บรรณานุกรม

Aunstrup, K., O. Anderson,and H. Outtrup. 1971. Proteolytic Enzymes, Their production and use. UK Patent 1,243,784.

Aunstrup, K., 1979. Production, isolation and economics of extracellular enzymes. Appl.Biochem.Bioeng. vol.2 pp. 27-69. Academic press, New York.

Aunstrup, K., 1980. Proteinase. Economic Microbiology (Rose,A.H.,ed.) Academic press, London pp. 49-114.

Aunstrup, K., 1981. New developments in the production and use of *Bacillus* protease. Abh. Akad. Wiss. DDR, Abt.Math.Naturwiss. Tech (3N, Mikrob.Enzymprod.), pp. 447-457.

Ajinomoto Co. Inc. 1973. Method of producing protease by fermentation. UK Patent 1,323,716.

Barfoed, H.C. 1983. "Detergents." Industrial Enzymology. The application of enzymes in industry. pp. 284-293.

Bernlohr, R.W.,and V. Clark. 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 of Protein Dye Binding. Anal.Biochem.72:248-254.

Chau,P.T.T.,and H. Urbanek.1974. Serine neutral protease from *Bacillus pumilus* as metalloenzyme. Acta Microbiol. Pol. ser. B. 6:21-5.

Delente, J.J. 1974. Heat resistant neutral protease enzyme. US Patent 3,796,635.

Delente, J.J, J.H. Johnson, M.J. Kuo, R.J. O'Conner, and L.E. Weeks. 1974. Production of a new thermostable neutral ;-galactosidase from a strain of *Bacillus stearothermophilus.* Biotechnol Bioeng. 16-1227.

Deutscher, M.P.,and A. Kornberg. 1968. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination.VI. Patterns of enzyme development during growth and sporulation of *Bacillus subtilis.* J. Biol. Chem. 243(18):4653-4660.

Dod, B.J., and G. Balassa. 1973. The kinetics of extracellular protease production in an abnormal sporulation mutant of *B. subtilis.* Biochimie. 55:1005.

Durham, D.R., D.B. Stewart, and E.J. Stellwag. 1987. Novel alkaline- and Heat-stable serine protease from Alkalophilic *Bacillus sp.* strain GX 6638. J. Bacteriol. 169(6):2762-8.

Durham, D.R, and C.G. McNamee. 1988. US Patent 4,764,470.

Enzyme Nomenclature. Recommendations of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzymes, together with their units and Symbols of Enzyme Kinetics , 1972.

Feldman, L.I.,and R. Delecourt. 1971. Alkaline protease by culturing *Bacillus amyloliquefaciens.* Fr Patent 2,049,904.

Frost, G.M., and D.A. Moss. 1987. Production of enzymes by fermentation. Biotechnology vol 7a Enzyme technology. pp. 156-165.

Fujiwara, N., and K. Yamamoto. 1987. Production of Alkaline protease in a low-cost medium by Alkalophilic *Bacillus sp.* and Properties of the enzyme. J. Ferment. Technol. 65(3):345-348.

Godfrey, T. 1983. Chapter V Comparison of key characteristics of industrial enzymes by type and source. Industrial enzymology. The application of enzymes in industry. pp. 466-502.

Higerd, T.B., J.A. Hoch, and J. Spizizen. 1972. Hyperprotease-producing mutants of *Bacillus subtilis. J.Bacteriol.*112:1028.

Horikoshi, K. 1971a. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms.Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* no. 221. Agric. Biol. Chem. 35:1407-1414.

Isono, M., K. Tomoda, K. Miyata, K. Maejima, and R. Kodama. 1972. Method for producing protease. US Patent 3,691,014.

Jensen, D.E. 1972. Continuous production of extracellular protease by *Bacillus subtilis* in a two-stage fermenter. Biotechnol. Bioeng. 14:647.

Keay, L., and B.S. Wildi.1970. protease of the Genus *Bacillus*. I. Neutral Proteases. Biotechnol. Bioeng. 12:179-212.

_____, P.W. Moser, and B.S. Wildi. 1970. Protease of Genus *Bacillus*. II. Alkaline Protease. Biotechnol. Bioeng. 12: 213-249.

