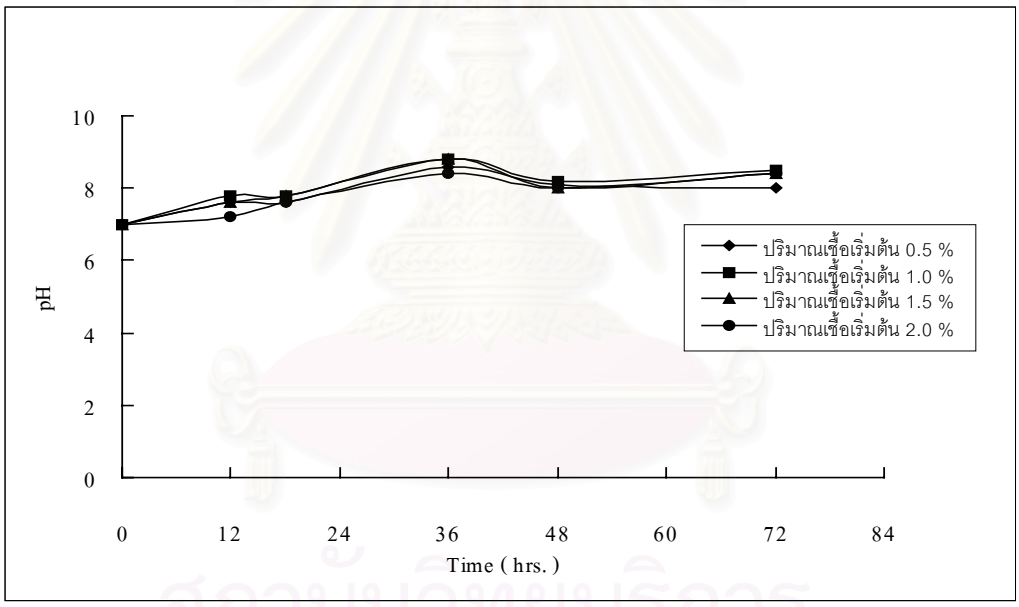
4.3.4 การหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในอาหาร Raja's medium

การหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ในอาหาร Raja's medium ที่อุณหภูมิ 37 °C, pH 7.0 พบว่า อัตราการเจริญของเชื้อในช่วง 0 - 12 ชั่วโมง การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5%, 1.0%,1.5% และ 2.0% (v/v) เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน แสดงดังรูปที่ 4.24 การเปลี่ยนแปลงค่า pH พบว่า ในการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ ค่า pH ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก แสดงดังรูปที่ 4.25 ส่วนการสร้างเอนไซม์นั้นพบว่าเอนไซม์จะเริ่มมีการสร้างหลังจากเชื้อมีการเจริญคงที่คือหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.5% (v/v) หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 36.11 U/mg protein ส่วนปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0%, 1.5% และ 2.0% (v/v) มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 25.91, 17.62, 22.24 U/mg protein ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.26

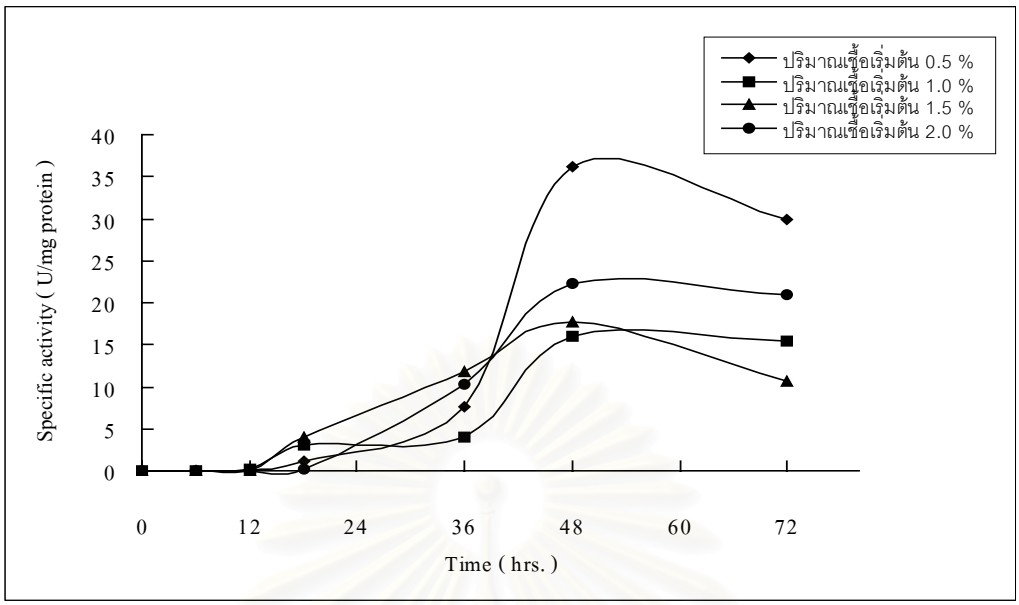
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.24 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหาร Raja's medium ที่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% (v/v)



รูปที่ 4.25 การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหาร Raja's medium ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% (v/v)

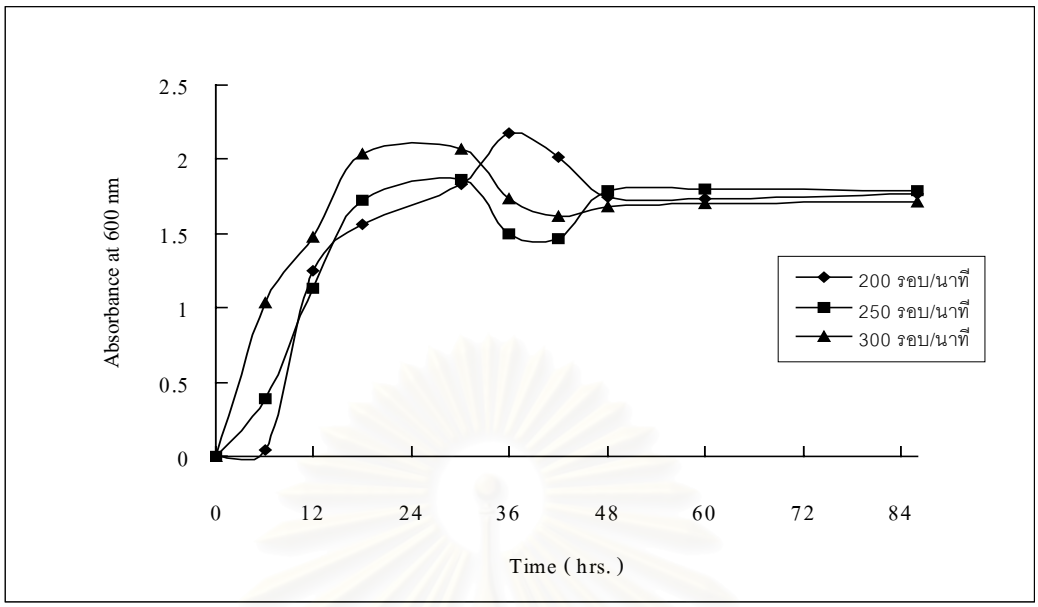


รูปที่ 4.26 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหาร Raja's medium ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% (v/v)

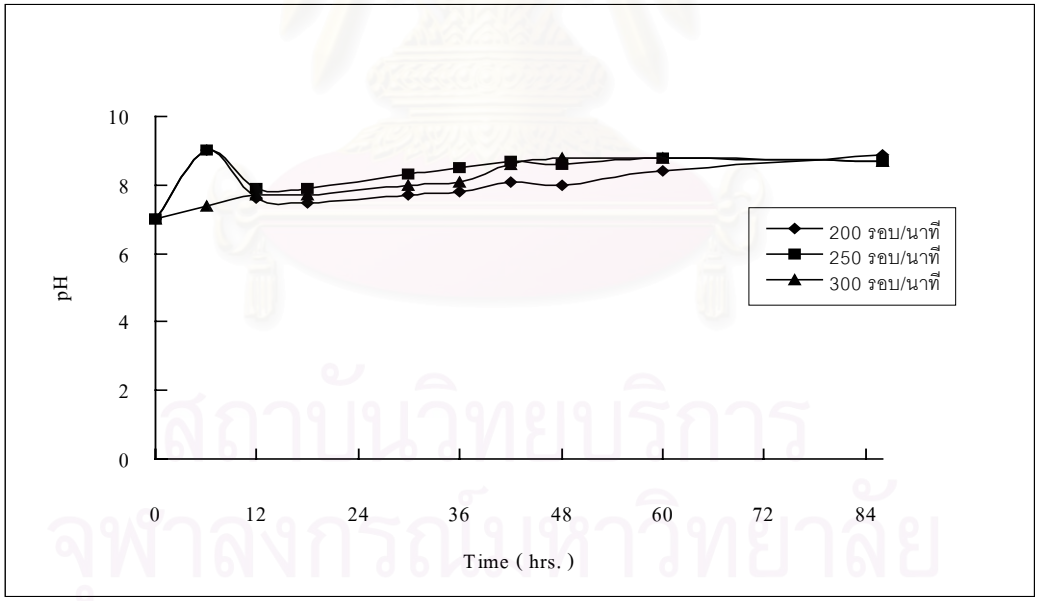
4.3.5 การหาความเร็วรอบที่เหมาะสมในอาหาร Raja's medium

การหาความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ในอาหาร Raja's medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH 7.0 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5% (v/v) พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อในช่วงเวลาที่ 0 - 12 ชั่วโมง การเขย่าที่ความเร็วรอบ 200, 250 และ 300 รอบ/นาที มีการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกัน แสดงดังรูปที่ 4.27 การเปลี่ยนแปลง pH พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้น 1 หน่วย หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.28 สำหรับการสร้างเอนไซม์จะเกิดในช่วงที่เชื้อมีการเจริญคงที่ ความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ 200 รอบ/นาที มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 38.72 U/mg protein และค่าแอคติวิตีจำเพาะที่ความเร็วรอบ 250 และ 300 รอบ/นาที มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 29.1 และ 16.61 U/mg protein ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.29

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

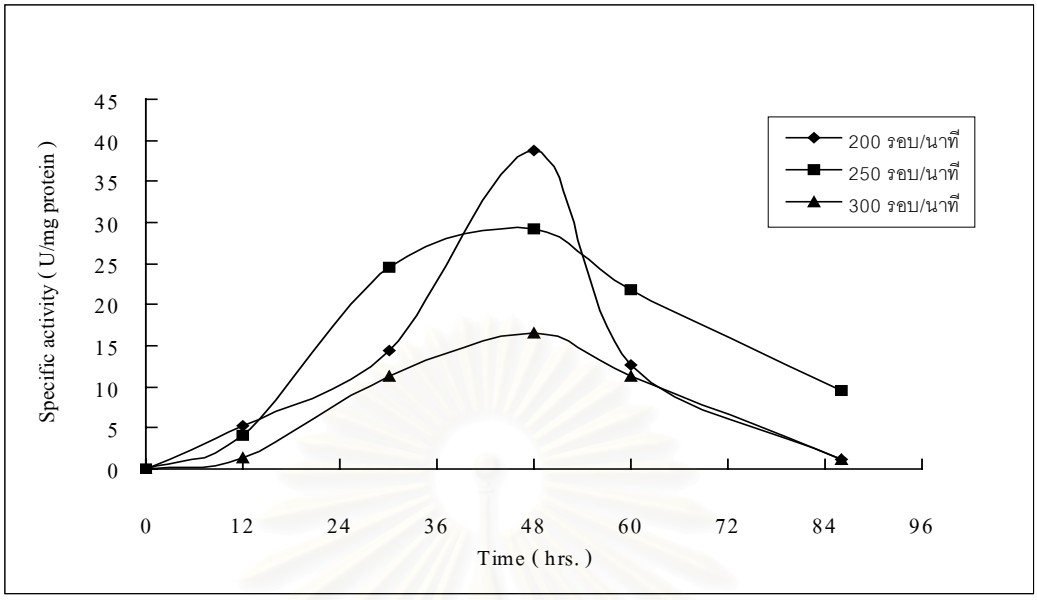


รูปที่ 4.27 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหาร Raja's medium ที่ความเร็วรอบ 200, 250 และ 300 รอบ/นาที



รูปที่ 4.28 การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหาร Raja's medium ที่ความเร็วรอบ 200, 250 และ 300 รอบ/นาที

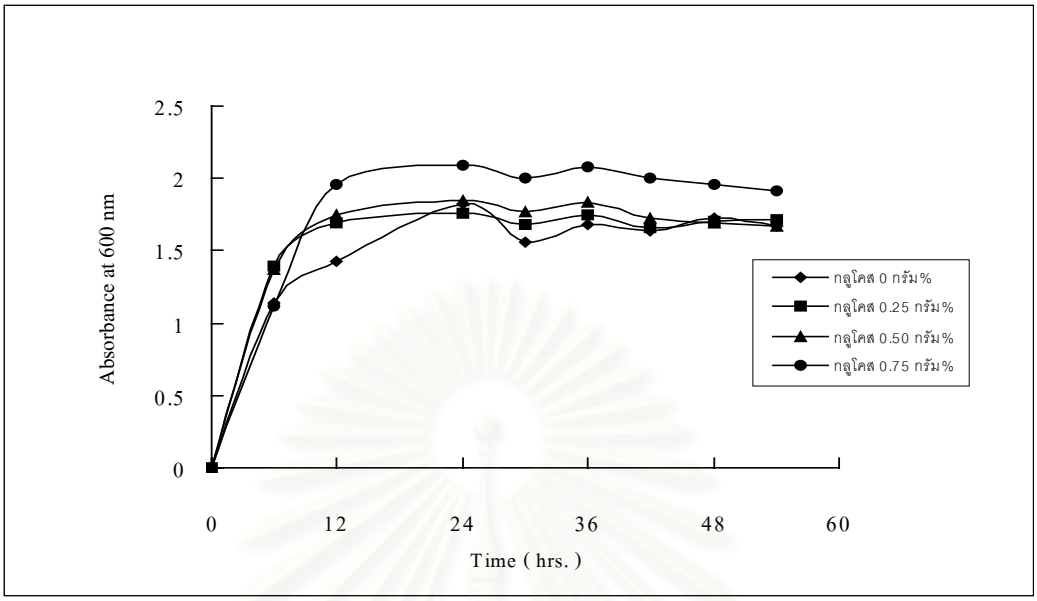
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



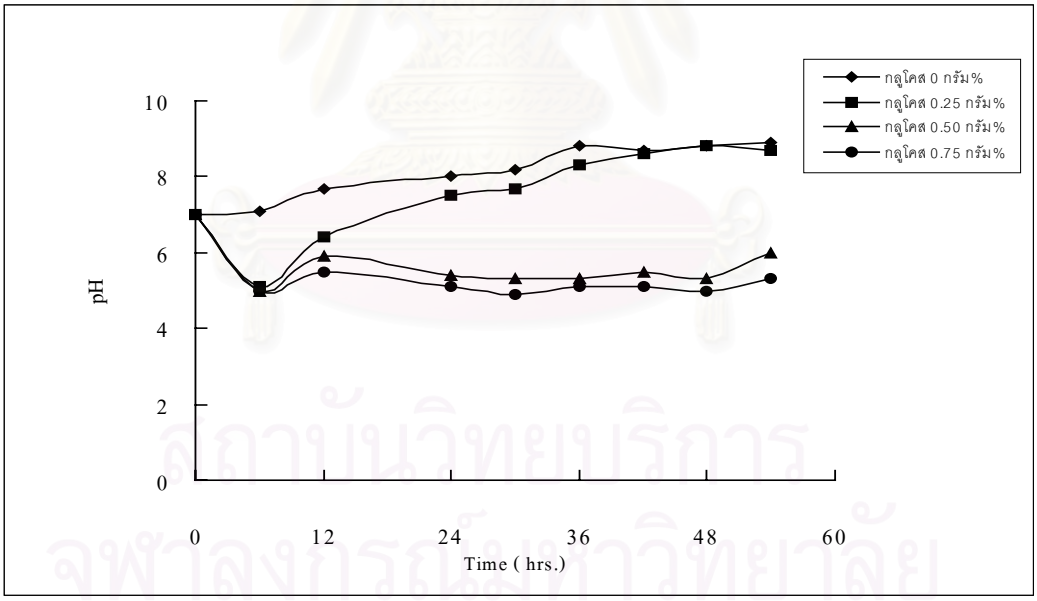
รูปที่ 4.29 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหาร Raja's medium ที่ความเร็วรอบ 200, 250 และ 300 รอบ/นาที

4.3.6 การหาความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมในอาหาร Raja's medium

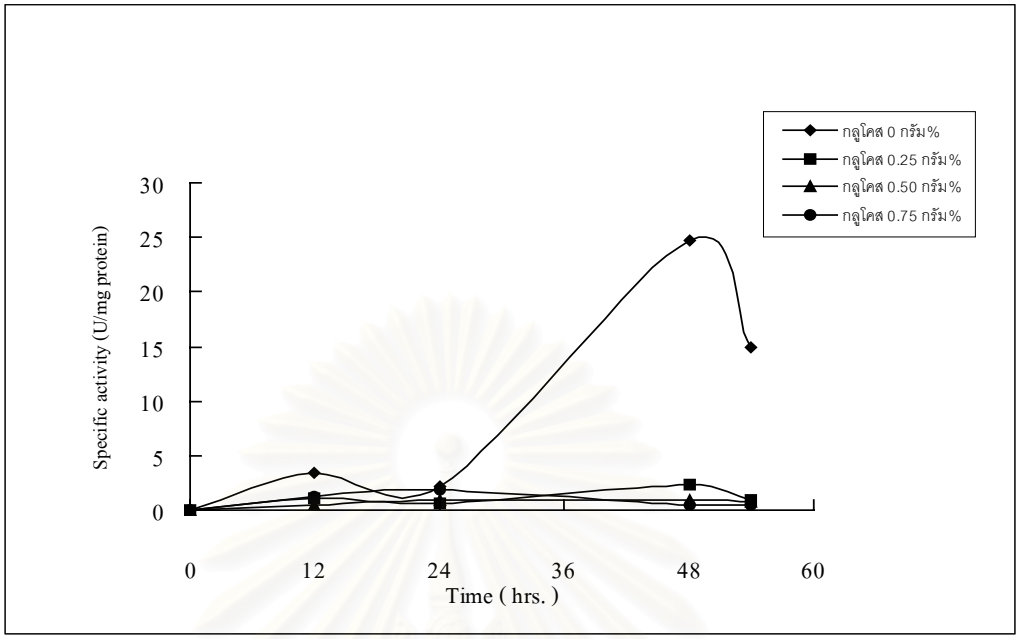
การหาความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ในอาหาร Raja's medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH 7.0 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5% (v/v) เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในการใช้ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0.70 กรัม% (w/v) เชื้อจะสามารถมีการเจริญเติบโตได้รวดเร็วที่สุด ส่วนที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0, 0.25 และ 0.75 กรัม% (w/v) เชื้อมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกันคือจะมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ในช่วงเวลา 0 - 12 ชั่วโมง และจะเริ่มมีการเจริญคงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.30 ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่า pH พบว่าการใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 0 และ 0.25 กรัม% (w/v) มีแนวโน้มว่าจะมีค่าเพิ่มขึ้น 1 หน่วย หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนที่ปริมาณกลูโคส 0.50 และ 0.75% มีแนวโน้มว่าจะลดลง แสดงดังรูปที่ 4.31 สำหรับการสร้างเอนไซม์พบว่า จะมีการสร้างเอนไซม์หลังเชื้อมีการเจริญคงที่คือ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งการไม่ใส่กลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 24.77 U/mg protein และที่ปริมาณกลูโคส 0.25, 0.50 และ 0.75 กรัม% (w/v) มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 2.29, 0.92 และ 0.65 U/mg protein ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.32



รูปที่ 4.30 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหาร Raja's medium ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0, 0.25, 0.50 และ 0.75 กรัม% (w/v)



