รายงานวิจัย

การหาจุลินทรีย์ใต้ทะเลลึกที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสชอบอุณหภูมิสูง และมีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งผลิตตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพชนิดใหม่

Screening of deep-sea microorganisms producing thermophilic and solvent stable hydrolytic enzymes as novel sources of biocatalyst production

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย

งบประมาณภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในสถาบันอุดมศึกษา

มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การหาจุลินทรีย์ใต้ทะเลลึกที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสชอบอุณหภูมิสูงและมีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งผลิตตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพชนิดใหม่” สำเร็จลงด้วยดีเนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 จากงบประมาณภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในสถาบันอุดมศึกษา มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย
กันยายน 2557

บทคัดย่อ

ความต้องการใช้เอนไซม์โปรติเอสที่มีสมบัติเฉพาะที่เพิ่มขึ้นในตลาดส่งผลให้นักเทคโนโลยีชีวภาพสนใจที่จะหาแหล่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสชนิดใหม่ที่มีสมบัติตามต้องการ แบคทีเรียใต้ทะเลซึ่งอาศัยอยู่ในสภาวะที่มีความหลากหลายทางชีวภาพและมีการเปลี่ยนแปลงทางสภาพแวดล้อมตลอดเวลาจึงเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์แหล่งหนึ่งที่น่าสนใจ โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะหาแบคทีเรียใต้ทะเลที่สามารถขับเอนไซม์โปรติเอสศักยภาพสูงออกมานอกเซลล์ได้ จากแบคทีเรียใต้ทะเลจำนวน 12 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเลของเกาะจาน แสมสาร ที่ระดับความลึก 9 และ 24 เมตร พบจำนวน 3 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยพบการผลิตเอนไซม์โปรติ-เอสสูงที่สุด (6.57 ± 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ในแบคทีเรียใต้ทะเลไอโซเลทที่ 7 ซึ่งมีการระบุชนิดว่าเป็น *Bacillus megaterium* โดยสามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงที่สุดหลังจากการบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30°C และค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ที่ความเร็วในการเขย่า 250 รอบต่อนาที เมื่อทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์โปรติเอสโดยการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นเกลืออิ่มตัวร้อยละ 60-80 และการไดอะไลซิส พบเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 125 เท่า โดยมีมวลโมเลกุลสัมพัทธ์ประมาณ 61 กิโลดาลตัน เมื่อทำปฏิกิริยากับสับสเตรทอะโซเคซีนพบสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์คือ ค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิเท่ากับ 37°C เอนไซม์มีความเสถียรในช่วงค่าพีเอชเป็นด่าง (ค่าพีเอช 7.0-9.0) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิสูงหลากหลายระหว่าง 60 และ 80°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าเกลือของโลหะไม่ส่งผลยับยั้งการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่กับเสริมแอคติวิตี และเอนไซม์ยังมีความเสถียรในสภาวะที่มีสารลดแรงตึงผิว สารฟอกขาว และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว ความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง การชอบทำปฏิกิริยาในสภาวะที่เป็นด่างและความสามารถในการทำปฏิกิริยาในสภาวะที่มีเกลือของโลหะ ตัวทำละลายอินทรีย์ สารลดแรงตึงผิว และสารซักฟอก สนับสนุนให้เห็นถึงศักยภาพของเอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้ในการนำมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสำหรับประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ เอนไซม์โปรติเอส, แบคทีเรียใต้ทะเล, *Bacillus megaterium*, ความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง, ความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์, การทนโลหะ, ความเสถียรในสารลดแรงตึงผิว

Abstract

Increasing demand of protease with specific properties lead biotechnologists explore a new source of protease. Marine bacterium living in wide biological diversity and environmental change is one of the popular sources for biotechnologists. This study aims to find a marine bacterium secrete high potent protease. Among 12 marine bacteria isolated from marine sediments of Koh Chan, Samaesan (9 and 24 meters depth), three were found to produce protease. Isolate No.7 showed the highest protease activity (6.57 ± 0.25 U/ml) and was identified as *Bacillus megaterium*. Maximum protease activity of the culture medium was obtained after 15 h at 30°C and pH 6.0, 250 rpm. The protease was successfully purified 125-fold by 60-80% ammonium sulphate precipitation and dialysis. The purified protease possessed a relative molecular mass of 61 kDa. Higher protease activity was determined at pH 8.0 and 37 °C with azocasein as a substrate. The enzymes was stable at alkali pH (7.0-9.0) for 6 h and at a variety of high temperature between 60 and 80 °C for 72 h. Metal ions did not affect the enzyme activity in contrast improve the activity. The enzyme was stable in surfactants, bleaching agents and hydrophobic solvents. The high temperature stability, alkaliphilic and ability to work in metal ions, solvents, surfactants and bleachining agents support the potential of this protease as a vigorous biocatalyst for industrial applications.

Keywords: protease, marine bacteria, *Bacillus megaterium*, thermostable, solvent-stable, metal-tolerant, surfactant stable

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	9
สารบัญภาพ	10
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	11
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	12
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	13
2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
2.1.1 นิเวศวิทยาทางทะเล	14
2.1.2 จุลินทรีย์ในทะเล	14
2.1.3 บทบาทของจุลินทรีย์ในทะเล	15
2.1.4 การระบุชนิดของจุลินทรีย์	15
2.1.5 ปัจจัยทางกายภาพที่ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์	18
2.1.6 เอนไซม์โปรติเอส	20
2.1.7 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส	22
2.1.8 แหล่งผลิตของเอนไซม์โปรติเอส	23
2.1.9 การประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในระดับอุตสาหกรรม	24
2.2 ขอบเขตของการดำเนินการวิจัย	27
3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	28
3.1 ตัวอย่างตะกอนทะเล	28
3.2 การคัดแยกแบคทีเรียใต้ทะเลจากตัวอย่างตะกอนทะเล	28
3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียใต้ทะเลที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส	29
3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	29
3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	29
3.4.2 การวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	29

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ)	
	3.5 การระบุชนิดของแบคทีเรียใต้ทะเลที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส	30
	3.6 การศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพและปริมาณไอออนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียใต้ทะเลที่คัดเลือกได้	30
	3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ	30
	3.6.2 การศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	31
	3.6.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	31
	3.6.4 การศึกษาผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	31
	3.6.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	31
	3.6.6 การศึกษาผลของการเติมแมงกานีสคลอไรด์และเมอร์คิวรี่คลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	31
	3.7 การติดตามกราฟการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียใต้ทะเลที่คัดเลือกได้	31
	3.8 การทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียใต้ทะเลที่คัดแยกได้	32
	3.8.1 การเตรียมส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้น	32
	3.8.2 การทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์โปรติเอส	32
	3.8.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	33
	3.9 การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้	33
	3.9.1 ผลของค่าพีเอชต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส	33
	3.9.2 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส	33
	3.9.3 ผลของสารเคมีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	34
	3.9.4 ผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	34
	3.9.5 ผลของดีเทอร์เจนท์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	34
	3.9.6 ผลของสารฟอกขาวต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	34
	3.9.7 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส	34
	3.9.8 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอส	35
4	ผลการวิจัย	36
	4.1 การคัดแยกแบคทีเรียใต้ทะเลที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากตัวอย่างตะกอนทะเล	36
	4.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียใต้ทะเลที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่คัดแยกได้	37

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย (ต่อ)	
4.3 การศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพและปริมาณไอออนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus megaterium*	40
4.3.1 ผลของค่าพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	40
4.3.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	41
4.3.3 ผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	41
4.3.4 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	43
4.3.5 ผลของการเติมแมงกานีสคลอไรด์และเมอร์คิวรี่คลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	43
4.4 การติดตามกราฟการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*	45
4.5 การทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium*	46
4.6 การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium*	46
4.6.1 ผลของค่าพีเอชต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส	46
4.6.2 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส	50
4.6.3 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	51
4.6.4 ผลของสารเคมีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	51
4.6.5 ผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	52
4.6.6 ผลของดีเทอร์เจนท์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	53
4.6.7 ผลของสารฟอกขาวต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	54
4.6.8 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอส	55
5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย	56
6 สรุปผลการวิจัย	61
บรรณานุกรม	62
ภาคผนวก	
1 กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมินและวิธีการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน	67
2 กราฟมาตรฐานของแอล-ไทโรซีน วิธีการคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสและค่าพารามิเตอร์ต่างๆ	68
3 ตารางแสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตามความเข้มข้นอิ่มตัวต่างกันเทียบกับสารละลายเอนไซม์ปริมาตรหนึ่งลิตร	70

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก (ต่อ)	
4 กราฟการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน และวิธีการประมาณมวลโมเลกุลสัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอส	73
ประวัติและผลงานของผู้วิจัย	75

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การใช้เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรม	25
2	ตำแหน่งและความลึกของตะกอนทะเลที่เก็บมาศึกษา	28
3	อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแบคทีเรียที่คัดแยกได้	37
4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 7 ที่คัดเลือกได้เมื่อวิเคราะห์ตามวิธี API Skill bacterial identification	38
5	ตารางการทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus megaterium*	48
6	แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์	51
7	แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีสารเคมีต่างกัน	52
8	แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีดีเทอร์เจนท์ต่างกัน	54
9	แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีสารฟอกขาวต่างกัน	54
10	ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอส	55

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอส	21
2	กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส	23
3	ภาพรวมขอบเขตของการดำเนินการวิจัยในโครงการ	27
4	ตัวอย่างวงใสรอบโคโลนีที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนในอาหารแข็งสกิมมิลค์ของแบคทีเรีย	36
5	การวิเคราะห์วงศ์วานวิวัฒนาการของแบคทีเรียใต้ทะเลไอโซเลทที่ 7 ที่คัดแยกได้	40
6	ผลของค่าพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*	41
7	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*	42
8	ผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*	42
9	ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*	43
10	ผลของการเติมแมงกานีสคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*	44
11	ผลของการเติมเมอร์คิวรี่คลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*	44
12	กราฟการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*	45
13	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* ด้วยการวิเคราะห์ SDS-PAGE	47
14	ผลของค่าพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium*	47
15	ผลของค่าพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium*	49
16	ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium*	50
17	ผลของอุณหภูมิสูงต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium*	50
18	แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* ที่ความเข้มข้นเกลือต่างกัน	53

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

Δ	=	ผลต่าง
%	=	ร้อยละ
$^{\circ}C$	=	องศาเซลเซียส
ซม.	=	เซนติเมตร
atm	=	Atmosphere
A_w	=	ค่า Water activity
C	=	เบสไซโทซีน (Cytosine)
CFU	=	Colony forming unit
DTT	=	Dithiothreitol
EC	=	Enzyme committee
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic
G	=	เบสกวานีน (Guanine)
log $P_{O/W}$	=	Partition coefficient (octanol/water)
OD	=	Optical density
pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าพีเอช
PMSF	=	Phenylmethylsulfonyl fluoride
ppt	=	Part per ton

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การขยายตัวในปัจจุบันของภาคอุตสาหกรรมอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดการแข่งขันด้านเศรษฐกิจเพิ่มมากขึ้น และเพื่อเพิ่มความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจของภาคอุตสาหกรรมนั้นๆ ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อผลกำไรในการผลิตคือ การลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มกำลังการผลิตให้ได้สูงที่สุด เอนไซม์จัดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่ผู้ประกอบการภาคอุตสาหกรรมให้ความสนใจใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตปริมาณสูงในระยะเวลาอันสั้นเมื่อเทียบกับกระบวนการผลิตปกติที่ใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และยังมีขั้นตอนในการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากปฏิกิริยาให้มีความบริสุทธิ์ที่สามารถทำได้ง่ายกว่าการใช้สารเคมีในการเร่งปฏิกิริยา รวมทั้งไม่ทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Ranganathan et al., 2008; Dizge and Keskinler, 2008) ซึ่งหนึ่งในชนิดเอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้และมีความต้องการในตลาดสูงคือ เอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (hydrolytic enzymes)

เอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส เป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) สลายพันธะที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุลของสับสเตรท ซึ่งชนิดของเอนไซม์ไฮโดรเลสที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมสูงที่สุด ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส (protease) และเอนไซม์ไลเพส (lipase) ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ (peptide bond) และพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ภายในโมเลกุลของโปรตีนและลิพิด ตามลำดับ และยังสามารถนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาการสลาย คือ ปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์และปฏิกิริยาการสร้างหรือเคลื่อนย้ายพันธะเอสเทอร์ ตามลำดับ ในสภาวะที่ปราศจากน้ำ คือ ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) หรือในสภาวะของไหลซุปเปอร์คริติคอล (supercritical fluid) ได้

โดยทั่วไปแหล่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเพสในระดับอุตสาหกรรมมักได้มาจากจุลินทรีย์มากกว่าพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญได้เร็วและเลี้ยงง่ายกว่าพืชหรือสัตว์ ที่การเพาะเลี้ยงนั้นขึ้นกับสภาพภูมิอากาศและการเก็บเกี่ยว รวมทั้งเป็นการประหยัดพื้นที่ในการผลิตและให้ปริมาณเอนไซม์สูงกว่าด้วย (Macrae and Hammond, 1985) ในช่วงสิบปีที่ผ่านมาแบคทีเรียกลุ่มใหม่ในกลุ่มเอ็กทรีโมไฟล์ (extremophile) ที่สามารถเจริญในสภาวะที่รุนแรง เช่น ความดันสูง สภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูงและมีตัวทำละลายอินทรีย์ผสมได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในหมู่นักวิจัยและนิยมนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสที่มีคุณลักษณะเฉพาะ ได้แก่ มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ความเค็ม และตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งเป็นคุณลักษณะพึงประสงค์ของตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Sellek & Chaudhuri, 1999; Gupta & Khare, 2009; Sardessai & Bhosle, 2002; Bont, 1998) และได้เคยมีรายงานถึงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเพสที่มีคุณลักษณะดังกล่าวจากแบคทีเรียบางชนิดในกลุ่มนี้จำนวนหนึ่ง (Sellek & Chaudhuri, 1999; Khmelnitsky et al., 1988; Klibanov, 2001; Ogino & Ishikawa, 2001; Gupta & Khare, 2009; Sardessai & Bhosle, 2002; Bont, 1998) จากความจริงดังกล่าวประกอบกับข้อเท็จจริงที่ว่าสภาวะใต้ทะเลลึกนั้นเป็นสภาวะที่มีความหลากหลายทางกายภาพที่ไม่เหมาะต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตปกติ และแบคทีเรียที่สามารถเจริญอยู่ใต้ทะเลลึก (deep sea) หรือตัวอย่างโคลนทะเล (marine mud) นั้น มักผลิตเอนไซม์ที่มีคุณลักษณะพึงประสงค์

ดังกล่าวได้ (Sardessai & Bhosle, 2002) ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะคัดแยกแบคทีเรียใต้ทะเลที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส โดยมุ่งเป้าไปที่การผลิตเอนไซม์โปรติเอสและ/หรือเอนไซม์ไลเพส ซึ่งมีการประยุกต์ใช้มากในระดับอุตสาหกรรม โดยสนใจที่จะทำการคัดแยกแบคทีเรียใต้ทะเลจากตะกอนใต้ทะเลตะวันออก ซึ่งอาจเป็นที่รวมของน้ำทิ้งที่มีการระบายลงสู่ทะเลของโรงงานอุตสาหกรรมในบริเวณใกล้เคียง เช่น นิคมอุตสาหกรรมอมตะนคร นิคมอุตสาหกรรมปิ่นทอง นิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง และนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุต เป็นต้น รวมทั้งทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสและ/หรือเอนไซม์ไลเพสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียใต้ทะเลที่คัดแยกได้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์แหล่งใหม่สำหรับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียใต้ทะเลที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสโดยมุ่งเน้นที่เอนไซม์โปรติเอสและ/หรือเอนไซม์ไลเพสที่ชอบอุณหภูมิสูง ทนเกลือ และมีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์
2. เพื่อหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและ/หรือเอนไซม์ไลเพสจากแบคทีเรียใต้ทะเลที่คัดเลือกได้
3. เพื่อทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสและ/หรือเอนไซม์ไลเพสที่คัดแยกได้

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 นิเวศวิทยาทางทะเล (ศิริพรรณ สารินทร์, 2550)

นิเวศวิทยาของบริเวณทะเลเปิด (pelagic) จะประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็กหลายชนิด แต่จะไม่มีสิ่งมีชีวิตชั้นสูงอยู่เลย ผลผลิตเบื้องต้นที่เกิดขึ้นจะมาจากพวกสาหร่ายขนาดเล็กและจุลินทรีย์ โดยจะพบจุลินทรีย์จำนวนมากในน้ำทะเลบริเวณชายฝั่ง บริเวณที่มีการหมุนเวียนสารอาหารขึ้นสู่ผิวน้ำ (up-welling) และบริเวณปากแม่น้ำ (estuarine) ซึ่งบริเวณที่พบจุลินทรีย์จำนวนมากนี้พบว่า จุลินทรีย์พวกเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรีย (heterotrophic bacteria) จะอาศัยอยู่กับสาหร่ายหรือเกาะอยู่กับเศษซากต่าง ๆ ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์กว่าน้ำทะเลในบริเวณทะเลเปิดที่มีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำ นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากในดินตะกอน (107-108 ต่อกรัม) ที่ความลึกประมาณ 2-3 เซนติเมตรแรกของความหนาของดินตะกอน ทั้งนี้เพราะปริมาณสารอาหารที่มีมากอยู่ในดินตะกอนชั้นบนๆ จุลินทรีย์บางชนิดที่เจริญในพื้นผิวน้ำจะเคลื่อนที่ขึ้นลงไปมาและบางครั้งก็เกาะติดกับอนุภาคของตะกอนที่แขวนลอยอยู่ ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้ก็เป็นแหล่งอาหารของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในบริเวณทะเลเปิด

2.1.2 จุลินทรีย์ในทะเล (ศิริพรรณ สารินทร์, 2550)

จุลินทรีย์ในทะเล โดยความหมายที่แท้จริงแล้วคือ จุลินทรีย์ที่ต้องสามารถเจริญได้ในน้ำที่มีความเค็มประมาณ 20-40 ppt และมีโซเดียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจุลินทรีย์ในทะเลจะต้องอาศัยไอออนที่อยู่ในน้ำทะเลรักษาความสมดุลและการทำงานที่เหมาะสมของเซลล์เมมเบรน เช่น โซเดียมและคลอไรด์ไอออนจะจำเป็นต่อกระบวนการขนส่งแบบแอคทีฟ (active transport) ของเซลล์ จุลินทรีย์ในทะเลบางชนิดจะมีเซลล์เมมเบรนหลายชั้นอยู่ล้อมรอบตัวเซลล์ นอกจากนี้จุลินทรีย์ในทะเลยังต้องสามารถเจริญได้ในที่ที่มีสารอาหารต่ำอย่างเช่นในมหาสมุทร และยังมีเซลล์ขนาดเล็ก มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำ แต่มีความสามารถในการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้สูง ดังนั้นจุลินทรีย์ในทะเลส่วนใหญ่จึงเป็นพวกที่เจริญได้ในที่ที่มีสารอาหารต่ำ (obligately oligotrophic) ที่สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ (psychro-philic หรือ psychrotrophic) ยกเว้นจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในผิวน้ำทะเลเขตอบอุ่นหรือบริเวณร่องน้ำอุ่น (thermalvent) ส่วนแบคทีเรียที่เจริญในร่องน้ำลึก (deep-sea trenches) ก็จะต้องทนต่อแรงดันสูงได้ (barotolerant หรือ barophilic bacteria)

แบคทีเรียในทะเลส่วนใหญ่จะเป็นพวกแกรมลบ (gram-negative) ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ และเป็นพวกแอโรป (aerobes) หรือแฟคัลเททีฟ แอนาโรป (facultative anaerobes) ได้แก่ *Pseudomonas, Vibrio, Flavobacterium, Spirillum, Alcaligenes, Hyphomicrobium, Cytophaga, Microcuclus* และ *Actinomycetes* ส่วนพวกแกรมบวก (gram-positive) ที่พบมากได้แก่ *Bacillus* ซึ่งมักพบในดินตะกอน และพวกแอนาโรป เช่น *Desulflovibrio* และ *Methanogens* ซึ่งพบในชั้นดินตะกอนลึก นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียพวกคีโมลิโทโทรฟิค (chemolithotrophic) ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนในทะเล เช่น *Nitrosococcus,*

Nitrococcus, Nitrosomonas, Nitrospina และ *Nitrobacter* นอกจากจะพบแบคทีเรียในน้ำทะเลแล้วยังพบในสัตว์ทะเลต่าง ๆ อีกด้วย เช่น ในปลา กุ้ง ปู หอย เป็นต้น

2.1.3 บทบาทของจุลินทรีย์ในทะเล (ศิริพรรณ สารินทร์, 2550)

2.1.3.1 การย่อยสลายสารอินทรีย์

จุลินทรีย์ในทะเลมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ สารอินทรีย์ประมาณร้อยละ 60 จะถูกย่อยสลายเป็นแร่ธาตุต่าง ๆ ส่วนอีกร้อยละ 40 จะเปลี่ยนเป็นสารประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ สารอินทรีย์ที่ถูกย่อยสลายได้เร็ว ได้แก่ กรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ส่วนไขมันและพอลิแซคคาไรด์ที่ซับซ้อนมาก ๆ จะถูกย่อยสลายอย่างช้า ๆ

2.1.3.2 การเปลี่ยนแปลงของวัฏจักรสารในทะเล

แบคทีเรียในทะเลช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในวัฏจักรสารต่าง ๆ ที่สำคัญคือ วัฏจักรไนโตรเจน แบคทีเรียในทะเลหลายชนิดสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ โดยผลผลิตแอมโมเนียที่ได้จะถูกเปลี่ยนแปลงในกระบวนการไนไตรฟิเคชัน (nitrification) นอกจากนี้แอมโมเนียที่ได้จะมีความสัมพันธ์กับวัฏจักรของคาร์บอน โดยจะถูกนำไปเป็นวัตถุดิบสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ของไนโตรเจนและสารอนินทรีย์ต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียในทะเลยังไม่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของวัฏจักรไนโตรเจนที่สมบูรณ์ได้เมื่อเทียบกับวัฏจักรไนโตรเจนในดิน สำหรับวัฏจักรกำมะถัน มีแบคทีเรียในทะเลหลายชนิดที่สามารถย่อยสลายโปรตีนแล้วให้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ นอกจากนี้การย่อยสลายสารอินทรีย์ของกำมะถันในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนก็จะให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ออกมาด้วย จากนั้นแบคทีเรียพวกที่เปลี่ยนไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นซัลเฟต โดยกระบวนการรีดักชันก็จะทำงานต่อ ส่วนแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ก็จะใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์แสงและให้กำมะถันคืนกลับมา