Markkanen, P.H., and M.J. Bailey. 1974. Simultaneous production of α-amylase, β-glucanase and proteolytic enzymes by *Bacillus subtilis*. J. Appl. Chem. Biotechnol. 24:93.

Markland, F, and Jr Smith. 1971. Subtilisin: Primary structure, Chemical and Physical Properties.The Enzymes (Boyer,P.D.,ed.) 3:561-608.

Nehete, P.N., Shah, V.D., and R.M. Kothari, 1985. Profile of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. Biotechnol. Lett. 7, 413

_____, 1986. Isolation of a high yielding alkaline protease variant of *Bacillus licheniformis*. Enzyme Microb. Technol. 8: 370.

Oyama, K., S. Irino, T. Harada, and N. Hagi. 1984. Enzymatic production of aspartame. Enzyme engineering 7. (A.I. Laskin, G.T. Tsao, and L.B. Wingard Jr., eds.) Ann. N.Y. Acad. Sci. 434:95.

Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the Genus *Bacillus*. Bacteriol. Rev. 41(3):711-753.

Rikagaku, K.1973. Alkaline Protease and Process for the preparation There of. UK Patent 1,308,238.

Sadaie, Y., and T. Kada. 1985. *Bacillus subtilis* gene involved in cell division, sporulation and exoenzyme secretion. J. Bacteriol. 163:648.

Schindler, K., W. Schreiber, and W. Fisher. 1972. Verfahren 2ur Herstellung von Protease. Ger. Offen. 2,063,988. (Ger. Patent Appl)

Shah, D.N.,V.D. Shah, P.N. Nehete, and R.M. Kothari. 1986. Isolation of *Bacillus licheniformis* mutants from stable production profiles of alkaline protease. Biotechnol. Lett. 8:103.

Shimamura, M.,S. Onuma, and H. Amano.1971. Alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. Ger. Offen. 1,940,488 (Ger. Patent Appl.)

_____, S.Onuma,and H.Amano. 1972. Alkaline protease. Ger. Offen.

2,121,397 (Ger. Patent Appl.)

Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe. J.G. Holt. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology vol.2 Williams and Wilkins, Baltimore.

Spudich, J.A., and A. Kornberg. 1968. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. VII Protein turnover during sporulation of *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. 243(17): 4600-4605.

Stahl, M.L., and E. Ferrari. 1984. Replacement of the *Bacillus subtilis* structural gene with an vitro derived deletion mutant. J. Bacteriol. 158:411.

Takami, H., T. Akiba, and K. Horokoshi. 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus sp.* no. AH-101. Appl. Microbial. Biotechnol. 30:120-124.

Takii, Y., N. Kuriyama, and Y. Suzuki. 1990. Alkaline serine protease produced from citric acid by *Bacillus alcalophilus* subsp. *halodurans* KP 1239. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34:57-62.

Takii, Y., T. Akiba, and K. Horikashi. 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus sp.* no. AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33:519-523.

Tang, P., O.C. Nielsen, K. Gibson, K. Aunstrup, and H.E. Schiff. 1980. Protease product of reduced allergenicity. UK Patent 2,024,830.

Thomson, A.R., B.J. Miles, J.C. Caygill, and D.J. Moore. 1982. US Patent 4,318,990.

Tobe, S., T. Takami, Y. Hirose, and K. Mitsugi. 1975. Purification and some Properties of Alkaline Proteinase from *Bacillus sp.*.

Agr. Biol. Chem. 39(9):1749-1755.

Tsuchida, O., Y.Yagima, T. Ishizuka, T. Arai, J. Yamada, M. Takeuchi, E. Ichishima. 1986. An alkaline proteinase of an alkalophilic *Bacillus sp.*. Curr. Microbiol. 14:7-12.

Tsuru, D. 1972. Zinc-Proteases of microbial origin, especially of *Bacillus pumilus* as metalloenzyme. Acta Microbiol. Pol. ser. B. 6:21-25.

Vitkovic, L., and H.L. Sadoff. 1975. Relation ship between sporulation, protease and antibiotic in sporulation *Bacillus licheniformis*, p.362-366. In P. Gerhardt, H.L.Sadoff, and R.N. Costilow (ed.), Spores VI. American society for Microbiology, Washington, D.C.