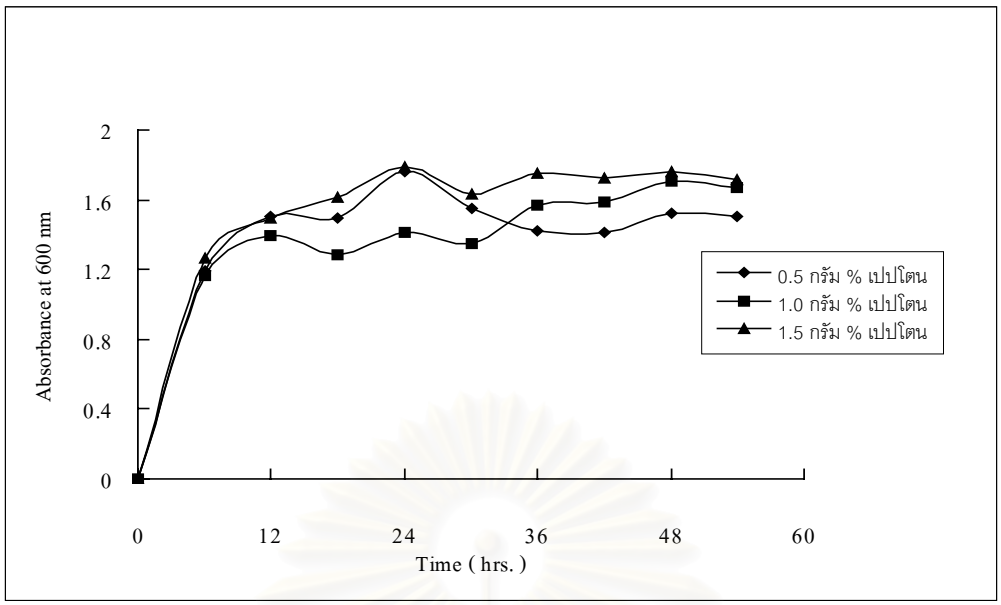
รูปที่ 4.31 การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหาร Raja's medium ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0, 0.25, 0.50 และ 0.75 กรัม% (w/v)



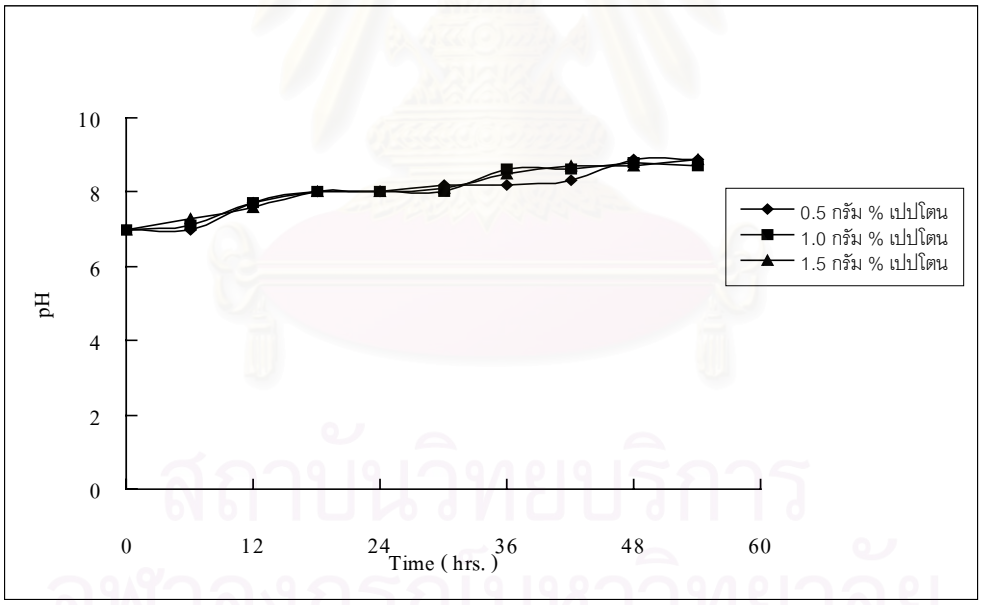
รูปที่ 4.32 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหาร Raja's medium ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0, 0.25, 0.50 และ 0.75 กรัม% (w/v)

4.3.7 การหาความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตนที่เหมาะสมในอาหาร Raja's medium

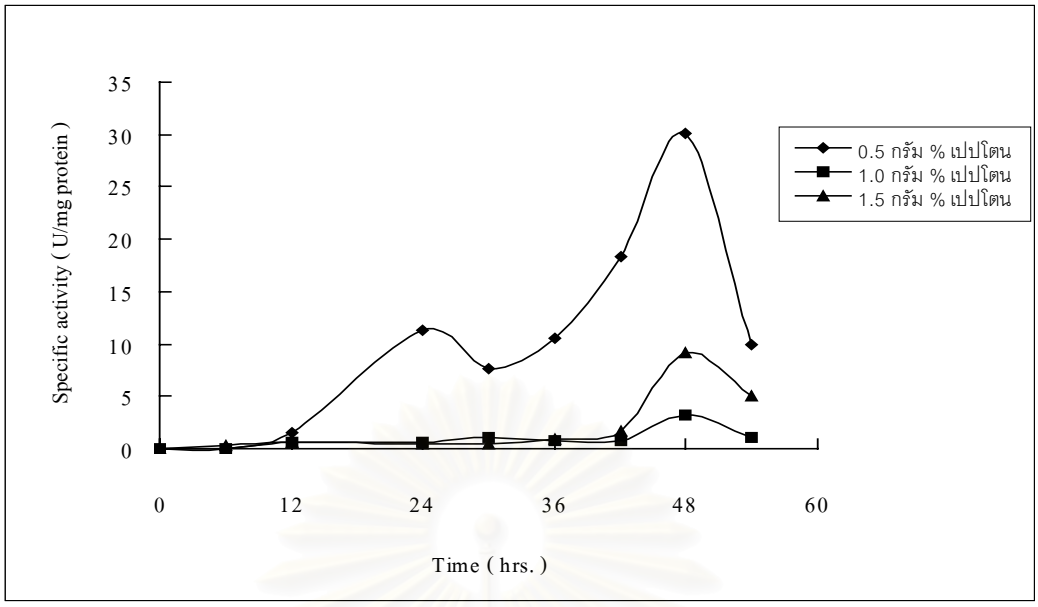
การหาความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ในอาหาร Raja's medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH 7.0 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5% (v/v) เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที และไม่ใส่กลูโคส พบว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตน ที่ทำให้เชื้อมีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วคือ 0.5 กรัม% (w/v) หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อจะเริ่มมีการเจริญคงที่ แสดงดังรูปที่ 4.33 ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่า pH พบว่าการใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตน ทุกๆความเข้มข้นมีแนวโน้มค่า pH เพิ่มขึ้น 1 หน่วยหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.34 สำหรับการผลิตเอนไซม์พบว่าการใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตนที่ 0.5 กรัม% (w/v) เปปโตนจะสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะที่มีค่ามากที่สุดคือ 30.13 U/mg protein หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเชื้อจะมีการผลิตเอนไซม์หลังจากมีอัตราการเจริญของเชื้อคงที่ และที่ 1.0 กรัม% และ 1.5 กรัม% (w/v) จะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 3.27 และ 9.21 U/mg protein ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.35



รูปที่ 4.33 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหาร Raja's medium ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตน 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัม% (w/v)



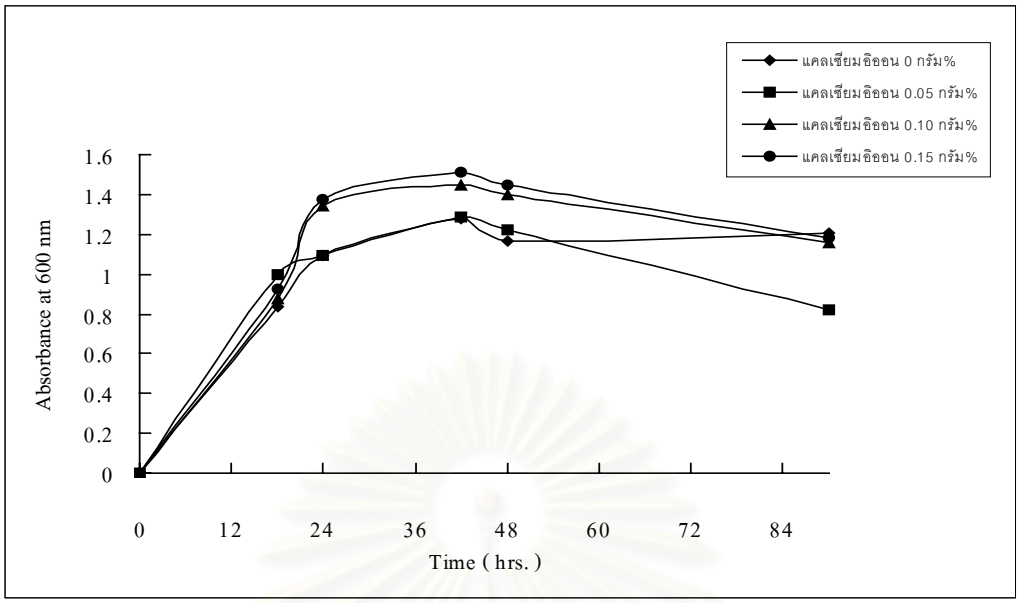
รูปที่ 4.34 การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหาร Raja's medium ที่ปริมาณไนโตรเจนของเปปโตน 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัม% (w/v)



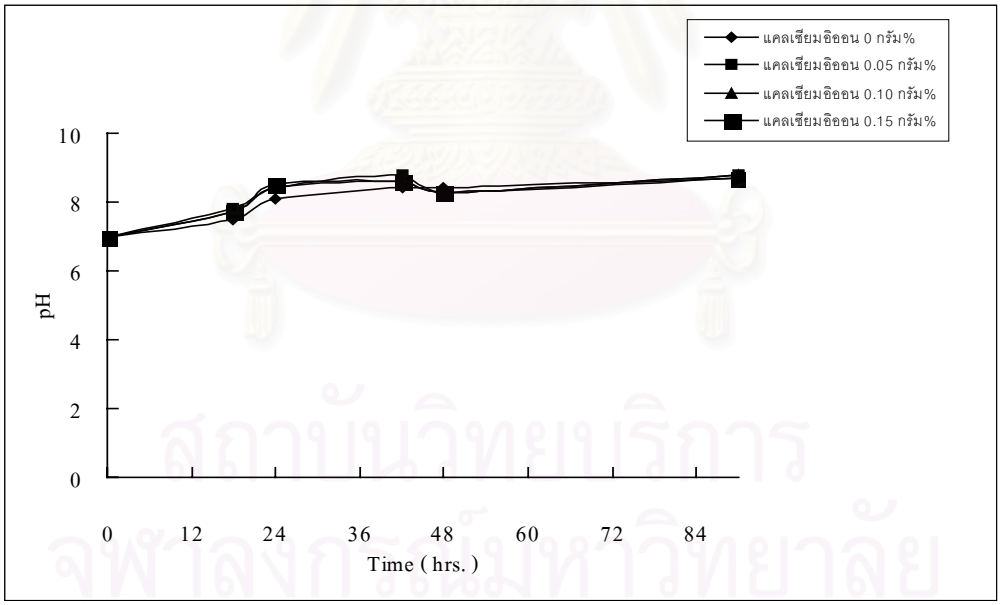
รูปที่ 4.35 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหาร Raja's medium ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตน 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัม% (w/v)
หมายเหตุ การหาปริมาณไนโตรเจนของเปปโตน โดยวิธี Kjeldal (ภาคผนวก ค.)

4.3.8 การหาปริมาณแคลเซียมอิออนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium

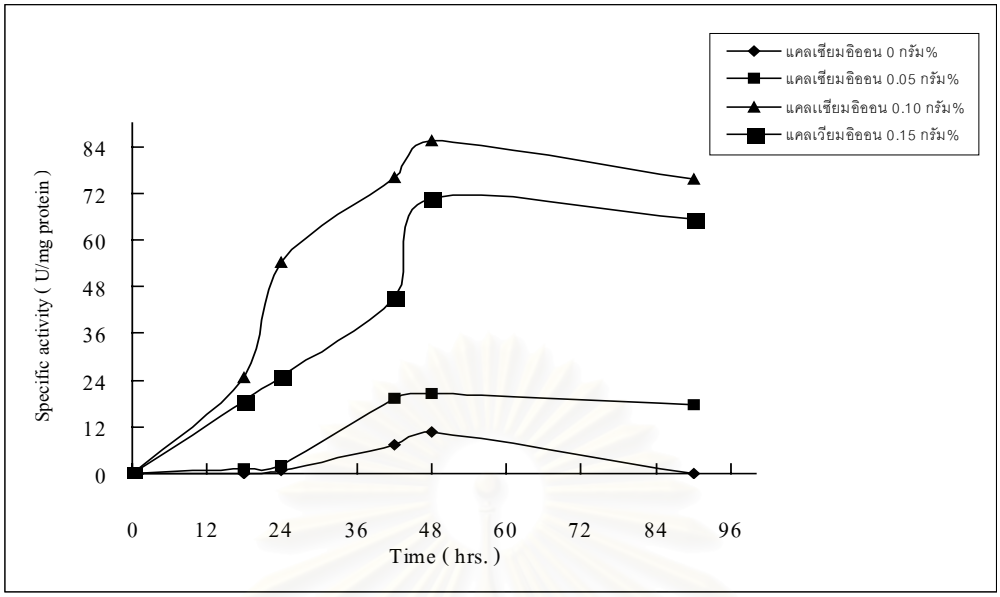
การหาปริมาณแคลเซียมอิออนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH 7.0 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5% (v/v) เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ไม่ใส่กลูโคส และใช้ไนโตรเจนจากเปปโตนที่ความเข้มข้น 0.5 กรัม% (w/v) พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อจะมีการเติบโตได้อย่างรวดเร็วที่ปริมาณแคลเซียมอิออน 0.10 และ 0.15 กรัม% (w/v) ส่วนที่ 0 และ 0.05 กรัม% (w/v) จะมีอัตราการเจริญของเชื้อที่ช้ากว่า หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.36 ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่า pH พบว่าทุกๆความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนมีแนวโน้มค่า pH เพิ่มขึ้นหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.37 สำหรับการผลิตเอนไซม์พบว่าการผลิตเอนไซม์ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ ปริมาณแคลเซียมอิออน 0.10 กรัม% (w/v) มีค่าเท่ากับ 85.5 U/ mg protein หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนที่ปริมาณแคลเซียมอิออน 0, 0.05 และ 0.15 กรัม% (w/v) มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 10.59, 20.36 และ 70.54 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.38



รูปที่ 4.36 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหาร Raja's medium ที่ความเข้มข้นของแคลเซียม-อิออน 0, 0.05, 0.10 และ 0.15 กรัม% (w/v)



รูปที่ 4.37 การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหาร Raja's medium ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน 0, 0.05, 0.10 และ 0.15 กรัม% (w/v)

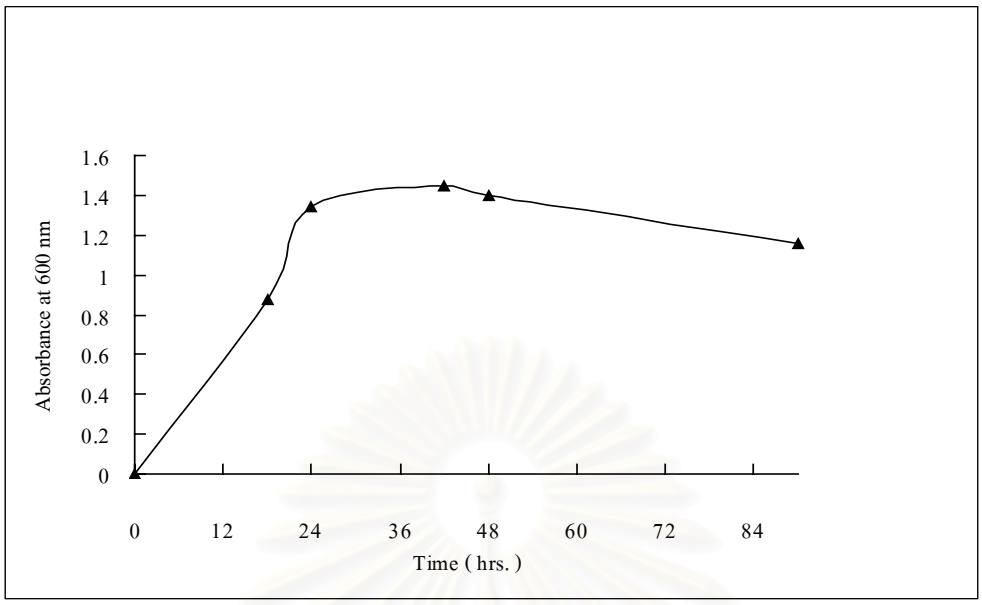


รูปที่ 4.38 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหาร Raja's medium ที่ความเข้มข้นของแคลเซียม-อิออน 0, 0.05, 0.10 และ 0.15 กรัม% (w/v)

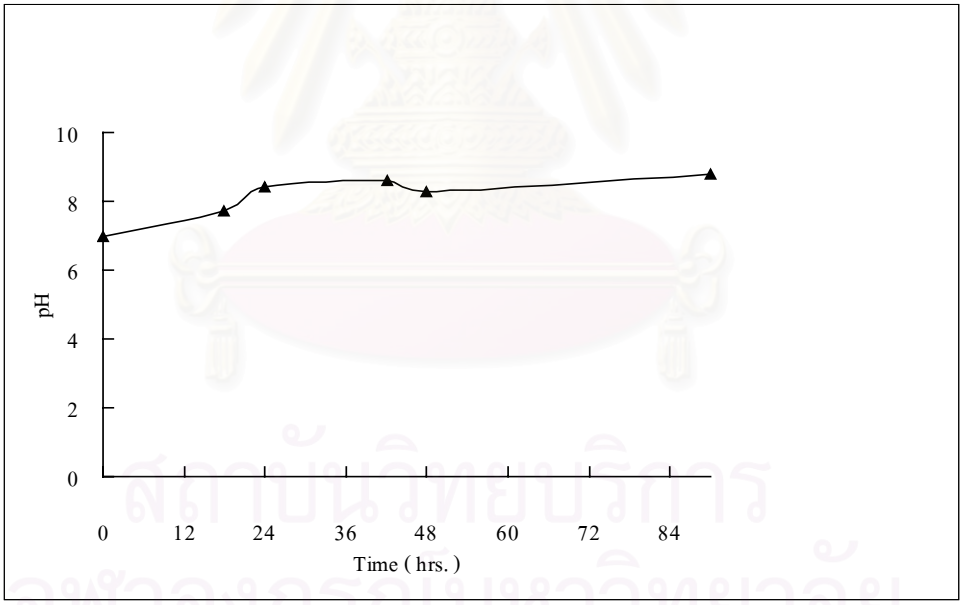
4.3.11 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในอาหาร Raja's medium

การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B.cereus* ในอาหาร Raja's medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH 7.0 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5% (v/v) เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ไม่ใส่กลูโคส ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตน 0.5 กรัม% (w/v) และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.10 กรัม% (w/v) ที่ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่างๆ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-12 ชั่วโมง และอัตราการเจริญของเชื้อจะเริ่มคงที่ แสดงดังรูปที่ 4.39 ส่วนการเปลี่ยนแปลง pH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น 1 หน่วย หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.40 สำหรับการผลิตเอนไซม์พบว่าจะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดคือ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 85.5 U/mg protein แสดงดังรูปที่ 4.41

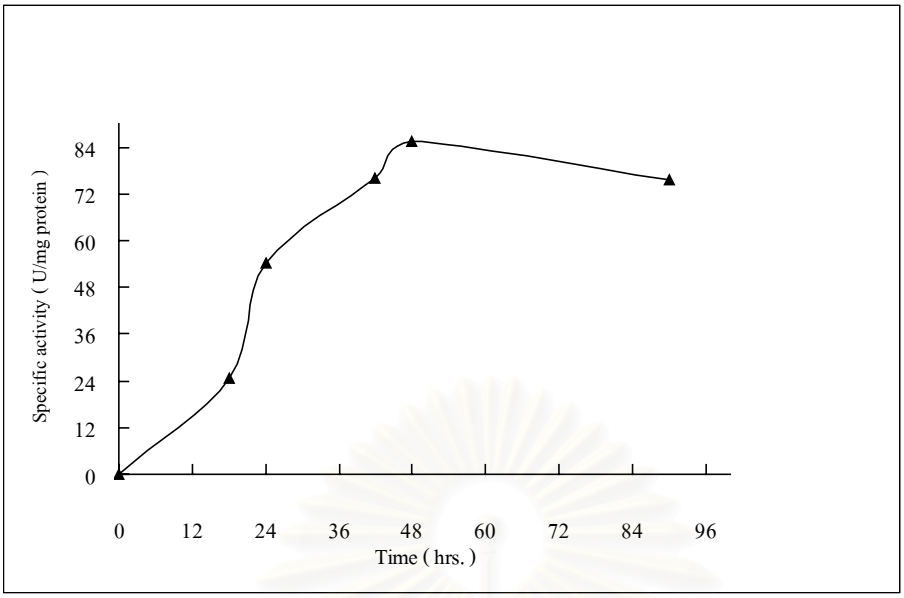
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.39 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหาร Raja's medium ที่ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่างๆ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง



รูปที่ 4.40 การติดตามการเปลี่ยนแปลง ค่า pH ในอาหาร Raja's medium ที่ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่างๆ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง



รูปที่ 4.41 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในอาหาร Raja's medium ที่ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่างๆ