2.1.3.3 การเกิดโรค

จุลินทรีย์หลายชนิดในทะเลสามารถก่อโรคต่าง ๆ กับสัตว์ทะเลได้ นอกจากนี้จุลินทรีย์ในทะเลบางชนิดยังอาศัยสัตว์ทะเลเป็นพาหะในการทำให้เกิดโรคกับมนุษย์ เช่น โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *Vibrio parahaemolyticus, Staphylococcus aureus, Salmonella* และ *Clostridium botulinum* เป็นต้น

2.1.4 การระบุชนิดของจุลินทรีย์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2539)

การระบุชนิดของจุลินทรีย์มีการจัดลำดับอย่างเป็นระบบ ซึ่งจำเป็นจะต้องรู้ลักษณะของจุลินทรีย์ก่อน โดยบอกถึงความสัมพันธ์และความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ตามทฤษฎีวิวัฒนาการของชาร์ลส์ ดาร์วิน ซึ่งกล่าวไว้ว่าสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะต่าง ๆ คล้ายกันเป็นผลเนื่องจากสืบทอดมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน ดังนั้นการจัดสิ่งมีชีวิตเป็นหมวดหมู่ จึงแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ โดยทั่วไปลักษณะที่สำคัญของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหลักเกณฑ์ในการระบุชนิด ได้แก่

2.1.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

จะทำการศึกษาจากเชื้อบริสุทธิ์ โดยดูจากขนาด รูปร่าง โครงสร้างของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากแต่ละเซลล์มีขนาดเล็กมากมีหน่วยเป็นไมโครเมตร ในการศึกษาจึงต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายประมาณ

1,000 เท่า และยังต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ให้รายละเอียดมากขึ้น ทั้งนี้รูปร่างลักษณะของเซลล์ไม่ได้บอกถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมากนัก แต่อาจใช้ในการระบุชนิดของแบคทีเรียได้ เช่น โครงสร้างของเอนโด-สปอร์ (endospore) หรือ แฟลกเจลลา (flagella) เป็นต้น

2.1.4.2 องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ (chemical composition)

เซลล์ของจุลินทรีย์ประกอบด้วยสารอินทรีย์แตกต่างกันมากมาย เช่น การมีลิโพพอลิแซ็กคา-ไรด์ (lipolysaccharide) ที่ผนังเซลล์เป็นลักษณะของแบคทีเรียแกรมลบ แต่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มี หรือแบคทีเรียแกรมบวกมีกรดไทโคอิก (teichoic acid) ที่ผนังเซลล์ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบไม่มี เป็นต้น

2.1.4.3 ลักษณะของการเลี้ยงเชื้อ (cultural characterization)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสารอาหารแตกต่างกัน เช่น บางชนิดเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการได้ บางชนิดเลี้ยงในอาหารที่มีสารอนินทรีย์เท่านั้น แต่บางชนิดต้องการสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล พิริมิดีน วิตามิน และโคเอนไซม์ เป็นต้น

จุลินทรีย์ย่อมมีความต้องการสภาพแวดล้อมในอาหารเจริญที่แตกต่างกัน เช่น สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงหรืออุณหภูมิต่ำ และก๊าซก็มีความจำเป็น เนื่องจากบางชนิดจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญ แต่บางชนิดไม่จำเป็นต้องใช้ นอกจากนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิดยังมีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกัน เช่น เลี้ยงในอาหารเหลวมีการกระจายมาก หรือตกตะกอนที่ก้นหลอด หรือเป็นฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร ส่วนในอาหารแข็งจะเจริญเป็นโคโลนีที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งจะมีลักษณะแตกต่างกัน เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ เนื้อสัมผัส ความหนืด สี และลักษณะปรากฏที่แตกต่างกัน

2.1.4.4 ลักษณะของเมแทบอลิซึม (metabolic characterization)

เมแทบอลิซึม (metabolism) คือ ปฏิกิริยาทางเคมีที่ทำให้เกิดกระบวนการดำรงชีวิตของเซลล์ ปฏิกิริยานี้จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น จุลินทรีย์บางชนิดต้องใช้พลังงานจากแสง หรือบางชนิดใช้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ นอกจากนี้วิถีในการสังเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ก็แตกต่างกัน

2.1.4.5 ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic characterization)

สารพันธุกรรมในเซลล์จะมีลักษณะคงที่และเกิดการเปลี่ยนแปลงได้น้อย ดังนั้นจึงนำมาช่วยในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ได้โดยศึกษาจาก

2.1.4.5.1 องค์ประกอบของเบสในสายดีเอ็นเอ (DNA base composition)

ดีเอ็นเอประกอบด้วยคู่ของเบส คือ กวานีน (guanine) คู่กับไซโตซีน (cytosine) และอะดีนีน (adenine) คู่กับไทมีน (thymine) ซึ่งจำนวนของเบสในดีเอ็นเอคิดเป็นร้อยละของกวานีนกับไซโทซีนรวมกันที่เรียกว่าร้อยละโมล G+C (mole %G+C) ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ตั้งแต่ร้อยละ 23 ถึงร้อยละ 75

2.1.4.5.2 ลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ในสายดีเอ็นเอ

เป็นหลักเกณฑ์ที่สำคัญที่สุดในการจัดหมวดหมู่จุลินทรีย์ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอนั้นจะมีความจำเพาะกับชนิดของจุลินทรีย์

2.1.4.6 ลักษณะทางนิเวศวิทยา (ecological characterization)

ถิ่นที่อยู่ของจุลินทรีย์ มีความสำคัญในการบอกลักษณะของจุลินทรีย์นั้น ๆ เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดสามารถอยู่อย่างกระจายทั่วไปในธรรมชาติ แต่บางชนิดจะจำกัดที่อยู่ในบางบริเวณเท่านั้น

2.1.4.7 ปฏิกิริยาชีวเคมีเบื้องต้น

2.1.4.7.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรีย (catalase test)

โดยปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นอันตรายกับเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ออกซิเจนและน้ำได้ ดังนั้นในการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้หรือไม่ ทำได้โดยการใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วสังเกตดูการเกิดก๊าซ ถ้าให้ก๊าซแสดงว่าให้ผลบวก

2.1.4.7.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ออกซิเดสของแบคทีเรีย (oxidase test)

แบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) มีขบวนการออกซิเดทีฟฟอสโฟริเลชัน (oxidative phosphorylation) สำหรับขบวนการหายใจและสร้างพลังงานในระหว่างที่ขบวนการนี้เกิดขึ้น จะมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่ออกซิเจนโดยผ่านลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนซึ่งอาศัยการทำงานของไซโตโครม (cytochrome) ได้ผลิตภัณฑ์คือน้ำ ในแบคทีเรียมีไซโตโครมมากมายที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ออกซิเดสตัวสุดท้ายในการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้ออกซิเจน

การตรวจสอบเอนไซม์ออกซิเดสจะใช้รีเอเจนต์สองชนิดคือ เททราเมทิล-พารา-ฟินิลีนไดอะมีน ไดไฮโดรคลอไรด์ (tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride) หรือไดเมทิล-พารา-ฟีนิลีนไดอะมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (dimethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride) ซึ่งปกติไม่มีสีและจะมีสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มเมื่อถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ออกซิเดสจะสามารถออกซิไดส์รีเอเจนต์เหล่านี้ทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม

2.1.4.7.3 การทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (oxidation-fermentation test)

การใช้น้ำตาลเหล่านี้จะได้กรดหรือกรดและก๊าซ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยโปรตีนเล็กน้อย โซเดียมคลอไรด์ บัฟเฟอร์ อินดิเคเตอร์ วุ้น และคาร์โบไฮเดรต โปรตีนที่ใส่ลงไปเพียงเล็กน้อยเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดด่างที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากขบวนการดีอะมิเนชัน (deamination)

2.1.4.7.4 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (motile test)

เนื่องจากเชื้อที่มีแฟลกเจลลาจะสามารถเคลื่อนที่ออกจากบริเวณเดิมไปยังบริเวณใหม่ ซึ่งจะเกิดการเจริญและแบ่งตัวยังบริเวณนั้นต่อไป ดังนั้นถ้าต้องการทดสอบเพื่อให้เห็นลักษณะการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างชัดเจน จะมีการใส่ไทฟีนิลเททราโซเลียมคลอไรด์ (2,3,5 triphenyl-tetrazolium chloride; TTC) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียที่เจริญทวีจำนวนจะนำ TTC ซึ่งไม่มีสีเข้าสู่เซลล์แล้วรีดิวซ์ TTC เป็นตะกอนของเม็ดสีแดง ให้เห็นตรงบริเวณที่มีการเจริญทวีจำนวนของแบคทีเรีย

2.1.5 ปัจจัยทางกายภาพที่ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (ดวงพร คันธโชติ, 2545)

สภาวะแวดล้อมส่งผลโดยตรงต่ออัตราการเจริญและการตายของจุลินทรีย์และจะมีความแตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นในห้องปฏิบัติการหรือในธรรมชาติต่างก็มีปัจจัยทางกายภาพที่ควบคุมอัตราการเจริญหรือการตายของจุลินทรีย์ ในธรรมชาติเป็นสภาวะที่ไม่สามารถควบคุมพารามิเตอร์ทางสิ่งแวดล้อมได้ แต่ในห้องปฏิบัติการเป็นไปได้ที่จะควบคุมพารามิเตอร์เหล่านั้น ทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ได้ เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่ามีปัจจัยหลักที่ส่งผลอยู่ 5 ปัจจัย ได้แก่

2.1.5.1 ค่าพีเอช

อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นกับค่าพีเอชมาก เพราะค่าพีเอชจะส่งผลต่อธรรมชาติของโปรตีน ประจุของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ (polypeptide chain) มีอิทธิพลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน ปกติเอนไซม์จะเสียสภาพที่ค่าพีเอชต่ำมากหรือสูงมาก บทบาทของค่าพีเอชต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์จุดที่สำคัญแรกสุดคือค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องปรับให้เหมาะต่อการเจริญของเชื้อ และติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เพื่อที่จะได้มีการควบคุมค่าพีเอชให้เชื้อเจริญจนถึงจุดสูงสุดและใช้สารอาหารได้หมด การควบคุมค่าพีเอช หรือการป้องกันการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยได้ โดยการเติมสารปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง (buffer agent) ลงในอาหาร

ช่วงการทนต่อค่าพีเอชของจุลินทรีย์จะแตกต่างกันไปขึ้นกับประเภทของจุลินทรีย์ ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีที่ค่าพีเอช 6-9 แม้ว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ที่ค่าพีเอชต่ำ แต่ก็มีข้อยกเว้นสำหรับแบคทีเรียที่ทนกรดซึ่งค่าพีเอชเท่ากับ 0.8 ก็สามารถเจริญได้ แบคทีเรียที่ชอบกรด (acidophile) สามารถเจริญได้ดีที่ค่าพีเอชต่ำ แบคทีเรียเหล่านี้มีการปรับตัวของระบบสรีรวิทยาในส่วนของเอนไซม์และกิจกรรมการขนส่งที่เยื่อหุ้มเซลล์ให้สามารถทำงานได้ที่ค่าพีเอชต่ำ โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 2 และ 4 เซลล์พวกนี้จะรักษาสภาพไซโทพลาสซึมให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 หรือสูงกว่า การรักษาผลต่างของค่าพีเอชจะอยู่ที่ทรานส์เมมเบรน โดยขึ้นอยู่กับพลังงานและความต่างศักย์ไฟฟ้าของทรานส์เมมเบรน *Escherichia coli* และโพรคาริโอตอื่น ๆ มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือค่าพีเอชเป็นกลาง ค่าผลต่างของค่าพีเอชระหว่างภายในเซลล์และภายนอกเซลล์จะถูกรักษาโดยโปรตอนที่นำเข้าเพื่อให้ค่าพีเอชภายในยังคงเป็น 7.6-7.8 ส่วนแบคทีเรียที่มีค่าพีเอชเหมาะสมต่อการเจริญเป็นช่วงด่างพวกนี้จะเจริญในสภาวะที่มีค่าพีเอชระหว่าง 8.0 และ 11.5 โดยค่าพีเอชภายในไซโทพลาสซึมจะเท่ากับ 9.0 หรือน้อยกว่า แต่ค่าพีเอชภายนอกจะเป็น 11 ดังนั้นภายใต้สภาพนี้ไซโทพลาสซึมจะมีความเป็นกรดมากกว่าอาหารที่เลี้ยงใน *Bacillus firmus* และ *B. alcalophilus* จะรักษาค่าพีเอชโดยอาศัย

กิจกรรมของ Na^+/H^+ ATPase แต่แบคทีเรียพวกไม่ชอบด่าง (non-alkaliphilic) เช่น *B. firmus* ที่ผ่าเหล่าจะขาดกิจกรรมของ Na^+/H^+ ATPase

2.1.5.2 อุณหภูมิ

เป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญต่ออัตราการเจริญและการตายของจุลินทรีย์ เพราะอุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาชีวเคมีภายในเซลล์ และรูปแบบโครงสร้างสามมิติของโปรตีนจึงมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วย แอคติวิตีของเอนไซม์ต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อได้ค่าแอคติวิตีสูงสุด อุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกันไปสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด หรือถึงแม้เป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่จากสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันก็มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานต่างกัน และเมื่ออุณหภูมิสูงเกินอุณหภูมิที่เหมาะสมจนทำให้โปรตีนเสียสภาพ ในที่สุดจุลินทรีย์จะตายเพราะเมแทบอลิซึมหยุดลง

อุณหภูมิสามารถนำมาใช้แบ่งจุลินทรีย์เป็นกลุ่มตามช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้ดี คือ พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ เรียกว่า ไซโครไฟล์ (psychrophile) ซึ่งจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิน้อยกว่า 0 องศาเซลเซียส หากน้ำยังมีสภาพเป็นของเหลวที่ใช้ได้ จุลินทรีย์กลุ่มนี้พบได้ทั่วไปตามมหาสมุทรต่างๆ ส่วนพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางเรียกว่ามีโซไฟล์ (mesophile) ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 20-50 องศาเซลเซียส โดยส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจะจัดอยู่ในกลุ่มนี้ โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญประมาณ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิในร่างกายของมนุษย์ และอีกกลุ่มคือพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง เรียกว่า เทอร์โมไฟล์ (thermophile) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 55-60 องศาเซลเซียส แต่บางชนิดของกลุ่มนี้ก็รอดชีวิตได้ที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นการจำแนกว่าเป็นกลุ่มใดจึงยึดเอาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นหลักไม่ใช่ช่วงอุณหภูมิที่รอดชีวิตได้

2.1.5.3 แรงดันออสโมซิส

แรงดันออสโมซิสระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปแบ่งเป็น 3 สภาวะ ได้แก่ สภาวะไอโซโทนิก (isotonic solution) หมายถึง ความเข้มข้นของสารภายในเซลล์เท่ากับสิ่งแวดล้อมที่เซลล์อยู่ ซึ่งในสิ่งแวดล้อมจะพบสภาพเช่นนี้น้อยมาก ส่วนสภาวะไฮโปโทนิก (hypotonic solution) ความเข้มข้นของสารในสิ่งแวดล้อมจะน้อยกว่าภายในเซลล์ ซึ่งเซลล์ทั่วไปมักอยู่ในสภาวะนี้ คือสิ่งแวดล้อมที่เซลล์อยู่มีความเข้มข้นของสารน้อยกว่าภายในเซลล์ประมาณ 10 มิลลิโมลาร์ และอีกสภาพคือสภาวะไฮเปอร์โทนิก (hypertonic solution) ที่ความเข้มข้นของสารในสิ่งแวดล้อมมีมากกว่าภายในเซลล์ เช่น ในที่ที่มีเกลือสูง น้ำตาลสูง สภาพเช่นนี้ใช้ถนอมอาหารได้ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวถูกละลายไม่เพียงแต่เปลี่ยนค่า A_w (water activity) แต่ยังมีผลต่อแรงดันออสโมซิส ซึ่งเป็นแรงที่เป็นผลจากความแตกต่างของตัวถูกละลายกระทำต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่น ๆ มีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมซิส แต่แรงดันออสโมซิสที่มากอาจส่งผลให้จุลินทรีย์ตายได้ ในสารละลายที่มีสภาวะไฮเปอร์โทนิก เซลล์จุลินทรีย์อาจย่นและเหี่ยว ขณะที่เมื่ออยู่ในสภาวะไฮโปโทนิกเซลล์อาจแตกได้

การทนเกลือของจุลินทรีย์นั้นเกี่ยวกับค่า A_w และแรงดันออสโมซิสเช่นกัน จุลินทรีย์บางกลุ่มเป็นพวกชอบเกลือ (halophilic) หมายถึง ต้องการเกลือสำหรับการเจริญ กลุ่มที่ชอบเกลือปานกลางส่วนมากคือแบคทีเรียในทะเลซึ่งเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือประมาณร้อยละ 3 ส่วนพวกที่ชอบเกลือมากอัตราการเจริญสูงสุดคือ ในสารละลายเกลืออิ่มตัวมันจึงเจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือมากกว่าร้อยละ 15 ซึ่งเป็นสภาวะที่

พบได้ในทะเลสาบน้ำเค็มและถังหมักผัก ความเข้มข้นที่สูงของเกลือปกติส่งผลต่อระบบการขนส่งที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้แตกและโปรตีนเสียสภาพ แต่จุลินทรีย์กลุ่มนี้มีกลไกทางสรีรวิทยาสำหรับการทนเกลือที่มีความเข้มข้นสูง แบคทีเรียพวกนี้ เช่น *Halobacterium* sp. จะมีเยื่อหุ้มเซลล์และเอนไซม์ที่ต่างจากแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งทำให้เซลล์ยังคงมีกิจกรรมที่ความเข้มข้นเกลือสูงได้ ในจุลินทรีย์ส่วนใหญ่นั้นระบบสรีรวิทยาไม่มีการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อเกลือความเข้มข้นสูง และความไวต่อเกลือของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ส่วนใหญ่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ในที่มีเกลือร้อยละ 3 แต่บางสายพันธุ์ของ *Staphylococcus* sp. จะทนเกลือและสามารถเจริญในที่มีเกลือมากกว่าร้อยละ 10 ได้

2.1.5.4 อากาศ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544)

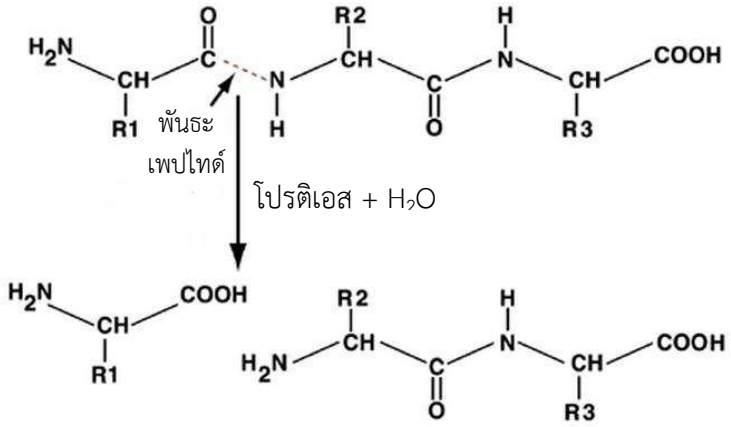
แบคทีเรียมีความต้องการอากาศแตกต่างกัน มีทั้งพวกแอโรบ (aerobes) ที่ต้องการออกซิเจนเพื่อใช้สร้างพลังงานในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ บางชนิดเป็นแฟคัลเททิฟแอนแอโรบ (facultative anaerobes) คือสามารถเจริญในที่มีหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ พวกนี้สามารถสร้างพลังงานได้จากการหายใจถ้ามีออกซิเจน หรือจากกระบวนการหมักถ้าไม่มีออกซิเจน ส่วนพวกที่เจริญในที่ไม่มีออกซิเจนเรียกว่า แอนแอโรบแท้จริง หรือ ออบลิเกตแอนแอโรบ (obligate anaerobes)

2.1.5.5 สารอาหาร

ระบบนิเวศส่วนใหญ่ตามธรรมชาติไม่มีลักษณะที่อุดมด้วยสารอินทรีย์ที่ใช้ได้ จุลินทรีย์ในระบบนิเวศต่างๆ เช่น มหาสมุทร ต่างอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของสารอาหารต่ำ สารประกอบอนินทรีย์ส่วนใหญ่ต่างก็เป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์ แต่ก็มีสารประกอบอนินทรีย์หลายชนิดเช่นกันที่มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ดังนั้นสารประกอบอนินทรีย์จึงเป็นได้ทั้งสารอาหารหรือสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ สารประกอบอนินทรีย์ที่สำคัญซึ่งพบได้ทั่วไปในระบบนิเวศ ได้แก่ แก๊สต่างๆ เช่น ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน เป็นต้น ในรูปของธาตุ เช่น กำมะถัน (S) ในรูปของไอออน เช่น แอมโมเนียม (NH_4^+) เฟอร์รัส (Fe^{2+}) เฟอร์ริก (Fe^{3+}) โซเดียม (Na^+) โพแทสเซียม (K^+) ซัลเฟต (SO_4^{2-}) ไนเตรต (NO_3^-) ไนไตรต์ (NO_2^-) และคลอไรด์ (Cl^-) เป็นต้น

2.1.6 เอนไซม์โปรติเอส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543)

เอนไซม์โปรติเอส มีชื่อสามัญหลายชื่อได้แก่ เพปติเดส (peptidase) โปรติเอส (protease) โปรติเนส (proteinase) เพปไทด์ไฮโดรเลส (peptidehydrolase) และเอนไซม์โปรติโอไลติค (proteolytic enzyme) เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ด้วยน้ำ (ภาพที่ 1) รวมทั้งสลายพันธะอื่นที่มีลักษณะคล้ายพันธะเพปไทด์แต่ประกอบด้วยหมู่เคมีต่างไป เช่น เอไมด์ ($-NH_2$) เอสเทอร์ (-COOR) ไทโอเอสเทอร์ (-COSR) หรือไฮโดรซาเมท (-CONHOH) ในปัจจุบันสามารถจัดจำแนกเอนไซม์โปรติเอสออกได้เป็น 4 ชนิด ตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยาและโครงสร้างของเอนไซม์ ดังนี้



ภาพที่ 1 การสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอส (ดัดแปลงจาก Terrence and Osna, 2003)

2.1.6.1 เซรีนโปรติเอส (serine protease)

เซรีนโปรติเอสมีเลขตามระบบ คือ EC 3.4.21 เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ถูกยับยั้งได้ด้วยไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (diisopropylfluorophosphate) ด้วยการเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซีของอนุมูลเซริล (seryl residue) ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ เซรีนโปรติเอสทั้งหมดจัดเป็นเอนโดเพปติเดส (endopeptidase) ที่ทำงานได้ดีในช่วงค่าพีเอชมากกว่า 7.0 (ค่าพีเอช 7-11) ตัวอย่างเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มนี้ได้แก่ ซับทิลิซิน (subtilisin) EC 3.4.21.14 ที่จัดอยู่ในกลุ่มของแอลคาไลน์เซรีนโปรติเอส (alkaline serine protease) ที่แยกได้จาก *Bacillus* ที่รู้จักกันดีในชื่อของ ซับทิลิซินบีพีเอน (subtilisin BPN) หรือ นากาเรสซับทิโลเพปทิเดสซี (nagarase subtilo-peptidase C)