Yang, M.Y., E. Ferrari, and D.J. Henner. 1984. Cloning of the neutral protease gene of *Bacillus subtilis* and the use of the cloned geneto create an in vitro-derived deletion mutation. J. Bacteriol. 160:15.

Yoneda, Y. 1980. Increased production of extracellular enzymes by the synergistics effect of genes introduced into *Bacillus subtilis* by stepwise transformation. Appl. Environ. Microbiol. 39:274.

Ward, O.P. 1985. Proteolytic Enzymes. Comprehensive Biotechnology (Moo Yang, M.,ed.), vol. 3, pp. 789-818, Pergamon press, Oxford. New York. Toronto. Syndney. Frankfurt.

Wells, J.A., E. Ferrari, D.J. Henner, D.A. Estell, and E.Y. Chem. 1983. Cloning, sequencing and secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. 11:7911.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย

1.1 สูตรอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อ และเก็บรักษาเชื้อจุลชีพ

Soluble starch	20	กรัม
Polypeptone	5	"
Yeast extract	5	"
K_2HPO_4	1	"
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	"
agar	15	"
น้ำกลั่น	1,000	มล.

อบฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที ปรับ pH ให้เป็น 10.5 ด้วย 10 % Na_2CO_3

1.2 สูตรสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

สูตรอาหารเหมือนกับภาคผนวกที่ 1.1 แต่ไม่เติมวุ้นผง

1.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับการสังเคราะห์โปรตีเอส

KH_2PO_4	1	กรัม
แหล่งคาร์บอน	เปลี่ยนแปลง	
แหล่งไนโตรเจน	"	
น้ำกลั่น	100	มล.

อบฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว 15 นาที ปรับ pH ให้เป็น 10.5 ด้วย 10 % Na_2CO_3

1.4 สูตรอาหารสำหรับจำแนกสกุลของจุลชีพ

1.4.1 Starch agar plate

Potato starch	10	กรัม

Nutrient agar	1,000	มล.
น้ำกลั่น	50	"

1.4.2 Casein agar plate

Skim milk	10	กรัม
Nutrient agar	1,000	มล.

1.4.3 Gelatin agar plate

Gelatin	120	กรัม
Nutrient agar	1,000	มล.

1.4.4 Triple sugar iron agar (TSI)

Beef extract	3	กรัม
Yeast extract	3	"
Peptone	20	"
Glucose	1	"
Lactose	10	"
Sucrose	10	"
$FeSO_4.7H_2O$	0.2	"
NaCl	5	"
$Na_2S_2O_3.5H_2O$	0.3	"
0.2 % Phenol red	12	มล.
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

อบฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที

1.4.5 Glucose fermentation broth

Glucose	3	กรัม
Nutrient broth	100	มล.
Phenol red	3-4	หยด

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4.6 สารละลาย ก.

Sulfanilic acid	8	กรัม
Acetic acid 5 N	1,000	มล.

1.4.7 สารละลาย ข.

Dimethyl-ɨ-naphthylamine	6	มล.
Acetic acid 5 N	1,000	มล.

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2.1 Bradford's reagent

95 % Ethyl Alcohol	50	มล.
85 % Phosphoric acid	100	"
Coomassie Brilliant Blue G-250	100	มก.

เติมน้ำกลั่นจนเป็น 1 ลิตร

2.2 สารละลายที่ใช้ในการหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส

2.2.1 0.5 % Casein solution

casein	0.5	กรัม
0.1 M Glycine-NaOH pH 10.5	100	มล.

2.2.2 10 % Trichloroacetic acid

Trichloroacetic acid	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

2.2.3 0.1 M Glycine-NaOH pH 10.5

Glycine		กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ปรับ pH ให้เป็น 10.5 ด้วย 10 % NaOH

2.3 สารเคมีสำหรับอิเลคโตรโฟรีซีส

2.3.1 30 % acrylamide-0.8 % Bis

Acrylamide	30	กรัม

Bis-acrylamide	0.8	"

เติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล.

กรองด้วยด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บในที่มืดและเย็น

2.3.2 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

Tris	6.055	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย HCl

2.3.3 1.25 M Tris-HCl pH 6.8

Tris	15.14	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย HCl

2.3.4 Electrode buffer (0.025 M Tris-HCl-0.192 M Glycine pH 8.3)

Tris	3.275	กรัม
Glycine	14.4192	"
20 % SDS	5	มล.

เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มล.

2.3.5 Solubilizing Medium

20 % SDS	1	มล.
Glycerol	2	"
ß-mercaptoethanol	1	"
1.25 M Tris-HCl pH 6.8	1	"
Bromphenol blue	เล็กน้อย	

2.3.6 0.2 % Coomassie blue stain

coomassie blue	0.8	กรัม
Methyl alcohol	200	มล.
Acetic acid	40	"

น้ำกลั่น 100 "

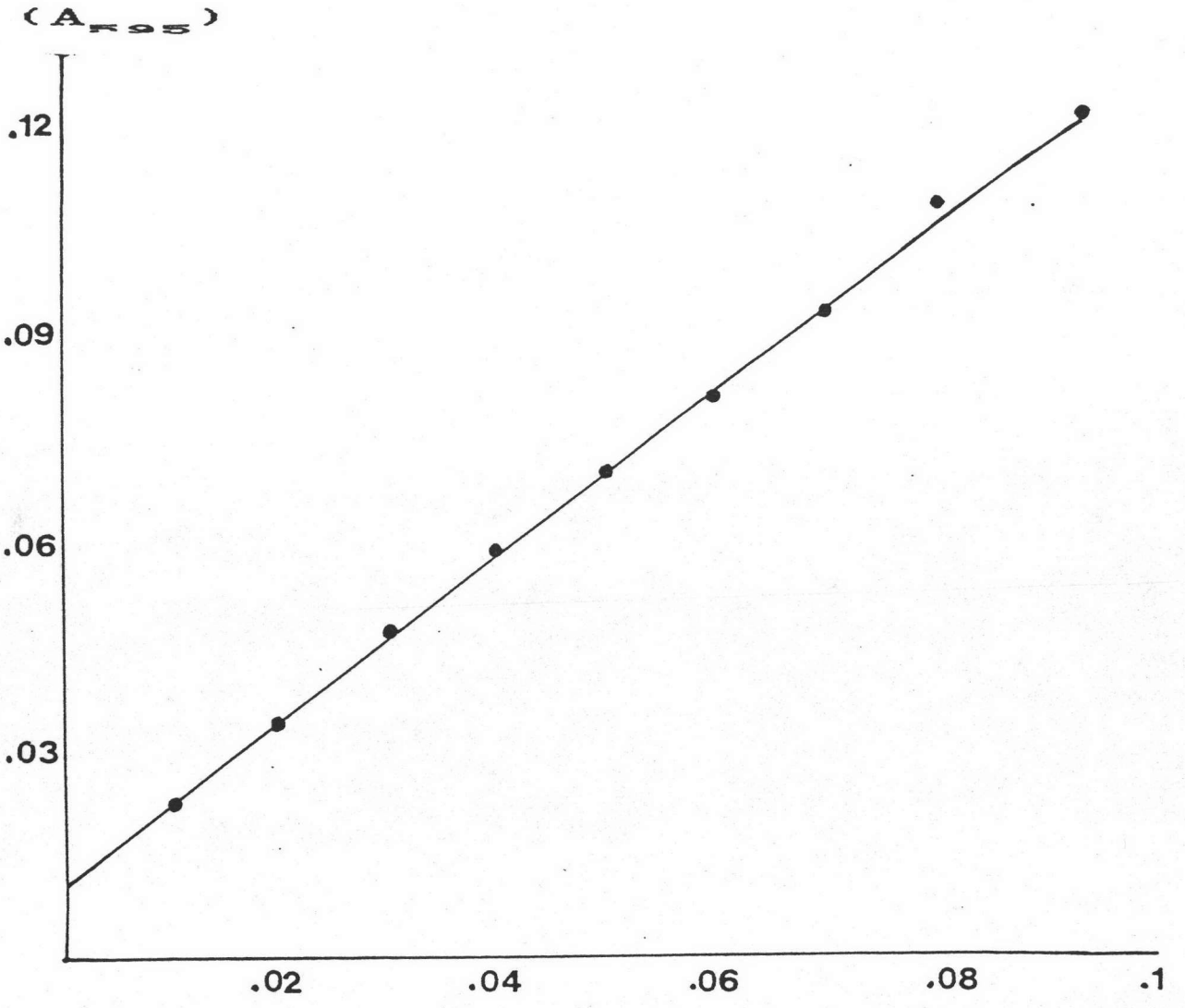
ละลายสีย้อมในอัลกอฮอล์ จึงค่อยเติมกรด และน้ำกลั่น กรองด้วย กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