4.4 การเตรียมเอนไซม์โปรติเอสและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

การเตรียมเอนไซม์ปริมาณมาก โดยเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ในทำนองเดียวกับข้อ 3.3.1.1 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อคือ Raja's medium สูตรที่ปรับแล้วปริมาณ 300 มิลลิลิตรดังแสดงในข้อ 4.4.1 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH 7.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที แสดงในข้อที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าการเจริญของ *B. cereus* จะมีอัตราการเจริญเติบโตของเชื้ออย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อจะเริ่มคงที่ ช่วงนี้จะมีการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้น และมีการสร้างเอนไซม์ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่า pH จะมีแนวโน้มสูงขึ้น 1 หน่วยหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้น การเตรียมเอนไซม์เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ จึงเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ในสูตรอาหาร Raja's medium ที่ปรับแล้ว ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ที่มีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 300 มิลลิลิตร จำนวน 8 ขวด เก็บเอนไซม์หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้สารละลาย crude enzyme ปริมาณ 2,400 มิลลิลิตร มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรติเอส 0.4 U/mg protein สรุปดังตารางที่ 4.7

4.4.1 สูตรอาหาร Raja's medium ที่ปรับแล้วตามข้อ 4.3

$CaCl_2.2H_2O$	1	กรัม
K_2HPO_4	0.6	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
NaCl	0.045	กรัม
เปปโตน	5	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pHให้เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.4.2 การทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี ultrafiltration

หลังจากได้ crude enzyme จากข้อ 4.4.1 แล้วนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี ultrafiltration เพื่อลดปริมาตรให้เหลือ 1 ใน 3 โดยกรองผ่านเมมเบรนที่มี molecular weight cut off 10,000 จากการทดลองพบว่า crude enzyme ที่ผ่านกระบวนการ ultra-filtration แล้วมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 2.01 U/mg protein แสดงดังตารางที่ 4.7

4.4.3 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

การตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งบดละเอียดลงใน crude enzyme อย่างช้าๆ โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่าทำให้ค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2 เท่า คือ มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 3.56 U/mg protein แสดงดังตารางที่ 4.7 จากนั้นนำไปไดอะไลซิสใน Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0 โดยใช้ปริมาณบัฟเฟอร์ 10 เท่าของสารละลายที่ได้จากการปั่นตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต

ตารางที่ 4.7 สรุปผลการทำให้เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)	แอคติวิตีจำเพาะทั้งหมด (ยูนิต/ มก.โปรตีน)	ปริมาณโปรตีนที่เหลือ (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
1. สารละลายเอนไซม์ตั้งต้น	2,400	237.6	96.0	0.4	100	1
2. Ultrafiltration	1,475	129.8	261.8	2.0	272.7	5.0
3. ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80%	30	12.21	43.4	3.56	45.23	8.9

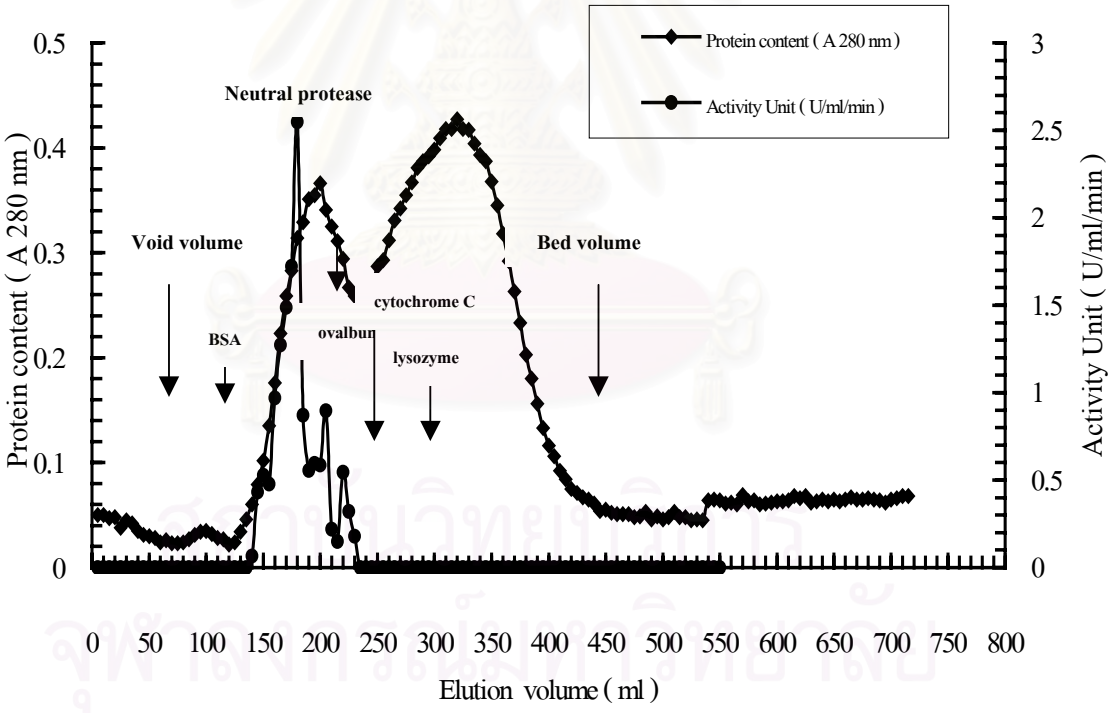
4.5 ผลการศึกษาสมบัติของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน

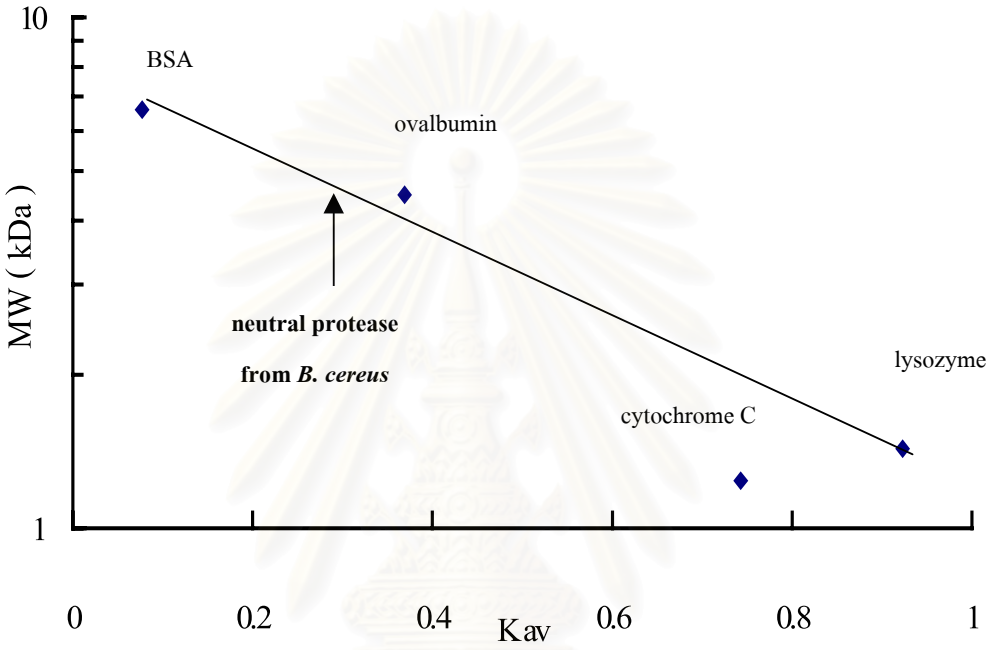
4.5.1 ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลและการหาหน่วยย่อยของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วน

ก) เซฟาเดกซ์ จี-75 คอลัมน์

หลังจากผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารละลายเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 จากนั้นชะด้วยสารละลาย Tris-HCl 0.01 M, pH 7.0 ที่มีแคลเซียมอิออน 20 mM การเตรียมคอลัมน์วิธีตามข้อ 3.5.1.1 แสดงดังรูปที่ 4.42 ซึ่งจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า โปรตีนมาตรฐาน BSA, ovalbumin, lysozyme และ cytochrome C จะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย elution volume 135, 195, 300 และ 265 มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสจาก *B. cereus* จะออกจากคอลัมน์พร้อมกับ ovalbumin คือมีค่า elution volume เท่ากับ 195 มิลลิลิตร เมื่อนำมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ K_{av} แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ 4.50 พบว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 34,700 ดาลตัน

รูปที่ 4.42 การหาน้ำหนักโมเลกุลของนิวทรัลโปรติเอสจาก *B. cereus* ในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75





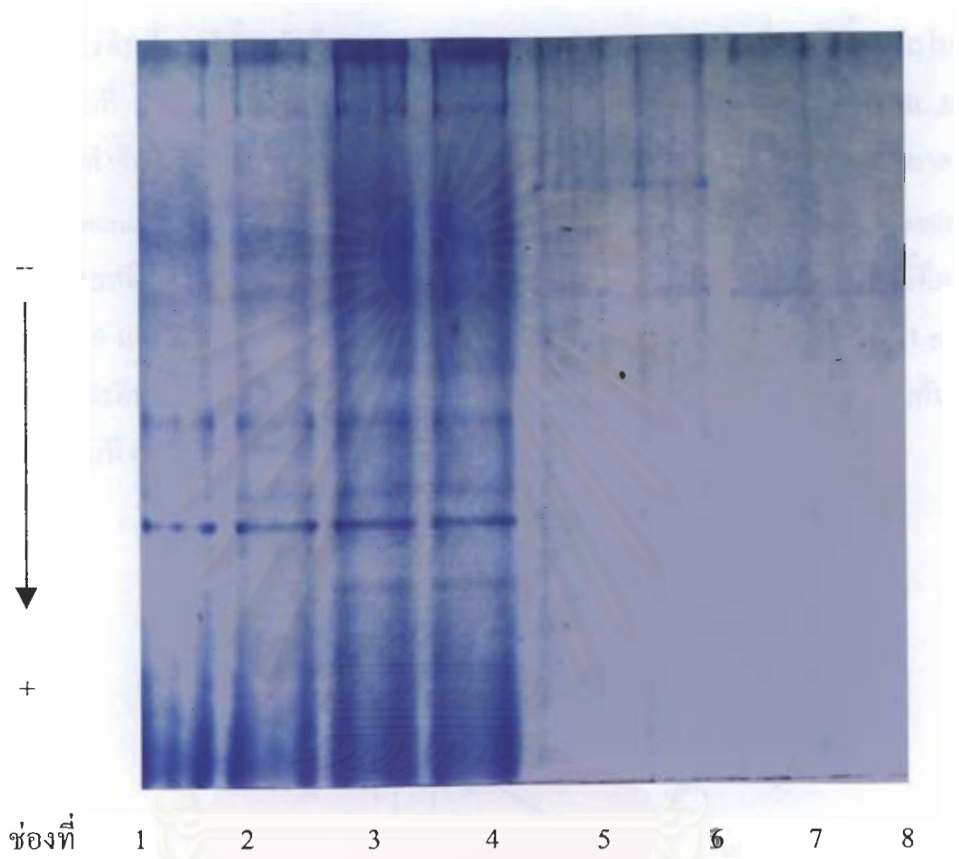
รูปที่ 4.43 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสโดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 (ขนาด 83.5 x 1.15 ซม.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข) วิธีแยกโปรตีนด้วยโพลีอะคลิลาไมด์เจลชนิดไม่ต่อเนื่อง (Disc polyacrylamide Gel Electrophoresis) วิธีการทดลองตามข้อ 3.5.1.2

หลังจากได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก เซฟาเดกซ์ จี-75 คอลัมน์ นำมาแยกโปรตีนที่ได้ โดยทำการทดลองเทียบกับสารละลายโปรติเอสจาก crude enzyme, ultrafiltration และ จากการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% แสดงดังรูปที่ 4.44 ซึ่งพบว่าการทำให้โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วนตามขั้นตอนข้อ 4.4 สามารถทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นสังเกตได้จากแถบของโปรตีนมีจำนวนลดน้อยลง จากการใส่โปรตีนลงในหลุมที่ทดสอบหลุมละ 20 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาณโปรตีนของ crude enzyme, แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% และจากเซฟาเดกซ์ จี-75 คอลัมน์ คือ 20 ไมโครกรัมโปรตีน, 81 ไมโครกรัมโปรตีน และ 62 ไมโครกรัมโปรตีนตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.44 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการทำนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วน จาก *B. cereus* แยกโดยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส pH 7.0

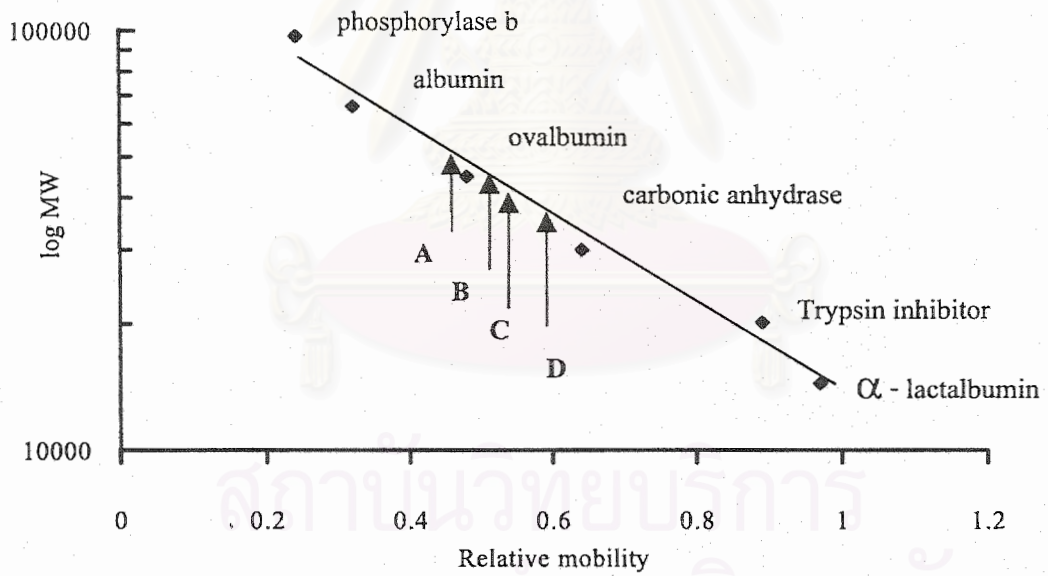
ช่องที่ 1-2 crude enzyme (20 ไมโครกรัมโปรตีน)

ช่องที่ 3-4 โปรตีนจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% (81 ไมโครกรัมโปรตีน)

ช่องที่ 5-8 นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจากคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี - 75 (62 ไมโครกรัมโปรตีน)

4.4.2 ผลการศึกษาหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยการใช้ เอสดีเอส - พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส (polyacrylamide gel electrophoresis)

นำสารละลายนิวทรัลโปรติเอสที่ได้จาก *B. cereus* ทำให้เข้มข้นแล้วหลังจากผ่านเซฟาเดกซ์ จี-75 คอลัมน์ มาทำอิเลกโทรโฟริซิสโดยวิธีเอสดีเอส วิธีการทดลองดังข้อ 3.5.1.3 พบว่ามีแถบโปรตีนเกิดขึ้น 3 แถบ แถบโปรตีนที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 63,000 ดาลตัน แถบโปรตีนที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 54,000 ดาลตัน แถบที่ 3 มีน้ำหนักโมเลกุล 46,000 ดาลตัน และแถบที่ 4 มีน้ำหนักโมเลกุล 38,100 ดาลตัน จากการทำอิเลกโทรโฟริซิสควบคู่ไปกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่า โปรตีนมาตรฐาน phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor และ α - lactalbumin จะมีการเคลื่อนที่ในแผ่นเอสดีเอสอะคริลาไมด์เจล ซึ่งแสดงโดยค่า relative mobility เรียงลำดับดังนี้คือ 0.24, 0.32, 0.48, 0.64, 0.89 และ 0.97 ส่วนเอนไซม์นิวทรัล โปรติเอส จาก *B.cereus* มีค่า relative mobility ของแถบโปรตีนที่ 1- 4 คือ 0.43, 0.50, 0.56 และ 0.60 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ 4.45



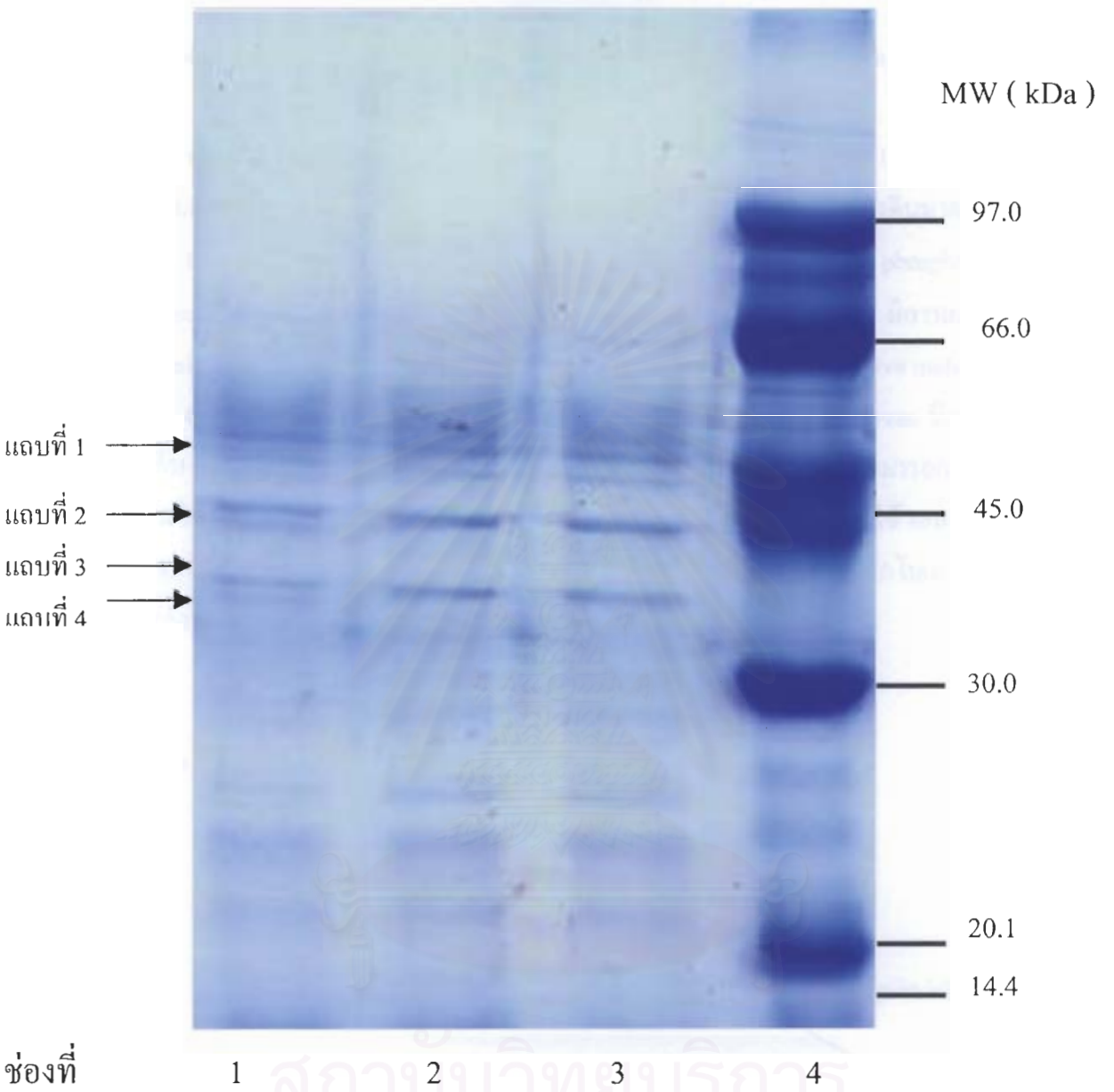
รูปที่ 4.45 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยวิธีเอสดีเอส - พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส

จุด A : แถบโปรตีนที่ 1 ของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus*

จุด B : แถบโปรตีนที่ 2 ของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus*

จุด C : แถบโปรตีนที่ 3 ของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus*

จุด D : แถบโปรตีนที่ 4 ของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus*



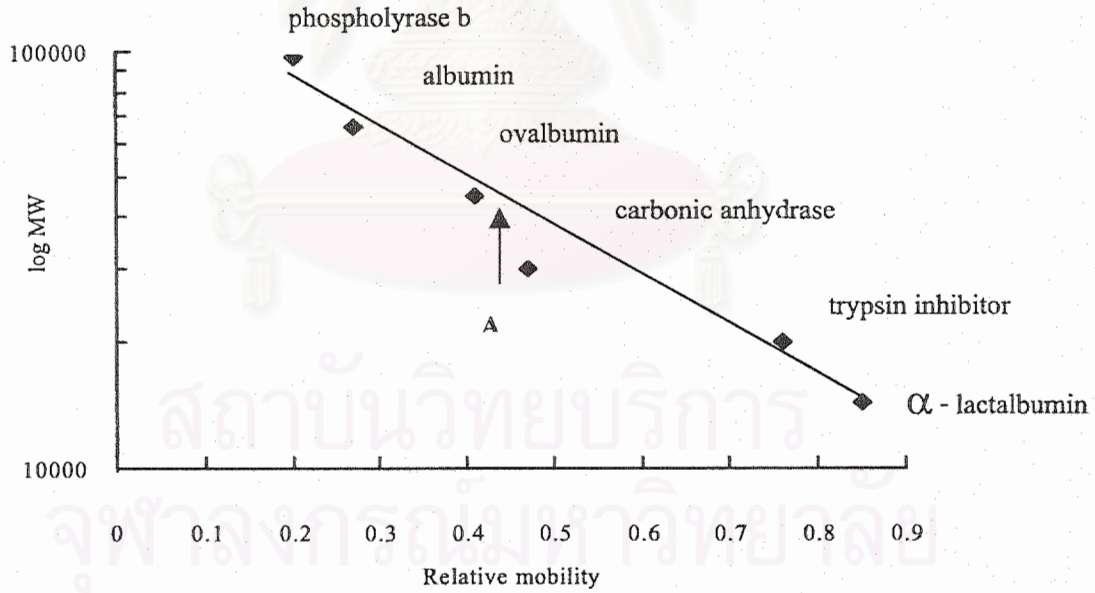
รูปที่ 4.46 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus* แยกโดยวิธี เอสดีเอส - โพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส

ช่องที่ 1-3 นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจากคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 (62 ไมโครกรัมโปรตีน)

ช่องที่ 4 โปรตีนมาตรฐาน (รายละเอียดดังข้อ 4.5.1 ข้อ ค.)