2.1.6.2 ไธออลโปรติเอส (thiol protease)

ไธออลโปรติเอสมีเลขตามระบบ คือ EC 3.4.22 เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฮดริล (-SH) อยู่ในบริเวณเร่งและอาจมีฮีสทิซิล (histisyl) รวมอยู่ด้วย ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้อยู่ในช่วงเป็นกลาง คือ 6.0-7.5 และเป็นเอนไซม์ที่ค่อนข้างทนความร้อนได้ดี อาจจะทนความร้อนได้ถึง 60-80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอชเป็นกลาง แต่มักเสียสภาพที่ค่าพีเอชน้อยกว่า 4 ไธออลโปรติเอส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์ของโปรตีนที่ถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารซัลไฮดริล (sulphydryl reagent) หรือสารกลุ่มไธออล (thiol groups) เช่น พารา-คลอโรเมอร์คิวริเบนโซเอท (*p*-chloromercuribenzoate หรือ *p*CMB) ไอโอโดอะซิทาไมด์-เอน-เอทิลมาเลอิไมด์ (idoacetamide-N-ethyl maleimide) เป็นต้น (Verachtert and de Mot, 1990) สารยับยั้งจะทำลายอนุมูลซัลไฮดริลที่บริเวณเร่งของเอนไซม์จนสูญเสียการทำงานได้ ในบางครั้งจึงเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า ซัลไฮดริลโปรติเนส ตัวอย่างของเอนไซมโปรติเนสกลุ่มนี้ เช่น ปาเปน (papain) (EC 3.4.22.2) จากยางมะละกอ และโบรมิเลน (bromelain) จากสับปะรด เป็นต้น

2.1.6.3 แอซิดโปรติเอส (acid protease)

แอซิดโปรติเอสมีเลขตามระบบ คือ EC 3.4.23 เป็นเอนไซม์ที่มีช่วงการทำงานเหมาะสมอยู่ในช่วงค่าพีเอชที่เป็นกรด โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 2 และ 4 โดยมีความจำเพาะกับกรดอะมิโน

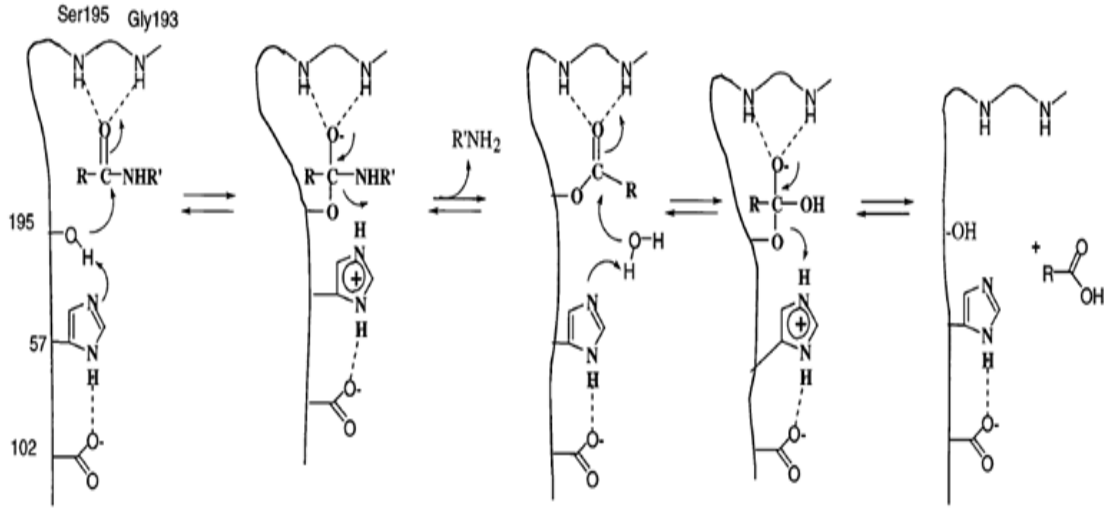
ชนิดอะโรมาติก (aromatic amino acid) แต่จะถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารประกอบเพปสเตอิน ไดอะโซอะเซติล นาเลซีนเมทิล เอสเทอร์ (pepstain diazoacetyl norlecine- methyl ester) แอซิดโปรติเอสจากจุลินทรีย์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ เพปซินไลค์เอนไซม์ (pepsin-like enzyme) เป็นเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Aspergillus* sp. *Penicllium* sp. และ *Rhizopus* sp. และ เรนนินไลค์เอนไซม์ (rennin-like enzyme) ซึ่งมีกิจกรรมที่ใกล้เคียงกับคาล์ฟ ไคโมซิน (calf-chymosin) ที่ผลิตจาก *Mucor pusillus, Endothia purasitica* และ *A. miehei* (Fogarty and Kelly, 1990)

2.1.6.4 เมทัลโลโปรติเอส (metalloprotease)

เมทัลโลโปรติเอสมีเลขตามระบบ คือ EC 3.4.24 เป็นเอนไซม์ที่มีไอออนของโลหะรวมอยู่ภายในโมเลกุลของเอนไซม์ หรือช่วยในปฏิกิริยาการเร่งสลาย เช่น Zn^{2+} เอนไซม์นี้ทำการตัดสายพอลิเพปไทด์จากปลาย (exopeptidase) โดยทำปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าพีเอชเป็นกลาง (ค่าพีเอช 5.6-7.5) ซึ่งอาจเรียกว่า นิวทรัลโปรติ-เอส (neutralprotease) ก็ได้ และเนื่องจากมีไอออนของโลหะร่วมในปฏิกิริยาจึงมักถูกยับยั้งได้ด้วยสารดึงโลหะ (metel chelating agents) เช่น เอทิลลีนไดอะมีนเททราอะซิติก (ethylenediaminetetraacetic; EDTA) และวันเทนฟีแนนโทรลิน (1,10-phenanthrolin) (Pero et al., 1990) แต่สารประกอบที่มีกำมะถัน หรือไดไอโซโพร-พิลฟลูออโรฟอสเฟต(diisopropylfluorophosphate; DIFP) ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้ ตัวอย่างเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มนี้ เช่น คาร์บอกซีเพปติเดสเทอร์โมไลซินคอลลาจีเนส (carboxypeptidase thermolysin collagenase) เป็นต้น (Verachtert and de Mot, 1990)

2.1.7 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส (http://www.rosehulman.edu/~brandtChem330/ Enzyme_ mech_ examples .pdf)

กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสที่จะยกตัวอย่างในหัวข้อนี้คือ กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเซรีนโปรติเอส ที่เพิ่มอัตราการสลายพันธะเพปไทด์ได้ 10^{10} เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะที่ไม่มีตัวเร่งปฏิกิริยา บริเวณเร่งของเซรีนโปรติเอสประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 เรซิดิว ที่ทำหน้าที่สำคัญ คือ เซรีน ฮิสติดีน และแอสปา-เตท และเป็นบริเวณอนุรักษ์ของเซรีนโปรติเอสเกือบทุกชนิด กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้นจากการเข้าจับของเอนไซม์กับสับสเตรท จากนั้น อิเล็กตรอนของฮิสติดีนจะเข้าสร้างพันธะกับอะตอมไฮโดรเจนของเซรีน ทำให้เซรีนแสดงความเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ที่สามารถสร้างพันธะโคเวเลนท์กับหมู่คาร์บอนิลของพันธะเพปไทด์ในสับสเตรท ส่งผลให้ประจุลบของออกซิเจนบนหมู่คาร์บอนิลของเพปไทด์สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโปรตอนของหมู่เอไมด์ เกิดบริเวณที่เรียกว่า ออกซียานไอออน โฮล (oxyanion hole) ที่ทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาการสลายต่อไป โดยหมู่ N-H ในพันธะเพปไทด์ของสารตั้งต้น จะเกิดส่งถ่ายอิเล็กตรอนให้กับอะตอมไนโตรเจนในสายโซ่ข้างของฮิสติดีน ทำให้พันธะเพปไทด์ของสับสเตรทแตกออก จากนั้นพันธะเอสเทอร์ระหว่างเพปไทด์และอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโนเซรีน จะเกิดการสลายได้เป็นเพปไทด์ที่มีหมู่คาร์บอนิล และหมู่ไฮดรอกซีของกรดอะมิโนเซรีนคืนกลับมา สุดท้ายเอนไซม์ก็จะหลุดออกจากสับสเตรทและกลับมาอยู่ในรูปที่พร้อมเร่งปฏิกิริยาต่อไป (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส (Hedstrom, 2002)

2.1.8 แหล่งผลิตของเอนไซม์โปรติเอส (มยุรฉัตร เอกธรรมกิจ และสุจิตรา ยนต์สิงห์, 2548)

2.1.8.1 เอนไซม์โปรติเอสจากพืช

การผลิตโปรติเอสจากพืชมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ใช้เวลานานและพื้นที่มาก อย่างไรก็ตามมีเอนไซม์โปรติเอสหลายชนิดจากพืชที่ผลิตและใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ปาเปนจากยางมะละกอ ที่ทำงานได้ดีในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 5 และ 9 และมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 80 ถึง 90 องศาเซลเซียส หรือ โบรมิเลนจากสับปะรด ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติคล้ายกับซีสเทอีนโปรติเอส และทำงานได้ดีในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 5 และ 9 สำหรับเคราติเนส (keratinase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายผมและขนแกะมักนำไปใช้ป้องกันการอุดตันในระบบบำบัดน้ำเสีย

2.1.8.2 เอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์

ส่วนใหญ่มาจากตับอ่อนของสัตว์ ตัวอย่างโปรติเอสจากสัตว์ เช่น ทริปซิน (trypsin) จากกระเพาะที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการผลิตยา ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) จากตับที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคจึงเป็นเอนไซม์ที่มีราคาแพง ใช้ในอุตสาหกรรมย่อยพันธะเพปไทด์ในอาหารที่มีส่วนประกอบของนมสำหรับผู้ที่มีอาการแพ้โปรตีนจากน้ำนม เพปซิน (pepsin) จากกระเพาะของสัตว์ซึ่งสามารถทำงานได้ดีในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 1 และ 2 และเรนนิน (rennin) จากกระเพาะลูกวัว ที่ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมนม ทำให้ผลิตภัณฑ์นมมีความคงตัว เพิ่มกลิ่นและรสชาติให้ดีขึ้น

2.1.8.3 เอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์

แม้ว่าเอนไซม์โปรติเอสจะพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่ในปัจจุบันแหล่งผลิตของเอนไซม์โปรติเอสที่มีขายในเชิงการค้าส่วนใหญ่มักมาจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรีย แบคทีเรียสามารถเจริญอย่างรวดเร็ว และยังควบคุมการเจริญได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีต้นทุนในการเลี้ยงที่ต่ำกว่าพืชและสัตว์ อุตสาหกรรมส่วนใหญ่จึงนิยมนำแบคทีเรียมาเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์มาใช้ เพราะแบคทีเรียมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ซับซ้อน

น้อยกว่าราและไวรัส และสภาวะในการเลี้ยงก็ง่าย เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากพืชและสัตว์ไม่สามารถตอบสนองต่อความต้องการของโลกในปัจจุบันจึงทำให้เกิดความสนใจเอนไซม์โปรติเอสที่มาจากจุลินทรีย์มากขึ้น และจุลินทรีย์นั้นก็เป็นแหล่งที่ดีของเอนไซม์โปรติเอส เนื่องจากมีความหลากหลายทางชีวเคมีและมีการดัดแปลงพันธุกรรมได้ง่าย และมีคุณลักษณะเฉพาะที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Rao et al., 1998)

เอนไซม์โปรติเอสที่จำหน่ายในเชิงการค้าส่วนใหญ่เป็นพวกนิวทรัลและอัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus* เอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสมักมีการทำงานได้ในช่วงค่าพีเอชแคบ (ค่าพีเอช 5-8) และสามารถทนอุณหภูมิสูงได้ค่อนข้างต่ำ ส่วนเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่มีลักษณะเฉพาะคือ สามารถทำงานได้ที่ค่าพีเอชสูงๆ (ค่าพีเอช 10) มีความจำเพาะต่อสับสเตรท และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 60 องศาเซลเซียส ด้วยสมบัติเหล่านี้ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส จึงทำให้มีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก (Rao et al., 1998)

จากความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีการพัฒนาตลอดและความต้องการเอนไซม์ที่มีคุณลักษณะเฉพาะใหม่ ทำให้นักเทคโนโลยีชีวภาพยังคงสนใจที่จะค้นหาเอนไซม์โปรติเอสจากแหล่งผลิตใหม่ (Sana et al., 2006) ที่สามารถทนต่อสภาวะที่รุนแรงในกระบวนการอุตสาหกรรม เช่น ในสภาวะที่มีการใช้เกลือ ค่าพีเอชที่สูงหรือต่ำเกินไปและอุณหภูมิสูง

แบคทีเรียใต้ทะเลเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ชนิดใหม่ที่กำลังได้รับความนิยม ซึ่งมีการค้นพบการผลิตเอนไซม์หลายชนิดที่สามารถนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาในระดับอุตสาหกรรม เช่น โปรติเอส, ไคติเนส (chitinase), เอสเทอเรส (esterase), ไลเพส (lipase), อะไมเลส (amylase), อะกาเรส (agarase) และ เอริลซัลฟาเตส (arylsulphatase) ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียใต้ทะเล อาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีความหลากหลายทางชีวภาพและอาจพบการปนเปื้อนของสารเคมีจึงทำให้สามารถปรับตัวเพื่อความอยู่รอดได้ดีกว่าแบคทีเรียที่พบบนบก (Sana et al., 2006)

2.1.9 การประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในระดับอุตสาหกรรม (วทัญญุตา ภู่โยทิน, 2544)

เอนไซม์โปรติเอสถูกจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลสที่มีบทบาทโดยตรงในอุตสาหกรรม และมีการใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบันถึงร้อยละ 60 ของเอนไซม์ทั้งหมดที่ใช้ (Rao et al., 1998) ดังสรุปตัวอย่างอุตสาหกรรมที่มีการใช้เอนไซม์โปรติเอสเร่งปฏิกิริยาได้ในตารางที่ 1

2.1.9.1 เบเกอรี

สำหรับเอนไซม์โปรติเอสที่นำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเบเกอรี มีวัตถุประสงค์สำคัญ 2 ประการ คือ เพื่อปรับปรุงให้มีกลูเตนในโดล์ (dough) สูง (Outtrup and Boyce, 1990) ในการทำขนมปังกรอบแคร็กเกอร์ (cracker) และ บีสกิต (biscuit) ส่วนมากจะใช้แอซิดโปรติเอสจากเชื้อรา โดยโปรติเอสจะทำให้กลูเตนถูกย่อยสลายจึงทำให้ไม่เกิดการกักเก็บอากาศในโดล์ระหว่างการหมักด้วยยีสต์ จึงทำให้โดล์ไม่พอง เมื่อนำไปอบจะได้เนื้อสัมผัส (texture) ที่กรอบมาก โปรติเอสที่ใช้เช่น นิวทรัลโปรติเอส จาก *Bacillus amyloliquefaciens* และใช้เพื่อให้ขนมปังมีรสชาติที่ดีขึ้น จากกลิ่นของกรดอะมิโนที่ได้รับจากการสลาย (Poutanen, 1997)

ตารางที่ 1 การใช้เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรม

ประเภทของอุตสาหกรรม	วัตถุประสงค์ในการใช้	แหล่งผลิตเอนไซม์	ชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้
1. เบเกอรี	การทำขนมปังกรอบ	รา	แอซิดโปรติเอสและนิวทรัลโปรติเอส
2. การผลิตเบียร์	ทำให้เบียร์ใสขึ้น	รา, แบคทีเรีย	ปาเปน, โบรมิเลน, เพปซิน,
3. ธัญชาติ	ใช้ในขั้นตอนการแปรรูปเครื่องปรุงรส	รา, แบคทีเรีย	ปาเบน, โบรมิเลน, เพปซิน
4. ผลิตภัณฑ์จากนม	รักษารสชาติของผลิตภัณฑ์ย่อยโปรตีนในนม รักษาคุณภาพและช่วยในการระเหยของนม	รา, แบคทีเรีย	เอนไซม์จากน้ำย่อย, ปาเปน, โบมิเลน, เพปซิน
5. การผลิตอาหารสัตว์	เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารสัตว์	รา, แบคทีเรีย	เอนไซม์จากน้ำย่อย, เพปซิน
6. การแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อและปลา	ทำให้เนื้อมีความนุ่ม	รา, แบคทีเรีย	ปาเบน, โบรมิเลน
7. อุตสาหกรรมยาและทางการแพทย์	ช่วยในการย่อย	รา, แบคทีเรีย	ปาเบน, โบรมิเลน
8. การฟอกหนัง	ทำให้หนังมีความนุ่มและช่วยกำจัดขน	รา, แบคทีเรีย	เอนไซม์จากน้ำย่อย, ปาเบน
9. การผลิตผงซักฟอก	ขจัดคราบโปรตีนและสิ่งสกปรก	รา, แบคทีเรีย	แอลคาไลน์โปรติเอส

ที่มา: Miller and Litsky, 1976 อ้างอิงใน อภิรดี อุดมสิน, 2546

2.1.9.2 การผลิตเบียร์

ในอุตสาหกรรมการหมักเบียร์หรือผลิตเบียร์ นิยมนำเอนไซม์โปรติเอสมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์สำคัญ 2 ประการ คือ ใช้ในขั้นตอนการผลิต มีการนำนิวทรัลโปรติเอสจากแบคทีเรียมาเติมในการหมักเพื่อเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนอิสระสำหรับการเจริญของยีสต์ เป็นการปรับปรุงคุณภาพเบียร์ให้ดีขึ้น และใช้เพื่อช่วยให้น้ำเบียร์มีความใส เพราะในขั้นตอนการเก็บเบียร์จะเก็บที่อุณหภูมิต่ำและมักจะเกิดความขุ่น ที่เกิดจากสารประกอบโพลีฟีนอล คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนในเบียร์ การใส่โปรติเอสลงไปจะช่วยทำให้เบียร์มีความใสมากขึ้น (Aunstrup, 1979)

2.1.9.3 การผลิตอาหารสัตว์

วัตถุประสงค์ในการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารสัตว์นั้น เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารสัตว์ ในลูกสัตว์ที่เพิ่งหย่านม (weaning animals) จะเป็นอีกกลุ่มที่ควรเสริมเอนไซม์ลงในอาหาร เนื่องจากทางเดินอาหารยังไม่คุ้นเคยกับสารอาหารชนิดใหม่ ทำให้การผลิตเอนไซม์ย่อยสารอาหารต่างๆ ยังไม่สมบูรณ์ จึงควรเสริมเอนไซม์จำพวกโปรติเอสลงไปด้วย เพื่อช่วยให้การย่อยอาหารและดูดซึมอาหารเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้การเติมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารสัตว์ยังช่วยกำจัดสารขัดขวางโภชนะ (antinutritional factors; ANFs) เนื่องจากในวัตถุดิบอาหารสัตว์หลายๆ ชนิด นอกจากจะมีสารอาหารที่ให้ประโยชน์ต่อการดำรงชีวิตของสัตว์แล้ว ยังมีองค์ประกอบที่ก่อให้เกิดโทษต่อสุขภาพสัตว์ด้วย เรียกสารเหล่านี้ว่าสารขัดขวางโภชนะ ยกตัวอย่างเช่น สารชีวโมเลกุลในกลุ่มโปรตีนซึ่งพบมากในพืชตระกูลถั่ว มีสมบัติไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในทางเดินอาหารของสัตว์ ทำให้สัตว์ย่อยและดูดซึมโปรตีนไปใช้ได้น้อยลง จึงได้มีการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไปช่วยย่อยโปรตีนในพืชตระกูลถั่วนี้

2.1.9.4 การแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อและปลา

การแปรรูปผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เนื่องจากผู้บริโภคชอบเนื้อสัตว์ที่มีความนุ่มและไม่เหนียว โดยเฉพาะเนื้อวัว ดังนั้นการทำให้เนื้อนุ่มสามารถทำได้โดยการเก็บรักษาเนื้อที่ได้จากซากสัตว์ภายหลังการฆ่าไว้ในห้องเย็นเป็นเวลาหลายสัปดาห์ เพื่อให้โปรตีนในเนื้อสัตว์เกิดการเร่งสลายตัวเอง (autocatalysis) มีการใช้โปรติเอสเพื่อไปไฮโดรไลซ์โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (fibrous protein) ทำให้เนื้อมีความนุ่มได้ดีมาก วิธีการทำได้โดยฉีดเอนไซม์เข้าไปในซากสัตว์ภายหลังการฆ่าสัตว์แล้ว เพื่อให้เอนไซม์กระจายไปทั่วทั้งตัวสัตว์ อาจทำการปั๊มเข้าทางหลอดเลือด ภายหลังจากเลือดได้ไหลออกจากตัวสัตว์หมดแล้ว เพื่อให้เนื้อสัตว์มีความนุ่ม

2.1.9.5 การฟอกหนัง

ในการฟอกหนังนิยมนำเอนไซม์โปรติเอสมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการกำจัดขนสัตว์ โดยมีการนำเซรีนโปรติเอสจากจุลินทรีย์มาใช้แทนสารเคมี เช่น โปรติเอสชอบเค็มจาก *Bacillus* sp. ข้อดีของการใช้โปรติ-เอส ในขั้นตอนการกำจัดขนสัตว์ คือ ลดปัญหาการบำบัดของเสียจากโรงงานเนื่องจากสารเคมีซึ่งมีต้นทุนสูง และทำให้หนังสัตว์มีความนุ่มและยืดหยุ่น โดยมีการนำเซรีนโปรติเอสจากแบคทีเรียมาใช้แทนเอนไซม์จากสัตว์แต่ไม่ได้ผลดีนัก ในปี ค.ศ 1970 จึงมีการนำเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียมาใช้แทนการใช้ทริปซินและเพนครีเอทิน (pancreatin) ที่รวมทั้งมีการใช้แอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzea, B. amyloliquefaciens, B. licheniformis* ที่มีขายในปัจจุบันในชื่อการค้า ได้แก่ PIN, Pyrase, Novocor ตามลำดับ (วทัญญุตา ภู่โยทิน, 2544)

2.1.9.6 การสังเคราะห์เพปไทด์ (จิตติมา เจริญพานิช, 2552)

ในปัจจุบันนิยมนำเพปไทด์มาใช้ในอุตสาหกรรมที่หลากหลายอาทิเช่น เครื่องดื่มที่ผสมกรดอะมิโน โปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) สารให้ความหวานเทียมในรูปของไดเพปไทด์ซึ่งในการสังเคราะห์จะใช้เอนไซม์โปรติเอสเร่งปฏิกิริยาในทิศทางการผันกลับของปฏิกิริยาการสลาย ที่จะเกิดปฏิกิริยาในสภาวะที่มีน้ำน้อยหรือในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ และต้องการเอนไซม์ โปรติเอสที่มีความเสถียรในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์และช่วงค่าพีเอชกว้าง