2.3.7 Destaining solution

10 % acetic acid	100	มล.
50 % methyl alcohol	500	"

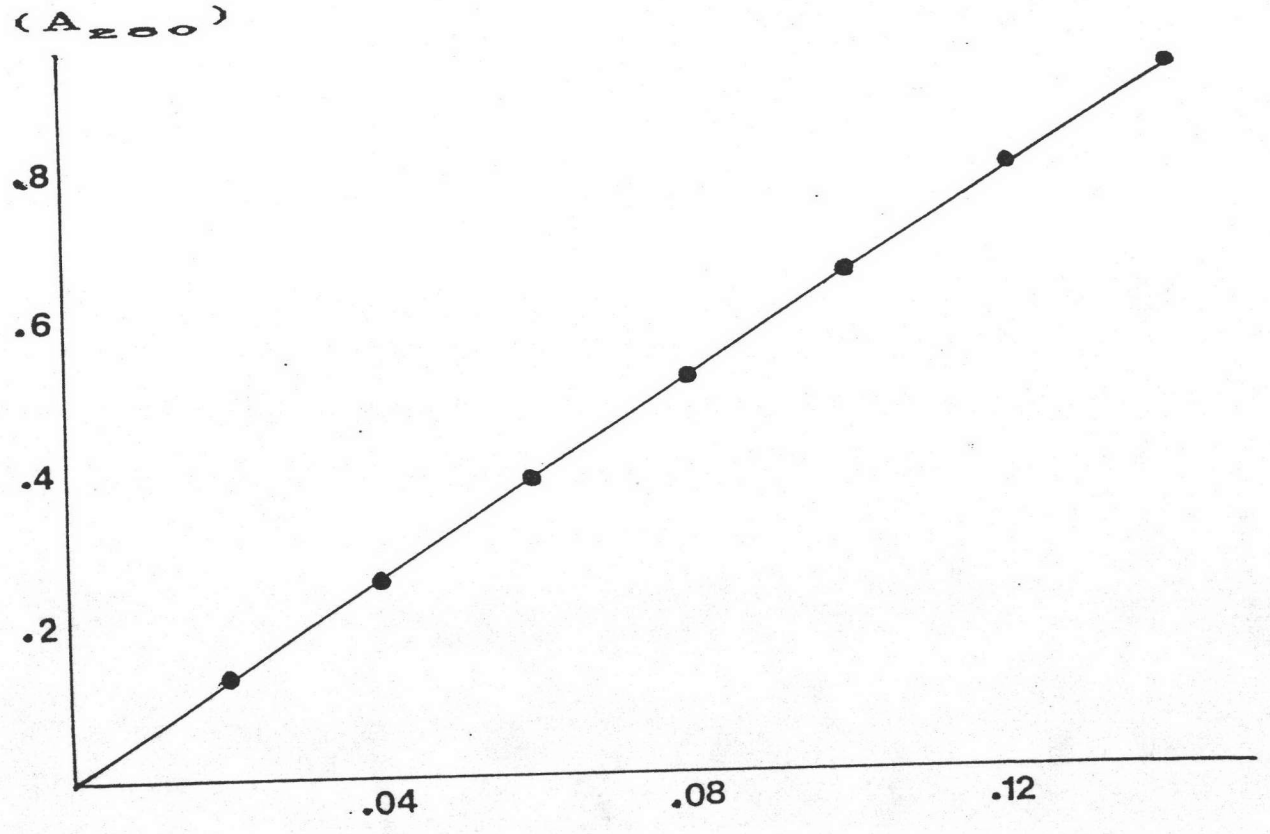
เติมน้ำกลั่นจนเป็น 1,000 มล.

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร



กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร



ความเข้มข้น (มก./มล.)

กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไทโรซีน

ประวัติผู้เขียน

น.ส. กฤษณา โพธิสารัตนะ เกิดวันที่ 2 ธันวาคม พ.ศ. 2509 ที่อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2530 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2531