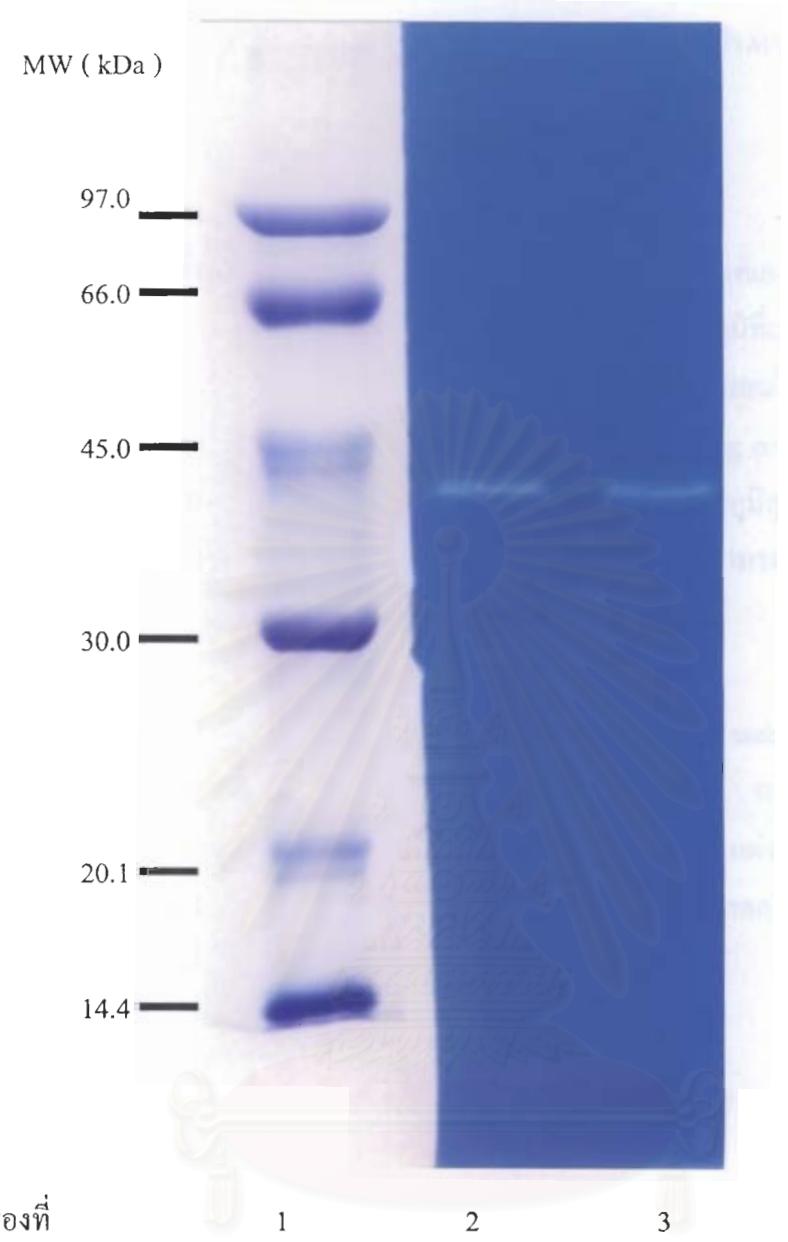
4.4.3 ผลการศึกษาหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอส โดยวิธี Subtrate-Containing SDS Zymogram gel

หลังจากเตรียม Substrate-Containing SDS Zymogram gel ตามวิธีข้อ 3.5.1.4 ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสโดยใช้ casein เป็นสารตั้งต้น โดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 4.5.1 ข้อ ค. พบว่ามีแถบโปรตีนเกิดขึ้น 1 แถบ พบว่าโปรตีนมาตรฐาน phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor, α - lactalbumin มีการเคลื่อนที่ใน Substrate-Containing SDS Zymogram gel ซึ่งแสดงโดยค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) ดังนี้ คือ 0.20, 0.27, 0.41, 0.47, 0.76 และ 0.85 ส่วนเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสจาก *B.cereus* มีค่า relative mobility เท่ากับ 0.44 สามารถหาค่าน้ำหนักโมเลกุลได้เท่ากับ 44,700 ดาลตัน ซึ่งสามารถกล่าวได้จากข้อมูลนี้ว่า เอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสจาก *B.cereus* ตรงกับแถบโปรตีนที่ 3 จากการใช้ เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 46,000 ดาลตัน แสดงดังรูปที่ 4.47 และ 4.48



รูปที่ 4.47 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) และ log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยวิธี Substrate - Containing SDS Zymogram gel

จุด A : นิวทรัลโปรติเอสจาก *B. cereus*



รูปที่ 4.48 รูปแบบโปรตีนมาตรฐานและ**นิวทรัลโปรติ**เอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus* แยกโดย Substrate - Containing SDS Zymogram gel

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน (รายละเอียดดังข้อ 4.5.1 ข้อ ค.)

ช่องที่ 2 - 3 นิวท**รัล**โปรติเอส**ที่บริ**สุทธิ์บางส่วนจากคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี - 75 คอ**ลัมน์โครม**าโต**รกรา**ฟี (62 ไมโครกรัมโปรตีน)

4.6 ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี จลนพลศาสตร์ ของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน

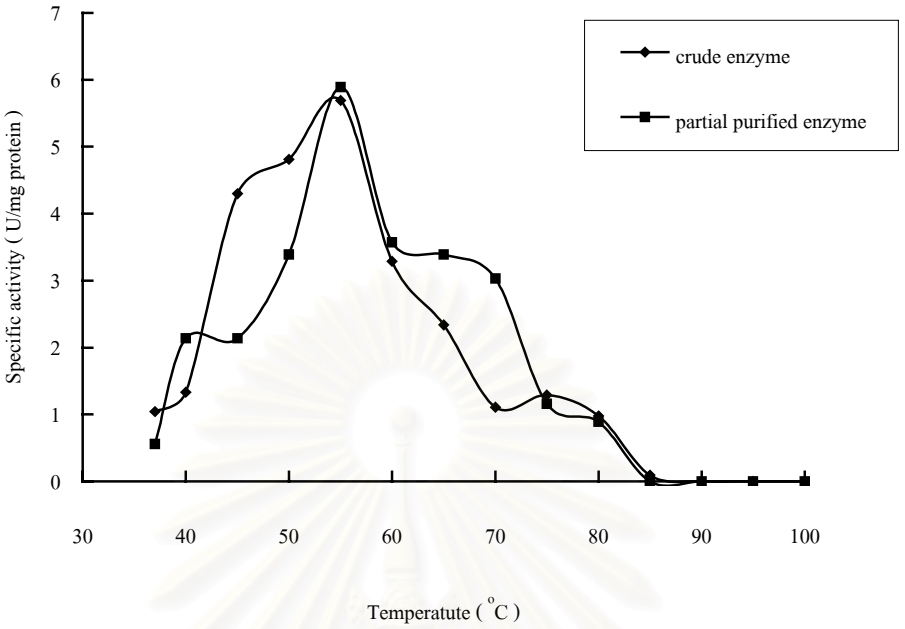
4.6.1 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนซึ่งผลิตจาก *B. cereus* โดยทำเทียบกับใน crude enzyme พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันทั้งในเอนไซม์โปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนและ crude enzyme มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 5.69 U/mg protein และ 5.89 U/mg protein ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะมีแนวโน้มลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 55 องศาเซลเซียส และหลังจากอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะหมดความสามารถในการทำงานได้ แสดงดังรูปที่ 4.49

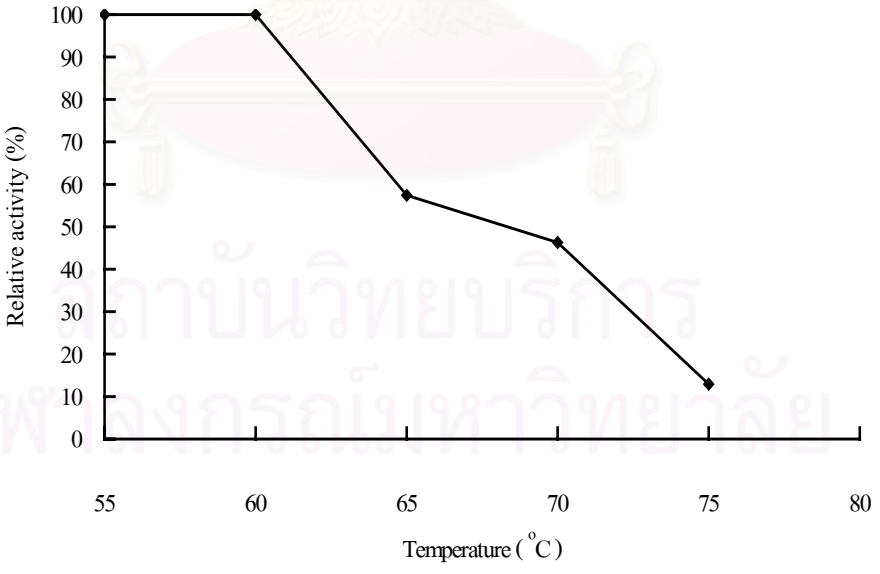
4.6.2 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ (thermal stability)

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ พบว่า การบ่มที่อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลา 30 นาที เอนไซม์ยังไม่สูญเสียแอคติวิตี แต่จะเริ่มมีแอคติวิตีเหลือครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และมีแนวโน้มลดลงถ้าบ่มเชื้อที่ 70 องศาเซลเซียสขึ้นไป แสดงดังรูปที่ 4.50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.49 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีจำเพาะของนิวทรัลโปรติเอสจาก *B.cereus*



รูปที่ 4.50 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus*

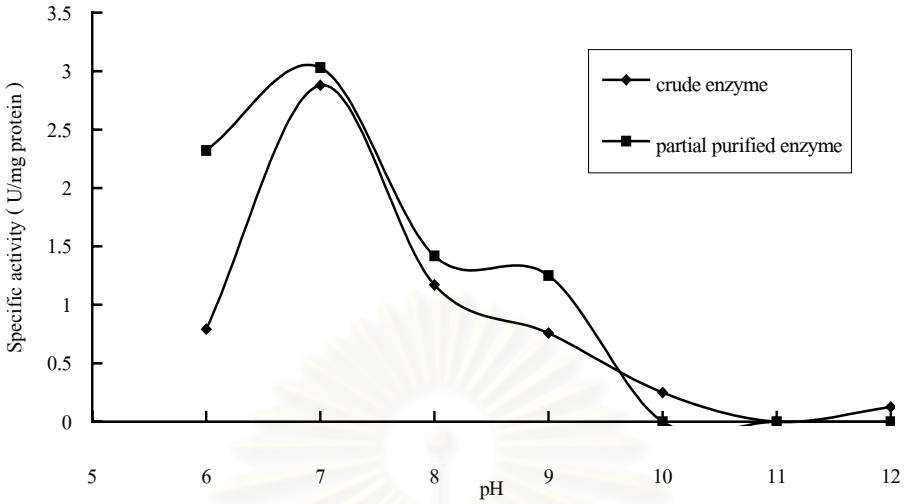
4.6.3 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจาก *B. cereus* โดยเทียบกับ crude enzyme โดยใช้ phosphate buffer 0.1 M, pH 6.0, Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0 - 9.0 และ Glycine-NaOH 0.1 M, pH 10.0 - 12.0 พบว่า pHที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ทั้ง 2 ชนิด คือ Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 2.88 และ 3.03 U/mg protein ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.51

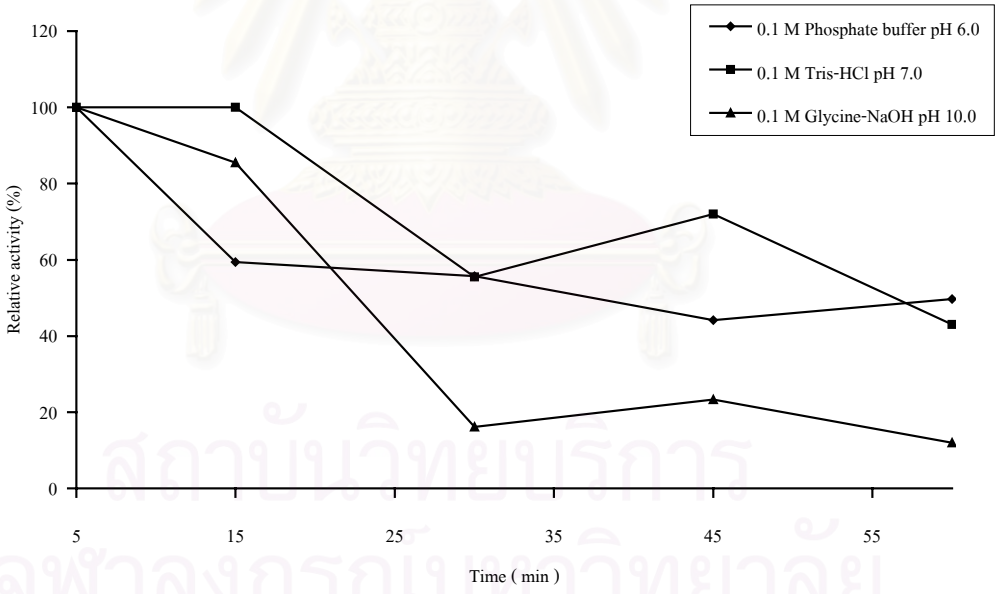
4.6.4 ผลการศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ (pH stability)

pH ที่เอนไซม์มีความเสถียรที่สุดคือ Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0 เมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลา 5 นาที ค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 2.0 U/mg protein สำหรับที่ phosphate buffer 0.1 M, pH 6.0 และ Glycine-NaOH 0.1 M, pH 10.0 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1.59 และ 1.67 U/mg protein ตามลำดับ ค่าความเสถียรของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงครึ่งหนึ่ง ในการบ่มเอนไซม์ที่ pH ต่างๆ หลังจากเวลาผ่านไป 15 นาที แสดงดังรูปที่ 4.52

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.51 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus*

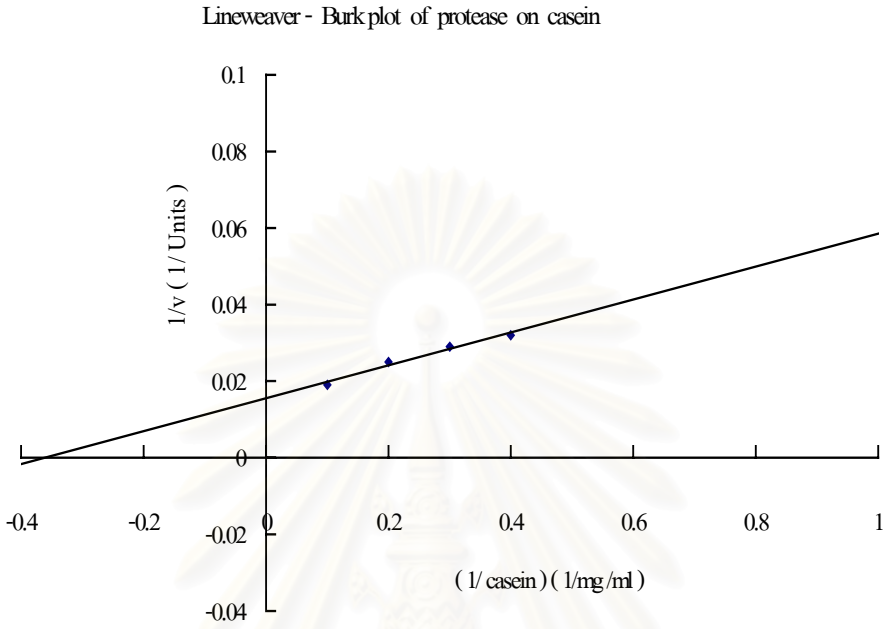


รูปที่ 4.52 pH ต่อความเสถียรของนิวทรัลโปรติเอสจาก *B.cereus* เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ใน phosphate buffer 0.1 M, pH 6.0 , Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0 และ Glycine - NaOH 0.1 M, pH 10.0

4.6.5 ผลการศึกษาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ต่อสับสเตรทธรรมชาติและสับสเตรทสังเคราะห์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

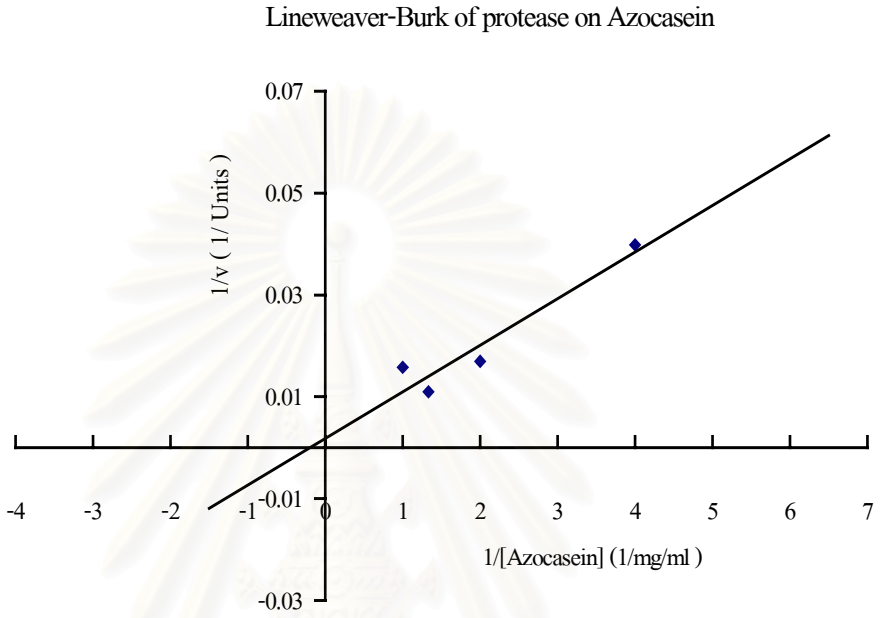
จากการศึกษาการเปรียบเทียบระหว่างความสามารถในการไฮโดรไลส์สับสเตรทธรรมชาติของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus* กับ *B. subtilis* TISTR 25 โดยใช้ casein เป็นสับสเตรท นำผลที่ได้มาพลอตหาค่า K_m และ V_{max} โดยวิธี Lineweaver - Burk ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.53, 4.54, 4.55 และ 4.56 ตามลำดับ การหาค่าประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการทำงาน (Efficiency) ระหว่างเชื้อ 2 ชนิด คือ *B. cereus* และ *B. subtilis* TISTR 25 แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.8 พบว่าค่า K_m ของ casein และ azocasein สำหรับ *B. cereus* มีค่าเท่ากับ 2.78 มก./มล. และ 5.11 มก./มล. ส่วน *B.subtilis* TISTR 25 มีค่าเท่ากับ 0.20 มก./มล. และ 1.033 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่า K_m ของ Casein จาก *B.cereus* มีค่าสูงกว่าของเอนไซม์จาก *B. cereus* แสดงว่ามีความสามารถในการยึดจับกับ casein และ azocasein น้อยกว่า แต่เมื่อเปรียบเทียบความเร็วสูงสุดในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลส์ (V_{max}) พบว่าเอนไซม์จาก *B. cereus* สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลส์ casein และ azocasein ได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ได้จาก *B. subtilis* TISTR 25 ซึ่งจาก *B. cereus* มีค่า V_{max} ของ casein และ azocasein เท่ากับ 64.52 Unit/mg และ 555.55 Unit/mg ตามลำดับ ส่วนการหาค่าประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ (Efficiency) พบว่าค่า Efficiency ของเอนไซม์ที่ได้จาก *B. cereus* มีค่ามากกว่าค่า (Efficiency) ของ *B. subtilis* TISTR 25 แสดงว่าเอนไซม์จาก *B. cereus* มีประสิทธิภาพการทำงานทั้ง casein และ azocasein มากกว่า เอนไซม์ของ *B. subtilis* TISTR 25 แสดงดังตารางที่ 4.9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