2.1.9.7 การทำซีอิ้วและเนยแข็ง

ในการทำซีอิ้ว (soy sauce) มีการใช้เอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลือง เช่น การใช้โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* และ *A. sojae* หรือมีการใช้เอนไซม์เรนเนตจากกระเพาะลูกวัว ในการทำเนยแข็งที่ทำให้เกิดการตกตะกอนของน้ำนมอย่างรวดเร็วในค่าพีเอชที่เป็นกลางซึ่งมีการสลายตัวของโปรตีนในน้ำนมต่ำ แต่จากข้อจำกัดในเรื่องราคาทำให้ในปัจจุบันนิยมนำเอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ที่มีลักษณะใกล้เคียงมาใช้แทน เช่น เรนนินไลค์เอนไซม์จาก *Mucor miechi*, *M. pusillus* และ *Endothai parasitica*

2.1.9.8 การผลิตผงซักฟอก (วทัญญุตา ภู่โยทิน, 2544)

ผงซักฟอกจะประกอบไปด้วยส่วนประกอบหลักๆ คือ สารลดแรงตึงผิว (surfactants หรือสารกำจัดคราบสกปรก) สารซักล้าง (detergent) สารที่ใช้รักษาระดับความเป็นด่าง (alkaline builder) เป็นต้น เสื้อผ้าที่สกปรกจะดูดซับสิ่งสกปรกจากสิ่งแวดล้อม หรือจากร่างกายที่มีทั้งคราบโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ซึ่งในสภาวะการซักฟอก ความร้อน ความเป็นด่าง สารลดแรงตึงผิว และสารกำจัดคราบสกปรกจะช่วยขจัดคราบออกได้ แต่โปรตีนไม่สามารถถูกขจัดออกไปได้ และยังคงติดอยู่กับเส้นใยผ้า เพราะโปรตีนจะแข็งตัวเป็นก้อน และไม่ละลายที่ค่าพีเอชเป็นด่าง (ค่าพีเอช 9-10) การใช้เอนไซม์โปรติเอสในผงซักฟอกสามารถนำมาใช้แก้ปัญหาได้ เพราะเอนไซม์จะย่อยโปรตีนที่เกาะอยู่บนเสื้อผ้า ทำให้ผงซักฟอกมีประสิทธิภาพในการซักล้างมากขึ้น สำหรับเอนไซม์ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก จะต้องสามารถทำงานและมีความเสถียรต่อส่วนประกอบต่างๆ ที่เป็นส่วนผสมของผงซักฟอก เช่น ต้องมีความเสถียรในสารลดแรงตึงผิว สารซักล้าง และสารฟอกขาว ซึ่งสารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบหลักๆ ในผงซักฟอก นอกจากนี้เอนไซม์ยังต้องมีสภาวะที่ใช้ในการซัก เช่น มีความเสถียรในช่วงพีเอชที่เป็นด่าง (alkaline protease) และต้องเสถียรต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการซัก

2.2 ขอบเขตของการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยตลอดโครงการวิจัยนี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลัก คือ (1) การคัดเลือกและระบุชนิดแบคทีเรียใต้ทะเลที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (2) การหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียใต้ทะเลลึกที่คัดเลือกได้ และ (3) การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ที่คัดแยกได้ ซึ่งสามารถสรุปแผนงานตลอดโครงการได้ดังภาพที่ 3

การคัดเลือกและระบุชนิดแบคทีเรียใต้ทะเลที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส

การหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์จาก
แบคทีเรียใต้ทะเลลึกที่คัดเลือกได้

การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ที่คัดแยกได้

ภาพที่ 3 ภาพรวมขอบเขตของการดำเนินการวิจัยในโครงการ

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างตะกอนทะเล

สุ่มเก็บตัวอย่างตะกอนทะเล จำนวน 10 กรัม ที่ระดับความลึกต่างกัน จากทะเลในเขตภาคตะวันออก โดยการออกเรือในช่วงเวลาระหว่างวันที่ 25 พฤษภาคม 2556 ถึงวันที่ 30 เมษายน 2557 ดังสรุปในตารางที่ 2 ทำการเก็บตัวอย่าง โดยใช้พลั่วตักตะกอนทะเลที่ความลึกลงไป 10 ซม. จากพื้นผิวเก็บเข้าหลอดปลายแหลมและแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาคัดแยกแบคทีเรียใต้ทะเลที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยจะเก็บไว้ไม่เกินหนึ่งสัปดาห์ ทำการบันทึกความลึก อุณหภูมิ และความดันของน้ำขณะเก็บตัวอย่าง ความเค็มของน้ำทะเลขณะเก็บตัวอย่างอยู่ระหว่าง 25 ppt และ 30 ppt ลักษณะตัวอย่างเป็นดินทรายสีน้ำตาลเข้มผสมโคลนและมีน้ำทะเลผสม โดยมีค่าพีเอชในช่วง 6.0-6.8

ตารางที่ 2 ตำแหน่งและความลึกของตะกอนทะเลที่เก็บมาศึกษา

ตัวอย่างที่	แหล่งของตัวอย่าง	ความลึก (เมตร)	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความดัน (atm)
1	ชายหาดอ่าวพร้าวช่วงที่มีการรั่วซึมของคราบน้ำมันดิบ จังหวัดระยอง	5	32	1.6
2	เกาะจาน แสมสาร จังหวัดชลบุรี	9	21	2.1
3	เกาะจาน แสมสาร จังหวัดชลบุรี	24	21	4
4	เกาะช้าง จังหวัดตราด	18	24	2.3
5	ทะเลบ้านกรูด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	0.5	31	1.0
6	ทะเลเขาเต่า จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	0.5	34	1.0
7	หินเพลิง จังหวัดระยอง	16	26	3
8	หินเพลิง จังหวัดระยอง	21	26	3.6
9	เรือหลวงคราม จังหวัดชลบุรี	22	25	3.8

3.2 การคัดแยกแบคทีเรียใต้ทะเลจากตัวอย่างตะกอนทะเล

ชั่งตัวอย่างตะกอนทะเล อย่างละ 1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายตัวอย่างและทำการเจือจางตัวอย่าง 5 เท่า และ 10 เท่า ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ไม่ได้เจือจาง, เจือจาง 5 เท่า และ 10 เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มากระจายให้ทั่ว (spread) บนอาหารแข็ง Luria–Bertani ที่ประกอบไปด้วยทริปโทน (bacto-tryptone) ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร), ยีสต์เอ็กซ์แทรค (yeast extract) ร้อยละ 0.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ NaCl ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มี

ลักษณะโคโลนีและสีหรือรูปร่างแตกต่างกัน มาทำให้บริสุทธิ์โดยการเลี้ยงซ้ำบนอาหารแข็งชนิดเดิมจนไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อโคโลนีอื่น

3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียใต้ทะเลที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2 มาทดสอบการย่อยโปรตีนโดยนำมาเพาะเชื้อแบบลงเชื้อตำแหน่งเดียว (point inoculation) บนอาหารแข็งสกิมมิลล์ (skim milk) ที่ประกอบไปด้วยผงสกิมมิลล์ (skim milk powder) ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร), เปปโทน (peptone) ร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร), ยีสต์เอ็กซ์-แทรค ร้อยละ 0.25 (น้ำหนักต่อปริมาตร), กลูโคส (glucose) ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ NaCl ร้อยละ 2.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เลือกไอโซเลทที่ให้บริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนี มาวัดความกว้างของบริเวณใสเทียบกับความกว้างของโคโลนีทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน พร้อมทั้งตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ขับออกมานอกเซลล์ของเชื้อที่เลี้ยงเจริญในอาหารเหลว LB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามวิธีที่จะอธิบายในหัวข้อ 3.4 เลือกไอโซเลทที่แสดงค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดมาทำการระบุชนิดต่อไป

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจะใช้วิธีของ Bradford (1976) โดยการผสมสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรกับสารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent; BioRad) ปริมาตร 245 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และคำนวณเทียบความเข้มข้นโปรตีนกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA (ภาคผนวกที่ 1)

3.4.2 การวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

ดูดเชื้อเจริญปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ทำการแยกเซลล์ออก โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำส่วนใสซึ่งเรียกว่าส่วนสกัดเอนไซม์มาติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอะโซเคซีน (azocasein hydrolysis) (นิตยา เยาว์แสง, 2552) โดยทำการผสมอะโซเคซีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับ ส่วนสกัดเอนไซม์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ทิ้งไว้ 15 นาที ปั่นเหวี่ยงตะกอนอะโซเคซีนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารโฟลิน (folin reagent) อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คำนวณเทียบค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสกับกราฟมาตรฐานของ L-tyrosine (ภาคผนวกที่ 2) ในการวัดค่าแอคติวิตีแต่ละครั้งจะทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาแล้วทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่กำหนด

3.5 การระบุชนิดของแบคทีเรียใต้ทะเลที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส

การระบุชนิดของแบคทีเรียใต้ทะเลผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่คัดแยกได้จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณลักษณะทางชีวเคมี ตามวิธีของ “API Skills Bacterial Identification Method” และลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA (Weisburg et al., 1991) ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน 16S rRNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ของยีน 16S rRNA ของ *Escherichia coli* ที่ตำแหน่งเบส 22-41 และ 1066-1085 (Precigou et al., 2004) โดยสารละลายผสมที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ปริมาตรทั้งหมด 100 ไมโครลิตร) ต่อหนึ่งตัวอย่าง ประกอบด้วยโครโมโซมอลดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม dNTP แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์แต่ละสายที่ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์ บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1X และเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) 2.5 หน่วย (เติมทีหลัง) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมต่อไปนี้ คือ ความร้อนเริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดเครื่องชั่วคราว เพื่อเติมเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ต่อมาทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ ที่ประกอบด้วยขั้นการแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที การจับของไพรเมอร์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และการต่อสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และขั้นสุดท้ายของการต่อสายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ (ขนาดประมาณ 1.1 กิโล-เบส) โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเจล GF-1 GEL DNA RECOVERT KIT (Vivantis) ตามวิธีที่แนะนำจากบริษัท จากนั้นเชื่อมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เตรียมได้เข้าสู่ T/A cloning vector ทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E.coli* DH5α และสกัดพลาสมิดสายผสมที่ได้ด้วยชุดสกัดพลาสมิด GF-1 PLASMID DNA EXTRACTION KIT (Vivantis) นำพลาสมิดสายผสมที่ผ่านการยืนยันว่ามีชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แต่ละสายพันธุ์ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (Sanger et al., 1977) เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลี-โอไทด์ที่ได้ (Basic local alignment search tool; BLAST) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลนิวคลี-โอไทด์โลก (GenBank: http://www.ncbi. nlm.nih.gov) และจัดจำพวกนิวคลีโอไทด์ (alignment) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ CLUSTALW (http://align.genome.jp/) เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวงค์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) โดยอาศัยความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ และสร้างแผนภาพวงค์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) แบบ Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) ที่มีค่า bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง (Felsenstein, 1985) และมีการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Kimura 2-parameter method (Kimura, 1980) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013)

3.6 การศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพและปริมาณไอออนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียใต้ทะเลที่คัดเลือกได้

3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำแบคทีเรียใต้ทะเลที่คัดแยกได้จากข้อ 3.3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงในสภาวะเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาเป็นหัวเชื้อในการศึกษาต่อไป โดยกำหนดให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในแต่ละการทดลองมีค่า OD600 ประมาณ 1.9

3.6.2 การศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.6.1 ร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน ตั้งแต่ 3 ถึง 11 บ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นำเชื้อเจริญมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อคำนวณผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น (ΔOD600) โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาที่ 0 ชั่วโมงของการเลี้ยง, วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ทุกการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง และรายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ยพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.6.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ถ่ายหัวเชื้อร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.6.2 บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 5 ถึง 50 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่า ΔOD600, ปริมาณโปรตีน และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ทุกการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง และรายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ยพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.6.4 การศึกษาผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ถ่ายหัวเชื้อร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมที่หาได้จากข้อ 3.6.2 บ่มเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วที่แตกต่างกัน คือ 150 ถึง 350 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่หาได้จากข้อ 3.6.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่า ΔOD600, ปริมาณโปรตีน และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ทุกการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง และรายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ยพร้อมส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.6.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ถ่ายหัวเชื้อร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกันคือ ร้อยละ 0 ถึง 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงให้เจริญในสภาวะที่หาได้จากข้อ 3.6.4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่า ΔOD600, ปริมาณโปรตีน และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ทุกการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง และรายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ยพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.6.6 การศึกษาผลของการเติมแมงกานีสคลอไรด์และเมอร์คิวรี่คลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

นำเชื้อที่คัดแยกได้จากข้อ 3.3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีการเติมแมงกานีสคลอไรด์หรือเมอร์คิวรี่คลอไรด์ ความเข้มข้น 0 ถึง 20 มิลลิโมลาร์ บ่มเลี้ยงเชื้อตามสภาวะเหมาะสมที่หาได้ในหัวข้อ 3.6.4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่า ΔOD600, ปริมาณโปรตีน และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ทุกการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง และรายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ยพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.7 การติดตามกราฟการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียใต้ทะเลที่คัดเลือกได้

เลี้ยงแบคทีเรียใต้ทะเลที่คัดแยกได้จากข้อ 3.3 ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศา-เซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะเดียวกัน เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อร้อยละ 10 ลงใน

อาหาร LB ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 และมีการเติม NaCl ร้อยละ 2.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากัน ดูดเชื้อมา 4 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวัดค่า ΔOD600, ค่าพีเอช, ตรวจนับจำนวนโคโลนีแบบ CFU (colony forming unit), วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส จากนั้นเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยจะเก็บตัวอย่างเชื้อเจริญปริมาตร 4 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ทุก 3 ชั่วโมงของการเจริญ การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง และรายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ยพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.8 การทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียใต้ทะเลที่คัดแยกได้

3.8.1 การเตรียมส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้น

ในการเตรียมหัวเชื้อทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในหลอดทดลองขนาด 15 เซนติเมตร ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ด้วยการเขย่าต่อเนื่องที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นำหัวเชื้อที่ได้ถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าต่อเนื่องที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อมาเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงให้เชื้อเจริญและเพิ่มปริมาณเซลล์ ดังสภาวะที่กล่าวมาแล้ว โดยใช้ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 นำเชื้อเจริญที่ได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเก็บส่วนใสซึ่งคือส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้น (crude protease) มาวัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้แล้วในหัวข้อ 3.4

3.8.2 การทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์โปรติเอส

นำส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.8.1 มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ผ่านการบดละเอียดปริมาณตามที่ระบุในตารางมาตรฐานน้ำหนักเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวกที่ 3) ลงในส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทีละน้อยๆ โดยใช้ช้อนตักสารขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็นลำดับขั้น ดังนี้ ร้อยละเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, และ 70-80 เมื่อพบว่าเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียตกตะกอนที่ความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60-70 และ 70-80 มากที่สุด จึงทดลองตกตะกอนเกลือใหม่ จำนวน 2 ความเข้มข้น คือที่ความเข้มข้นเกลืออิ่มตัวร้อยละ 0-60 และร้อยละ 60-80 กวนอย่างต่อเนื่องให้เกิดการละลายอย่างสมบูรณ์ตลอดเวลาบนน้ำแข็ง เมื่อทำการเติมเกลือจนครบปริมาณแล้วจะทำการกวนอย่างต่อเนื่องต่อเป็นเวลา 30 นาที บนน้ำแข็ง ปั่นเก็บตะกอนโปรตีนที่ได้ในแต่ละขั้นโดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาทำการไดอะไลซิส (dialysis) โดยละลายตะกอนโปรตีนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าพีเอช 7.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบรรจุลงในถุงไดอะไลซิส ทำการไดอะไลซ์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ปริมาตร 1800 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งจะเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ทุก 4 ชั่วโมง เป็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้

ในแต่ละขั้นไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ต่อไป ตลอดการทดลองจะทำการวัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้ในทุกความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตกตะกอน และคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะ ปริมาณเอนไซม์คงเหลือ และจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ และรายงานในรูปของตารางสรุปการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวกที่ 2)

3.8.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรติเอสที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจลแยก (separating gel) ที่มีความเข้มข้นอะคริลาไมด์ ร้อยละ 12 การวิเคราะห์ทำโดยการผสมตัวอย่างสารละลายโปรตีนและสารระบุตำแหน่ง (dye) ในอัตราส่วน 1:6 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะหยอดลงในช่องของเจล ให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลคงที่ 150 โวลต์ เมื่อสีระบุตำแหน่งเคลื่อนที่ถึงปลายเจล นำเจลที่ได้มาย้อมด้วยสารละลายย้อมสีคูแมซีบลู (ประกอบด้วยกรดอะซิติก ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เมทานอล ร้อยละ 40 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และสีคูแมซีบลู ร้อยละ 0.25 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายผสมของกรดอะซีติก ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ เมทานอล ร้อยละ 40 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งพื้นหลังของเจลไม่มีสี เพื่อชะเอาสีคูแมซีบลูในส่วนที่เป็นพื้นหลังออก เพื่อให้แถบแบนของโปรตีนปรากฏออกมา นำเจลที่ได้ไปสแกนด้วยเครื่องสแกน นำไปประมาณมวลโมเลกุลสัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้การเคลื่อนที่ของแถบเอนไซม์เทียบกับของโปรตีนมาตรฐาน (วิธีการประมาณมวลโมเลกุลสัมพัทธ์ของเอนไซม์แสดงในภาคผนวกที่ 4)

3.9 การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.9.1 ผลของค่าพีเอชต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส

การหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดำเนินการโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากหัวข้อ 3.8 กับสับเสตรทที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่างกันคือ ค่าพีเอช 3-6 (ใช้บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์), ค่าพีเอช 6-8 (ใช้บัฟเฟอร์ฟอตเฟต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์), ค่าพีเอช 7-9 (ใช้บัฟเฟอร์ทริสความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์) และค่าพีเอช 9-12 (ใช้บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์) และติดตามค่าแอคติวิตีของเอนไซม์คำนวณเป็นค่าร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์ (% relative activity) โดยใช้ผลการทดลองที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดเป็นร้อยละ 100 สำหรับการศึกษาผลของค่าพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ จะดำเนินการทดลองคล้ายกันแต่จะบ่มสารละลายเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่างๆ เป็นเวลา 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ก่อนทำปฏิกิริยาคำนวณค่าร้อยละแอคติวิตีคงเหลือ (% residual activity) โดยเทียบผลการทดลองที่ค่าพีเอชที่ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุดเป็นร้อยละ 100

3.9.2 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ดำเนินการโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ในชนิดของบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมที่หาได้ในหัวข้อ 3.9.1 ที่อุณหภูมิต่างกัน จากนั้นติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์และคำนวณเป็นค่าร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์โดยเทียบผลการทดลองที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงที่สุดเป็นร้อยละ 100 สำหรับการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ จะทำโดยการบ่ม

สารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และติดตามวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เวลา 6, 12, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง คำนวณเป็นค่าร้อยละแอคติวิตีคงเหลือโดยเทียบค่าแอตติวิตีของเอนไซม์ที่ชั่วโมงที่ศูนย์เป็นร้อยละ 100

3.9.3 ผลของสารเคมีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การศึกษาผลของสารเคมีต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทำโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ในสภาวะที่มีสารเคมีต่างๆ ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ และติดตามค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ รายงานผลการทดลองเป็นค่าร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์โดยเทียบค่าแอคติวิตีโปรติเอสของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารเคมีเป็นร้อยละ 100 สารเคมีที่ใช้ศึกษาได้แก่ NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$, $HgCl_2$, PMSF, EDTA และ DTT

3.9.4 ผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การศึกษาผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์จะใช้โซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกันคือระหว่างร้อยละ 0-20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เติมลงในปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่หาได้จากข้อ 3.9.1 และ 3.9.2 จากนั้นติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส คำนวณค่าร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์โดยเทียบค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในสภาวะที่ไม่มีเกลือเป็นร้อยละ 100

3.9.5 ผลของดีเทอร์เจนท์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การติดตามการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีดีเทอร์เจนท์ทำโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่มีสารดีเทอร์เจนท์ ได้แก่ SDS, Tween80 และ Triton X-100 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 1, 5 และ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ คำนวณค่าร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์โดยเทียบค่าแอคติวิตีโปรติเอสของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมดีเทอร์เจนท์เป็นร้อยละ 100

3.9.6 ผลของสารฟอกขาวต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การติดตามการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีสารฟอกขาวทำโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่มีสารฟอกขาว ได้แก่ Hydrogenperoxide (H_2O_2), Nitrioriacetic acid, Sodium dihydrogen orthophospate, Sodium carbonate, Sodium carboxymethyl cellulose, Sodium perborate, Sodium percarbonate, Sodium pyrophosphate tetrabasic, Sodium p-toluene sulfonate, Sodium silicate, Sodium tripolyphosphate, Sodium xylenesulfonate และ Zeolite ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 1, 5 และ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ คำนวณค่าร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์โดยเทียบค่าแอคติวิตีโปรติเอสของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารฟอกขาวเป็นร้อยละ 100

3.9.7 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส

บ่มสารละลายเอนไซม์ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดความเข้มข้นร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ระหว่างการบ่มปฏิกิริยาจะทำการเขย่าสารผสมอย่างต่อเนื่องที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นติดตามค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ ตัว

ทำละลายอินทรีย์ที่นำมาศึกษาได้แก่ ไดเมทิลซัลโฟนิลออกไซด์ (DMSO มีค่า log $P_{o/w}$ = -1.22), เมทานอล (methanol มีค่า log $P_{o/w}$= -0.8), เอทานอล (ethanol มีค่า log $P_{o/w}$ = -0.24), บิวทานอล (butanol มีค่า log $P_{o/w}$ =0.8), เบนซีน (benzene มีค่า log $P_{o/w}$ = 2.0), โทลูอีน (toluene มีค่า log $P_{o/w}$ = 2.7) เฮกเซน (hexane มีค่า log $P_{o/w}$ = 3.6), เดคเคน (decane มีค่า log $P_{o/w}$ = 5.6), และ เฮกซาเดคเคน (hexadecane มีค่า log $P_{o/w}$ = 8.8) รายงานผลการทดลองเป็นค่าร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์โดยเทียบค่าแอคติวิตีโปรติเอสของชุดควบคุมที่ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์เป็นร้อยละ 100