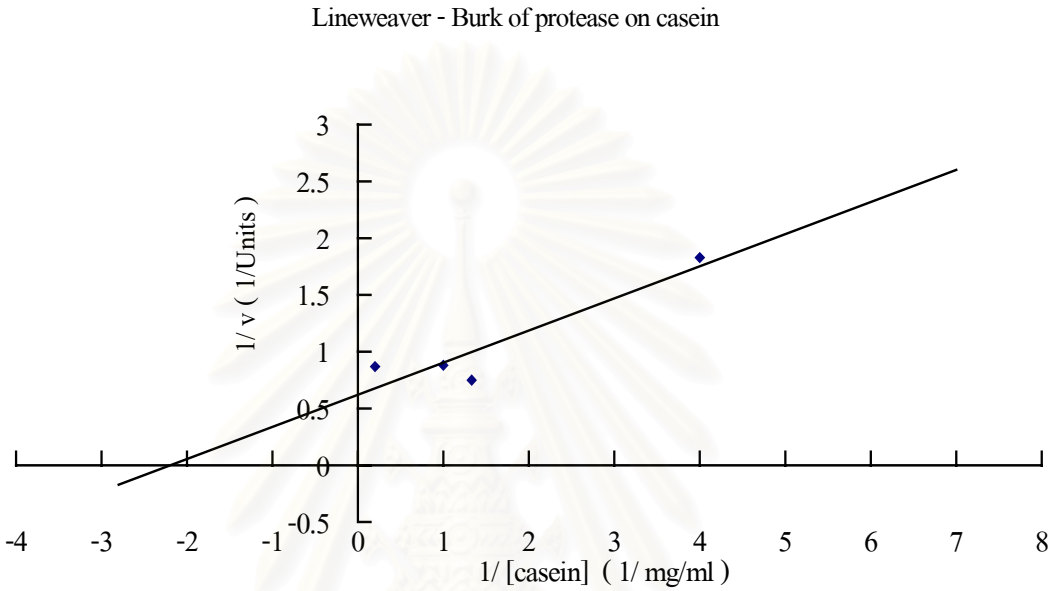
รูปที่ 4.53 Lineweaver - Burk plot ของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus* เมื่อใช้ casein เป็นสับสเตรท วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 7.0 ตามวิธีในข้อ3.1.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



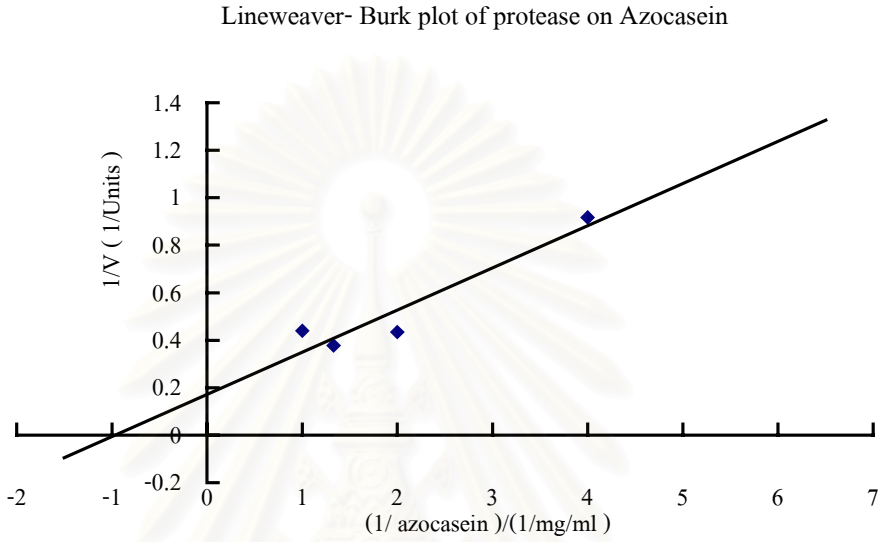
รูปที่ 4.54 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus* เมื่อใช้ azocasein เป็นสับสเตรท วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 7.0 ตามวิธีในข้อ 3.1.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.55 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อใช้ casein เป็นสับสเตรท วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 7.0 ตามวิธี ในข้อ 3.1.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.56 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อใช้ azocasein เป็นสับสเตรท วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 7.0 ตามวิธีในข้อ 3.1.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 สรุปค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสจาก *B.cereus* และ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อใช้ casein และ azocasein เป็นสับสเตรท

สับเสตรท	แหล่งของเอนไซม์	ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์	
		K_m*	V_{max}*
casein	*B.cereus*	2.78	64.52
	B.subtilis TISTR 25	0.204	0.911
azocasein	*B.cereus*	5.11	555.55
	B.subtilis TISTR 25	1.03	5.817

K_m ของ casein และ azocasein มีหน่วยเป็น มก./มล.

V_{max} มีหน่วยเป็น Unit / mg protein

ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอส (Efficiency) ที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus* และ *B. subtilis* TISTR 25

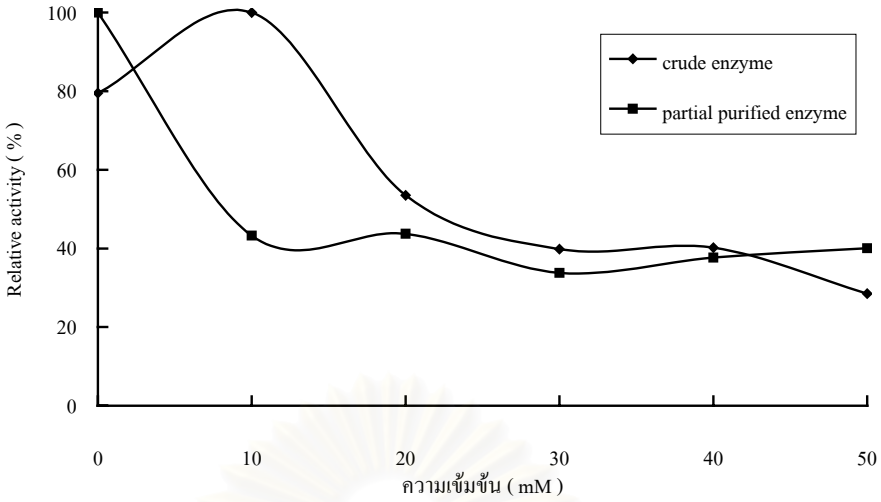
สับสเตรท	*B. cereus*			*B. subtilis* TISTR 25		
	K_m	V_{max}	*Efficiency*	K_m	V_{max}	*Efficiency*
casein	2.78	64.52	23.21	0.20	0.91	4.46
azocasein	5.11	555.55	108.67	1.03	5.81	5.63

4.6.6 ผลการศึกษาผลของตัวเร่งการทำงาน ตัวยับยั้ง และไอออนของโลหะต่อการทำงานของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน

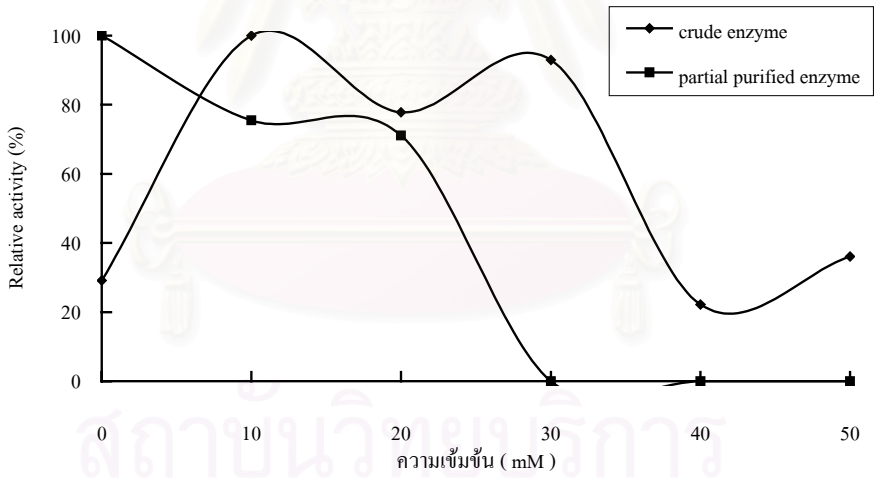
4.6.6.1 ผลการศึกษาผลของตัวเร่งการทำงานของโปรติเอส

ผลการศึกษาผลของตัวเร่งการทำงานของโปรติเอสโดยใช้สารละลายเอนไซม์บ่มกับแคลเซียมอิออนที่ความเข้มข้นต่างๆ วิธีการทดลองตามข้อ 3.6.7.3 พบว่า แคลเซียม-อิออนที่ความเข้มข้น 10 mM มีความสามารถในการเร่งการทำงานของเอนไซม์ได้ 100% ใน crude enzyme ส่วนในนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน จาก *B. cereus* พบว่าแคลเซียมอิออนไม่มีผลต่อการเร่งการทำงานของเอนไซม์มากนัก แสดงดังรูปที่ 4.57 สำหรับใน crude enzyme และ นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. subtilis* TISTR 25 พบว่าใน crude enzyme แคลเซียมอิออนที่มีความเข้มข้น 10 mM สามารถเร่งการทำงานได้ ส่วนใน นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน แคลเซียมอิออนไม่มีผลต่อการเร่งการทำงานของเอนไซม์แสดงดังรูปที่ 4.58

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.57 ผลของแคลเซียมอิออนต่อการเร่งการทำงานของ crude enzyme และ นิวทรัล โปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.cereus* ที่ความเข้มข้นของ แคลเซียมอิออนคือ 10, 20, 30, 40 และ 50 mM ตามวิธีข้อ 3.6.7.3

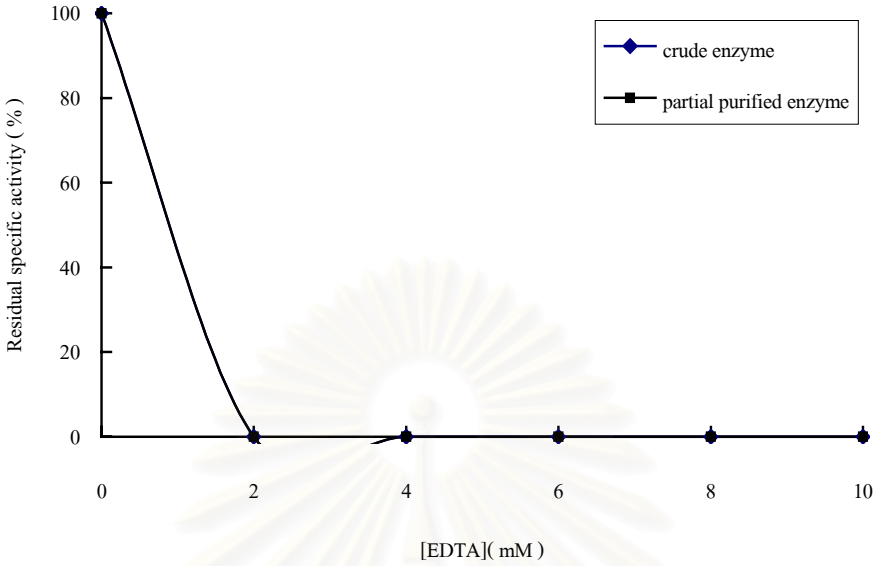


รูปที่ 4.58 ผลของแคลเซียมอิออนต่อการเร่งการทำงานของ crude enzyme และ นิวทรัล โปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B.* subtilis TISTR 25 ที่ความเข้มข้นของแคลเซียม-อิออนคือ 10, 20, 30, 40 และ 50 mM ตามวิธีข้อ 3.6.7.3

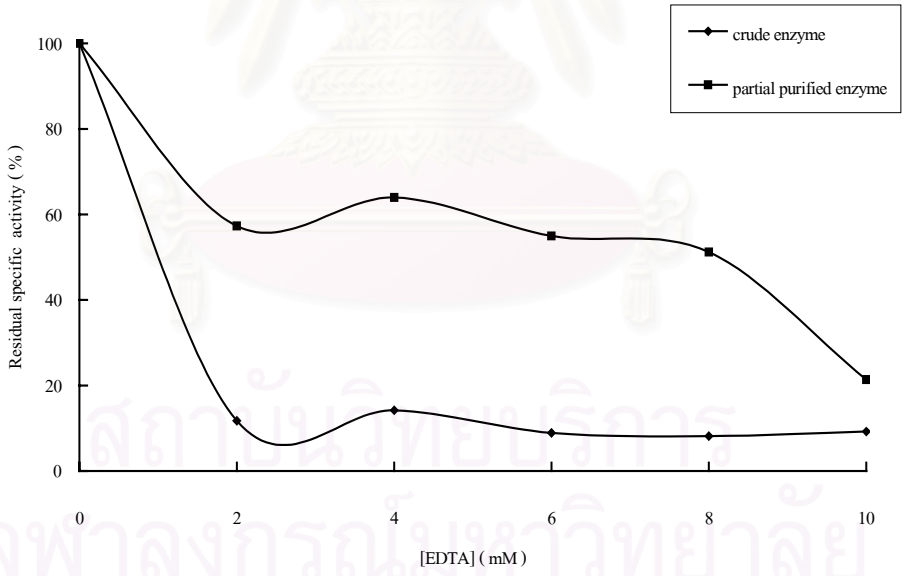
4.6.6.2 ผลของการศึกษาผลของตัวยับยั้งโปรติเอส

ผลการศึกษาผลของตัวยับยั้งโดยใช้สารละลายเอนไซม์บ่มกับ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ วิธีการทดลองตามข้อ 3.6.7.2 พบว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 2 - 10 mM มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ใน crude enzyme และ นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน จาก *B.cereus* ได้ 100% แสดงดังรูปที่ 4.59 สำหรับ crude enzyme และนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. subtilis* TISTR 25 ที่มีความเข้มข้นของ EDTA 2 - 10 mM พบว่าใน crude enzyme สามารถยับยั้งการทำงานของ crude enzyme ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนสามารถยับยั้งการทำงานได้ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังรูปที่ 4.60 (วัดแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 3.1.4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.59 ผลการยับยั้งการทำงานของ crude enzyme และ นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน จาก *B. cereus* ที่ความเข้มข้นของ EDTA คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 mM



รูปที่ 4.60 ผลการยับยั้งการทำงานของ crude enzyme และ นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน จาก *B. subtilis* TISTR 25 ที่ความเข้มข้นของ EDTA คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 mM ตามวิธีข้อ 3.6.7.2

4.6.6.4 ผลการศึกษาผลของไอออนโลหะ

เมื่อศึกษาผลของโลหะ ตามวิธีในข้อ 3.6.7.1 ต่อค่าแอคติวิตีจำเพาะของนิวทรัลโปรติเอสจาก *B. cereus* พบว่าไอออนของโลหะที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สามารถแบ่งการยับยั้งออกได้ 3 กลุ่ม จากตารางที่ 4.10

1. ไอออนของโลหะที่สามารถยับยั้งการทำงานได้ประมาณ 50% คือ ไอออนของโลหะพวก แมงกานีส

2. ไอออนของโลหะที่สามารถยับยั้งการทำงานได้ประมาณ 60-90% คือ ไอออนของโลหะพวก แมกนีเซียม นิเกิล ลิเธียม โคบอลต์ และ สังกะสี

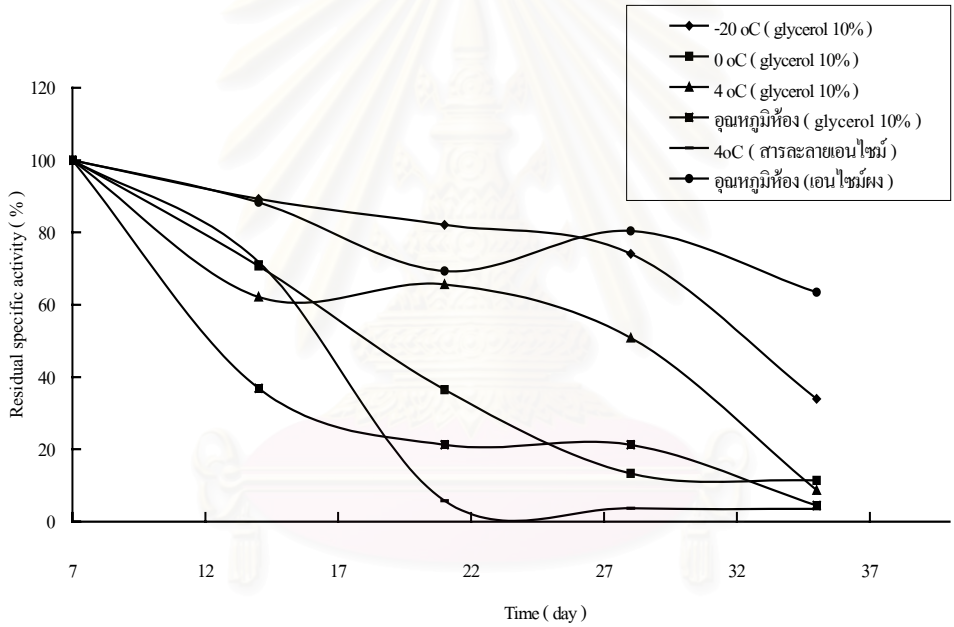
3. ไอออนของโลหะที่สามารถยับยั้งการทำงานได้ 100% คือ ไอออนของโลหะพวก คอบเปอร์ เหล็ก และคลอไรด์

ตารางที่ 4.10 ผลของไอออนของโลหะต่อแอคติวิตีจำเพาะของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus*

ผลของไอออนโลหะ	Relative specific activity (%)
หลอดควบคุม	100
$MnSO_4.H_2O$ 10 mM	50.0
$MnCl_2.4H_2O$ 10 mM	47.2
$Ni(NO_3)_2.6H_2O$ 10 mM	38.9
$MgCl_2$ 10 mM	36.1
LiCl 10 mM	36.1
$CoCl_2.6H_2O$ 10 mM	16.7
$ZnSO_4.7H_2O$ 10 mM	13.9
$NaNO_2$ 10 mM	13.9
$FeSO_4.7H_2O$ 10 mM	8.3
$MgSO_4$ 10 mM	3.9
$HgCl_2$ 10 mM	2.8
$CuSO_4.5H_2O$ 10 mM	0.0
$FeCl_3.6\ H_2O$ 10 mM	0.0

4.7 ผลการศึกษาอุณหภูมิในการเก็บรักษาเอนไซม์ที่ภาวะต่างๆ

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ใน glycerol 10% ที่ภาวะต่างๆ คือ –20 องศาเซลเซียส, 0 องศาเซลเซียส, 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง พบว่าการเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 1 เดือน การเก็บเอนไซม์โดยวิธี lyophilized เหลือแอคติวิตี 63 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเก็บรักษาสารละลายเอนไซม์ใน 10 % glycerol ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส,0 องศาเซลเซียส, 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง แอคติวิตีจำเพาะที่เหลือเท่ากับ 33.9, 11.38, 8.69 และ 4.47% ตามลำดับ ส่วนในสารละลายเอนไซม์ที่ไม่ได้เติม glycerol 10% เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส แอคติวิตีจำเพาะที่เหลือเท่ากับ 3.53% แสดงดังรูปที่ 4.61



รูปที่ 4.61 ผลของการเก็บรักษาสารละลายเอนไซม์ใน glycerol 10% ที่ภาวะต่างๆคือที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส, 0 องศาเซลเซียส , 4 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง เอนไซม์ผงที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และสารละลายเอนไซม์ที่ไม่ได้เติม glycerol 10% ที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 1 เดือน นำมาวัดแอคติวิตีจำเพาะที่เหลืออยู่ทุกๆ 7 วันโดยวิธีตามข้อ 3.1.4

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสทนร้อน

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 ที่สามารถผลิตโปรติเอสทนร้อนที่แยกได้จากดินก้นบ่อน้ำเค็มร้อน จังหวัดกระบี่ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และใช้วิธีการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA gene ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* มีความใกล้เคียงสายพันธุ์กันมาก ใน 6 species คือ *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* และ *Bacillus weihenstephanensis* (Ameur และคณะ, 2003) ดังนั้นจึงใช้ลักษณะทางชีวเคมีและทางสัณฐานวิทยา เพื่อประกอบการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วย จากงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการเกิด hemolysis บน blood agar เป็นตัวชี้วัดการจำแนกสายพันธุ์ว่าอยู่ในกลุ่ม *Bacillus cereus*

ภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตโปรติเอส

การศึกษาสูตรอาหารในการเลี้ยงเชื้อ *B.cereus* พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตโปรติเอสคือ สูตร Raja's medium (ข้อ 4.4.1) การใช้อาหารสูตร Raja's medium พบว่ามีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าการใช้ Nutrient broth อาจเนื่องจากว่า มีส่วนประกอบในอาหารที่สามารถช่วยให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่า เช่น มีพวกแคลเซียมซึ่งจำเป็นต่อการสร้างผนังเซลล์ และการสร้างสปอร์ของเชื้อ ฟอสเฟตและแมกนีเซียมเป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์ ATP, เป็นต้น ในช่วงแรกแบคทีเรียจะมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วซึ่งสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นมากและเมื่อมีการเจริญคงที่แล้ว (stationary phase) จะเริ่มมีการสร้างนิวทรัลโปรติเอสขึ้นมีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 การทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Kim และคณะ (2001) ซึ่งศึกษาการเจริญของ *Bacillus cereus* KCTC 3674 พบว่าการสร้างเอนไซม์จะอยู่ในช่วงที่เชื้อมีการเจริญคงที่แล้ว (stationary phase) เช่นกัน

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตนิวทรัลโปรติเอสที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดของ *Bacillus cereus* คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการศึกษาเรื่องอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ของ วรรณวิมล ทรัพย์ดี (2540) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อมีส่วนสำคัญในการเลี้ยงเชื้อ

และมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ เพราะถ้าอุณหภูมินั้นเหมาะสมจะทำให้เชื้อสามารถมีการเจริญเติบโตได้ดี และช่วยให้กระบวนการต่างๆที่เกิดภายในเซลล์มีการทำงานที่ดี

pH ที่เหมาะสมในอาหาร Raja's medium ที่ *B.cereus* สามารถผลิตนิวทรัลโปรติเอสที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด คือ pH 7.0 หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากงานวิจัยที่ผ่านมา Moon และ Parulekar (1991) พบว่าที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus firmus* เท่ากับ 7.7 จะมีการผลิตโปรติเอสให้แอคติวิตีสูง และถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมี pH สูงตอนเริ่มต้นจะทำให้เชื้อไม่เจริญในช่วงแรก ดังนั้น pH สามารถกดดันการผลิตโปรติเอสได้

การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5% (v/v) ทำให้มีการสร้างเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงสุดหลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5 % (v/v) นั้นเหมาะสมต่อปริมาณสารอาหารที่ใช้ทำให้ผลิตเอนไซม์ได้มาก

ความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตนิวทรัลโปรติเอสที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด คือ 200 รอบ/นาที หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการมีผู้ศึกษาเกี่ยวกับการละลายของออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของความเร็วรอบในการเขย่า และจุลินทรีย์สายพันธุ์บาซิลัส เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ ดังนั้นปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอจะช่วยให้เมตาบอลิซึมเกิดขึ้นได้ดี รวมทั้งส่งผลให้เซลล์มีการเจริญได้สูงด้วย (Chain และ Gualandi, 1954) แต่จากการทดลองข้างต้นพบว่าความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ 200 รอบต่อนาที อาจเป็นไปได้ว่าเป็นความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเจริญของ *Bacillus cereus* ซึ่งแตกต่างกันตามสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังได้มีผู้ศึกษาว่าการใช้ความเร็วรอบที่มากเกินไปในการเขย่าอาจส่งผลให้การเจริญของเชื้อต่ำลงและส่งผลต่อการสร้างเอนไซม์ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณออกซิเจนที่มากเกินไปจะสามารถกดการสร้างเอนไซม์ของเชื้อได้ (O'Reilly, 1983)

การไม่ใส่กลูโคสในอาหาร Raja's medium จะทำให้ *B.cereus* ผลิตนิวทรัลโปรติเอสที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มากเกินไปจะทำให้เกิด catabolic repression โดยกลูโคสจะไปกดการทำงานของยีนส่วนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ทำให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ หรือทำให้เกิดการชะลอการสร้างเอนไซม์ (Doi, 1973; Bernlohr, 1964) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ เกษม พงษ์มณี (2536) ที่พบว่าระดับความเข้มข้นของกลูโคสมีผลต่อการสร้างเอนไซม์

ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากเปปโตนที่เหมาะสมในอาหาร Raja's medium คือ 0.5 กรัม% (w/v) ทำให้เชื้อผลิตนิวทรัลโปรติเอสที่มีค่าแอคติวิตีสูงสุด หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้นการใช้ปริมาณเปปโตนที่เหมาะสมจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ Kole และคณะ (1988) รายงานว่าถ้ามีโนโตรเจนปริมาณมากหรือน้อยเกินไปจะกดดันการสร้างเอนไซม์ได้ นอกจากนี้ Adin. และคณะ (2002) ได้ศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. PE-11 ศึกษาถึงสัดส่วนของปริมาณเปปโตนที่เหมาะสมในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตของเอนไซม์ ซึ่งผลที่ได้คือ ปริมาณเปปโตนมีผลต่อการควบคุมขบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ และปริมาณเปปโตนที่มากเกินไปมีผลยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์

ความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium คือ 0.10 กรัม % (w/v) เนื่องจากเชื้อสามารถผลิตนิวทรัลโปรติเอสที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากงานวิจัยของ Uttam C.B.และคณะ (1999) มีรายงานว่าการเติมแคลเซียมอิออนปริมาณ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า สามารถป้องกันการเกิด autolysis ของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus brevis* และ ทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น โดยเอนไซม์ยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน และยังมีรายงานว่าแคลเซียมอิออนสามารถเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ subtilisin จาก *Bacillus* sp. AK.1 โดยพบว่าแคลเซียมอิออนสามารถทำให้เอนไซม์มีความเสถียรโดยเพิ่มความแข็งแรงบริเวณพันธะไดซัลไฟด์ที่อยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (Helen S.T. และคณะ, 2000)

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium คือ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อจะผลิตนิวทรัลโปรติเอสที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด จากงานวิจัยที่ผ่านมา การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 จะสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงสุดหลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (เกษม พงษ์มณี, 2536) ดังนั้นการนำเอนไซม์มาใช้เพื่อประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม หรือ การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมีความจำเป็นที่จะต้องทราบช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ปริมาณสูงสุด และประโยชน์สูงสุดในการนำเอนไซม์มาใช้

การเตรียมเอนไซม์โปรติเอสและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

จากการทดลองในการเตรียม crude enzyme ปริมาณมากโดยใช้สูตรอาหารที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus ereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium สูตรที่ปรับแล้วปริมาณ 300 มิลลิลิตร สูตรอาหารตามข้อ 4.4.1 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH 7.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เมื่อเริ่มมีการเจริญเติบโตคงที่จะมีการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นและผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยใช้วิธี ultrafiltration ทำให้เอนไซม์มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 5 เท่า แสดงดังตารางที่ 4.7 จากนั้นจึงตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% ซึ่งทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเป็น 9 เท่าจาก crude enzyme จากขั้นตอนต่างๆทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นบางส่วน แต่จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียง 9 เท่าจาก crude enzyme ดังนั้นอาจต้องปรับปรุงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน คือ ใช้สารละลายในการตกตะกอนโปรตีนแทนแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 80% เช่น อะซีโตน หรือ เอทานอล เป็นต้น อาจทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นได้และสามารถนำไปศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนต่อไป

ผลการศึกษาสมบัติของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน

การหาน้ำหนักโมเลกุลของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีเซฟาเดกซ์จี-75 คอลัมน์โครมาโตรกราฟี พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 34,700 ดาลตัน และการหาหน่วยย่อยของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธีเอสดีเอส – พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส พบว่ามีแถบโปรตีนเข้ม 3 แถบ และมีแถบโปรตีนที่ 4 ต่อจากแถบที่ 3 ลงมาอีก 1 แถบ ซึ่งแถบโปรตีนที่ 1 – 3 มีน้ำหนักโมเลกุล ดังนี้ คือ 63,000, 54,000 และ 46,000 ดาลตัน ตามลำดับ ส่วนแถบโปรตีนที่ 4 มีน้ำหนักโมเลกุล 38,100 ดาลตัน และจากวิธี Substrate – Containing SDS Zymogram gel electrophoresis ทำให้ทราบขนาดน้ำหนักโมเลกุลของนิวทรัลโปรติเอสโดยใช้ casein เป็นสับเสตรท พบว่ามีแถบโปรตีนเกิดขึ้น 1 แถบ สามารถหาค่าน้ำหนักโมเลกุลได้เท่ากับ 44,700 ดาลตัน ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่านิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38,000 – 46,000 ดาลตัน แต่น้ำหนักโมเลกุลของนิวทรัลโปรติเอสที่น่าเชื่อถือ คือ วิธีเซฟาเดกซ์ จี – 75 คอลัมน์โครมาโตรกราฟี เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในรูปธรรมชาติ (native form) ส่วนในวิธี เอสดีเอส – พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิสและวิธี Substrate – Containing SDS Zymogram gel electrophoresis เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ เนื่องจาก SDS ไปทำให้โครงรูปของ tertiary structure ของเอนไซม์เปลี่ยนไปเป็น primary structure ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ได้อาจคลาดเคลื่อนจากค่าที่

ควรเป็นจริง จากการทดลอง น้ำหนักโมเลกุลของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีเซฟาเดกซ์ จี - 75 คอลัมน์โครมาโตรกราฟี มีขนาดเท่ากับ 34,700 ดาลตัน แต่จากการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธีเอสดีเอส – พอลิอะคริลาไมด์ มีน้ำหนักหนักโมเลกุล 38,100 ดาลตัน และวิธี Substrate – Containing SDS Zymogram gel มีน้ำหนักโมเลกุล 44,700 ดาลตัน จากการทดลองนี้พบว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus cereus* KCTC 3674 พบว่ามีโปรติเอส 2 ชนิด เมื่อแยกด้วย เอสดีเอส - พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส ซึ่งโปรตีนชนิดที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 36,000 ดาลตันและโปรตีนชนิดที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 38,000 ดาลตัน (Sam และคณะ, 2001) และยังมีรายงานว่า การหาหน่วยย่อยของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. DJ-1, DJ-2 และ DJ-3 โดยวิธี Zymogram ในการเปรียบเทียบความสามารถในการย่อย substrate 3 ชนิดคือ casein, fibrin และ gelatin จากการทดลองนี้ได้ใช้ substrate คือ casein ในการหาหน่วยย่อยของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธีเอสดีเอส - พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40,000 - 50,000 ดาลตัน (Nack และคณะ, 2001)

<u>การศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี จลนศาสตร์ของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วน</u>

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 7.0 แต่หลังจากอุณหภูมิเกิน 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะหมดความสามารถในการทำงานได้ สำหรับผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ พบว่าการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังบ่มเป็นเวลา 20 นาที แต่มีแนวโน้มลดลงเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสขึ้นไป จากงานวิจัยของ Yamagata และคณะ (1995) ได้ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ว่ายังมีแอคติวิตีอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่า นิวทรัลโปรติเอสที่ได้จากการทดลองมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานเช่นเดียวกับงานที่ผ่านมา แต่มีความเสถียรของเอนไซม์ที่ดีกว่า คือ เอนไซม์ยังมีแอคติวิตีที่เหลืออยู่มากกว่าเมื่อใช้เวลาในการบ่มเอนไซม์ที่นานกว่า

pH ที่เหมาะสมและ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ต่อการทำงานของนิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* ที่ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดคือที่ pH 7.0 (0.1 M Tris-HCl) โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สำหรับ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ พบว่าที่ pH 7.0 เอนไซม์จะมีความเสถียรมากที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 5 นาที แต่หลังจากบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และความเสถียรจะมีแนวโน้มลดลงหลังจากเวลาผ่านไป 15 นาที จากงานวิจัยที่ผ่านมา ได้ศึกษา pH ที่เหมาะสมและ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ต่อการทำงานของนิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *B. cereus* KCTC 3674 พบว่า มี pH ที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 8.0 ส่วน

ความเสถียรของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า นิวทรัลโปรติเอสที่ได้จากการทดลองนี้มีค่า pH ต่ำกว่าและมีความเสถียรต่อค่า pH ที่น้อยกว่าเมื่อดูจากค่าแอคติวิตีที่เหลืออยู่ แสดงว่าเอนไซม์นี้ยังไม่มีความเสถียรมากพอ

ผลการศึกษาผลของสับสเตรทธรรมชาติและสับสเตรทสังเคราะห์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ จากตารางที่ 4.8 ค่า K_m ของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* ระหว่าง casein และ azocasein พบว่า ค่า K_m ของ casein มีค่าน้อยกว่า azocasein แสดงว่า นิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* มีความชอบต่อสับสเตรทที่เป็น casein มากกว่าคือสามารถจับได้แน่นกว่า (high affinity) ส่วนนิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน และสำหรับการหาค่า ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ (Efficiency) พบว่าค่า Efficiency ของเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus cereus* มีค่ามากกว่าค่า Efficiency ของเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR25 แสดงว่าเอนไซม์จาก *Bacillus cereus* มีประสิทธิภาพการทำงานทั้ง casein และ azocasein มากกว่าเอนไซม์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 4.9 จากรายงานที่ผ่านมาของ Tony และ Jon(1983) ในการหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จากแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *Escherichia coli* B-11 และ *Klebsiella aerogenes* A ในการใช้สับสเตรทที่ย่อยคือ Benzylpenicillin, α-amino-benzylpenicillin, *p*-hydroxy-α-amino-benzylpenicillin, α-carboxyl-benzylpenicillin และ 3- thienyl α-carboxy-benzylpenicillin พบว่าในสับเสตรท 3 ชนิดแรกพบว่าค่า Efficiency ของเอนไซม์จาก *Escherichia coli* B-11มีค่ามากกว่า *Klebsiella aerogenes* A แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ที่ดีกว่า *Klebsiella aerogenes* A ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ผลิตมาจากจุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกันย่อมมีประสิทธิภาพในการทำงานที่แตกต่างกัน ขึ้นกับความชอบของเอนไซม์ต่อสับเสตรทและอัตราเร็วสูงสุดในการทำปฏิกิริยา เป็นต้น

การศึกษาตัวเร่งการทำงานของเอนไซม์จาก *Bacillus cereus* พบว่าการใช้แคลเซียมอิออนที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ใน crude enzyme สามารถเร่งการทำงานของเอนไซม์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับนิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ให้ผลเช่นเดียวกัน แต่แคลเซียมอิออนไม่มีผลในการเร่งการทำงานในนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *B. cereus* และ *B. subtilis* TISTR 25 ได้มีผู้ศึกษาโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* Ak.1คือ แคลเซียมอิออน ซึ่งการมีแคลเซียมอิออนจะช่วยให้พันธะไดซัลไฟด์มีความแข็งแรงมากขึ้น ดังนั้นเอนไซม์จึงมีความเสถียรมากขึ้น (Helen S.ละคณะ, 2000) จากการทดลองพบว่าแคลเซียมอิออนไม่มีผลต่อการทำงานของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน อาจเนื่องจาก ในโมเลกุลของเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมที่มากพอจากสูตรอาหารของ Raja's ที่จะทำให้เอนไซม์มีความเสถียร และมีรูปร่างที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่แล้ว ส่วนใน crude enzyme ของทั้งสองสายพันธุ์พบว่า การที่ค่าแอคติวิตีจำเพาะที่เหลือ

อยู่ของเอนไซม์มีค่ามากขึ้น แสดงว่าการเติมแคลเซียมอิออนใน crude enzyme ช่วยทำให้เอนไซม์มีรูปร่างที่เหมาะสมต่อการทำงานมากขึ้น

การศึกษาตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้สารคีเลตติ้ง คือ EDTA ที่ความเข้มข้น 2 – 10 มิลลิโมลาร์ พบว่า EDTA สามารถยับยั้งการทำงานของนิวทรัลโปรติเอสที่ได้จาก *B.cereus* ได้ดีกว่านิวทรัลโปรติเอสจาก *B.subtilis* TISTR แสดงว่านิวทรัลโปรติเอสจาก *B. cereus* เป็นเมทัลโลโปรติเอส ซึ่งมีโลหะอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ดังนั้นการศึกษาถึงโลหะที่อยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์อาจใช้วิธี x – ray crystallography เพื่อดูโครงสร้างของเอนไซม์และทราบถึงโลหะที่อยู่บริเวณเร่งได้ จากการทดลองนี้การเติม EDTA สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยของ Sam และคณะ (2001) พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของเมทัลโลโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* KCTC คือ EDTA และมีโลหะสังกะสีอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์

ผลของไอออนโลหะ จากตารางที่ 4.10 พบว่าไอออนโลหะส่วนใหญ่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งจากการเติมไอออนของโลหะ จะทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีจำเพาะที่เหลืออยู่ลดลง แสดงว่าไอออนของโลหะมีผลต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งอาจทำให้เอนไซม์มีรูปร่างที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงาน หรือไปบดบังบริเวณเร่งของเอนไซม์ จึงส่งผลให้แอคติวิตีจำเพาะที่เหลืออยู่ลดลง

การศึกษาอุณหภูมิในการเก็บรักษาเอนไซม์ที่ภาวะต่างๆ จากรูปที่ 4.61 พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์คือ การเก็บเอนไซม์ใน glycerol 10% ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ การเก็บเอนไซม์ในรูปเอนไซม์ผง (lyophilized) ที่อุณหภูมิห้อง แต่การเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปผง มักมีปัญหาในการใช้เนื่องจาก อาจเป็นสาเหตุในการแพ้ ทำให้เกิดอาการคัน ไม่สะดวกในการใช้งาน และเครื่องมือในการทำเอนไซม์เป็นผงมีราคาแพง ดังนั้นจึงควรเก็บในรูปสารละลายเอนไซม์ที่เติม glycerol 10% ดีกว่า ได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปสารละลายเอนไซม์และในรูปเอนไซม์ผง พบว่าการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปเอนไซม์ผงจะสามารถเก็บไว้ได้นานโดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (เกษม พงษ์มณี, 2536)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสจากตัวอย่างดินในประเทศไทยจาก 63 ตัวอย่างดิน สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสได้ทั้งหมด 12 และสามารถคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดคือแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 โดยวิธี azocasein hydrolysis ภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส , pH 7.0 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 เป็นแบคทีเรียจากดินบริเวณก้นบ่อน้ำเค็มร้อน จังหวัดกระบี่ จากการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยวิธีทางสัณฐานวิทยา ทางชีวเคมีและการยืนยันผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทางชีวเคมีโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA gene สรุปว่าเป็น *Bacillus cereus*

2. การหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus cereus* และการผลิตเอนไซม์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ อาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ Raja's medium ที่ประกอบด้วย เปปโตน 0.5 กรัม% (w/v) โดยไม่เติมกลูโคส แคลเซียมอิออน 0.1 กรัม% (w/v), ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นคือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเขย่าคือที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. การเตรียมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อ Raja's medium ในสูตรที่ปรับแล้ว ($CaCl_2.2H_2O$ 1 กรัม, K_2HPO_4 0.6 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม, NaCl 0.045 กรัม, peptone 5 กรัม ในปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จำนวน 8 ขวด เก็บเอนไซม์หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้สารละลายเอนไซม์ 2,400 มิลลิลิตร มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรติเอส 0.4 U/mg protein จากนั้นนำมาทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเป็น 2.0 U/mg protein จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 3.56 U/mg protein

4. การศึกษาสมบัติของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนของนิวทรัลโปรติเอสจาก *Bacillus cereus* สำหรับการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเซฟาเดกซ์ จี-75 คอลัมน์ นิวทรัลโปรติเอสจาก *Bacillus cereus* มีน้ำหนักโมเลกุล 34,700 ดาลตัน

5. การศึกษาหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยการใช้วิธี เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Bacillus cereus* ให้แถบโปรตีน 4 แถบ แถบที่ 1 มี น้ำหนักโมเลกุล 63,000 ดาลตัน และ แถบที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 54,000 ดาลตัน แถบที่ 3 มีน้ำหนักโมเลกุล 46,000 ดาลตัน และแถบที่ 4 มีน้ำหนักโมเลกุล 38,100 ดาลตัน

6. การศึกษาหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้วิธี Substrate -Containing SDS Zymogram gel นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Bacillus cereus* ให้แถบที่เกิดการย่อยโปรตีน 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 44,700 ดาลตัน

7. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของนิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* คือที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยให้ผลเช่นเดียวกันทั้ง crude enzyme และ นิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน สำหรับความเสถียรของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์ยังไม่สูญเสียแอคติวิตีเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส และแอคติวิตีจะลดลงครึ่งหนึ่งหลังบ่มเอนไซม์ 65 องศาเซลเซียส และมีแนวโน้มลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

8. pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของนิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* คือที่ pH 7.0 และเอนไซม์จะยังคงมีแอคติวิตีในช่วง pH 6.0 - 9.0 แต่ pH ที่เหมาะสมคือ pH 7.0 หลังจากเวลาผ่านไป 15 นาที ค่าความเสถียรของเอนไซม์ในทุกๆ pH จะลดลงครึ่งหนึ่ง

9. สับสเตรทที่เหมาะสมต่อการทำงานของนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Bacillus cereus* คือ casein ส่วนประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (Efficiency) นั้น นิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* มีประสิทธิภาพในการทำงานได้ดีกว่านิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในสับสเตรตทั้ง 2 ชนิด คือ casein และ azocasein เนื่องจากมีค่า Efficiency ที่สูงกว่า

10. ไอออนของโลหะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และสารที่ยับยั้งการทำงานของนิวทรัลโปรติเอส คือ EDTA โดยมีความเข้มข้น 2 - 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งใน crude enzyme และนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* สำหรับนิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ EDTA สามารถยับยั้งการทำงานของ crude enzyme ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนสามารถยับยั้งการทำงานได้ 50 เปอร์เซ็นต์

11. แคลเซียมอิออนมีความสามารถในการเร่งการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* ได้ คือ แคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถเร่งการทำงานได้ 100 เปอร์เซ็นต์ใน crude enzyme ส่วนในนิวทรัลโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน แคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อการเร่งการทำงานของเอนไซม์ สำหรับนิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

12. ภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์คือ การเก็บในรูปสารละลายเอนไซม์ที่เติม glycerol 10% เนื่องจากง่ายต่อการใช้งานและไม่ก่อให้เกิดฝุ่นที่อาจก่ออาการระคายเคือง เหมือนกับเอนไซม์ผง (lyophilized)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กฤษณา โพธิสารัตนะ : 2535. *การศึกษาสมบัติของแอลคาไลน์โปรติเอสจาก Bacillus sp. ชนิดทนต่อสภาวะด่าง* . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

. เกษม พงษ์มณี : 2536. *การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสโดย Bacillus subtilis* TISTR 25 . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ - มหาวิทยาลัย.