3.9.8 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอส

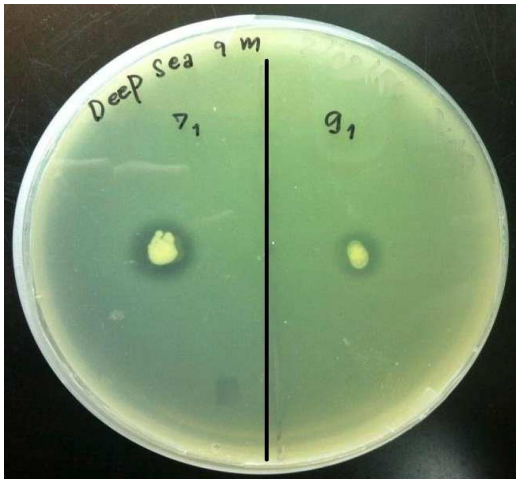
การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอสจะใช้สับสเตรทอะโซเคซีนและเคซีน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในการศึกษาด้วยการติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ คำนวณค่าร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์โดยเทียบค่าแอคติวิตีของปฏิกิริยาที่เกิดจากสับสเตรทอะโซเคซีนเป็นร้อยละ 100

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียใต้ทะเลที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากตัวอย่างตะกอนทะเล

เมื่อนำตัวอย่างตะกอนทะเลจากทะเลในเขตภาคตะวันออก จำนวน 9 ตัวอย่าง ที่ระดับความลึกต่างกันมาทำการเจือจางตัวอย่าง 5 เท่า และ 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อและกระจายทั่วบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบแบคทีเรียที่มีความแตกต่างของลักษณะโคโลนี ขนาด และสี จำนวนทั้งสิ้น 22 ไอโซเลท ซึ่งเมื่อนำมาเพาะเชื้อแบบลงเชื้อตำแหน่งเดียวบนอาหารแข็งสกิมมิลค์และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 4) พบแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท (ไอโซเลทที่ 5, 7, และ 9) ที่มีแนวโน้มว่าจะเป็นไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ ซึ่งเมื่อวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแล้ว พบว่าไอโซเลทที่ 7 มีอัตราส่วนของวงใสต่อโคโลนีมากที่สุดคือเท่ากับ 2.18 ขณะที่ไอโซเลทที่ 9 มีอัตราส่วนของวงใสต่อโคโลนีเท่ากับ 1.40 สำหรับไอโซเลทที่ 5 นั้นพบอัตราส่วนน้อยที่สุด คือ 1.20 และเมื่อวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสพบว่า ไอโซเลทที่ 7 ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดเท่ากับ 6.57±0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากไอโซเลทอื่น ดังแสดงในตารางที่ 3 ด้วยเหตุนี้จึงเลือกแบคทีเรียไอโซเลทที่ 7 มาทำการระบุชนิดของแบคทีเรียต่อไป



ภาพที่ 4 ตัวอย่างวงใสรอบโคโลนีที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนในอาหารแข็งสกิมมิลค์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 7 และไอโซเลทที่ 9 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแบคทีเรียที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงเจริญบนอาหารแข็งสกิมมิลค์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่แบคทีเรียขับออกมานอกเซลล์

ไอโซเลทที่	ลักษณะโคโลนี	อัตราส่วนของขนาดวงใสต่อขนาดโคโลนี	แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
5	ขอบหยัก มีวงใสรอบๆ โคโลนีขนาดใหญ่และกลม สีขาวขุ่น	1.20	6.32 ± 0.25
7	ขอบหยัก โคโลนีมีสีขาวขุ่น	2.18	6.57 ± 0.25
9	ขอบเรียบและกลม โคโลนีขนาดใหญ่ มีสีขาวขุ่น	1.40	6.42 ± 0.08

4.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียใต้ทะเลที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่คัดแยกได้

การระบุชนิดของแบคทีเรียใต้ทะเลไอโซเลทที่ 7 ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่คัดแยกได้ จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีตามวิธี API Skill bacterial identification ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16S rRNA ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียไอโซเลทที่ 7 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์คะทะเลส (catalase) และสามารถผลิตกลีเซอรอล (glycerol) เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine), อะไมดาลิน (amygdalin), ซาลิซิน (salicin), เอสคูลิน-เฟอร์ริกซิเตรท (esculin ferric citrate), อาบูติน (arbutin), อินูลิน (inulin), อะไมดอน (amidon) และไกลโคเจน (glycogen) รวมทั้งสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด เช่น แอล-อะราบิโนส (L-arabinose), ดี-ไรโบส (D-ribose), ดี-ไซโลส (D-xylose), ดี-กาแลกโทส (D-galactose), ดี-กลูโคส (D-glucose), ดี-ฟรักโทส (D-fructose), อิโนซิทอล (inositol), ดี-แมนนิทอล (D-mannitol), ดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose), ดี-มอลโตส (D-maltose) และ ดี-แลคโตส (D-lactose) เป็นต้น ดังสรุปในตารางที่ 4 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่ 7 คือ *Bacillus megaterium* โดยมีระดับความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์เท่ากับร้อยละ 99.1 ผลการระบุชนิดโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีนี้ให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16S rRNA ที่พบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ถึงร้อยละ 99 กับ *B. megaterium* หลายสายพันธุ์ เช่น *B. megaterium* strain BAB-2927 (Accession no. KF853118.1), *B. megaterium* strain KUDC1750 (Accession no. KC414696.1), *B. megaterium* strain MSC2 (Accession no. HQ694774.1) เป็นต้น และจัดไอโซเลทที่ 7 เป็น *B. megaterium* เช่นกัน (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 7 ที่คัดเลือกได้เมื่อวิเคราะห์ตามวิธี API Skill bacterial identification

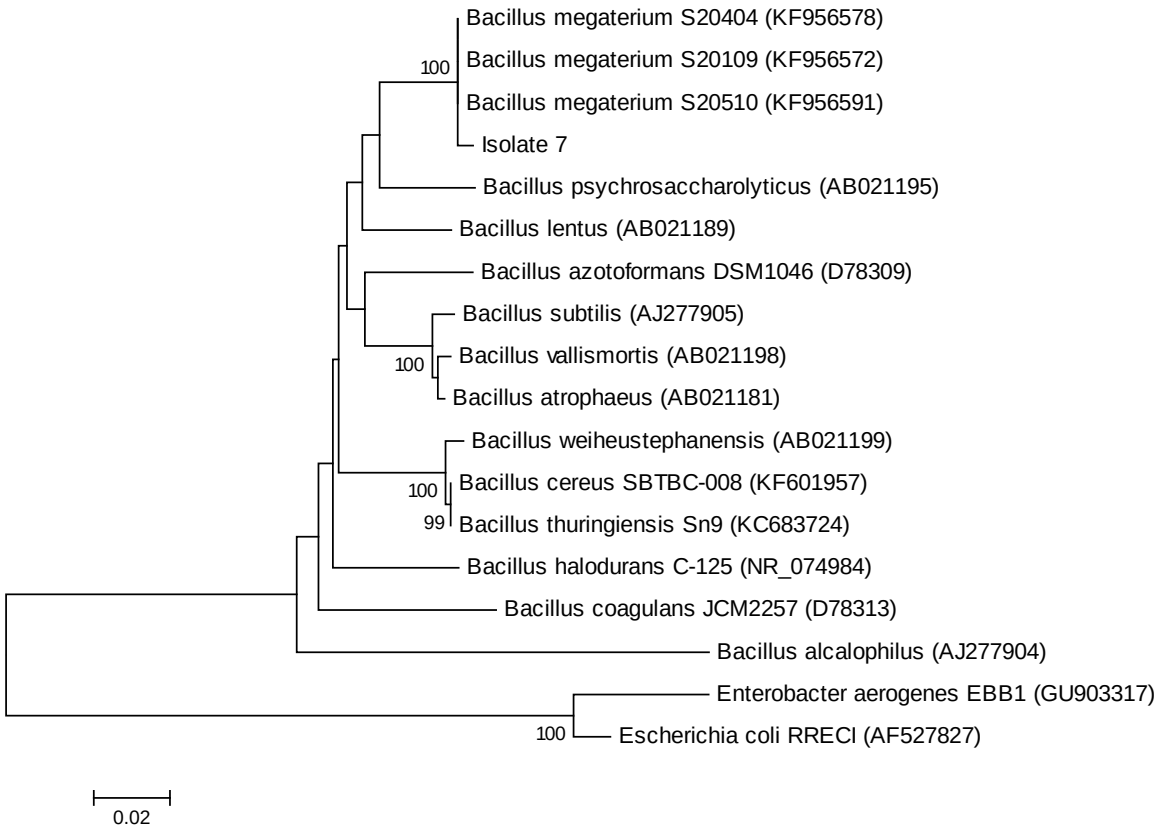
ปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบ	ผลการวิเคราะห์
การย้อมแกรม (gram stain)	แกรมบวก, รูปร่างท่อน
การทดสอบปฏิกิริยาเอนไซม์คะทะเลส (catalase test)	+
กลีเซอรอล (glycerol)	+
อีริทรีทอล (erythritol)	-
ดี-อะราบิโนส (D-arabinose)	-
แอล-อะราบิโนส (L-arabinose)	+
ดี-ไรโบส (D-ribose)	+
ดี-ไซโลส (D-xylose)	+
แอล-ไซโลส (L-xylose)	-
ดี-อะโดนิทอล (D-adonitol)	-
เมทิล-เบต้า-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (methyl-β-D-xylopyranoside)	-
ดี-กาแลกโทส (D-galactose)	+
ดี-กลูโคส (D-glucose)	+
ดี-ฟรักโทส (D-fructose)	+
ดี-แมนโนส (D-mannose)	-
แอล-ซอร์โบส (L-sorbose)	-
แอล-แรมโนส (L-rhamnose)	-
ดูซิทอล (ducitol)	-
อิโนซิทอล (inositol)	+
ดี-แมนนิทอล (D-mannitol)	+
ดี-ซอบิทอล (D-sorbitol)	-
เมทิล-แอลฟา-ดี-แมนโนไพราโนไซด์ (methyl-α-D-mannopyranoside)	-
เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (methyl-α-D-glucopyranoside)	-
เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine)	+
อะไมดาลิน (amygdalin)	+
อาบูติน (arbutin)	+
เอสคูลิน เฟอร์ริก ซิเตรท (esculin ferric citrate)	+

หมายเหตุ – หมายถึง ให้ผลลบ
+ หมายถึง ให้ผลบวก

ตารางที่ 4 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 7 ที่คัดเลือกได้เมื่อวิเคราะห์ตามวิธี API Skill bacterial identification

ปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบ	ผลการวิเคราะห์
ซาลิซิน (salicin)	+
ดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose)	+
ดี-มอลโตส (D-maltose)	+
ดี-แลคโตส (D-lactose)	+
ดี-เมลิไบโอส (D-melibiose)	+
ดี-แซคคาโรส หรือซูโครส (D-saccharose หรือ sucrose)	+
ดี-ทรีฮาโลส (D-trehalose)	+
อินูลิน (inulin)	+
ดี-เมลิไซโทส (D-melezitose)	+
ดี-ราฟฟิโนส (D-raffinose)	+
อะไมดอนจากแป้ง (Amidon; starch)	+
ไกลโคเจน (glycogen)	+
ไซลิทอล (xylitol)	-
เจนทิโอไบโอส (gentiobiose)	+
ดี-ทูราโนส (D-turanose)	+
ดี-ไลโซส (D-lyxose)	-
ดี-ทากาโลส (D-tagalose)	-
ดี-ฟูโคส (D-fucose)	-
แอล-ฟูโคส (L-fucose)	-
ดี-อะราบิทอล (D-arabitol)	-
แอล-อะราบิทอล (L-arabitol)	-
โพแทสเซียม กลูโคเนต (potassium gluconate)	-
โพแทสเซียม ทู-คีโตกลูโคเนต (potassium 2-ketogluconate)	-
โพแทสเซียม ไฟว์-คีโตกลูโคเนต (potassium 5-ketogluconate)	-
ผลสรุป	*Bacillus megaterium* (ความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ร้อยละ 99.1)

หมายเหตุ – หมายถึง ให้ผลลบ
+ หมายถึง ให้ผลบวก

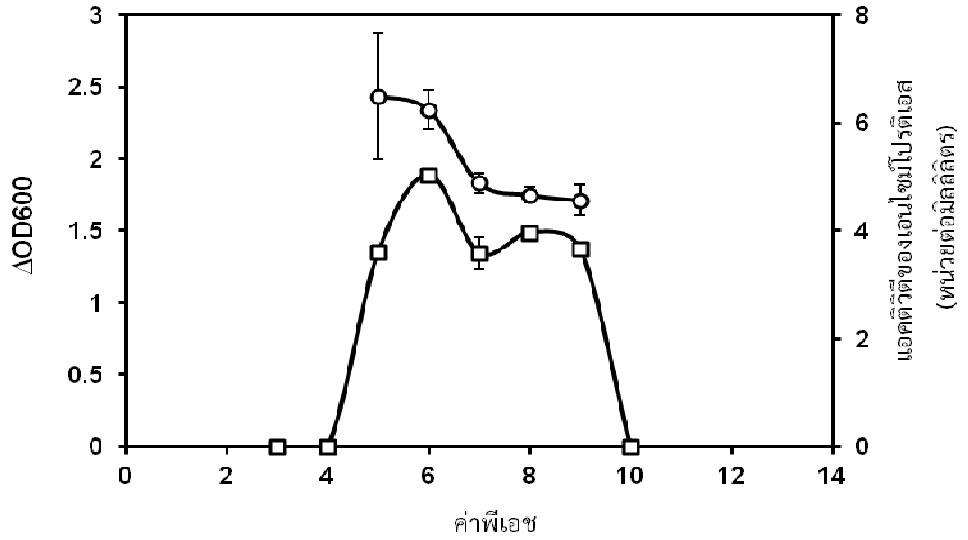


ภาพที่ 5 การวิเคราะห์วงศ์วานวิวัฒนาการของแบคทีเรียใต้ทะเลไอโซเลทที่ 7 ที่คัดแยกได้ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA เทียบกับแบคทีเรียในกลุ่มที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน ตัวเลขที่ระบุถัดจากจุดแยกของกิ่งเป็นค่าร้อยละความเชื่อมั่นของการวิเคราะห์ซึ่งจะแสดงเมื่อมีค่ามากกว่าร้อยละ 70 จากการวิเคราะห์ฐานราก (bootstrap analysis) จำนวน 1000 ครั้ง ระยะห่างทางวิวัฒนาการ (evolutionary distances) คำนวณโดยใช้วิธี Kimura 2-parameter และอยู่ในหน่วยจำนวนของเบสที่เปลี่ยนไปต่อตำแหน่ง

4.3 การศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพและปริมาณไอออนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus megaterium*

4.3.1 ผลของค่าพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

เมื่อนำ *B. megaterium* ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีค่าพีเอชแตกต่างกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที แล้วติดตามค่า ΔOD600 ปริมาณโปรตีน และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสพบว่า *B. megaterium* สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ที่ค่าพีเอชในช่วง 5.0-9.0 โดยมีการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 คือ 6.25 ± 0.37 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเพิ่มค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงจะพบว่าการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง และไม่สามารถเจริญได้ที่ค่าพีเอชมากกว่า 9.0 ดังแสดงผลการทดลองในภาพที่ 6



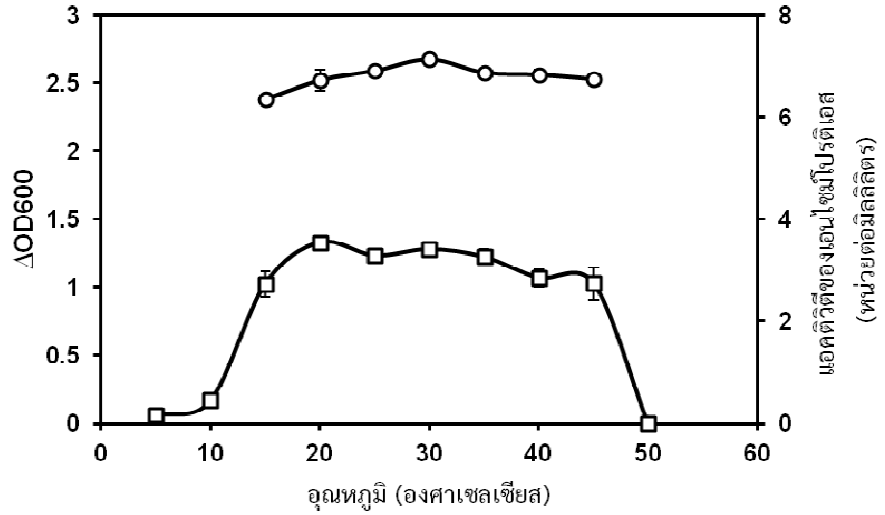
ภาพที่ 6 ผลของค่าพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*
กำหนดให้ □ คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ΔOD600) เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่วิเคราะห์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
○ คือ ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

4.3.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

เมื่อทราบค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium* แล้ว (ผลการทดลองจากหัวข้อ 4.3.1) จะทำการเลี้ยงเชื้อเจริญที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ ตั้งแต่อุณหภูมิ 5 ถึง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที และวัดค่า ΔOD600 ปริมาณโปรตีน และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสได้ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 7 คือ *B. megaterium* สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 15 ถึง 45 องศาเซลเซียส และมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 7.15±0.09 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่า *B. megaterium* ไม่สามารถเจริญได้

4.3.3 ผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

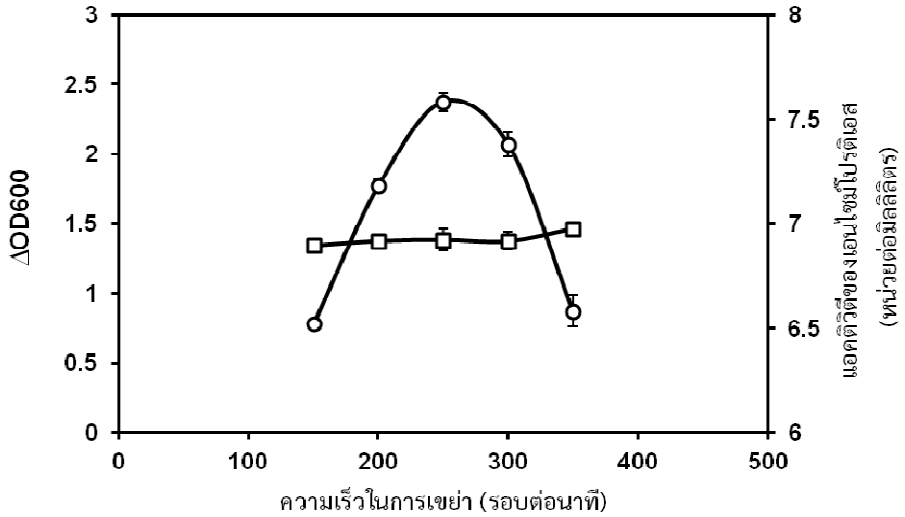
เมื่อทราบค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium* แล้วปัจจัยต่อมาที่ได้ทำการศึกษา คือ ปริมาณออกซิเจนต่อการเจริญโดยใช้ความเร็วในการเขย่าที่แตกต่างกันระหว่าง 150 และ 350 รอบต่อนาทีเป็นตัวกำหนด เมื่อบ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดค่า ΔOD600 ปริมาณโปรตีน และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส พบว่า *B. megaterium* สามารถเจริญได้ดีในระดับที่ใกล้เคียงกันในทุกความเร็วในการเขย่าแต่จะมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับที่ต่างกัน โดยพบว่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีนั้น *B. megaterium* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุดเท่ากับ 7.58 ± 0.04 หน่วยต่อมิลลิลิตร ขณะที่เมื่อใช้ความเร็วในการเขย่าที่สูงหรือต่ำกว่านั้นจะมีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณน้อยลง ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*

กำหนดให้ □ คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ΔOD600) เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่วิเคราะห์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

○ คือ ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)



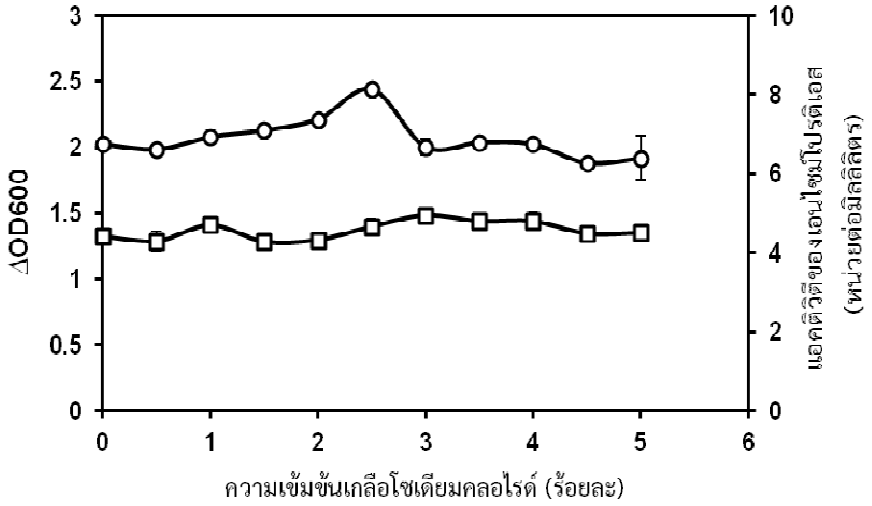
ภาพที่ 8 ผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*

กำหนดให้ □ คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ΔOD600) เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่วิเคราะห์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

○ คือ ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

4.3.4 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* ในอาหารเหลว LB ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ ร้อยละ 0 ถึง 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงให้เจริญในสภาวะเหมาะสมที่หาได้จากข้อ 4.3.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *B. megaterium* สามารถเจริญได้ในอาหาร LB ที่มีเกลือทุกความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้แต่จะแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดเท่ากับ 8.13 ± 0.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นองค์ประกอบและค่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังแสดงในภาพที่ 9



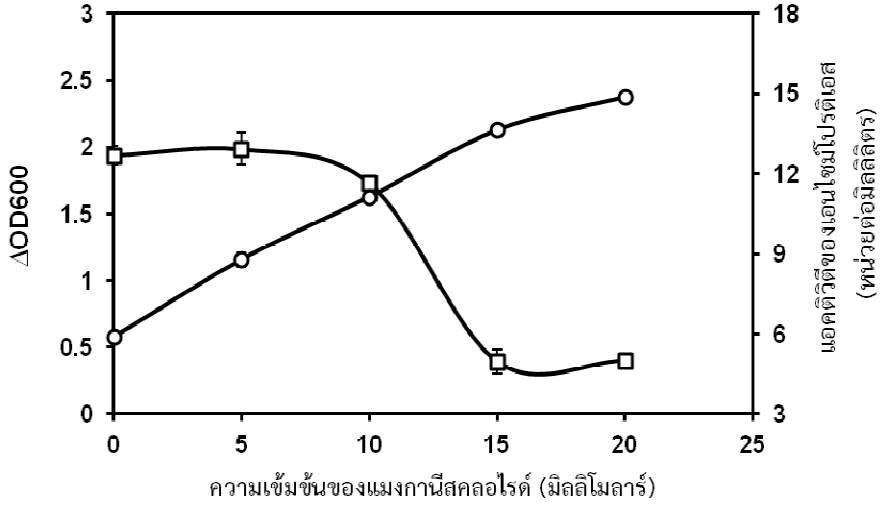
ภาพที่ 9 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*

กำหนดให้ □ คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ΔOD600) เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่วิเคราะห์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

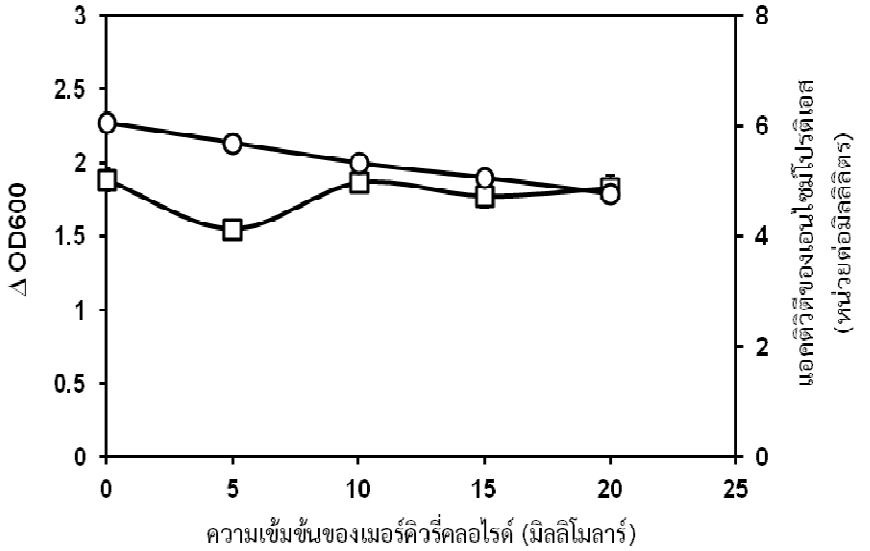
○ คือ ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

4.3.5 ผลของการเติมแมงกานีสคลอไรด์และเมอร์คิวรี่คลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

การเลี้ยง *B. megaterium* ในอาหารเหลว LB ที่มีการเติมแมงกานีสคลอไรด์หรือเมอร์คิวรี่คลอไรด์ความเข้มข้น 0 ถึง 20 มิลลิโมลาร์ ลงเป็นส่วนประกอบของอาหารและบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะเหมาะสมที่หาได้จากข้อ 4.3.3 พบว่า *B. megaterium* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีการเติมแมงกานีสคลอไรด์สูงถึง 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นการเจริญจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแมงกานีสคลอไรด์ แต่ที่น่าสนใจคือ เมื่อมีปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เพิ่มขึ้นจะทำให้สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสได้เพิ่มขึ้นตามไปด้วย ดังแสดงในภาพที่ 10 สำหรับการเลี้ยงเจริญในอาหารที่มีการเติมเมอร์คิวรี่คลอไรด์พบว่า *B. megaterium* ยังคงสามารถเจริญได้ดีที่ทุกความเข้มข้นของเมอร์คิวรี่คลอไรด์แต่ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจะลดลงตามปริมาณของเมอร์คิวรี่คลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 11



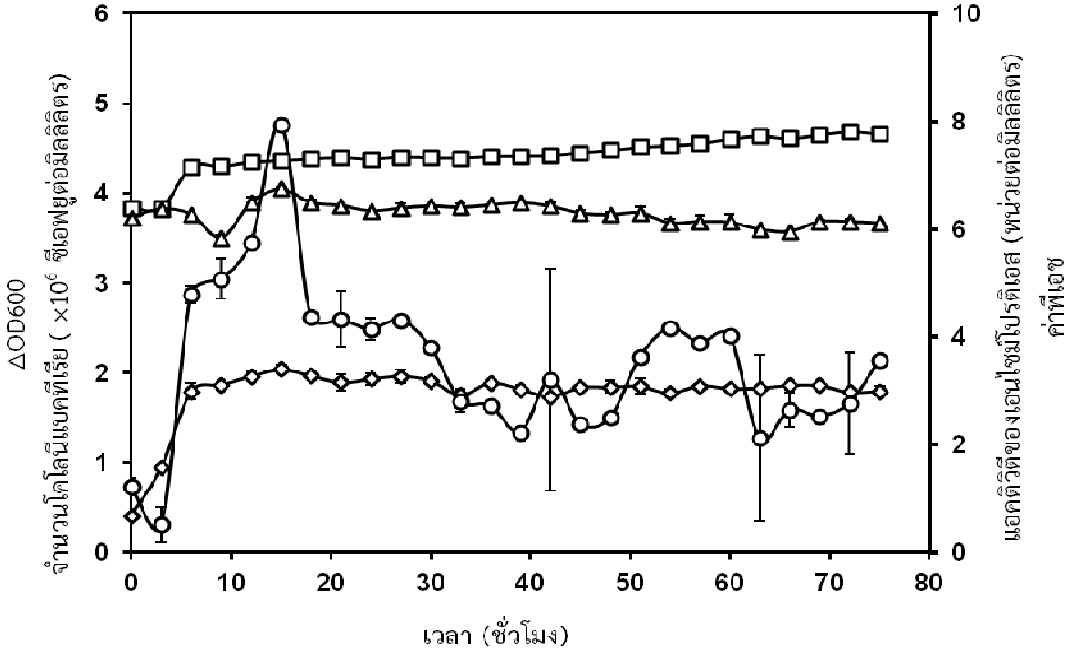
ภาพที่ 10 ผลของการเติมแมงกานีสคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*
กำหนดให้ ☐ คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ΔOD600)
เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่วิเคราะห์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
○ คือ ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)



ภาพที่ 11 ผลของการเติมเมอร์คิวรี่คลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*
กำหนดให้ ☐ คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ΔOD600)
เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่วิเคราะห์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
○ คือ ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

4.4 การติดตามกราฟการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *B. megaterium* ให้ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงแล้วจากข้อ 4.3 จึงได้มีการติดตามกราฟการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยจะเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงมาวิเคราะห์ทุกๆ 3 ชั่วโมงต่อเนื่อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในการวิเคราะห์จะวัดค่า ΔOD600, ค่าพีเอช, นับจำนวนโคโลนี, ปริมาณโปรตีน และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 12 กล่าวคือ เมื่อเวลาผ่านไป 9 ชั่วโมง *B. megaterium* สามารถเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) โดยสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุด (6.74 ± 0.02 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ที่ชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยง โดยมีจำนวนโคโลนีและค่า ΔOD600 เท่ากับ 4.76 ± 0.03 × 10^6 CFUต่อมิลลิลิตร และ 2.04 ± 0.05 ตามลำดับ และปริมาณเซลล์จะลดลงเมื่อเลี้ยงเจริญต่อเนื่องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในลักษณะที่ขึ้นกับเวลา แต่จะส่งผลต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสเพียงเล็กน้อย สำหรับค่าพีเอชของอาหารนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามเวลาในการเลี้ยง



ภาพที่ 12 กราฟการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*

กำหนดให้ □ คือ ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยง

△ คือ ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

○ คือ จำนวนโคโลนีแบคทีเรีย (×10^6 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร)

◇ คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ΔOD 600) เมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญที่เวลาที่ทำการวิเคราะห์

4.5 การทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus megaterium*

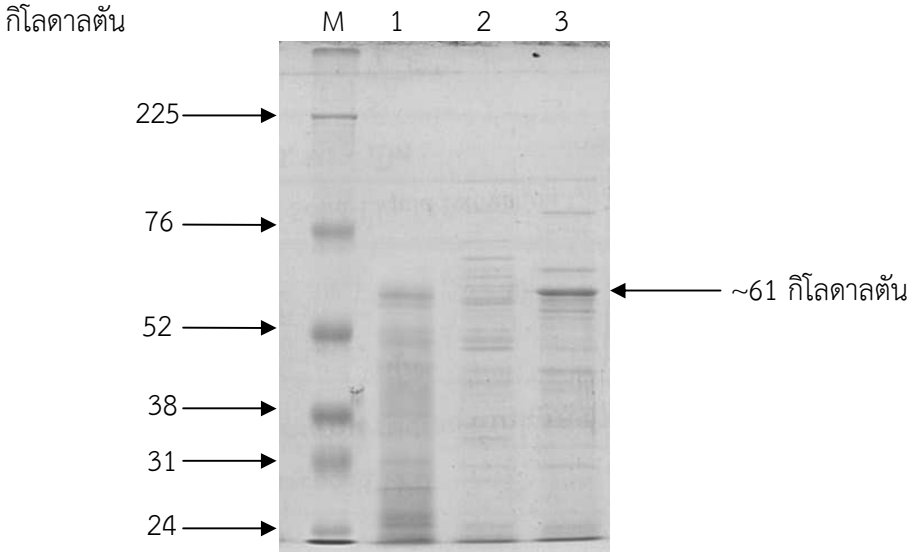
เมื่อนำส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้นไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละต่างกัน พบว่าสามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสสูงในตะกอนโปรตีนที่ใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60-70 และ 70-80 โดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 68.39 และ 83.40 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ จึงทำการตกตะกอนเอนไซม์ใหม่ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 0-60 และ 60-80 พบว่าเอนไซม์โปรติเอสส่วนใหญ่จะตกตะกอนที่ความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60-80 โดยให้ค่าแอคติวีตีเอนไซม์ทั้งหมดเท่ากับ 38.96 หน่วย และมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงถึง 5729.41 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งแสดงถึงความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 125.67 เท่า แม้จะมีปริมาณเอนไซม์คงเหลือเพียงร้อยละ 0.56 ดังแสดงในตารางที่ 5

เมื่อนำสารละลายโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนเกลือมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และประมาณมวลโมเลกุลสัมพัทธ์เทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยการวิเคราะห์ SDS-PAGE พบว่า การตกตะกอนเอนไซม์โปรติเอสด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60-80 ให้แถบโปรตีนที่คาดว่าคือเอนไซม์โปรติเอสที่มีความเข้มสูงกว่าแถบโปรตีนอื่นและไม่พบในตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยเกลืออิ่มตัวร้อยละ 0-60 โดยมีขนาดอยู่ระหว่าง 52 และ 76 กิโลดาลตัน จากการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการึทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีน (ภาคผนวกที่ 4) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีมวลโมเลกุลสัมพัทธ์ประมาณ 61 กิโลดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 13 และนำมาศึกษาคุณลักษณะเฉพาะต่อไป

4.6 การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium*

4.6.1 ผลของค่าพีเอชต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส

การวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ค่าพีเอชต่างกัน พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอะโซเคซีนได้ทุกค่าพีเอชตั้งแต่ 3 ถึง 12 โดยแสดงค่าแอคติวิตีมากกว่าครึ่งในช่วงค่าพีเอช 5-10 ซึ่งพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อยู่ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8 ดังแสดงในภาพที่ 14 สำหรับการศึกษาผลของค่าพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยทำการบ่มสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่างกันเป็นเวลา 1, 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่า เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 1 และ 3 ชั่วโมง เอนไซม์ยังคงสามารถรักษาความเสถียรได้มากกว่าร้อยละ 50 ในทุกค่าพีเอชและจะยังคงเหลือแอคติวิตีมากกว่าร้อยละ 80 ในช่วงค่าพีเอช 6-9 ดังแสดงในภาพที่ 15ก และ 15ข ซึ่งให้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันกับการบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แต่พบว่าเอนไซม์ยังคงรักษาแอคติวิตีได้สูงเกินร้อยละ 80 ในช่วงค่าพีเอชแคบลงคือ 7-9 ดังแสดงในภาพที่ 15ค



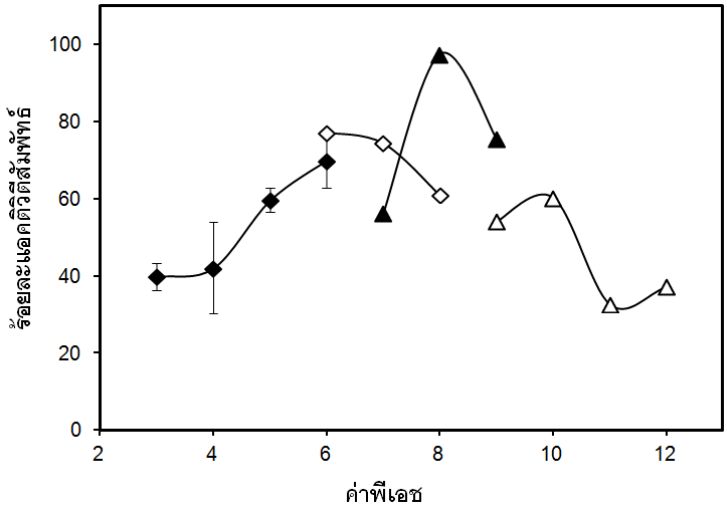
ภาพที่ 13 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* ด้วยการวิเคราะห์ SDS-PAGE โดยใช้เจลแยกที่มีความเข้มข้นอะคริลาไมด์ร้อยละ 12

กำหนดให้ M คือ โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 1 คือ ส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้น

แถวที่ 2 คือ โปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 0-60

แถวที่ 3 คือ โปรตีนและเอนไซม์โปรติเอส (ลูกศร) ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60-80



ภาพที่ 14 ผลของค่าพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium*

กำหนดให้ —◆— คือ 50 mM Sodium acetate (ค่าพีเอช 3-6)

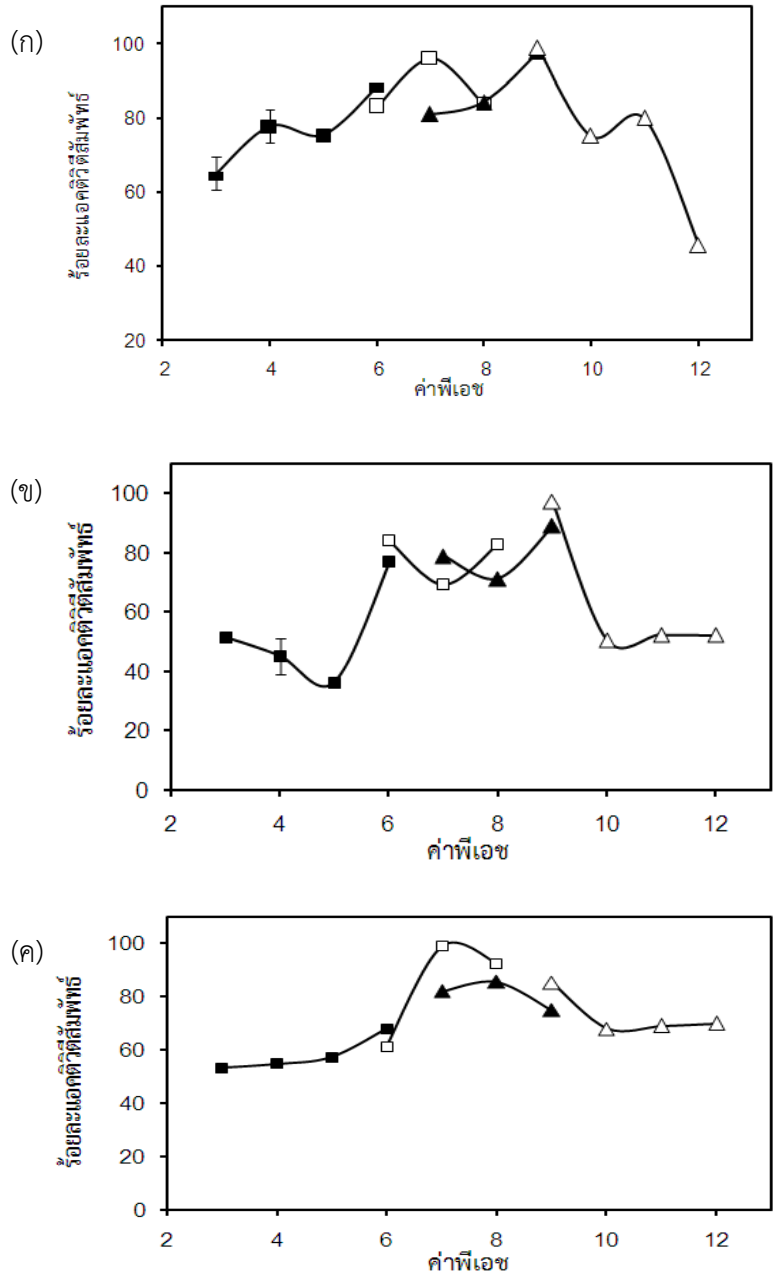
—◇— คือ 50 mM Phosphate (ค่าพีเอช 6-8)

—▲— คือ 50 mM Tris-HCl (ค่าพีเอช 7-9)

—△— คือ 50 mM Sodium carbonate (ค่าพีเอช 9-12)

ตารางที่ 5 ตารางการทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus megaterium*

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	ปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตี (หน่วยต่อมล.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก.)	ปริมาณเอนไซม์คงเหลือ (ร้อยละ)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
ส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้น	1500	0.102	153	4.65	6,975	45.59	100	1
การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 0-60	6.20	0.387	2.40	0.88	5.46	2.28	0.08	0.05
การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60-80	6.80	0.001	0.0068	5.73	38.96	5,729.41	0.56	125.67



<u>ภาพที่ 15</u> ผลของค่าพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอชต่างกันเป็นเวลา (ก) 1 ชั่วโมง (ข) 3 ชั่วโมง และ (ค) 6 ชั่วโมง

กำหนดให้ —■— คือ 50 mM Sodium acetate (ค่าพีเอช 3-6)

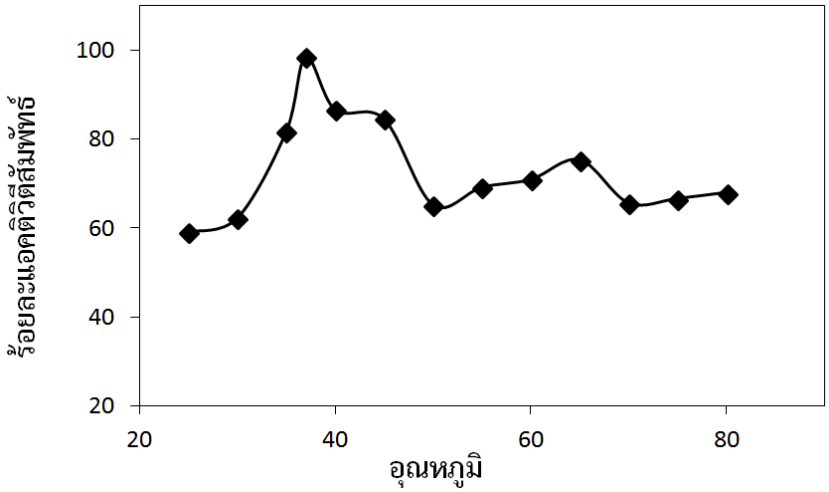
—□— คือ 50 mM Phosphate (ค่าพีเอช 6-8)

—▲— คือ 50 mM Tris-HCl (ค่าพีเอช 7-9)

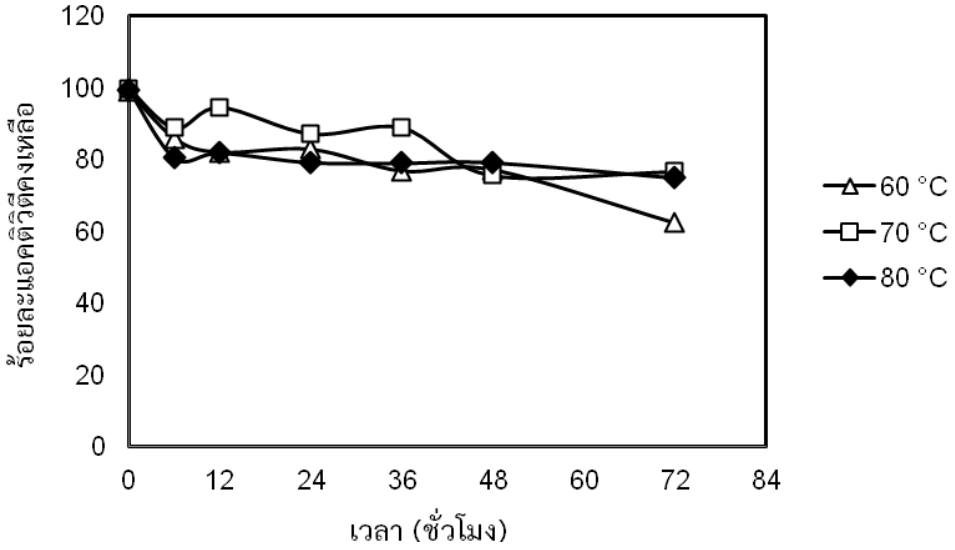
—△— คือ 50 mM Sodium carbonate (ค่าพีเอช 9-12)

4.6.2 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส

การวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิต่างกัน เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสคือ ที่อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 16 สำหรับการศึกษาผลของอุณหภูมิสูงต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ในทุกอุณหภูมิที่ทำการศึกษา เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* ยังคงรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้มากกว่าร้อยละ 80 เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ในทุกค่าอุณหภูมิเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเอนไซม์ยังคงเหลือแอคติวิตีมากกว่าร้อยละ 60 เมื่อทำการบ่มต่อเนื่องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 16 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium*



ภาพที่ 17 ผลของอุณหภูมิสูงต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างกันเป็นเวลาต่อเนื่อง 72 ชั่วโมง

4.6.3 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิด พบว่า การบ่มเอนไซม์ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว คือ เบนซีน โทลูอีน เฮกเซน เดดเคน และเฮกซาเดคเคน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ไม่ส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* แต่เมื่อทำการบ่มนานขึ้นเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง จะส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เล็กน้อย ขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วจะส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางส่วน แต่ในสภาวะดังกล่าวเอนไซม์โปรติเอสยังคงรักษาแอคติวิตีไว้ได้มากกว่าครึ่ง ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ความเข้มข้นร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ / เวลาในการบ่ม	ค่า log $P_{o/w}$	ร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์		
		6 ชม.	12 ชม.	24 ชม.
ชุดควบคุม	-	100	100	100
DMSO	-1.22	56	55	53
เมทานอล	- 0.8	63	62	56
เอทานอล	- 0.24	63	57	56
บิวทานอล	0.8	61	65	71
เบนซีน	2.0	112	89	69
โทลูอีน	2.7	99	102	78
เฮกเซน	3.6	109	94	90
เดคเคน	5.6	104	98	79
เฮกซาเดคเคน	8.8	110	101	88

4.6.4 ผลของสารเคมีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การติดตามการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีไอออนโลหะชนิดและความเข้มข้นต่างกันพบว่า ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ไม่ส่งผลยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่ในทางกลับกันจะเสริมการทำงานของเอนไซม์ โดย Mn^{2+} สามารถเสริมการทำงานของเอนไซม์ได้มากกว่าร้อยละ50 ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไอออนโลหะเป็น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ จะเพิ่มค่าแอคติวิตีของเอนไซม์มากขึ้นไป ขณะที่ไอออน

โลหะอื่น ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ไม่ส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เล็กน้อยเมื่อความเข้มข้นสูงถึง 10 มิลลิโมลาร์ เมื่อเทียบกับค่าแอคติวิตีของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมไอออนโลหะลงไป ดังแสดงในตารางที่ 7 สำหรับผลตัวยับยั้งต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส พบว่า การเติม DTT ความเข้มข้นสูงถึง 5 มิลลิโมลาร์ ช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์ แต่ PMSF ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 2 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ขณะที่ EDTA ความเข้มข้นมากกว่า 5 มิลลิโมลาร์ จะส่งผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์

ตารางที่ 7 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีสารเคมีต่างกัน

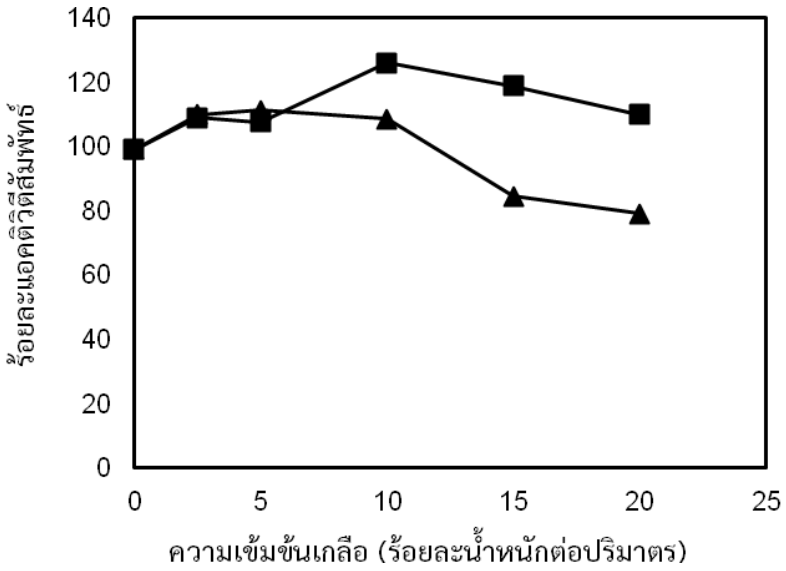
ชนิดของสารเคมี / ความเข้มข้นที่ศึกษา	ร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์		
	ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์	ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์	ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์
ชุดควบคุม	100	100	100
Na^{+}	114	110	65
Ca^{2+}	117	121	79
Mg^{2+}	122	92	77
Mn^{2+}	151	184	176
Hg^{2+}	122	105	79
Zn^{2+}	118	104	77
PMSF	118	66	76
DTT	147	114	*
EDTA	127	102	86

หมายเหตุ * คือ ไม่ได้ทำการทดลอง

4.6.5 ผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การเตรียมเกลือโซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ตั้งแต่ร้อยละ 0-20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในปฏิกิริยาของเอนไซม์และวัดค่าแอคติวิตีพบว่า เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่งผลเสริมค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เล็กน้อย แต่เมื่อความเข้มข้นเกลือสูงกว่านี้จะส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เล็กน้อยในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น โดยเอนไซม์ยังคงเหลือ

แอคติวิตีมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อทำปฏิกิริยาในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ขณะที่การเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ลงในปฏิกิริยาส่งผลเสริมค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นและให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดที่ความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ เท่ากับร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์จะมีค่าลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมคลอไรด์มากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* ที่ความเข้มข้นเกลือต่างกัน

กำหนดให้ สัญลักษณ์ —▲— คือ ผลการทดลองของการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์

—■— คือ ผลการทดลองของการเติมแคลเซียมคลอไรด์

4.6.6 ผลของดีเทอร์เจนท์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

เมื่อทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีดีเทอร์เจนท์พบว่า ดีเทอร์เจนท์ทั้งสามชนิด ไม่ส่งผลยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสแม้จะใช้ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ก็ตาม ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีดีเทอร์เจนท์ต่างกัน

ชนิดของดีเทอร์เจนท์ / ความเข้มข้นที่ศึกษา	ร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์		
	ร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
ชุดควบคุม	100	100	100
SDS	120	111	116
Tween-80	122	125	105
Triton X-100	131	160	92

4.6.7 ผลของสารฟอกขาวต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

เมื่อติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีสารฟอกขาวพบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์มีค่าลดลงตามความเข้มข้นของสารฟอกขาวที่เพิ่มขึ้น โดยเอนไซม์ยังคงเร่งปฏิกิริยาได้มากกว่าร้อยละ 70 เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีสารฟอกขาวความเข้มข้นร้อยละ 1 และร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และจะเหลือแอคติวิตีมากกว่าครึ่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีสารฟอกขาวความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ดังสรุปในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีสารฟอกขาวต่างกัน

ชนิดของสารฟอกขาว / ความเข้มข้นที่ศึกษา	ร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์		
	ร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
ชุดควบคุม	100	100	100
H_2O_2	125	97	89
Nitriloriacetic acid	96	97	94
Sodium dihydrogen orthophosphate	91	91	52
Sodium carbonate	110	99	97
Sodium carboxymethyl cellulose	71	68	61
Sodium perborate	103	72	61

ตารางที่ 9 (ต่อ) แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีสารฟอกขาวต่างกัน

ชนิดของสารฟอกขาว / ความเข้มข้นที่ศึกษา	ร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์		
	ร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
ชุดควบคุม	100	100	100
Sodium percarborate	86	68	56
Sodium pyrophosphate tetrabasic	88	77	56
Sodium p-toluene sulfonate	96	75	10
Sodium silicate	84	70	69
Sodium tripolyphosphate	94	74	54
Sodium xylenesulfonate	92	74	55
Zeolite	97	94	90

4.6.8 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอส

การทดสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* โดยใช้อะโซเคซีนและเคซีนเป็นสับสเตรท พบว่า เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* มีความจำเพาะต่อเคซีนมากกว่าอะโซเคซีนซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์ โดยให้ค่าแอคติวิตีสูงกว่าถึงร้อยละ 60 ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอส

ชนิดของสับสเตรท (ร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร)	ร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์
อะโซเคซีน	100
เคซีน	160

บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

นิเวศวิทยาใต้ทะเลเป็นสภาวะที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงประกอบด้วยเกลือความเข้มข้นสูง ความดันของน้ำ และอาจพบการปนเปื้อนของโลหะหนัก ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ใต้ทะเลจึงต้องสามารถปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่แปรปรวนแบบนี้ได้ และหากแบคทีเรียสามารถผลิตสารตัวกลางหรือเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการนำไปดำรงชีพก็น่าจะมีสมบัติที่น่าสนใจซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพได้ ดังเช่น เคยมีรายงานพบแบคทีเรียใต้ทะเล *Bacillus subtilis* ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนต่อความเข้มข้นเกลือสูงได้ (Maruthiah et al., 2013) หรือการพบ *B. cereus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้ (Shah et al., 2010)

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมอย่างต่อเนื่องโดยมีแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญคือจุลินทรีย์ ด้วยเหตุนี้การค้นหาแหล่งผลิตใหม่ของเอนไซม์โปรติเอส จึงยังคงได้รับความสนใจจากภาครัฐและเอกชน ทั้งนี้เพื่อหวังที่จะเพิ่มกำลังการผลิตเอนไซม์ภายในประเทศ เนื่องจากท้องทะเลเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่มีความหลายหลายทางนิเวศวิทยาสูงจึงน่าจะมีโอกาสพบแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการเจริญในสภาวะที่หลากหลาย รวมทั้งยังสามารถผลิตสารตัวกลางหรือเอนไซม์ที่มีคุณลักษณะที่น่าสนใจซึ่งอาจรวมถึงเอนไซม์โปรติเอสได้

เมื่อนำตัวอย่างตะกอนทะเลที่ระดับความลึก 9 เมตรและ 24 เมตร จากบริเวณเกาะจาน เขตแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ที่อาจมีการปนเปื้อนจากของเสียและสารพิษที่ปล่อยมาจากนิคมอุตสาหกรรมที่รายล้อมมาทำการคัดแยกแบคทีเรียใต้ทะเล พบแบคทีเรียที่มีความแตกต่างของลักษณะโคโลนีปรากฏเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าทั้งสิ้น 12 ไอโซเลท ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของจุลินทรีย์ใต้ทะเล (ศิริพรรณ สารินทร์, 2550) และเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยการเลี้ยงในอาหารแข็งสกิมมิลค์ ซึ่งมีส่วนประกอบของโปรตีนเคซีนจากน้ำนม โดยอาศัยหลักการที่ว่าถ้าเซลล์แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมาภายนอกเซลล์ได้ จะต้องไฮโดรไลซ์โปรตีนเคซีนในอาหารเลี้ยงได้เป็นเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระที่จะมองเห็นเป็นบริเวณใสรอบโคโลนีของแบคทีเรีย (http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1176/protease) ผลการทดลองพบแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลทที่ให้บริเวณใสรอบโคโลนี ซึ่งแสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะผลิตเอนไซม์โปรติเอส และเมื่อยืนยันผลการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสับสเตรทอะโซเคซีน พบว่าอัตราส่วนของวงใสต่อขนาดโคโลนีให้ผลสอดคล้องกับค่าแอคติวิตีที่วัดได้ กล่าวคือ แบคทีเรียไอโซเลทที่ 7 มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด โดยให้อัตราส่วนขนาดวงใสต่อขนาดโคโลนีมากที่สุดเท่ากับ 2.18 และมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดคือ 6.57 ± 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับของไอโซเลทอื่น ด้วยเหตุนี้จึงเลือกแบคทีเรียไอโซเลทที่ 7 มาทำการระบุชนิดตามวิธี API Skill bacterial identification และลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16S rRNA ได้เป็น *Bacillus megaterium* ซึ่งเคยมีรายงานวิจัยที่คล้ายกันของ Das และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 ที่คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากชายฝั่งทะเลเบงกอลตะวันตก ประเทศอินเดีย พบ

Bacillus จำนวน 3 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้คือ *B. cereus, B. pumilus* และ *B. cibi* แต่ยังไม่เคยพบรายงานการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างของระบบนิเวศทางทะเลมาก่อน

ต่อมาได้ทำการศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium* ที่คัดเลือกได้ โดยเริ่มจากค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมซึ่งพบว่า *B. megaterium* ไม่สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ในสภาวะที่มีค่าพีเอชเป็นกรดแก่และเบสแก่ แต่จะเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ในช่วงค่าพีเอช 5 ถึง 9 โดยที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5 และ 6 ให้ศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสไม่ต่างกันมากคือ 6.49 ± 1.17 และ 6.25 ± 0.37 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ที่เลือกที่ค่าพีเอช 6 เป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมในการศึกษาต่อไปนั้นเนื่องจากที่ค่าพีเอช 5 มีความเป็นกรดมากเกินไป อาจส่งผลต่อสมดุลภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (อุมาพร ศิริพันธุ์, 2535) และ *B. megaterium* ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีที่ค่าพีเอช 5.7-7.0 (http://www.tgw1916.net/Bacillus/megaterium.html) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Asker et al. (2013) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรีย 30 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดินในท้องถิ่น และพบว่า *B. megaterium* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุด โดยสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ในช่วงค่าพีเอช 5.5 ถึง 8.0 โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7 ต่อมาได้ทำ การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium* ที่คัดเลือกได้ และพบว่าสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 15 และ 45 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับข้อเท็จจริงที่ว่า *B. megaterium* ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 3-45 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส (http://www.tgw1916.net/Bacillus/megaterium.html) ต่อมาได้ทำการศึกษาผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์และพบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในระดับใกล้เคียงกันที่ความเร็วในการเขย่าตั้งแต่ 150 ถึง 350 รอบต่อนาที และจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อใช้ความเร็วในการเขย่าเท่ากับ 250 รอบต่อนาที ถึงแม้ว่าที่ความเร็วในการเขย่า 350 รอบต่อนาทีจะส่งผลให้มีการเจริญของเชื้อที่ดีกว่า แต่การลดลงของค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสอาจ เนื่องมาจากปริมาณออกซิเจนและฟองอากาศที่สูง ที่อาจส่งผลทำลายพันธะไดซัลไฟด์ภายในโครงรูปของเอนไซม์สามารถทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ (อุมาพร ศิริพันธุ์, 2535)

หลังจากนั้นได้ทำการศึกษาผลของปริมาณไอออนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium* และพบว่าแบคทีเรียมีการเจริญได้ในทุกความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ แต่จะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) การเจริญที่ดีในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นั้นสอดคล้องกับข้อเท็จจริงที่ว่า *B. megaterium* ต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญและสามารถเจริญได้แม้ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 7 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (http://www.tgw1916.net/Bacillus/megaterium.html) แต่ในสภาวะที่มีเกลือสูงมากกว่าร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ส่งผลให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสลดลงนั้นอาจเนื่องมาจากผลของความแรงไอออนที่สูงที่สามารถเสียสภาพเอนไซม์บางส่วนได้นั่นเอง (จิตติมา เจริญพานิช, 2553) และเนื่องจาก *B. megaterium* ที่ใช้ศึกษานี้คัดแยกมาจากตะกอนทะเลในบริเวณเกาะจาน แสมสารที่ติดกับนิคมอุตสาหกรรมหลายแห่งที่อาจมีการปนเปื้อนของโลหะหนักหรือไอออน

บางชนิด และเอนไซม์หลายชนิดมักต้องการ Mn^{2+} เป็นโคแฟคเตอร์ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลของ Mn^{2+} และ Hg^{2+} ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยพบว่าการเติมแมงกานีสคลอไรด์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 10 มิลลิโมลาร์จะยับยั้งการเจริญของเชื้อ แต่สามารถเสริมค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสได้ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากแมงกานีสคลอไรด์มักมีหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิดที่ผลิตจาก *B. megaterium* เช่น เอนไซม์ไกลซิเลสมิวเคส (3-P-glycerase mutase) ที่ต้องการ Mn^{2+} เปลี่ยนเอนไซม์จากรูปที่ทำงานไม่ได้ให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ (Kuhn et al., 1993) เป็นต้น สำหรับปริมาณเมอร์คิวรี่คลอไรด์ที่ไม่ส่งผลต่อการเจริญของ *B. megaterium* นั้นก็เป็นไปตามคาด เนื่องจากตัวอย่างตะกอนทะเลที่เก็บมาอยู่ในเขตทะเลใกล้นิคมอุตสาหกรรมที่มักปล่อยโลหะหนักลงสู่แหล่งน้ำทะเลใกล้เคียงจึงเป็นไปได้ว่าเชื้อที่เจริญในบริเวณดังกล่าวต้องสามารถปรับตัวเพื่อการอยู่รอดในสภาวะดังกล่าวได้ แต่การที่ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ลดลงเมื่อมีการเติมเมอร์คิวรี่คลอไรด์เพิ่มขึ้นนั้นมีสาเหตุมาจากเมอร์คิวรี่มีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ โดยจะเข้าไปขัดขวางบริเวณพันธะไดซัลไฟล์ที่รักษาโครงรูปของเอนไซม์ ส่งผลให้เกิดการเสียสภาพของเอนไซม์จึงทำให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงได้ (Bezawada et al., 2011)

การติดตามกราฟการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium* เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีการเจริญและเข้าสู่ระยะเอ็กโปเนนเชียลภายในเวลา 6 ชั่วโมงจากนั้นจะเข้าสู่ระยะคงที่ที่เวลา 9 ชั่วโมง โดยมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่เวลา 15 ชั่วโมง และหลังจากเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง เชื้อจะค่อยๆ หยุดการเจริญและเริ่มตาย ซึ่งอาจมาจากปริมาณสารอาหารที่จำกัด และความเป็นเบสที่เพิ่มขึ้นของค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจเกิดจากการปล่อยสารตัวกลางลำดับที่สอง (secondary metabolite) เมื่อเชื้อเจริญสูงสุดและผลิตเอนไซม์โปรติเอสไปแล้วก็ได้

การทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *B. megaterium* ที่คัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเลเกาะจาน แสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พบว่า เอนไซม์โปรติเอสตกตะกอนได้ดีในช่วงความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60-80 โดยให้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 125.67 เท่า แต่มีค่าร้อยละเอนไซม์คงเหลือเพียง 0.56 ปริมาณเอนไซม์คงเหลือที่น้อยมากนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีหลังจากการทำไดอะไลซิส ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเอนไซม์อาจต้องการไอออนขนาดเล็กที่สามารถสูญเสียไปได้จากการทำไดอะไลซิสช่วยในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสในแบคทีเรีย (Sana et al., 2006; Haddar et al., 2009) เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรติเอส โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าตะกอนโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 60-80 ให้แถบโปรตีนขนาดประมาณ 61 กิโลดาลตัน ที่มีความเข้มชัดเจนเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนขนาดอื่นและไม่พบในตะกอนโปรตีนที่ตกจากเกลืออิ่มตัวร้อยละ 0-60 ซึ่งไม่สามารถตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในปริมาณสูงได้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแถบโปรตีนของเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium*

การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน พบว่า เอนไซม์มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาคือ 8.0 และมีความเสถียรในช่วงพีเอชที่เป็นด่างระหว่าง 6.0-9.0 จึงสามารถจัดอยู่ในกลุ่มของแอลคาไลฟิลิกโปรติเอส (alkaliphilic protease) ซึ่งนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่ต้องการสภาวะที่เป็นด่างในการทำงาน เช่น การผลิตผงซักฟอก (วทัญญุตา ภู่โยทิน, 2544) ซึ่งเคยมีรายงานพบแอลคาไลฟิลิกโปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* หลายสายพันธุ์ เช่น *B. mojavensis* A21 (Haddar et al., 2010) และ *B. cereus* (Shah et al., 2010) เป็นต้น การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีและความ

เสถียรของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์แสดงแอคติวิตีได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จึงจัดอยู่ในกลุ่มของมีโซฟิลิกเอนไซม์ (mesophilic enzyme) และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิสูงตั้งแต่ 60-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้ใกล้เคียงกับผลของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาคือ 37 องศาเซลเซียส (Patel et al., 2006) หรือเอนไซม์โปรติเอสของ gamma-Proteobacterium ที่ยังคงรักษาความเสถียรได้ในช่วงอุณหภูมิ 30 - 70 องศาเซลเซียส (Sana et al., 2006)

การศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ต่อการเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์พบว่า การเติมเกลือทั้งสองชนิดลงในปฏิกิริยาของเอนไซม์ส่งผลเสริมแอคติวิตีของเอนไซม์ ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกันกับในเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียใต้ทะเลกลุ่ม gamma-Proteobacterium ที่มีความเสถียรที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 30 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Sana et al., 2006) และเคยมีราย งานว่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจะเพิ่มสูงขึ้นในสภาวะที่มีเกลือแคลเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยา (Ghorbel et al., 2003) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากบริเวณเร่งของเอนไซม์โปรติเอสมีกรดอะมิโนสำคัญ 3 ตัว คือ เซรีน ฮีสติดีน และแอสปา-เตท ซึ่งเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มที่มีขั้วหรือมีประจุ ที่สามารถสร้างสะพานเกลือ (salt bridge) กับเกลือทั้งสองชนิด ทำให้เกิดการส่งถ่ายอิเล็กตรอนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น จึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นได้ จากสมบัติในการทนเกลือของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกหนัง ที่จำเป็นต้องอยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือสูงได้ การศึกษาผลของสารเคมีต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์พบว่าการเติมไอออนโลหะ Mn^{2+} ช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส โดยให้ผลสอดคล้องกับของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. ที่แอคติวิตีของเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มี Mn^{2+} ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (Jain et al., 2012) และจากข้อเท็จจริงที่ว่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการเติมไอออนประจุบวกที่มีรัศมีไอออนกว้าง ยกตัวอย่างเช่นการเติม Ca^{2+} ซึ่งมีขนาดรัศมีไอออนเท่ากับ 0.099 นาโนเมตร สามารถเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. cereus* ได้ (Shah et al., 2010) ในลักษณะเดียวกันการเติม Mn^{2+} ซึ่งมีขนาดรัศมีไอออนเท่ากับ 0.082 นาโนเมตร ก็อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นได้เช่นกัน

สำหรับผลของสารยับยั้งคือ PMSF DTT และ EDTA ที่ทำให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจาก PMSF เข้าไปสร้างพันธะโคเวเลนท์กับหมู่ไฮดรอกซีของกรดอะมิโนเซรีน จึงทำให้บริเวณเร่งของเอนไซม์เปลี่ยนไป ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลง ในลักษณะเดียวกัน DTT จะเข้าไปสลายพันธะไดซัลไฟด์ในโครงสร้างของเอนไซม์ ส่งผลให้รูปร่างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ที่สามารถทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงได้ ขณะที่ EDTA ซึ่งเป็นสารดึงโลหะ (metal chelating agent) อาจดึงไอออนโลหะที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ออกไป ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* ต้องการโลหะไอออนช่วยในการเร่งปฏิกิริยาและอาจมีเซรีนและ ซีสทิอีนอยู่ในบริเวณเร่งจึงจัดกลุ่มได้เป็นเซรีนโปรติเอส ไทออลโปรติเอส และเมทัลโลโปรติเอส นอกจากนี้เมื่อเอนไซม์อยู่ในสภาวะที่มีดีเทอร์เจนท์ พบว่า สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ (SDS) และสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (Tween-80 และ Triton X-100) รวมทั้งสารฟอกขาวแทบจะไม่ส่งผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เลยแม้ความเข้มข้นจะสูงถึงร้อยละ 10 ซึ่งเคยมีรายงานที่คล้ายกันในเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. alveayuensis* (Neelamegam et al., 2013) และ *B. mojavensis* A21 (Haddar et al., 2009) รวมทั้งเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* (Renganathan et al., 2011) อีกด้วย จากสมบัติความเสถียรของเอนไซม์ในสารลดแรงตึงผิว ร่วมกับการ

ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ประกอบกับการเสริมค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อเติม Ca^{2+} และ Mn^{2+} ที่พบได้มากในน้ำกระด้าง (http://www.foodnet-worksolution. com/wiki/word /2006/water-hardness) ของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* นี้จึงทำให้เหมาะที่จะนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอกได้

ความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* นี้เป็นอีกคุณลักษณะเฉพาะที่น่าสนใจ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus* หลายสายพันธุ์ เช่น *Bacillus* sp. (Reddy et al., 2008) และ *B. cereus* (Shah et al., 2010) โดยปกติตัวทำละลายอินทรีย์จะเข้าไปลดความยืดหยุ่น (flexibility) ของโครงสร้างเอนไซม์ซึ่งมีความสำคัญในการเร่งปฏิกริยา แต่ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสนี้มีความสามารถในการป้องกันการเสียสภาพธรรมชาติในสภาวะดังกล่าวโดยยังคงรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้มากกว่าครึ่ง จากคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์นี้เป็นสิ่งน่าสนใจสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการสังเคราะห์เพปไทด์ ที่จำเป็นอย่างยิ่งที่จะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ไม่มีขั้วเป็นตัวกลางในปฏิกิริยา (จิตติมา เจริญพานิช, 2552) และสุดท้ายผลของความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* มีความจำเพาะต่อเคซีนได้มากกว่าอะโซเคซีนซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์ ซึ่งให้ผลการทดลองตรงกับทฤษฎีที่ว่าเอนไซม์ชอบที่จะย่อยสลายพันธะเพปไทด์ของเคซีนซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติมากกว่าอะโซเคซีนซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์นั่นเอง

แม้การศึกษาเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. จะมีรายงานมากพอสมควร แต่ยังไม่เคยมีรายงานถึงเอนไซม์โปรติเอสที่มีคุณลักษณะเฉพาะที่น่าสนใจต่อภาคอุตสาหกรรมหลายอย่าง เช่น การชอบสภาวะที่เป็นด่าง ทนอุณหภูมิสูง มีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ เกลือ โลหะหนัก ดีเทอร์เจนท์ และสารฟอกขาว จึงทำให้เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* ที่ทำการศึกษาในโครงการวิจัยนี้มีลักษณะที่น่าสนใจมากกว่าเอนไซม์โปรติเอสที่เคยมีรายงานมาแล้ว และมีความเป็นไปได้สูงที่จะใช้แบคทีเรียใต้ทะเลเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์แหล่งใหม่ที่มีคุณลักษณะพึงประสงค์ที่สามารถนำไปต่อยอดประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียใต้ทะเลที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากตัวอย่างตะกอนทะเล บริเวณเกาะจานในเขตแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ที่ระดับความลึก 9 เมตร และ 24 เมตร พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ 3 ไอโซเลท จากทั้งหมด 12 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียไอโซเลทที่ 7 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ในปริมาณสูงที่สุด คือ 6.57 ± 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีอัตราส่วนของวงใสต่อขนาดของโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหารแข็งสกิมมิลค์เท่ากับ 2.18 ซึ่งสามารถระบุชนิดได้คือ *Bacillus megaterium* ที่มีสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลว LB คือ ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเท่ากับ 6 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพาะคือ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่าเท่ากับ 250 รอบต่อนาที และมีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเท่ากับร้อยละ 2.5 เมื่อทำการเติมแมงกานีสคลอไรด์และเมอร์คิวรี่คลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยง พบว่าปริมาณแมงกานีสคลอไรด์ที่มากกว่า 10 มิลลิโมลาร์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแต่สามารถเพิ่มค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ขณะที่การเติมเมอร์คิวรี่คลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงพบว่า *B. megaterium* สามารถเจริญได้ดีแม้ในสภาวะที่มีเมอร์คิวรี่สูงถึง 20 มิลลิโมลาร์ แต่ปริมาณของเมอร์คิวรี่-คลอไรด์จะยับยั้งการผลิตเอนไซม์โปรติเอสตามความเข้มข้นของเมอร์คิวรี่คลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น สำหรับการติดตามกราฟการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. megaterium* พบว่าการเลี้ยงเป็นเวลา 15 ชั่วโมงในสภาวะที่เหมาะสมส่งผลให้ *B. megaterium* เจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุด

โครงการวิจัยนี้สามารถทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* โดยการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 60-80 และการทำไดอะไลซิส ให้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 125.67 เท่า โดยมีมวลโมเลกุลประมาณ 61 กิโลดาลตันเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิคSDS-PAGE ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ คือค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์สามารถรักษาความเสถียรได้ดีในช่วงค่าพีเอช 6-9 เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง เอนไซม์มีความเสถียรในอุณหภูมิสูง 60-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์ และไอออนของโลหะทุกชนิดที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ไม่ส่งผลรบกวนการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ รวมทั้งโลหะหนัก Hg^{2+} แต่ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ไอออนทุกชนิดยกเว้น Mn^{2+} ส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เล็กน้อย การเติมสารยับยั้ง PMSF DTT และ EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ช่วยเสริมการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจะส่งผลยับยั้ง ขณะที่ดีเทอร์เจนท์และสารฟอกขาวแทบไม่ส่งผลยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส แม้ที่ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. megaterium* มีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วนานถึง 6 ชั่วโมง และชอบที่จะเร่งปฏิกิริยากับสับเสตรทเคซีนมากกว่าอะโซเคซีนถึงร้อยละ 60

บรรณานุกรม

จิตติมา เจริญพานิช. (2552). หลักการและสภาวการณ์ปัจจุบันของการสังเคราะห์เพปไทด์. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. ปีที่ 14: 128-137.

จิตติมา เจริญพานิช. (2553). เอนไซม์วิทยา. โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์: กรุงเทพมหานคร.

ดวงพร คันธโชติ. (2545). นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์: กรุงเทพมหานคร.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2544). จุลินทรีย์น่ารู้. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว: กรุงเทพมหานคร.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2539). จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.

นิตยา เยาว์แสง. (2552). การตรึงโปรติเอสบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนท์. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2543). เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.

มยุรฉัตร เอกธรรมกิจ และสุจิตรา ยนต์สิงห์. (2548). การศึกษาเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากถั่วเหลืองหมักชนิดต่างๆ. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง.

วทัญญุตา ภู่โยทิน. (2544). การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของโปรติเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียชอบเค็ม *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริพรรณ สารินทร์. (2550). จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม. โรงพิมพ์ห้างหุ้นส่วนจำกัดสามลดา: กรุงเทพมหานคร.

อภิรดี อุดมสิน. (2546). การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตนิวทรัลโปรติเอสทนร้อนจาก *Bacillus cereus.* วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุมาพร ศิริพันธุ์. (2535). เอกสารประกอบการบรรยาย วิชา ทอ 470 เทคโนโลยีผลิตภัณฑ์เนื้อ. ภาควิชาอุตสาหกรรมการเกษตร คณะธุรกิจการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้ เชียงใหม่.

Asker M.M.S., Mahmoud M.G., Shebwy K.El., Abd el Aziz M.S. (2013). Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. Genetic Engineering and Biotechnology. 11: 103–109.

Aunstrup K. (1979). Proteinases. Applied Biochemistry and Bioengineering. 2: 49-114.

Aunstrup K., Ottrup H., Andresen O., Dambmann C. (1979). Protease from alkaliphillic *Bacillus* species. Fermentation Technology. 4: 299-305.

Bezawada J., Yan S., John R.P., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. (2011). Recovery of *Bacillus licheniformis* alkaline protease from supernatant of fermented wastewater sludge using ultrafiltration and its characterization. Biotechnology Research International. 1-11. doi: 10.4061/2011/238549.

Bollag D.M., Rozycki M.D., Edelstein S.J. (1996). Protein Methods 2nd edition. Wiley-Liss.Inc 650 Third Avenue. United States of America.

Bont Jan A. M. de. (1998). Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. TIBTECH. 16: 493-499.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing, the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

Das S. et al. (2012). Bacterial isolates of marine coast as commercial producer of protease. Biological Sciences. 12: 96-107.

Dizge N., Keskinler B. (2008). Enzymatic production of biodiesel for canola oil using immobilized lipase. Biomass and Bioenergy. 32: 1274-1278.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

Fogarty W.M., Kelly C.T. (1990). Microbial Enzymes and Biotechmology. Elsevier Applied Science. London.

Ghorbel B., Kamoun A.S., Nasri M. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. Enzyme and Microbial Technology. 32: 513–518.

Gupta A., Khare S.K. (2009). Enzymes from solvent-tolerant microbes: Useful biocatalysts for non-aqueous enzymology. Critical Review of Biotechnology. 29: 44-54.

Haddar A., Bougatef A., Agrebi R., Kamoun A.S., Nasri M. (2009). A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21: Purification and characterization. Process Biochemistry. 44: 29-53.

Haddar A., Kamoun A.S., Zouari N.F., Noomen H., Nasri M. (2010). Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteases from *Bacillus mojavensis* A21. Biochemical Engineering Journal. 51: 53–63.

Hedstrom L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. Chemical Review. 101: 4501–4523.

Jain D., Pancha I., Mishra S.K., Shrivastav A., Mishra S. (2012). Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent-stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: A potential additive for laundry detergents. Bioresource Technology. 155: 288-236.

Khmelnitsky Y.L., Levashov A.V., Klyachko N.L., Martinek K. (1988). Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. Enzyme and Microbial Technology. 10: 710-724.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111-120.

Klibanov A.M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature. 409: 241-246.

Kuhn N.J., Setlow B., Setlow P. (1993). Manganese (II) activation of 3-phosphoglycerate mutase of *Bacillus megaterium:* pH-sensitive interconversion of active and inactive forms. Archives Biochemistry and Biophysics. 306: 342–349.

Macrae A.R., Hammond R.C. (1985). Present and future applications of lipases. Biotechnology. 3: 193-217.

Maruthiah T., Esakkiraj P., Prabakaran G., Palavesam A., Immanuel G. (2013). Purification and characterization of moderately halophilic alkaline serine protease from marine *Bacillus subtilis* AP-MSU6. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2: 116–119.

Miller B.M., Listky W. (1976). Microbial Enzyme. Industral Microbiology. Mc Graw-Hill INC.,

Neelamegam A., Rajeswari M.V., Balasubramanian T. (2013). Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes. Food and Bioproducts Processing. DOI: 10.1016/j.fbp.2013.08.009.

Ogino H., Ishikawa, H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. (2001). Journal of Bioscience and Bioengineering. 91: 109-116.

Outtrup H., Boyce C.O.L. (1990). Microbial Proteinases and Biotechnology. 2nd edition. Fogarty, M.W., and Kelly, C.T. (eds). Elsevier Applied Science. London.

Patel R.K., Dodia M.S., Joshi R.H., Singh S.P. (2006). Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. Process Biochemistry. 41: 2002–2009.

Pero J., Sloma A., Rufo G.A. Jr, Sullivan B.J. (1990). Isolation and characterization of a novel extracellular metalloprotease from *Bacillus subtilis.* Journal of Bacteriology. 172: 1019–1023.

Precigou S., Wieserl M., Pommares P., Goulasl P., Duran R. (2004). *Rhodococcus pyridinovorans* MW3, a bacterium producing a nitrile hydratase. Biotechnology Letters. 26: 1379-1384.

Poutanen K. (1997). Enzyme: An important tool in the improvement of the quality of cereal foods. Trends Food Science and Technology. 8: 300-306.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. American Society for Microbiology. 62: 597-635.

Ranganathan S., Narasimhan S., Muthukumar K. (2008). An overview of enzymatic production of biodiesel. Bioresource Technology. 99: 3975-3981.

Reddy L.V.A., Wee Y.J., Ryu H.W. (2008). Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 83: 1526–1533.

Renganathan R., Kothilmozhian R.J., Ramasamy R. (2011). Purification and characterization of a protease produced by *Bacillus megaterium* RRM2: application in detergent and dehairing industries. Journal of Basic Microbiology. 51: 614–624.

Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4: 406-425.

Sana B., Ghosh D., Saha M., Mukherjee J. (2006). Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-Proteo-bacterium isolated from the marine environment of the Sundarbans. Process Biochemistry. 41: 208–215.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceeding of National Academic Sciences USA. 74: 5463-5467.

Sardessai Y., Bhosle S. (2002). Tolerance of bacteria to organic solvents. Research in Microbiology. 153: 263-268.

Sellek G.A., Chaudhuri J.B. (1999). Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. Enzyme and Microbial Technology. 25: 471-482.

Shah K., Mody K., Keshri J., Jha B. (2010). Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 67: 85–91.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 30: 2725-2729.

Terrence D.M., Osna N.A. (2003). Intracellular Proteolytic Systems in Alcohol–Induced Tissue Injury. Nebraska Medical Center, Omaha.

Verachtert H., de Mot R. (1990). Yeast Biotechology and Biotechnology. Maecel Dekker: New York.

Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of bacteriology. 173 (2): 697-703.

[Online] แหล่งเข้าถึง http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1176/protease [สืบค้นเมื่อ 10 มีนาคม 2557]

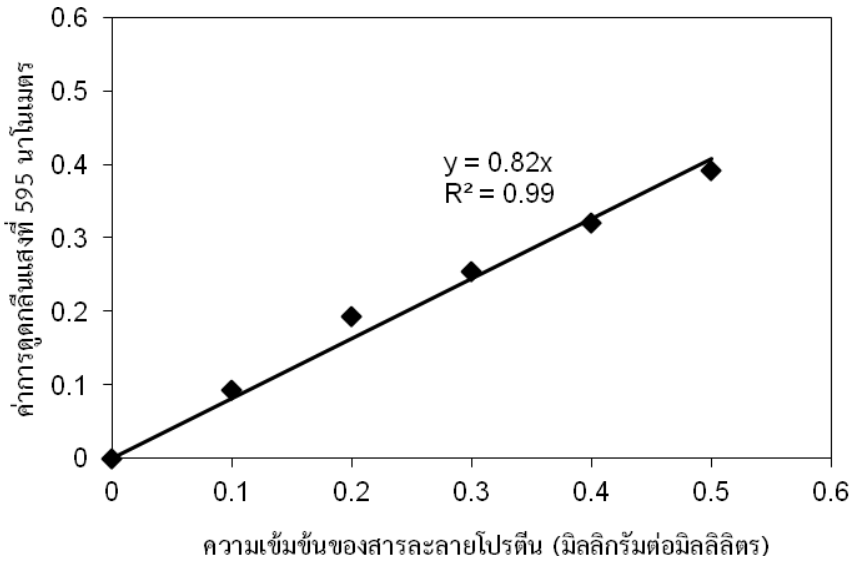
[Online] แหล่งเข้าถึง http://www.tgw1916.net/Bacillus/megaterium.html [สืบค้นเมื่อ 19 เมษายน 2557]

[Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.rosehulman.edu/~brandtChem330/Enzyme_mech_ examples.pdf [สืบค้นเมื่อ 27/3/2557]

[Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2006/water-hardness [สืบค้นเมื่อ 19/4/2557]

ภาคผนวกที่ 1

กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมินและวิธีการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน



จากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA) ได้สมการเส้นตรงที่มีค่าพารามิเตอร์ คือ ความชันของกราฟ = 0.82 และค่า R^2 = 0.99 ซึ่งสามารถนำมาคำนวณปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ได้จากสมการ

$$A = \varepsilon bc$$

โดยที่ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A_{595})

ε = ความชันของกราฟที่มีค่าเท่ากับ 0.82

b = ระยะทางที่แสงเคลื่อนที่ (ความกว้างของคิวเวต) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร

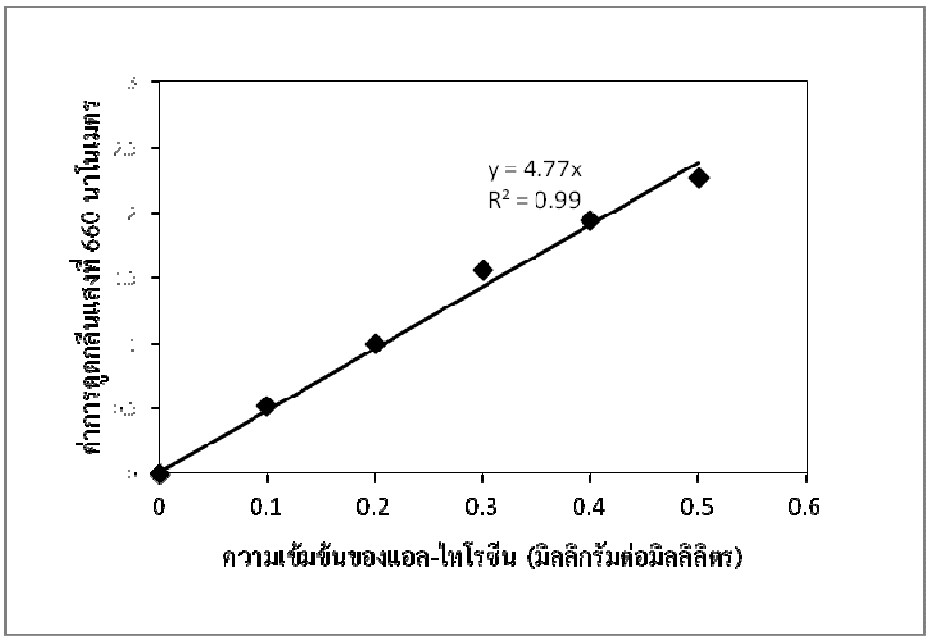
c = ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

$$\text{ความเข้มข้นโปรตีน} = \left(\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง } A_{595} \text{ ของตัวอย่าง} - \text{ค่าการดูดกลืนแสง } A_{595} \text{ ของตัวควบคุม}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน}} \right)$$

ปริมาณโปรตีนทั้งหมด = ความเข้มข้นโปรตีน x ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายส่วนใสที่เก็บได้

ภาคผนวกที่ 2

กราฟมาตรฐานของแอล-ไทโรซีน วิธีการคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส และค่าพารามิเตอร์ต่างๆ



จากกราฟมาตรฐานของแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) ได้สมการเส้นตรงที่มีค่าพารามิเตอร์ คือ ความชันของกราฟ = 4.77 และค่า R^2 = 0.99 ซึ่งสามารถนำมาคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) ได้จากสมการต่อไปนี้

$$1 \text{ หน่วยเอนไซม์} = \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสง } A_{660} \text{ ของตัวอย่าง x ปริมาตรทั้งหมดที่เกิดปฏิกิริยา)}}{\text{(ความชันของกราฟมาตรฐานแอล-ไทโรซีน x ปริมาตรเอนไซม์ที่ใช้ x เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา (นาที))}}$$

1 หน่วยเอนไซม์ = ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายอะโซเคซีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไทโรซีนอิสระ 1 มิลลิกรัมในเวลา 1 นาที

แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย) = แอคติวิตีเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร) x ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)

แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัม) = แอคติวิตีเอนไซม์โปรติเอสทั้งหมด/ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

วิธีการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์

1. การคำนวณหาร้อยละปริมาณเอนไซม์คงเหลือ

$$= \frac{\text{แอคติวิตีทั้งหมดจากแฟรคชั่นนั้นๆ (หน่วย)} \times 100}{\text{แอคติวิตีทั้งหมดของส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้น (หน่วย)}}$$

2. การคำนวณความบริสุทธิ์ของเอนไซม์

$$= \frac{\text{แอคติวิตีจำเพาะของแฟรคชันนั้นๆ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)}}{\text{แอคติวิตีจำเพาะของส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้น (หน่วยต่อมิลลิกรัม)}}$$

ภาคผนวกที่ 3

ตารางแสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตามความเข้มข้นอิ่มตัวต่างกัน เทียบกับสารละลายเอนไซม์ปริมาตรหนึ่งลิตร

ความเข้มข้นเริ่มต้น (ร้อยละ)	ความเข้มข้นสุดท้าย (ร้อยละ)									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
0	27	55	84	113	144	176	208	242	277	314
5		27	56	85	115	146	179	212	246	282
10			28	57	86	117	149	182	216	251
15				28	58	88	119	151	185	219
20					29	59	89	121	154	188
25						29	60	91	123	157
30							30	61	92	126
35								30	62	94
40									31	63
45										31

ที่มา: Bollag, Rozycki and Edelstein, 1996

ภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ตารางแสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตามความเข้มข้นอิ่มตัวต่างกัน เทียบกับสารละลายเอนไซม์ปริมาตรหนึ่งลิตร

ความเข้มข้นเริ่มต้น (ร้อยละ)	ความเข้มข้นสุดท้าย (ร้อยละ)									
	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
10	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
20	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
30	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
50	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55		33	66	101	138	175	215	256	298	343
60			33	67	103	140	179	219	261	305
65				34	69	105	143	183	224	266
70					34	70	107	146	186	228

ที่มา: Bollag, Rozycki and Edelstein, 1996

ภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ตารางแสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตามความเข้มข้นอิ่มตัวต่างกัน เทียบกับสารละลายเอนไซม์ปริมาตรหนึ่งลิตร

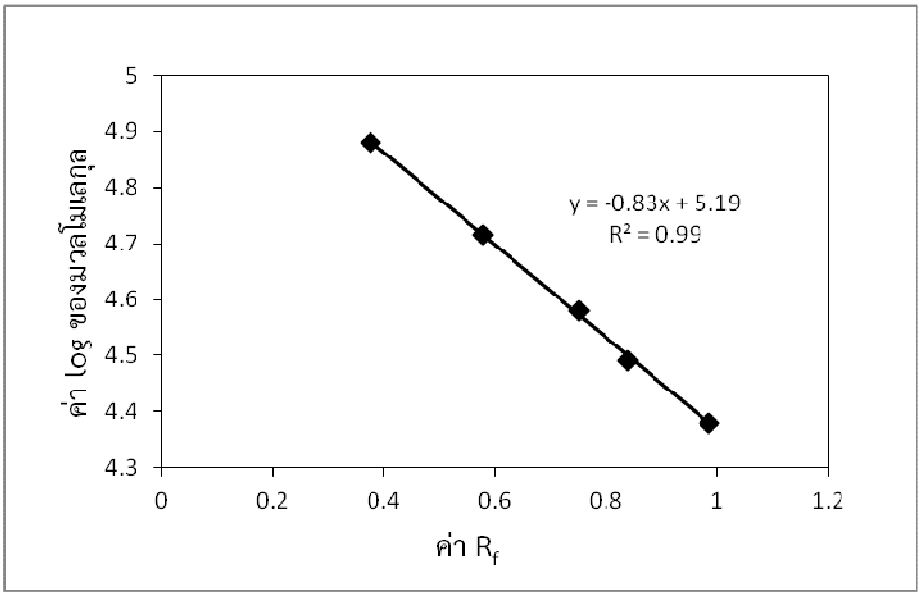
ความเข้มข้นเริ่มต้น (ร้อยละ)	ความเข้มข้นสุดท้าย (ร้อยละ)									
	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
75						35	72	110	149	190
80							36	73	112	152
85								37	75	114
90									37	76
95										38

ที่มา: Bollag, Rozycki and Edelstein, 1996

ภาคผนวกที่ 4

กราฟการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน และ วิธีการประมาณมวลโมเลกุลสัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอส

น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานแต่ละแถบ	ระยะทางที่เคลื่อนที่ได้ (เซนติเมตร)	ค่า R_f
76	5.15	0.38
52	7.90	0.58
38	10.30	0.75
31	11.50	0.84
24	13.50	0.99



จากกราฟได้สมการเส้นตรงที่มีค่าพารามิเตอร์ คือ ความชันของกราฟ = -0.83 และค่า R^2 = 0.99 ซึ่งสามารถนำมาคำนวณหามวลโมเลกุลสัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอส ได้ดังนี้

ระยะทางที่เอนไซม์โปรติเอสเคลื่อนที่ได้ (ซม.) เท่ากับ 6.7 มีค่า R_f เท่ากับ 0.49

จากสมการ $Y = -0.83x + 5.19$

แทนค่า X เท่ากับ 0.49 ลงในสมการ

จะได้ $Y = (-0.83 \times 0.49) + 5.19$

ค่า log ของมวลโมเลกุล $= 4.78$

มวลโมเลกุล $= 10^{4.78}$

$= 61.71$

ดังนั้น มวลโมเลกุลสัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอส (กิโลดาลตัน) เท่ากับ 61.71