ชัยสิทธิ์ สิทธิเวช: 2544. *การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิสูง*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ : 2532. *การแยกให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของแอลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ Bacillus subtilis* TISTR 25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สนธยา ศรีเมฆ. 2533. *ผลของสารต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิตโปรติเอสและเอนไซม์ในไนโตรเจนเมทาบอลิซึมของ Bacillus subtilis* TISTR 25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุดมลักษณ์ ธิติรักษ์พาณิชย์. 2533. *การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสจาก Bacillus subtilis* TISTR 25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Adinarayana K., Ellaiah P., 2002. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. *J. Phamaceut Sci* .3: 272 - 278.

Aunstrup, K., 1980. Proteinase. In Rose, A.H. (eds.), *Econ. Microb*. 114: 49 - 77.

Aiyappa, P.S., Traficante, L.J., and Lampen, O.J., 1977. Penicillinase - Releasing Protease of *Bacillus licheniformis*: Purification and General Properties. *J. Bacteriol*. 129: 191 - 197.

Ameur C., Sara B., Aurora R., Hadda O., Abdellatif B., and Danike D., 2003. *Bacillus anthracis* Diverges from Related Clades of the *Bacillus cereus* Group in 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Transcribed Spacers Containing tRNA Genes. *App.and Environ. Microbiol*. 69:33 - 40.

Bach H.J., Errampalli D., Leung K.T., Lee H., Hartmann A., Trevors J.T., and Munch J.C., 1999. Specific Detection of the Gene for the Extracellular Neutral Protease of *Bacillus cereus* by PCR and Blot Hybridization. *Appl. Env. Microbi*. 65: 3226 - 3228.

Barrett,F.F., 1979. Enzyme Uses in Milling and Baking Industries. In Reed, G.(eds), *Enzyme in Food Processing*. 301 - 330.

Bernlohr, R.W., and Clark, V., 1971. Characterization and Regulation of Protease Synthesis and Activity in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol*. 105: 276 - 283.

Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram quantities of Protein Utilizing The Principle Dye Binding. *Anal.Biochem.*72: 248 - 254.

Branislav V. and Gerard V. Expression of the Neutral Protease Gene from a Thermophilic *Bacillus* sp. BT1 Strain in *Bacillus subtilis* and Its Natural Host Identification of a Functional Promotor. *J. Bacteriol*. 182 : 4104 - 4107.

Chain, E.B., and Gualandi, G., 1954. *Rend. 1 st Super. sanit*., (English end), 17.5.

Chaloupka, J., and Kreckova, P., 1968. Protease Repression in *Bacillus megaterium* KM. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 8: 120 - 124.

Choi N.S., Lee K-S L., Han K-Y., and Kim S-H.,2001. Comparison of Three Substrates (Casein, Fibrin, and Gelatin) in Zymographic Gel. *J. Biochem and Molec. Biol*. 34 (6) : 531 - 536.

Dancer, B.N., and Mandelstam, J., 1975. Production and Possible Function of Serine Protease During Sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. 121: 406 - 410.

Doi R.H., 1972. Role of Protease in Sporulation. *Curr. Top. Cell. Regul*. 6: 1 - 20.

Don, R. Durham., David B. Stewart., and Stellwag, E.J., 1987. Novel Alkaline-and heat stable serine proteases from Alkalophilic *Bacillus* sp. Strain GX 6638. *J. Bacteriol.* 169: 2762 - 2768.

Drapeau, G.R., 1978. Role of a Metalloprotease in Activation of the Precursor of Staphylococcal Protease. *J. Bacteriol*. 136: 607 - 613.

Endo, S., 1962. Studies on Protease Produced by Thermophili Bacteria. *J.Ferment. Technol*. 40: 346 - 353.

Fujiwara, N., and Yamamoto, K., 1987. Production of Alkaline Protease in Low - Cost Medium by Alkalophilic *Bacillus* sp. and Properties of the Enzyme. *J. Ferment. Technol.* 65 vol.3: 345 - 348.

Giesecke, U.E, Bierbaum, G., Rudde, H., Spohn, U., and Wandrey, C., 1991. Production of Alkaline Protease with *Bacillus lichenisform is* in a Controlled Fed-Batch Process. *Appl*. *Microbiol, Biotechnol*. 26: 720 - 724.

Godfrey, T., 1983. Flavouring and Coloring. In Godfrey, T., and Reichelt, J. (eds), *Industrial Enzyme*.305-314. London: Macmillan.

Griffin, P.L., and Forgarty, W.M., 1973. Production and Purification of the Metalloprotease of *Bacillus Polymyxa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 26: 185 - 190.

Helen S T., Clyde A. S., Edward N.B., and Roy M. D., 2000. Purification and characterization of AK.1 protease, a thermostable subtilisin with a disulfide bond in the substrate - binding cleft. *Biochem.J*. 350: 321 - 328.

Halpern, MG., 1981. Production from *Bacillus subtilis* ATCC 21415 Through 21418. *Industrial Enzyme from Microbial Source* (Recent Advances) Chemical Technology Review. 186: 53-58, NOYES DATA Corporation, NewJersey, U.S.A.

Hideto T., Teruhiko A., and Koki H., 1989. Production of extremely Thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl. Microb .Biotec.* 30: 120 - 124.

Jaroslav, V., 1987. External Factor Involved in the Regulation of Synthesis of an Extracellular Proteinase in *Bacillus megaterium*: The Effect of Glucose and Amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 26: 373 - 377.

John, D.H., and David, G.C., 1991. The Response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to Manganese During Continuous - Phase Growth. *Appl, Microbiol. Biotechnol*. 35: 72 - 76.

Jolliffe, L.K., Doyle. J., and Streips.U.N., 1980. Extracellular Protease Modify Cell Wall Turnover in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. 141: 1199 - 1208.

Kole. M.M., Daper.I., and Gerson. F.G., 1988. Production of Protease by *Bacillus subtilis* Using Simultaneous Control of Ammonium Concentrations. *J. Chem. Tech. Biotechnol*. 41: 197 - 206.

Mala,B.R., Aparana, M.T., Mohini S.G., and Vasanti V.D, 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbrial Protease. *Microb. Mollec. Biol. Rev*. 62: 597 - 635.

Markkanen, P.H. and Bailey, M.J., 1974. Stimultaneous Production of α -Amylase, β-Glucanase and Proteolytic Enzymes by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Chem. Biotechnol*. 24: 93 - 103.

Maurizi, M.R., and Switzer, R.L., 1980. Proteolysis in Bacterial Sporulation. *Curr. Top. Cell. Regul*. 16: 163 - 224.

Miller, B.M., Listky, W., 1976. " Microbial Enzyme ", *Industrial Microbiology*, Mc Graw-Hill, INC.,

Moon, S.H., and Parulekar, S.J., 1991. A Parametric Study of Protease Production in Batch and Fed - Batch Cultures of *Bacillus firmus. Biot. Bioeng*. 37: 467 - 483.

O' Reilly, T., and Day, D.F., 1983. Effect of Culture Conditions on Protease Production by *Aeromonas hydrophilia*. *Appl. and Environ. Microbiol*. 45 vol.3: 1132 - 1135.

Outtrup, H., and Boyce, C.O., 1990. Microbrial Protease and Biotechnology . In Forgarty.W.M. & Kelly.C.T. Microbrial Enzyme and Biotechnology. 2 nd .227-254. New York : The United State of America.

Pero,J., and Sloma,A., 1993. Protease. In Sonenshien.A.L. (eds.). *Bacillus subtilis and Other Gram- Positive Bacteria*. 939-952. New York: The United State of America.

Piggot , P.J., and Coote, J.G., 1976. Genetic Aspects of Bacterial Endospore Formation. *Bacteriol. Rev.* 40: 908 - 962.

Pier, L.M., Maria, G.F., and Carlo Parini., 1988. Thermostable alkaline protease produces by *Bacillus thermoruber* - a new species of *Bacillus*. *Appl. Micro. Biotech*.28: 409 - 413.

Priest, F.G., 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in The Genus *Bacillus* . *Bacteriol. Rev.* 41: 711 - 753.

Raja, N. Z, Che N.R., and Kama, A., 1994. Purification and characterization of a heat - stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *A ppl. Micro. Biot*. 40: 822-827.

Roger, R.B., Bernard, O., 1972. Process for the Preparation of Protease Active in Alkaline Medium.*US. Patent 3,871,963*.Mar.18.

Sam S., Young J., In-Koo R., 2001. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674. *Arch Microbiol*. 175: 458-461.

Sookkheo B., Supachaikul S., Phutrakul S., and Chen S –T ., 2000. Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Prot.Expres. and Purific*.20: 142 - 151.

Sheeler and Bianchi, D.E., 1987. *Cell and Molecular Biology*. 3rd ed., John, Wiley& Son, Inc., New York.

Ulrike E., Till R., Helmut B., Monica E. and Erik C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acid Reserch*.17 vol. 19: 7843 - 7853.

Uttam C., Banerjee., Rajaesh K., Sani, W. A., Raman S., 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Proc. Biochem*. 35: 213 - 219.

Ward, O.P., 1983. Proteinase. In Fogarty, W.M.(eds .), Microbial Enzyme and Biotechnology. London and New York: *Applied Science Publishers*. 251 - 317.

Ward , O.P., 1985. Proteolytic enzyme. *Comprehensive Biotechnology* (Moo-Yong, m., ed.).3: 789 - 818. Peramon press, Oxford. New York. Toronto. Sydney. Frankfurt.

Webb, M., 1949. The Influence of Magnesium on Cell Division of Various Bacterial Species in Complex Media. *J. Gen. Microbiol*.3: 410 - 417.

Yukio T., Hisataka T., Hidesato S. and Yuzuru S., 1987. *Bacillus stearothermophilus* KP 1236 neutral protease with thermostabiity comparable to thermolysin.27:186 - 191.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สารละลายสำหรับการสกัด DNA

1. SET buffer (sucrose 20%, Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, EDTA 50 mM)

ผสมสารละลายให้เข้ากันในหลอดแก้วไร้เชื้อ (sterile test tube) จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ

sucrose 25 %	40	มิลลิลิตร
Tris-HCl 1 M, pH 7.6	2.5	มิลลิลิตร
EDTA 0.5 M, pH 8.0	5	มิลลิลิตร

1.1 sucrose 25 %

ละลาย sucrose 12.5 g ในน้ำ 40 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 50 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Tris-HCl 1M, pH 7.6 (2.5 มิลลิลิตร)

ละลาย Tris base 1.21 g ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นประมาณ 0.60 ml ตั้งทิ้งให้สารละลายเย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง ปรับ pH เป็น 7.6 โดย HCl หรือ NaOH ที่เจือจาง ปรับปริมาตร 10 ml ทำให้ไร้เชื้อโดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ละลาย disodium ethylene diamine tetraacetate .2H_2O (EDTA) จำนวน 1.861 กรัม ในน้ำ 8 มิลลิลิตร คนให้ละลายมากที่สุดโดยปรับให้เป็น pH 8.0 โดยใส่ NaOH 0.2 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. TEN buffer (Tris-HCl 10 mM pH 7.6 , EDTA 1 mM, NaCl 10 mM)

ผสมสารในหลอดแก้วไร้เชื้อ ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ

Tris-HCl 1 M , pH 7.6	0.1	มิลลิลิตร
EDTA 0.5 M, pH 8.0	0.02	มิลลิลิตร
NaCl 5 M	0.02	มิลลิลิตร

3. lysozyme (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ใน TEN buffer

ละลาย lysozyme 10 มิลลิกรัม ใน TEN buffer จำนวน 1 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วไร้เชื้อ

4. SDS 10 %

ละลาย sodium dodesyl sulfate (sodium lauryl sulfate) จำนวน 1กรัม ในน้ำ 9 มิลลิลิตรอุ่นที่ 68 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้การละลายเร็วขึ้น ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

5. sodium acetate 5 M, pH 7.4

ละลาย sodium acetate.3H_2O 6.8 กรัม ในน้ำ 8 มิลลิลิตร ปรับ pHให้เป็น 7.4 โดยการเติม glacial acetic acid ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. 10 X และ 1 X Tris - borate buffer (10X TB และ TB)

เตรียม 10 X TB โดยละลาย Tris base 10.8 กรัม boric 5.5 กรัม และ Na_2EDTA 0.93 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 10X TB นี้ให้เป็น TB โดยเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ลงใน 10X TB จำนวน 100 มิลลิลิตร

7. agarose 0.7 %

ใส่ agarose 0.7 กรัม ลงใน TB 100 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดพร้อมคนเป็นครั้งคราวจนละลายหมด ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดถึง 50 มิลลิลิตร ก่อนนำไปเทลงในเจลแชมเบอร์

8. tracking dye (0.025 % มิลลิกรัม Ficoll 400 จำนวน 4 กรัม และ SDS 50 มิลลิกรัม) ลงในน้ำกลั่นไร้เชื้อจำนวน 8 มิลลิลิตร หลังละลายหมดปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

หมายเหตุ : เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมและเก็บสีติดตามควรผ่านการทำลายนิวคลีเอสโดยการออโตเคลบ

9. DNA staining solution (ethidium bromide 2.5 mg/ml)

ละลาย ethidium bromide 2.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

1. วิธีเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำ เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส

1.1 Stock reagent

Acrylamide 30%	29.2	กรัม
N,N' –Methylene-bis-acrylamide	0.8	กรัม

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

1.2 Tris-HCl 5 M pH 8.8 (100 มิลลิลิตร)

Tris(hydroxymethyl) – aminomethane	18.17	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วย HCl 1 M แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

.

1.3 Tris-HCl 2.0 M pH 8.8 (100 มิลลิลิตร)

Tris(hydroxymethyl) – aminomethane	24.2	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วย HCl 1 M แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.4 Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (100 มิลลิลิตร)

Tris(hydroxymethyl) – aminomethane	6.06	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย HCl 1 M แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.5 Tris-HCl 1.0 M pH 6.8 (100 มิลลิลิตร)

Tris(hydroxymethyl) – aminomethane	12.1	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย HCl 1 M แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.6 solution B (เอสดีเอส – พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส), 100 มิลลิลิตร

Tris-HCl 2 M	75	มิลลิลิตร
SDS 10 %	4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	21	มิลลิลิตร

.

1.7 solution C (เอสดีเอส – พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส), 100 มิลลิลิตร

Tris-HCl 1 M	50	มิลลิลิตร
SDS 10 %	4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	46	มิลลิลิตร

1.8 tracking dye สำหรับ เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิส

Tris-HCl 1 M, pH 6.8	0.06	มิลลิลิตร
glycerol 50 %	2.5	มิลลิลิตร
SDS 10%	2.0	มิลลิลิตร
β - mercaptoethanol	0.5	มิลลิลิตร
bromophenol blue 1%	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.4	มิลลิลิตร

1.9 Electrode buffer (1,000 มิลลิลิตร)

Tris(hydroxymethyl) –aminomethane	3.0	กรัม
glycine	14.4	กรัม
SDS	1.0	กรัม

ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร (pH สุดท้ายควรเป็น 8.3)

2 วิธีเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำ non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

2.1

Tris-HCl 1M, pH 6.8	3.1	มิลลิลิตร
glycerol	5.0	มิลลิลิตร
bromophenol blue 1%	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.4	มิลลิลิตร

2.2 Electrode buffer (1,000 มิลลิลิตร)

Tris(hydroxymethyl) – aminomethane	3.03	กรัม
glycine	14.4	กรัม

ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร (pH สุดท้ายควรเป็น 8.3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วิธีเตรียมสารละลายที่ใช้ในการย้อมสีเจล (comassie brilliant blue staining)

3.1 staining solution, 100 มิลลิลิตร

comassie brilliant blue R-250	0.1	กรัม
methanol	45	มิลลิลิตร
acetic acid	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	45	มิลลิลิตร

3.2 destaining solution ,100 มิลลิลิตร

methanol	10	มิลลิลิตร
acetic acid	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

1. การหาปริมาณไนโตรเจรทั้งหมดใน peptone โดยวิธี Kjeldahl

ชั่ง peptone มา 0.1 และ 0.5 กรัม อย่างละ 2 หลอดใส่ในหลอดตัวอย่าง blank 2 หลอด โดยใส่น้ำกลั่นแทน peptone จากนั้นเติมตัวเร่งปฏิกิริยาผสม (โพแทสเซียมซัลเฟต 95 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม)ปริมาตร 1 กรัม และเติมกรดซัลฟุริกปริมาณ 20 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปกลั่นโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 85 มิลลิลิตร นำเอาขวดรูปกรวยใส่กรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 60 มิลลิลิตร ซึ่งเติมอินดิเคเตอร์ 2 - 3 หยด มารองรับสารละลายที่กลั่นได้ จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว แล้วจึงนำไปไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ไตเตรทจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงใส

คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนจากสูตรข้างล่างนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times C \times 1.4}{V}$$

A = ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B = ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

C = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

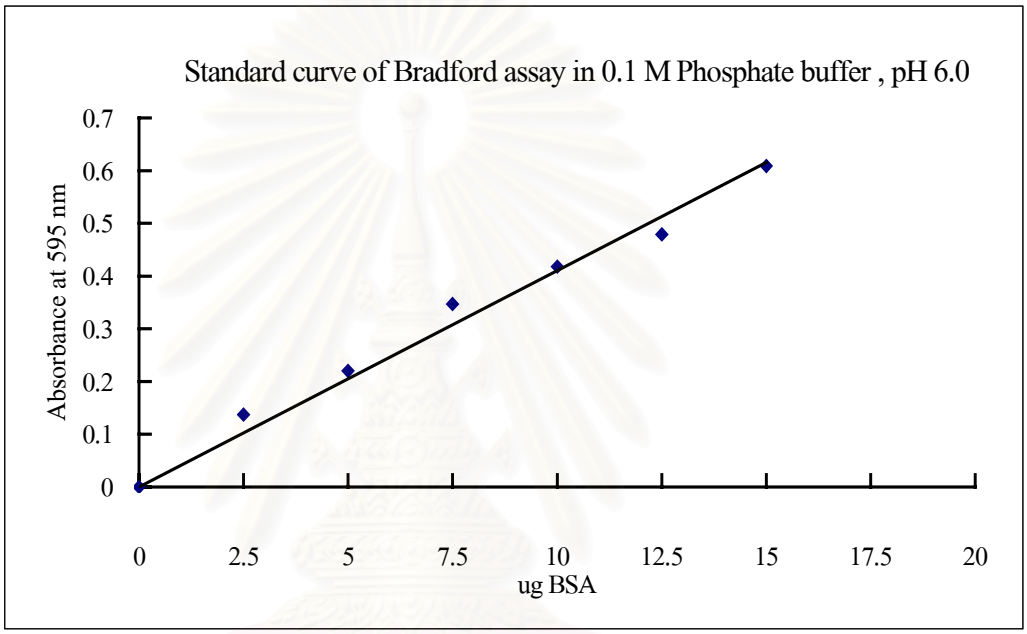
V = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

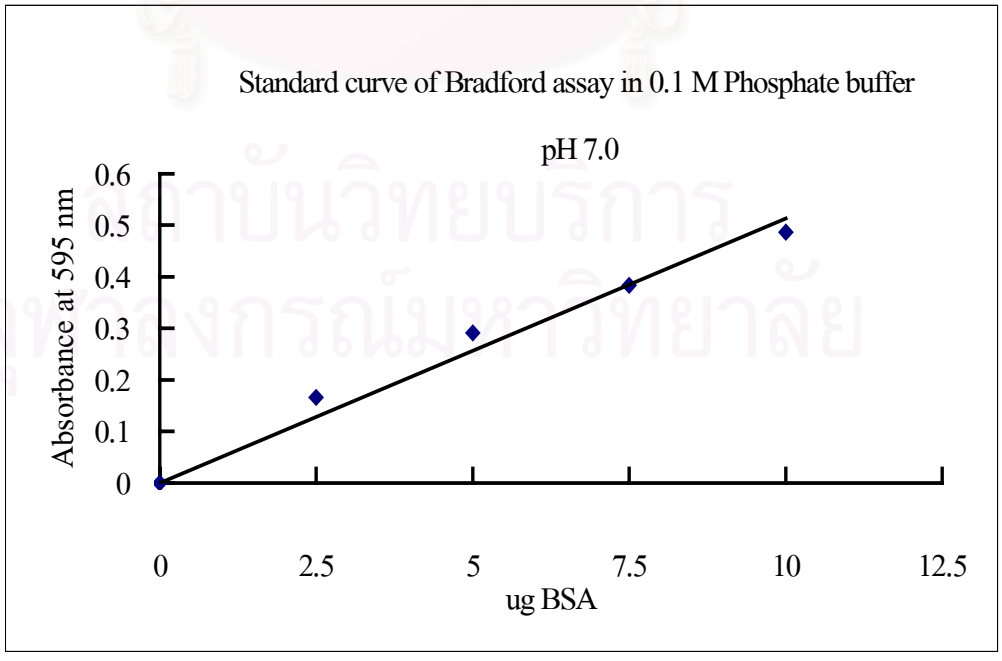
1.4 = ปริมาณของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N จำนวน 1 มิลลิลิตรที่สมมูลย์กับปริมาณของไนโตรเจน 1.4 มิลลิกรัม

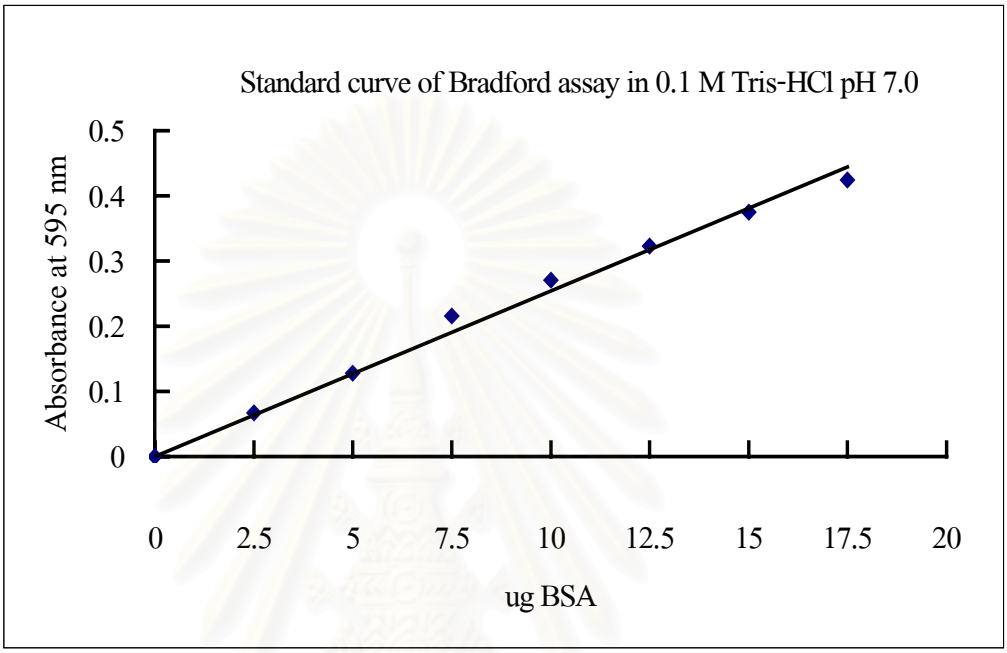
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

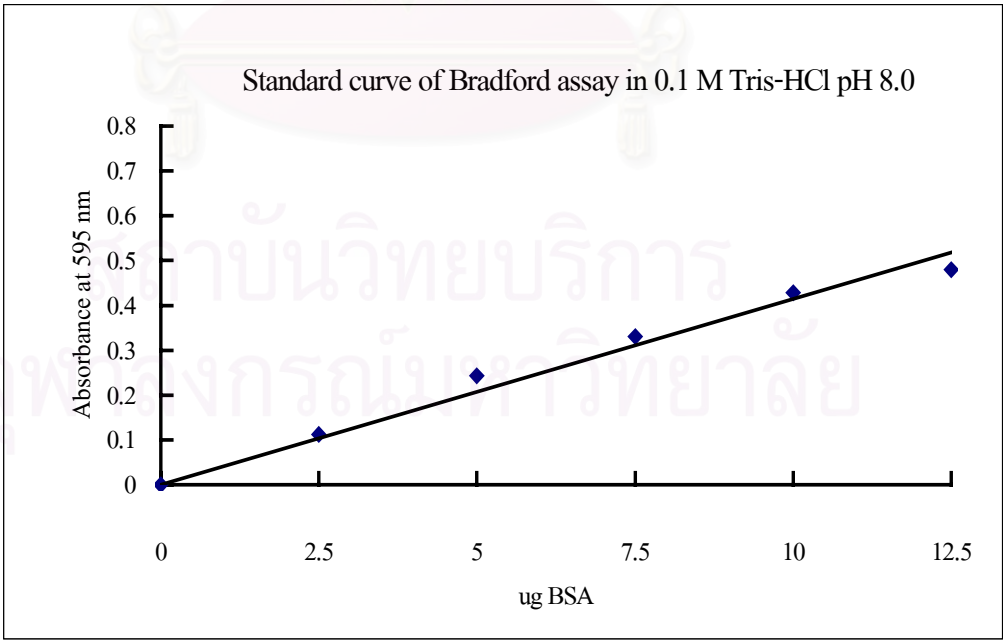
ภาคผนวก ง.

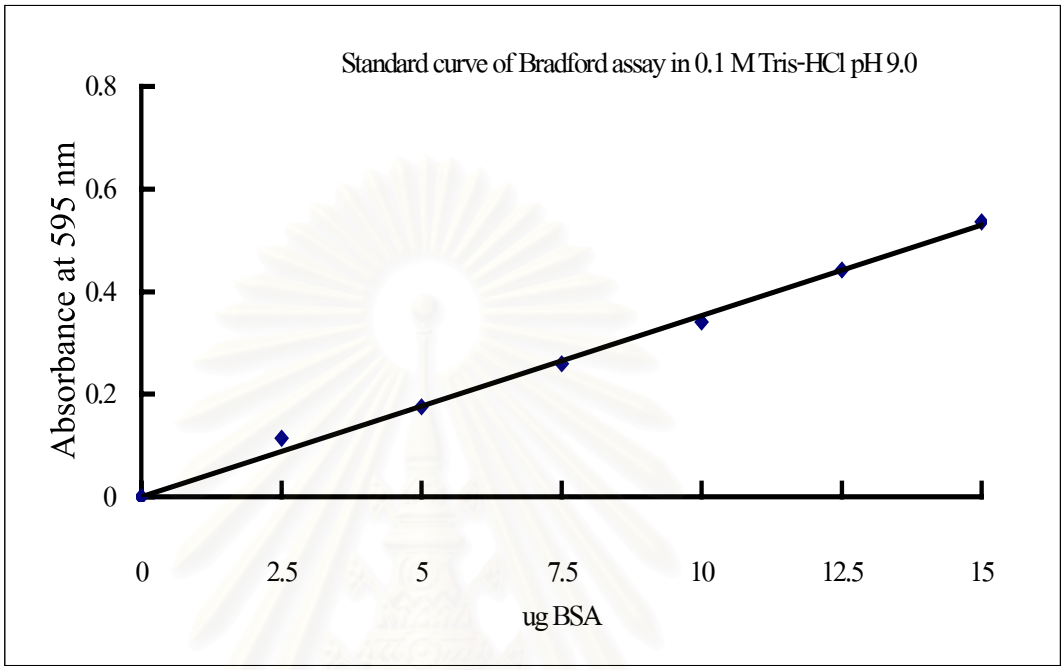
กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี micromethod ของ Bradford ใช้ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ปริมาณ 0 - 10 ไมโครกรัม วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.0 - 12.0

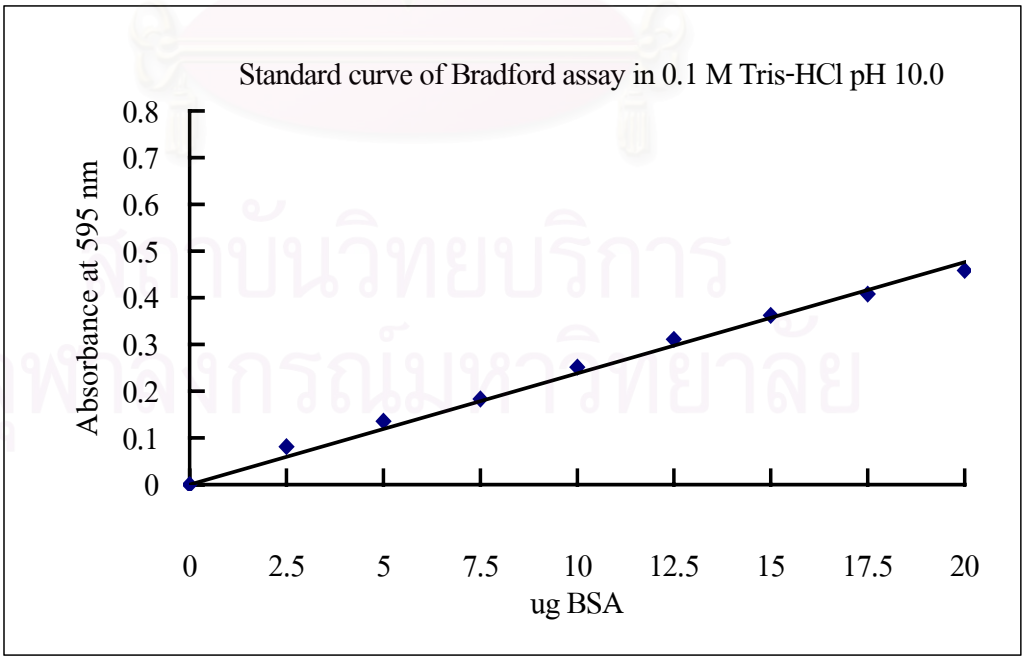


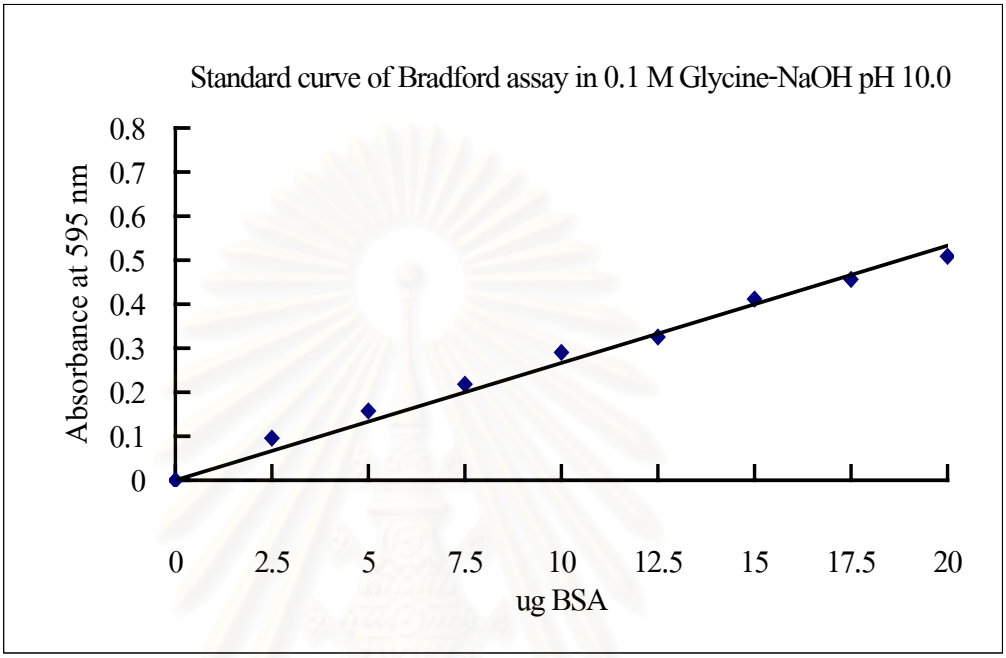


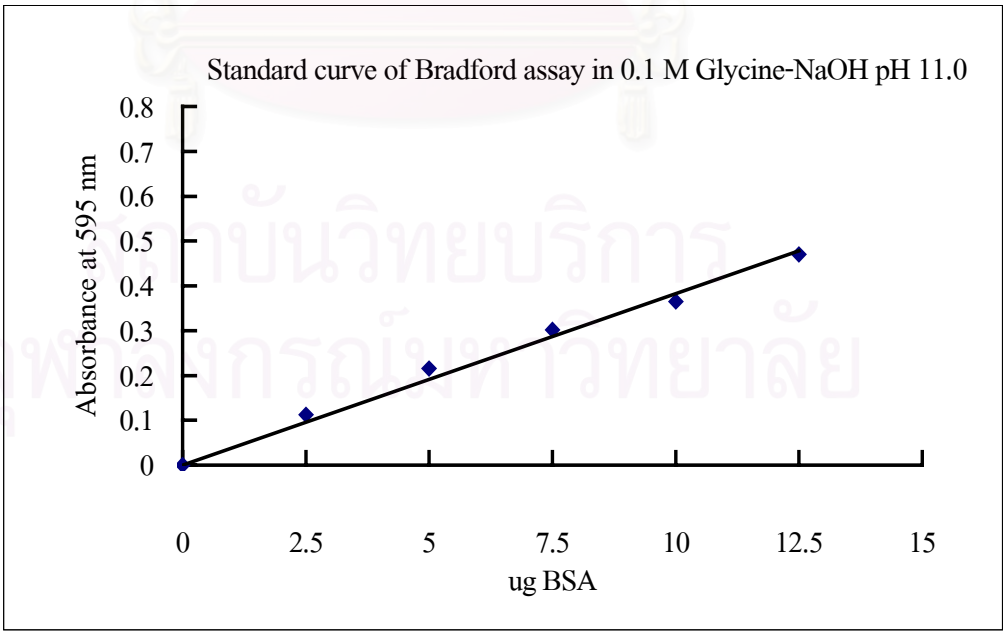

Standard curve of Bradford assay in 0.1 M Tris-HCl pH 7.0
Absorbance at 595 nm
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15
17.5
20
ug BSA

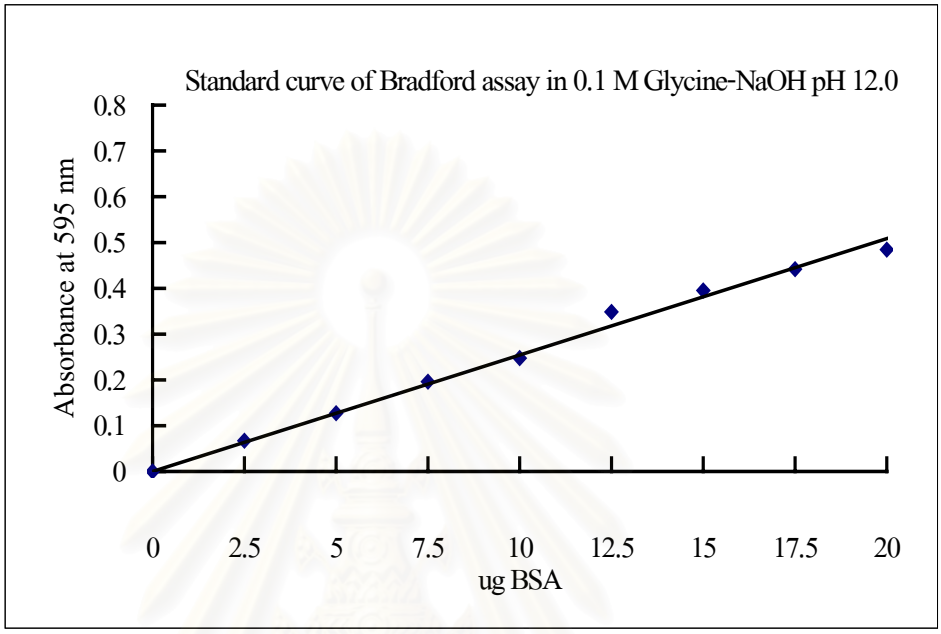

Standard curve of Bradford assay in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0
Absorbance at 595 nm
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
2.5
5
7.5
10
12.5
ug BSA


Standard curve of Bradford assay in 0.1 M Tris-HCl pH 9.0
Absorbance at 595 nm
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15
ug BSA


Standard curve of Bradford assay in 0.1 M Tris-HCl pH 10.0
Absorbance at 595 nm
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15
17.5
20
ug BSA


Standard curve of Bradford assay in 0.1 M Glycine-NaOH pH 10.0
Absorbance at 595 nm
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15
17.5
20
ug BSA

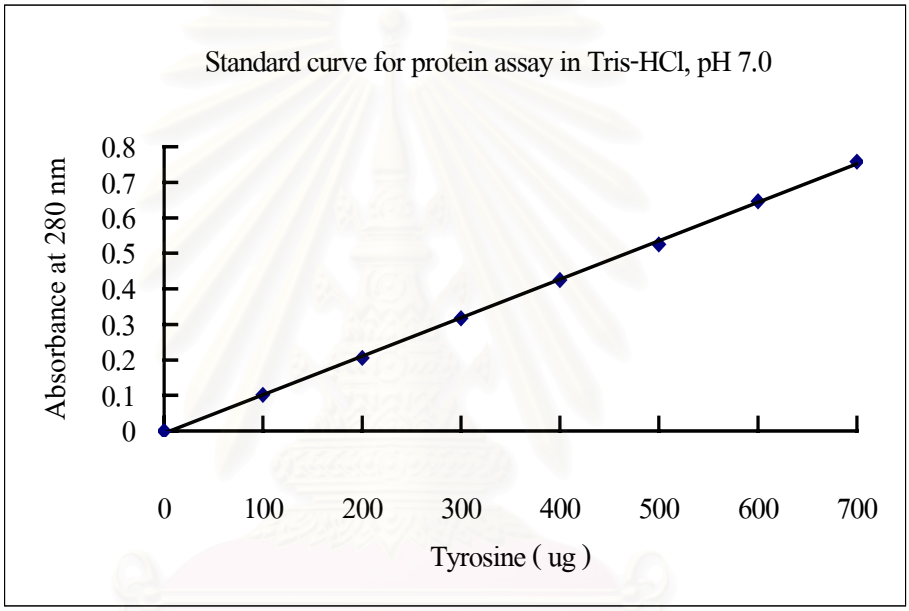

Standard curve of Bradford assay in 0.1 M Glycine-NaOH pH 11.0
Absorbance at 595 nm
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15
ug BSA



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ.

กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของสารละลายไทโรซีน ที่มีความเข้มข้น 0-14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอภิรดี อุดมสิน เกิดเมื่อวันที่ 24 สิงหาคม พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดนนทบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้เข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ในปีการศึกษา 2542 ปัจจุบันรับราชการในตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ หัวหน้าแผนกห้องปฏิบัติการทางเคมี ที่โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย