



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างท่อบำบัดน้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการฟอกหนัง

Construction of an inline remover for tannery effluent treatment

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช

ดร. ศรีสุดา นิเทศน์ธรรม

ดร. เอ็มมา อาสนจินดา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

รหัสโครงการ 176207

สัญญาเลขที่ 37/2558

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างท่อบำบัดน้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการฟอกหนัง

Construction of an inline remover for tannery effluent treatment

รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ดร. ศรีสุดา นิเทศน์ธรรม

ดร. เอ็มมา อาสนจินดา

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 176207

สัญญาเลขที่ 37/2558

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างท่อบำบัดน้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการฟอกหนัง

Construction of an inline remover for tannery effluent treatment

รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ดร. ศรีสุดา นิเทศน์ธรรม

ดร. เอ็มมา อาสนจินดา

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การสร้างท่อบำบัดน้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการฟอกหนัง” สำเร็จลงด้วยดีเนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 จากงบประมาณเงินแผ่นดิน มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

พฤศจิกายน 2558

## บทคัดย่อ

การฟอกหนังเป็นอุตสาหกรรมพื้นฐานที่พบได้ทั่วโลกซึ่งมีการปลดปล่อยสารปนเปื้อนความเข้มข้นสูงที่เป็นมลพิษและย่อยสลายทางชีวภาพได้ต่ำออกมากับน้ำทิ้งระหว่างกระบวนการฟอกหนัง นำมาสู่ปัญหาในการกำจัดและหนึ่งในของเสียหลักที่มีการปลดปล่อยออกมาก็คือสารอินทรีย์ เช่น โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ที่ปลดปล่อยออกมาซึ่งจะละลายน้ำของแหล่งน้ำได้ โดยทั่วไปการบำบัดน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังจะใช้วิธีทางกายภาพ-เคมี และวิธีการทางชีวภาพ หรือใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันแต่ก็ยังไม่สามารถกำจัดสารปนเปื้อนได้อย่างสมบูรณ์ โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะสร้างท่อบำบัดน้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการฟอกหนัง โดยในปีที่หนึ่งจะมุ่งเป้าไปที่การหาแบคทีเรียได้ทะเลที่สามารถขับเอนไซม์โปรติเอสที่มีประสิทธิภาพสูงออกมานอกเซลล์ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังในรูปแบบต่อไป ผลการทดลองพบแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ และมีการระบุชนิดจากคุณลักษณะทางชีวเคมีและลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ของยีน 16S rRNA ได้เป็น *Staphylococcus saprophyticus* และ *Bacillus subtilis* ตามลำดับ

*S. saprophyticus* ขับเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถทำงานได้ดีในค่าพีเอชช่วงกว้างคือ ค่าพีเอช 3.0-12.0 และในช่วงอุณหภูมิ 10-80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ถูกทำบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 70 เท่า ด้วยการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 70-80 และคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบคัดกรองขนาด พบเอนไซม์มีมวลโมเลกุลสัมพัทธ์ 28 กิโลดาลตัน และมีความเสถียรในช่วงค่าพีเอชที่เป็นต่างคือ ค่าพีเอช 6.0-9.0 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และยังคงรักษาความเสถียรได้ในช่วงอุณหภูมิสูง 60-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โลหะไอออน ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ) ไม่ส่งผลกระทบต่อแอกติวิตีของเอนไซม์แต่กลับเสริมการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์มีความเสถียรในสภาวะที่มีดีเทอร์เจนท์ เช่น SDS,  $\text{H}_2\text{O}_2$  และ Zeolite รวมทั้งรักษาความเสถียรได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เช่น เบนซีน เฮกเซน เฮกซาเดคเคน อีกด้วย

สำหรับเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* ถูกทำบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 14 เท่า ด้วยการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 80-90 และคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบคัดกรองขนาดเช่นกัน เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีกับสับสเตรทอะโซเคซีนที่ค่าพีเอช 11.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยมีความเสถียรในค่าพีเอชช่วงต่างคือ ค่าพีเอช 8.0-11.0 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และในช่วงอุณหภูมิสูง 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าตัวยับยั้ง ดีเทอร์เจนท์ และสารฟอกขาว ไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ และเอนไซม์ยังคงรักษาความเสถียรได้ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วและโลหะไอออนอีกด้วย

จากสมบัติในการรักษาความเสถียรในค่าพีเอชและอุณหภูมิช่วงกว้าง และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาในสภาวะที่มีโลหะไอออน ตัวทำละลายอินทรีย์ และดีเทอร์เจนท์ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดที่สามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสำหรับประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้

**คำสำคัญ** การสลายทางชีวภาพ, การบำบัดของไหลที่เกิดจากการฟอกหนัง, เอนไซม์โปรติเอส

## Abstract

Leather tanning is a wide common industry all over the world. The high concentrations of pollutants with low biodegradability in tannery wastewater represent a serious and actual technological and environmental challenge. One of the majority wastes associated with leather-making process is organic matter (e.g. proteins and carbohydrates) which is the depression of the dissolved oxygen content of stream waters caused by microbial decomposition. Tannery wastewater is generally treated by various physico-chemical and biological methods and by a combination of both, but often do not destroy contaminants. This study aims to construct an inline remover for tannery effluent treatment. Since proteases are envisaged to have extensive application in leather industry we initially focus on screening of marine bacterium that shows ability to secrete high potent protease. Two isolates were found to produce protease. Identification based on biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence identified the strains as *Staphylococcus saprophyticus* and *Bacillus subtilis*, respectively.

*S. saprophyticus* secreted a broad range pH (pH 3.0-12.0) and temperature (10-80 °C) active protease. The protease was successfully purified 70-fold to homogeneity by 70-80% ammonium sulfate precipitation and gel-permeable column chromatography. The enzyme possessed a relative molecular mass of 28 kDa. The enzyme was stable at alkali pH (6.0-9.0) for 6 h and a variety of high temperature between 60 and 80 °C for 72 h. Metal ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ) did not affect the enzyme activity in contrast improve the activity. The enzyme was stable in detergents (SDS,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Zeolite etc.) and hydrophobic solvents (benzene, hexane, hexadecane etc.).

The protease of *B. subtilis* was successfully purified 14-fold by 80-90% ammonium sulphate precipitation and gel-permeable column chromatography. The purified protease possessed a relative molecular mass of 30 kDa. Higher protease activity was determined at pH 11.0 and 50 °C with azocasein as a substrate. The enzymes was stable at alkali pH (8.0-11.0) for 6 h and at a variety of high temperature between 60 and 70 °C for 72 h. Protease inhibitors, detergents and bleaching agents did not affect the enzyme activity. The enzyme was also stable in hydrophobic solvents and metal ions.

Broad range pH and temperature stability and ability to work in metal ions, solvents and detergents support the potential of both proteases as a vigorous biocatalyst for industrial applications.

**Keywords:** Biodegradation, Tannery effluent treatment, Protease

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	7
สารบัญภาพ	8
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	9
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	10
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	12
2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
2.1.1 กระบวนการฟอกหนัง	13
2.1.2 เอนไซม์โปรติเอส	15
2.1.3 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส	17
2.1.4 แหล่งผลิตของเอนไซม์โปรติเอส	18
2.1.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในระดับอุตสาหกรรม	20
2.2 ขอบเขตของการดำเนินการวิจัย	22
3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง	23
3.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส	23
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	24
3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	24
3.3.2 การวิเคราะห์ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	24
3.4 การระบุชนิดของแบคทีเรียได้ทะเลที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส	24
3.5 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้	25
3.5.1 การเตรียมส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้น	25
3.5.2 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอส	25
3.5.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	26

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

บทที่	หน้า
3	ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ)
3.6	การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้
3.6.1	ผลของค่าพีเอชต่อแอกติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส
3.6.2	ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส
3.6.3	ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส
3.6.4	ผลของสารเคมีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส
3.6.5	ผลของดีเทอร์เจนต์ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส
3.6.6	ผลของสารฟอกขาวต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส
4	ผลการวิจัย
4.1	การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากตัวอย่างดินและตะกอนทะเล
4.2	การระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่คัดแยกได้
4.3	การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
4.3.1	การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจาก <i>S. saprophyticus</i>
4.3.2	การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>S. saprophyticus</i>
4.4	การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus subtilis</i>
4.4.1	การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจาก <i>B. subtilis</i>
4.4.2	การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>B. subtilis</i>
5	อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย
6	สรุปผลการวิจัย
	บรรณานุกรม
	ภาคผนวก
1	กราฟมาตรฐานของโพรตีนซีรัมอัลบูมินและวิธีการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน
2	กราฟมาตรฐานของแอล-ไทโรซีน วิธีการคำนวณแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสและค่าพารามิเตอร์
3	ตารางแสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตามความเข้มข้นอิมิตัวต่างกันเทียบกับสารละลายเอนไซม์ปริมาตรหนึ่งลิตร
	ประวัติและผลงานของผู้วิจัย



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การใช้เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรม	20
2 แหล่งของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง	23
3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 5 ที่คัดเลือกได้เมื่อวิเคราะห์ตามวิธี API Skill bacterial identification	31
4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 9 ที่คัดเลือกได้เมื่อวิเคราะห์ตามวิธี API Skill bacterial identification	33
5 ตารางสรุปการบริสุทธ์เอนไซม์โปรติเอสจาก <i>S. saprophyticus</i>	36
6 ผลของตัวทำลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธ์จาก <i>S. saprophyticus</i>	40
7 ผลของไอออนโลหะและตัวยับยั้งต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธ์จาก <i>S. saprophyticus</i>	41
8 ผลของดีเทอร์เจนท์และสารออกซิไดส์ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธ์จาก <i>S. saprophyticus</i>	41
9 ผลของสารฟอกขาวต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธ์จาก <i>S. saprophyticus</i>	42
10 ตารางสรุปการบริสุทธ์เอนไซม์โปรติเอสจาก <i>B. subtilis</i>	43
11 ผลของตัวทำลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธ์จาก <i>B. subtilis</i>	46
12 ผลของไอออนโลหะและตัวยับยั้งต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธ์จาก <i>B. subtilis</i>	47
13 ผลของดีเทอร์เจนท์และสารออกซิไดส์ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธ์จาก <i>B. subtilis</i>	47
14 ผลของสารฟอกขาวต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธ์จาก <i>B. subtilis</i>	48

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอส	16
2 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส	18
3 ภาพรวมขอบเขตของการดำเนินการวิจัยในโครงการ	22
4 การวิเคราะห์ห้วงศัวณวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 5 ที่คัดแยกได้	32
5 การวิเคราะห์ห้วงศัวณวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 9 ที่คัดแยกได้	35
6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>S. saprophyticus</i> โดยเทคนิค SDS-PAGE	37
7 ผลของค่าพีเอชต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>S. saprophyticus</i>	38
8 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>S. saprophyticus</i>	39
9 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>S. saprophyticus</i>	42
10 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>B. subtilis</i> โดยเทคนิค SDS-PAGE	43
11 ผลของค่าพีเอชต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>B. subtilis</i>	44
12 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>B. subtilis</i>	45
13 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>B. subtilis</i>	48

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

%	=	ร้อยละ
°C	=	องศาเซลเซียส
ชม.	=	ชั่วโมง
dNTP	=	Dideoxynucleotide
EC	=	Enzyme committee
h	=	hour
$\log P_{o/w}$	=	ค่าคงที่การกระจายตัวของตัวทำละลายอินทรีย์ในออกทานอลและน้ำ
pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าพีเอช

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การฟอกหนัง (Tanning) คือกระบวนการเตรียมพื้นผิวของหนังสัตว์ให้พร้อมก่อนที่จะนำมาผลิตเป็นเครื่องหนัง ซึ่งเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่เก่าแก่ที่สุดในโลกและรองรับความต้องการของประชากรในทุกภาคส่วน เมื่อจำนวนประชากรเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้การใช้หนังฟอกนั้นมีความต้องการเพิ่มสูงขึ้นด้วย จึงนำไปสู่การขยายตัวของกิจการฟอกหนังจากกิจการระดับเล็กไปสู่อุตสาหกรรมระดับใหญ่ขึ้น สำหรับประเทศไทยที่จัดเป็น 1 ใน 4 ของประเทศที่มีการส่งออกหนังฟอกและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากหนังมากที่สุดในโลก (Ramanujam et al., 2009) ประกอบกับนโยบายของภาครัฐที่ส่งเสริมให้ประเทศไทยเป็นเมืองแฟชั่นเสื้อผ้าและเครื่องแต่งกาย ทำให้อุตสาหกรรมเครื่องหนังมีกำลังขยายตัวเพิ่มขึ้นด้วย จึงไม่สามารถหลีกเลี่ยงกับปัญหามลพิษที่จะตามมาได้ ในกระบวนการฟอกหนังเริ่มจากวัตถุดิบที่เป็นหนังเค็ม (หนังแช่เกลือ) ผ่านขบวนการต่างๆ จนได้เป็นหนังสำเร็จพ่นสีที่พร้อมส่งจำหน่ายได้นั้นจำเป็นต้องมีการใช้วัตถุดิบเคมีภัณฑ์ พลังงาน และน้ำเป็นจำนวนมาก ที่กลายเป็นของเสียที่ทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำเสีย อากาศเสีย และกากของเสียจากการผลิต โดยพบว่าปัญหาหลักของโรงงานฟอกหนังคือ น้ำเสียที่มีโลหะหนักจากการฟอกโครมปนเปื้อนและกลิ่นเหม็นที่ยังไม่สามารถแก้ไขได้อย่างเป็นการถาวร (Khan et al., 1999)

กระบวนการฟอกหนังสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนหลัก คือ (1) การเตรียมหนังก่อนฟอก (beam house process) ที่จะต้องมีการกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการ เช่น ขนสัตว์ เศษหนัง และคราบไขมันออกจากหนังดิบก่อน เพื่อเตรียมหนังดิบให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะฟอก ในขั้นตอนนี้จะมีการแช่น้ำปูน กัดขนออกด้วยซัลไฟด์หรือเอนไซม์โปรติเอส (proteolytic enzymes) ขูดฟุ้งผัด แล่หนัง ล้างน้ำปูน และบ่มหนังในน้ำยาที่มีสารต้านการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น ไดไทโอคาร์บาเมต (dithiocarbamate) หรือ 2-(ไทโอไฮยาโนเมทิลไทโอ) เบนโซไทอะโซล (2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole) เป็นระยะเวลา 6 ชม. ถึง 12 วัน ซึ่งมีการปล่อยน้ำทิ้งที่มีฤทธิ์เป็นด่างอย่างแรงและมีสิ่งเจือปนที่เป็นสารจำพวกโปรตีนและไขมัน ตลอดจนสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน เช่น ปูนขาว สารลดแรงตึงผิว (surfactant) แอมโมเนียม (ammonium) อัลคาไลน์ (alkaline) ซัลไฟด์ (sulfide) และยาฆ่าเชื้อ เป็นต้น ออกมากับน้ำทิ้ง (2) การฟอก (tanning process) คือการเปลี่ยนสภาพหนังสัตว์ดิบซึ่งเน่าเปื่อยได้ไปเป็นหนังสำเร็จที่มีความคงตัวกว่า ไม่เน่าเปื่อย และมีความทนทานต่อสภาพอากาศและน้ำร้อน ซึ่งในขั้นตอนนี้จะมีการใช้สารเคมีบางชนิด ได้แก่ ฝาด (vegetable tanning) โครเมียม (chrome tanning) ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสและสารเคมีอื่นๆ เข้าไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนคอลลาเจน (collagen) ในหนัง (Rao et al., 2002; Sundar et al., 2011) ซึ่งเคยมีรายงานว่ามีการเติมสารเคมีลงไปในขั้นตอนนี้ประมาณ 300 กิโลกรัมต่อหนังดิบ 1 ตันเลยทีเดียว (Verheijen et al., 1996) โดยกระบวนการฟอกหนังด้วยโครเมียมหรือที่เรียกว่าการฟอกโครมนั้นเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากกว่าการฟอกฝาดที่ใช้แทนนิน (tannin) หรือสารสังเคราะห์เป็นตัวฟอก เนื่องจากใช้เวลานาน สารเคมีราคาถูกลง และหนังที่ผ่านการฟอกโดยวิธีนี้ยังทนต่อความร้อนและความชื้นได้ดีกว่า แต่ไม่ว่าจะใช้การฟอกหนังด้วยวิธีใดก็มีความจำเป็นที่จะต้องทำการดองกรดเสียก่อนเพื่อปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมกับปฏิกิริยา

การฟอกหนัง ซึ่งสารเคมีทั่วไปที่นิยมใช้ในขั้นตอนนี้คือ กรดเกลือ กรดกำมะถัน และกรดฟอร์มิก (formic acid) และในระหว่างการฟอกอาจมีการเติมสารเคมีพิเศษ เช่น สารซักฟอกหรือสารช่วยตรึงโครเมียม ลงไปในระหว่างการดองกรด เพื่อให้หนังจับโครเมียมได้ดีขึ้นและเพื่อลดปริมาณโครเมียมในน้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการฟอกหนัง แต่ทั้งนี้ปริมาณของโลหะหนักโครเมียมที่ยังเหลือตกค้างในน้ำทิ้งก็ยังคงอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูงอยู่ เมื่อผ่านขั้นตอนนี้หนังจะถูกรีดน้ำทำให้แห้ง เจียรผิวด้วยเครื่องตัดแต่งและคัดเลือกเพื่อเก็บไว้รอจำหน่ายหรือแปรรูปต่อไป (3) การฟอกซ้ำ ย้อมสี ให้น้ำมัน และการตกแต่งหนัง (finishing process) เป็นขั้นตอนที่มักกระทำกับหนังที่ได้มาจากการฟอกโครม โดยทำขึ้นเพื่อปรับปรุงคุณภาพหนังให้เหมาะสมกับความต้องการของตลาด ในการนี้สารเคมีที่ใช้อาจเป็นโครเมียม, แทนนิน หรือซินแทน (ซึ่งเป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้น) ก็ได้ (Durai and Rajasimman, 2011) จะเห็นได้ว่าการฟอกหนังเป็นกระบวนการแปรรูปหนังสัตว์ที่อาศัยน้ำและสารเคมีจำนวนมาก ที่อาจส่งผลให้เกิดการตกค้างของคราบโปรตีน ไขมัน กรดไขมัน สารแขวนลอย สารเคมี หรือโลหะหนัก โดยเฉพาะโครเมียมและซัลไฟด์มากับน้ำทิ้งของโรงงานปริมาณสูง (Nandy et al., 1999; Uberoi, 2003) สำหรับประเทศไทยเคยมีรายงานพบการตกค้างของสารแขวนลอยและโลหะหนักโครเมียมเฉลี่ยปริมาณ 8,725 และ 13 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในน้ำทิ้งรวมจากอุตสาหกรรมฟอกหนัง (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2549)

การบำบัดทางชีวภาพ เชื่อว่าเป็นวิธีการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ดีที่สุดแต่มีข้อจำกัดในเรื่องของความเสถียรและศักยภาพของแบคทีเรียที่ใช้ในระบบบำบัด (Jawahar et al., 1998; Kadam, 1990; Rajamani et al., 1995) จากปริมาณเกลือสูง (ร้อยละ 1-10 น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่พบในน้ำทิ้งจากโรงงานฟอกหนัง ส่งผลลดประสิทธิภาพของการบำบัดทางชีวภาพน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังด้วยวิธีปกติ (Dhaneshwar, 1990) จึงทำให้แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูง (salt tolerant bacteria) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดฯ ได้ ซึ่งเคยมีรายงานถึงการใช้แบคทีเรียทนเกลือทำงานร่วมกับแบคทีเรียธรรมชาติในระบบบำบัดแบบแอกติเวตเต็ดสลัดจ์ (activated sludge process) ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังได้ (Hinteregger and Streichsbier, 1997; Kargi and Uygur, 1997; Kubo et al., 2001; Lefebvre et al., 2005; Moon et al., 2003; Santos et al., 2001; Sivaprakasam et al., 2008) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำทิ้งที่มาจากกระบวนการฟอกหนังนั้น ยังมีคราบโปรตีน ไขมัน สารเคมี และโลหะหนัก โดยเฉพาะโครเมียมในปริมาณสูงที่ส่งผลต่อการเจริญและศักยภาพในการบำบัดของแบคทีเรียหรือเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียเหล่านี้ปนมาอีกด้วย ด้วยเหตุนี้โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะคัดแยกจุลินทรีย์ทนเกลือที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส ที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง สภาวะที่มีเกลือ โครเมียม ซัลไฟด์ และสารลดแรงตึงผิว เพื่อนำมาผลิตเป็นเอนไซม์ตรึงหรือเซลล์ตรึง ที่มีศักยภาพในการบำบัดน้ำทิ้งสังเคราะห์ที่ออกแบบให้มีองค์ประกอบคล้ายของไหลที่ได้จากกระบวนการฟอกหนัง และออกแบบท่อบำบัดต้นแบบที่มีศักยภาพในการบำบัดฯ เพื่อเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่สามารถถ่ายทอดให้ภาคอุตสาหกรรมฟอกหนังนำมาพัฒนาต่อยอดและใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่เกิดขึ้นต่อไปได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (ปีที่ 1 ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558)

- 1) คัดเลือกจุลินทรีย์ชอบเกลือและอุณหภูมิสูง และทนโครเมียมที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสหรือเอนไซม์โปรติเอส
- 2) ศึกษาคุณลักษณะเฉพาะและหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เพื่อเร่งให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปสหรือเอนไซม์โปรติเอสปริมาณสูง
- 3) ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะเอนไซม์ไลเปสหรือเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

## บทที่ 2

### การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

##### 2.1.1 กระบวนการฟอกหนัง

การฟอกหนัง (Tanning) คือกระบวนการเตรียมพื้นผิวของหนังสัตว์ให้พร้อมก่อนที่จะนำมาผลิตเป็นเครื่องหนัง ซึ่งเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่เก่าแก่ที่สุดในโลกและรองรับความต้องการของประชากรในทุกภาคส่วน เมื่อจำนวนประชากรเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้การใช้นหนังฟอกนั้นมีความต้องการเพิ่มสูงขึ้นด้วย จึงนำไปสู่การขยายตัวของกิจการฟอกหนังจากกิจการระดับเล็กไปสู่อุตสาหกรรมระดับใหญ่ขึ้น สำหรับประเทศไทยที่จัดเป็น 1 ใน 4 ของประเทศที่มีการส่งออกหนังฟอกและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากหนังมากที่สุดในโลก (Ramanujam et al., 2009) ประกอบกับนโยบายของภาครัฐที่ส่งเสริมให้ประเทศไทยเป็นเมืองแฟชั่นเสื้อผ้าและเครื่องแต่งกาย ทำให้อุตสาหกรรมเครื่องหนังมีกำลังขยายตัวเพิ่มขึ้นด้วย จึงไม่สามารถหลีกเลี่ยงกับปัญหามลพิษที่จะตามมาได้ ในกระบวนการฟอกหนังเริ่มจากวัตถุดิบที่เป็นหนังเค็ม (หนังแช่เกลือ) ผ่านขบวนการต่างๆ จนได้เป็นหนังสำเร็จพ่นสีที่พร้อมส่งจำหน่ายได้นั้นจำเป็นต้องมีการใช้วัตถุดิบเคมีภัณฑ์ พลังงาน และน้ำเป็นจำนวนมาก ที่กลายเป็นของเสียที่ทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำเสีย อากาศเสีย และกากของเสียจากการผลิต โดยพบว่าปัญหาหลักของโรงงานฟอกหนังคือ น้ำเสียที่มีโลหะหนักจากการฟอกโครมปนเปื้อนและกลิ่นเหม็นที่ยังไม่สามารถแก้ไขได้อย่างเป็นการถาวร (Khan et al., 1999)

กระบวนการฟอกหนังสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนหลัก คือ

(1) การเตรียมหนังก่อนฟอก (beam house process) ที่จะต้องมีการกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการ เช่น ขนสัตว์ เศษหนัง และคราบไขมันออกจากหนังดิบก่อน เพื่อเตรียมหนังดิบให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะฟอก ในขั้นตอนนี้จะมีการแช่น้ำปูน กัดขนออกด้วยซัลไฟด์หรือเอนไซม์โปรติเอส (proteolytic enzymes) ขูดฟุ้งผิด แล่หนัง ล้างน้ำปูน และบ่มหนังในน้ำยาที่มีสารต้านการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา ที่นิยมใช้ได้แก่ ไดไทโอคาร์บาเมต (dithiocarbamate) หรือ 2-(ไทโอไอโซยาโนเมทิลไทโอ) เบนโซไทอะโซล (2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole) เป็นระยะเวลา 6 ชม. ถึง 12 วัน ทำให้ในขั้นตอนนี้มีการปล่อยน้ำทิ้งที่มีฤทธิ์เป็นด่างอย่างแรงที่มีสิ่งเจือปนที่เป็นสารจำพวกโปรตีนและไขมัน ขนสัตว์ ตลอดจนสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน เช่น ปูนขาว สารลดแรงตึงผิว (surfactant) แอมโมเนียม (ammonium) อัลคาไลน์ (alkaline) ซัลไฟด์ (sulfide) และยาฆ่าเชื้อ เป็นต้น ออกมากับน้ำทิ้ง

(2) การฟอก (tanning process) คือการเปลี่ยนสภาพหนังสัตว์ดิบซึ่งเน่าเปื่อยได้ไปเป็นหนังสำเร็จที่มีความคงตัวว่า ไม่เน่าเปื่อย และมีความทนทานต่อสภาพอากาศและน้ำร้อน ซึ่งในขั้นตอนนี้จะมีการใช้สารเคมีบางชนิด ได้แก่ ฝาด (vegetable tanning) โครเมียม (chrome tanning) ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส และสารเคมีอื่นๆ เข้าไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนคอลลาเจน (collagen) ในหนัง (Rao et al., 2002; Sundar et al., 2011) ซึ่งเคยมีรายงานว่ามีการเติมสารเคมีลงไปในขั้นตอนนี้ประมาณ 300 กิโลกรัมต่อหนังดิบ 1 ตันเลยทีเดียว (Verheijen et al., 1996) โดยกระบวนการฟอกหนังด้วยโครเมียมหรือที่เรียกว่าการฟอกโครมนั้น เป็นวิธีที่ได้รับความนิยม

มากกว่าการฟอกฝาดที่ใช้แทนนิน (tannin) หรือสารสังเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเป็นตัวฟอก เนื่องจากใช้เวลานั้น สารเคมีราคาถูก และหนังที่ผ่านการฟอกโดยวิธีนี้ยังทนต่อความร้อนและความชื้นได้ดีกว่า ซึ่งเคยมีรายงานพบว่าร้อยละ 90 ของอุตสาหกรรมฟอกหนังใช้วิธีการฟอกโครมในขั้นตอนนี้ (Ramanujam et al., 2009) แต่ไม่ว่าการฟอกหนังจะดำเนินการโดยวิธีใด ก็มีความจำเป็นที่จะต้องทำการดองกรดเสียก่อนเพื่อปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมกับปฏิกิริยาการฟอกหนัง และสารเคมีทั่วไปที่นิยมใช้ในขั้นตอนนี้คือ เกลือแกง กรดกำมะถัน และกรดฟอร์มิก (formic acid) ที่มีค่าพีเอชประมาณ 3.5-4.0 ประกอบกับในระหว่างการฟอกอาจมีการเติมสารเคมีพิเศษ เช่น สารซักฟอกหรือสารช่วยตรึงโครเมียม ลงไปในระหว่างการดองกรด เพื่อให้หนังจับโครเมียมได้ดีขึ้นและเพื่อลดปริมาณโครเมียมในน้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการฟอกหนัง แต่ทั้งนี้ปริมาณของโลหะหนักโครเมียมที่ยังเหลือตกค้างในน้ำทิ้งที่มีความเป็นกรดก็ยังคงอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูงอยู่ เมื่อผ่านขั้นตอนนี้หนังจะถูกรีดน้ำทำให้แห้ง เจียรผิวด้วยเครื่องตัดแต่งและคัดเลือกเพื่อเก็บไว้รอจำหน่ายหรือแปรรูปต่อไป

(3) การฟอกซ้ำ ย้อมสี ให้น้ำมัน และการตกแต่งหนัง (finishing process) เป็นขั้นตอนที่มักกระทำกับหนังที่ได้มาจากการฟอกโครม โดยทำขึ้นเพื่อปรับปรุงคุณภาพหนังให้เหมาะสมกับความต้องการของตลาด ในกรณีสารเคมีที่ใช้อาจเป็นโครเมียม, แทนนิน หรือซินแทน (ซึ่งเป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้น) ก็ได้ (Durai and Rajasimman, 2011) จะเห็นได้ว่าการฟอกหนังเป็นกระบวนการแปรรูปหนังสัตว์ที่อาศัยน้ำและสารเคมีจำนวนมาก ที่อาจส่งผลให้เกิดการตกค้างของคราบโปรตีน ไขมัน เกลือ สารแขวนลอย สารเคมี หรือโลหะหนัก โดยเฉพาะโครเมียมและซัลไฟด์มากับน้ำทิ้งของโรงงานปริมาณสูง (Nandy et al., 1999; Uberoi, 2003) สำหรับประเทศไทยเคยมีรายงานพบการตกค้างของสารแขวนลอยและโลหะหนักโครเมียมเฉลี่ยปริมาณ 8,725 และ 13 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ในน้ำทิ้งรวมจากอุตสาหกรรมฟอกหนัง (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2549)

การบำบัดทางชีวภาพ เชื่อว่าเป็นวิธีการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ดีที่สุดแต่มีข้อจำกัดในเรื่องของความเสถียรและศักยภาพของแบคทีเรียที่ใช้ในระบบบำบัด (Jawahar et al., 1998; Kadam, 1990; Rajamani et al., 1995) สำหรับน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังนั้น เคยมีรายงานวิจัยถึงการใช้ ระบบบำบัด MSBR (membrane sequencing batch reactor) บำบัดน้ำทิ้งที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมหนังก่อนฟอกของโรงงานฟอกหนัง โดยเดินระบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 150 วันและไม่มีการกำจัดกากตะกอนออกกระหว่างเดินระบบ พบประสิทธิภาพของระบบในการกำจัดแอมโมเนียเมกอบสมบูรณ์ ขณะที่สามารถลดค่า COD (chemical oxygen demand) ได้ร้อยละ 90 และมีประสิทธิภาพในการกำจัดไนโตรเจนรวม (total nitrogen; TN) ในช่วงร้อยละ 60-90 (Goltara et al., 2003) หรือรายงานวิจัยของ Haydar และคณะ ในปี ค.ศ. 2007 ที่ใช้ระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบแอคติเวตเตดสลัดจ์ (activated sludge process) ซึ่งประกอบด้วยแท่งก่อกำเนิดอากาศและถังตกตะกอนที่มีดำเนินการของระบบบำบัดอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 267 วัน บำบัดน้ำทิ้งสังเคราะห์ของกระบวนการฟอกหนังพบว่าสามารถลดค่า BOD (biochemical oxygen demand) และ COD ของน้ำทิ้งได้ถึงร้อยละ 90 และ 80 ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการเดินระบบ เป็นต้น

จากปริมาณเกลือสูง (ร้อยละ 1-10 น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่พบในน้ำทิ้งจากโรงงานฟอกหนัง ส่งผลลดประสิทธิภาพของการบำบัดทางชีวภาพน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังด้วยวิธีปกติ (Dhaneshwar, 1990) จึงทำให้แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูง (salt tolerant bacteria) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดฯ ได้ ซึ่งเคยมีรายงานถึงการใส่แบคทีเรียทนเกลือทำงานร่วมกับแบคทีเรียธรรมชาติในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเตดสลัดจ์ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังได้



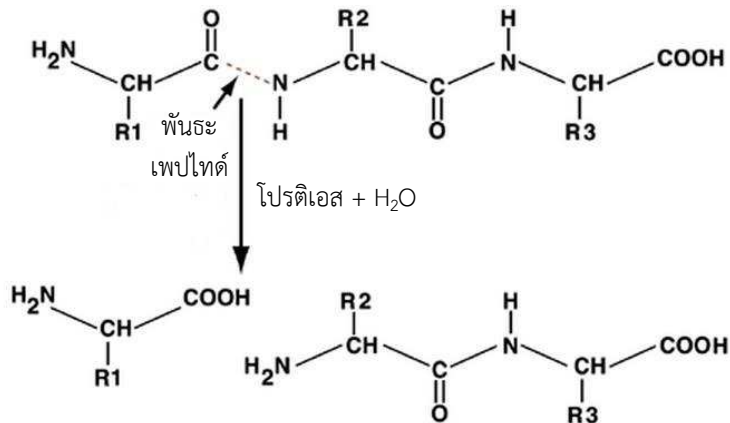
(Hinteregger and Streichsbier, 1997; Kargi and Uygur, 1997; Kubo et al., 2001; Lefebvre et al., 2005; Moon et al., 2003; Santos et al., 2001; Sivaprakasam et al., 2008) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำทิ้งที่มาจากกระบวนการฟอกหนังนั้น ยังมีคราบโปรตีน ไขมัน สารเคมี และโลหะหนัก โดยเฉพาะโครเมียมในปริมาณสูงที่ส่งผลกระทบต่อเจริญและศักยภาพในการบำบัดของแบคทีเรียหรือเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียเหล่านี้ป็นมาอีกด้วย จึงทำให้นักวิจัยส่วนใหญ่สนใจที่จะหาแบคทีเรียหรือเอนไซม์ที่มีความเสถียรในสภาวะดังกล่าวมาทดลองใช้ในระบบบำบัดน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนัง ดังตัวอย่างเช่น รายงานวิจัยของ Pillai และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 ที่คัดแยก *Bacillus subtilis* P13 ที่สามารถขับเอนไซม์เซรีนโปรติเอส (serine protease) มาใช้กักขังในขั้นตอนการเตรียมหนังก่อนฟอก รวมทั้งใช้ในการบำบัดขนสัตว์ที่ปนเปื้อนมากับน้ำทิ้งที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมหนังก่อนฟอก หรือรายงานวิจัยของ Sivaprakasam และคณะ ในปีเดียวกันที่ทดลองใช้เอนไซม์โปรติเอสทนเกลือที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* BC1 ความเข้มข้นร้อยละ 2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) กำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนมากับน้ำทิ้งของกระบวนการฟอกหนังได้ถึงร้อยละ 75 เมื่อทำการบำบัดเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับการกำจัดโครเมียมออกจากน้ำทิ้งของกระบวนการฟอกหนังนั้น ได้เคยมีรายงานถึงการใช้ *Bacillus subtilis* ที่คัดแยกได้จากดินและน้ำทิ้งในบริเวณใกล้แหล่งอุตสาหกรรมฟอกหนัง กำจัดโครเมียมที่อยู่ในระบบบำบัดได้ถึงร้อยละ 92-98 (Adeel et al., 2012) และการใช้ตัวดูดซับ (adsorbent) เช่น แอคติเวตเตดคาร์บอน (activated carbon) หรือวัสดุธรรมชาติที่ได้ทางการเกษตร เช่น เศษหญ้าและขี้เลื่อย ดูดซับโครเมียมที่ตกค้างในน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนัง เป็นต้น (Hamadia et al., 2001; Kadirvelu et al., 2001; Netzer et al., 1974; Ranganathan, 2000; Rao et al., 2002; Valdimir and Danish, 2002; Youssef et al., 2004)

## 2.1.2 เอนไซม์โปรติเอส (ปราณี อานเป็รื่อง, 2543)

เอนไซม์โปรติเอส มีชื่อสามัญหลายชื่อได้แก่ เพปติเดส (peptidase) โปรติเอส (protease) โปรตีนเอส (proteinase) เพปไทด์ไฮโดรเลส (peptidehydrolase) และเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ด้วยน้ำ (ภาพที่ 1) รวมทั้งสลายพันธะอื่นที่มีลักษณะคล้ายพันธะเพปไทด์แต่ประกอบด้วยหมู่เคมีต่างไป เช่น เอไมด์ (-NH<sub>2</sub>) เอสเทอร์ (-COOR) ไทโอเอสเทอร์ (-COSR) หรือไฮโดรซามเมท (-CONHOH) ในปัจจุบันสามารถจัดจำแนกเอนไซม์โปรติเอสออกได้เป็น 4 ชนิด ตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยาและโครงสร้างของเอนไซม์ ดังนี้

### 2.1.2.1 เซรีนโปรติเอส (serine protease)

เซรีนโปรติเอสมีเลขตามระบบ คือ EC 3.4.21 เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ถูกยับยั้งได้ด้วยไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (diisopropylfluorophosphate) ด้วยการเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซีของอนุมูลเซรีล (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 นากาเรสซับทิลโอเพปติเดสซี (nagarase subtilo-peptidase C)



ภาพที่ 1 การสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรตีเอส (ดัดแปลงจาก Terrence and Osna, 2003)

#### 2.1.2.2 ไธออลโปรตีเอส (thiol protease)

ไธออลโปรตีเอสมีเลขตามระบบ คือ EC 3.4.22 เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฮดริล (-SH) อยู่ในบริเวณเร่งและอาจมีฮิสทีซิน (histisyl) รวมอยู่ด้วย ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้อยู่ในช่วงเป็นกลาง คือ 6.0-7.5 และเป็นเอนไซม์ที่ค่อนข้างทนความร้อนได้ดี อาจจะทนความร้อนได้ถึง 60-80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอชเป็นกลาง แต่มักเสียสภาพที่ค่าพีเอชน้อยกว่า 4 ไธออลโปรตีเอส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์ของโปรตีนที่ถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารซัลไฮดริล (sulphydryl reagent) หรือสารกลุ่มไธออล (thiol groups) เช่น พารา-คลอโรเมอร์คิวริเบนโซเอท (*p*-chloromercuribenzoate หรือ *p*CMB) ไอโอโดอะซิ-ทาไมด์-เอน-เอทิลมาเลอิมิด (idoacetamide-N-ethyl maleimide) เป็นต้น (Verachtert and de Mot, 1990) สารยับยั้งจะทำลายอนุภาคซัลไฮดริลที่บริเวณเร่งของเอนไซม์จนสูญเสียการทำงานได้ ในบางครั้งจึงเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า ซัลไฮดริลโปรตีเนส ตัวอย่างของเอนไซม์โปรตีเนสกลุ่มนี้ เช่น ปาเปน (papain) (EC 3.4.22.2) จากยางมะละกอ และโบรมิเลน (bromelain) จากสับปะรด เป็นต้น

#### 2.1.2.3 แอซิดโปรตีเอส (acid protease)

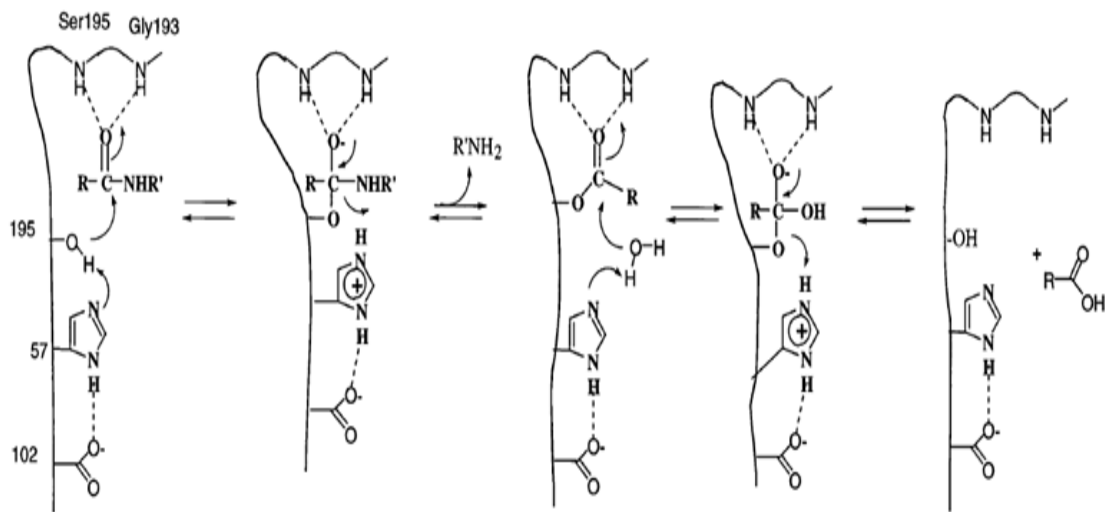
แอซิดโปรตีเอสมีเลขตามระบบ คือ EC 3.4.23 เป็นเอนไซม์ที่มีช่วงการทำงานเหมาะสมอยู่ในช่วงค่าพีเอชที่เป็นกรด โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 2 และ 4 โดยมีความจำเพาะกับกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก (aromatic amino acid) แต่จะถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารประกอบเพปสเทอีน ไดอะโซอะซิโตนาลีนเมทิล เอสเทอร์ (pepstain diazoacetyl norleucine- methyl ester) แอซิดโปรตีเอสจากจุลินทรีย์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ เพปซินไลค์เอนไซม์ (pepsin-like enzyme) เป็นเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. และ *Rhizopus* sp. และ เรนินไลค์เอนไซม์ (rennin-like enzyme) ซึ่งมีกิจกรรมที่ใกล้เคียงกับคาล์ฟ ไคโมซิน (calf-chymosin) ที่ผลิตจาก *Mucor pusillus*, *Endothia parasitica* และ *A. miehei* (Fogarty and Kelly, 1990)

#### 2.1.2.4 เมทัลโลโปรตีเอส (metalloprotease)

เมทัลโลโปรตีเอสมีเลขตามระบบ คือ EC 3.4.24 เป็นเอนไซม์ที่มีไอออนของโลหะรวมอยู่ภายในโมเลกุลของเอนไซม์ หรือช่วยในปฏิกิริยาการเร่งสลาย เช่น  $Zn^{2+}$  เอนไซม์นี้ทำการตัดสายพอลิเพปไทด์จากปลาย (exopeptidase) โดยทำปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าพีเอชเป็นกลาง (ค่าพีเอช 5.6-7.5) ซึ่งอาจเรียกว่า นิวทรัลโปรตีเอส (neutral protease) ก็ได้ และเนื่องจากมีไอออนของโลหะร่วมในปฏิกิริยาจึงมักถูกยับยั้งได้ด้วยสารดึงโลหะ (metal chelating agents) เช่น เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซีติก (ethylenediaminetetraacetic; EDTA) และ วันแทนฟีแนนทรอลิน (1,10-phenanthroline) (Pero et al., 1990) แต่สารประกอบที่มีกำมะถัน หรือไดโอโซไฟรฟิฟลูออโรฟอสเฟต (diisopropyl fluorophosphate; DIFP) ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้ ตัวอย่างเอนไซม์โปรตีเอสในกลุ่มนี้ เช่น คาร์บอกซีเพปติเดสเทอร์โมไลซินคอลลาจีเนส (carboxypeptidase thermolysin collagenase) เป็นต้น (Verachtert and de Mot, 1990)

**2.1.3 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรตีเอส** ([http://www.rosehulman.edu/~brandtChem330/Enzyme\\_mech\\_examples .pdf](http://www.rosehulman.edu/~brandtChem330/Enzyme_mech_examples.pdf))

กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรตีเอสที่จะยกตัวอย่างในหัวข้อนี้คือ กลไกการเร่งปฏิกิริยาของ เซรีนโปรตีเอส ที่เพิ่มอัตราการสลายพันธะเพปไทด์ได้  $10^{10}$  เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับในสถานะที่ไม่มีตัวเร่งปฏิกิริยา บริเวณเร่งของเซรีนโปรตีเอสประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 เรซิดิว ที่ทำหน้าที่สำคัญ คือ เซรีน ฮิสติดีน และแอสปาเรต และเป็นบริเวณอนุรักษ์ของเซรีนโปรตีเอสเกือบทุกชนิด กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรตีเอสเริ่มต้นจากการเข้าจับของเอนไซม์กับสับสเตรท จากนั้น อิเล็กตรอนของฮิสติดีนจะเข้าสร้างพันธะกับอะตอมไฮโดรเจนของเซรีน ทำให้เซรีนแสดงความเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ที่สามารถสร้างพันธะโคเวเลนต์กับหมู่คาร์บอนิลของพันธะเพปไทด์ในสับสเตรท ส่งผลให้ประจุลบของออกซิเจนบนหมู่คาร์บอนิลของเพปไทด์สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโปรตอนของหมู่เอไมด์ เกิดบริเวณที่เรียกว่า ออกซียานไอออน โฮล (oxyanion hole) ที่ทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาการสลายต่อไป โดยหมู่ N-H ในพันธะเพปไทด์ของสารตั้งต้น จะเกิดส่งถ่ายอิเล็กตรอนให้กับอะตอมไนโตรเจนในสายโซ่ข้างของฮิสติดีน ทำให้พันธะเพปไทด์ของสับสเตรทแตกออก จากนั้นพันธะเอสเทอร์ระหว่างเพปไทด์และอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโนเซรีน จะเกิดการสลายได้เป็นเพปไทด์ที่มีหมู่คาร์บอนิล และหมู่ไฮดรอกซีของกรดอะมิโนเซรีนคืนกลับมา สุดท้ายเอนไซม์ก็จะหลุดออกจากสับสเตรทและกลับมาอยู่ในรูปที่พร้อมเร่งปฏิกิริยาต่อไป (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรตีเอส (Hedstrom, 2002)

## 2.1.4 แหล่งผลิตของเอนไซม์โปรตีเอส (มยุรฉัตร เอกธรรมกิจ และสุจิตรา ยนต์สิงห์, 2548)

### 2.1.4.1 เอนไซม์โปรตีเอสจากพืช

การผลิตโปรตีเอสจากพืชมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ใช้เวลานานและพื้นที่มาก อย่างไรก็ตามมีเอนไซม์โปรตีเอสหลายชนิดจากพืชที่ผลิตและใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ปาเปนจากยางมะละกอ ที่ทำงานได้ดีในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 5 และ 9 และมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 80 ถึง 90 องศาเซลเซียส หรือ โบรมิเลนจากสับปะรด ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติคล้ายกับซีสเทอีนโปรตีเอส และทำงานได้ดีในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 5 และ 9 สำหรับเคราติเนส (keratinase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายผมและขนแกะมักนำไปใช้ป้องกันการอุดตันในระบบบำบัดน้ำเสีย

### 2.1.4.2 เอนไซม์โปรตีเอสจากสัตว์

ส่วนใหญ่มาจากตับอ่อนของสัตว์ ตัวอย่างโปรตีเอสจากสัตว์ เช่น ทริปซิน (trypsin) จากกระเพาะที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการผลิตยา ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) จากตับที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งเป็นเอนไซม์ที่มีราคาแพง ใช้ในอุตสาหกรรมย่อยพันธ์เปปไทด์ในอาหารที่มีส่วนประกอบของนมสำหรับผู้ที่มีอาการแพ้โปรตีนจากนม เปปซิน (pepsin) จากกระเพาะของสัตว์ซึ่งสามารถทำงานได้ดีในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 1 และ 2 และเรนนิน (rennin) จากกระเพาะลูกวัว ที่ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมนม ทำให้ผลิตภัณฑ์นมมีความคงตัว เพิ่มกลิ่นและรสชาติให้ดีขึ้น

### 2.1.4.3 เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์

แม้ว่าเอนไซม์โปรตีเอสจะพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่ในปัจจุบันแหล่งผลิตของเอนไซม์โปรตีเอสที่มีขายในเชิงการค้าส่วนใหญ่มักมาจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรีย แบคทีเรียสามารถเจริญอย่างรวดเร็ว และยังคงควบคุมการเจริญได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีต้นทุนในการเลี้ยงที่ต่ำกว่าพืชและสัตว์ อุตสาหกรรมส่วนใหญ่จึงนิยมนำแบคทีเรียมาเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์มาใช้ เพราะแบคทีเรียมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ซับซ้อน

น้อยกว่าราและไวรัส และสภาวะในการเลี้ยงก็ง่าย เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากพืชและสัตว์ไม่สามารถตอบสนองต่อความต้องการของโลกในปัจจุบันจึงทำให้เกิดความสนใจเอนไซม์โปรติเอสที่มาจากจุลินทรีย์มากขึ้น และจุลินทรีย์นั้นก็แหล่งที่ดีของเอนไซม์โปรติเอส 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, ไคตินเนส (chitinase), เอสเทอเรส (esterase), ไลเปส (lipase), อะไมเลส (amylase), อะกาเรส (agarase) และ เอริลซัลฟาเตส (arylsulphatase) ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียใต้ทะเล อาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีความหลากหลายทางชีวภาพและอาจพบการปนเปื้อนของสารเคมีจึงทำให้สามารถปรับตัวเพื่อความอยู่รอดได้ดีกว่าแบคทีเรียที่พบบนบก (Sana et al., 2006)

### 2.1.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในระดับอุตสาหกรรม (วัญญูตา ภูโยทิน, 2544)

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

#### 2.1.5.1 เบเกอรี่

สำหรับเอนไซม์โปรติเอสที่นำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเบเกอรี่ มีวัตถุประสงค์สำคัญ 2 ประการ คือ เพื่อปรับปรุงให้มีกลูเตนในโดล์ (dough) สูง (Outtrup and Boyce, 1990) ในการทำขนมปังกรอบ แคร็กเกอร์ (cracker) และ บิสกิต (biscuit) ส่วนมากจะใช้แอสิดโปรติเอสจากเชื้อรา โดยโปรติเอสจะทำให้กลูเตนถูกย่อยสลายจึงทำให้ไม่เกิดการกักเก็บอากาศในโดล์ระหว่างการหมักด้วยยีสต์ จึงทำให้โดล์ไม่พอง เมื่อนำไปอบจะได้น้ำเนื้อสัมผัส (texture) ที่กรอบมาก โปรติเอสที่ใช้เช่น นิวทรัลโปรติเอส จาก *Bacillus amyloliquefaciens* และใช้เพื่อให้ขนมปังมีรสชาติที่ดีขึ้น จากกลิ่นของกรดอะมิโนที่ได้รับจากการสลาย (Poutanen, 1997)

ตารางที่ 1 การใช้เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรม

ประเภทของอุตสาหกรรม	วัตถุประสงค์ในการใช้	แหล่งผลิตเอนไซม์	ชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้
1. เบเกอรี่	การทำขนมปังกรอบ	รา	แอสิดโปรติเอสและนิวทรัลโปรติเอส
2. การผลิตเบียร์	ทำให้เบียร์ใสขึ้น	รา, แบคทีเรีย	ปาเปน, โบรมิเลน, เพปซิน,
3. ัญชาติ	ใช้ในขั้นตอนการแปรรูปเครื่องปรุงรส	รา, แบคทีเรีย	ปาเปน, โบรมิเลน, เพปซิน
4. ผลิตภัณฑ์จากนม	รักษารสชาติของผลิตภัณฑ์ย่อยโปรตีนในนม รักษาคุณภาพและช่วยในการระเหยของนม	รา, แบคทีเรีย	เอนไซม์จากน้ำย่อย, ปาเปน, โบมิเลน, เพปซิน
5. การผลิตอาหารสัตว์	เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารสัตว์	รา, แบคทีเรีย	เอนไซม์จากน้ำย่อย, เพปซิน
6. การแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อและปลา	ทำให้เนื้อนุ่ม	รา, แบคทีเรีย	ปาเปน, โบรมิเลน
7. อุตสาหกรรมยาและทางการแพทย์	ช่วยในการย่อย	รา, แบคทีเรีย	ปาเปน, โบรมิเลน
8. การฟอกหนัง	ทำให้หนังนุ่มและช่วยกำจัดขน	รา, แบคทีเรีย	เอนไซม์จากน้ำย่อย, ปาเปน
9. การผลิตผงซักฟอก	ขจัดคราบโปรตีนและสิ่งสกปรก	รา, แบคทีเรีย	แอลคาไลน์โปรติเอส

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

2.1.5.2 การผลิตเบียร์

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

### 2.1.5.3 การผลิตอาหารสัตว์

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

### 2.1.5.4 การแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อและปลา

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

### 2.1.5.5 การฟอกหนัง

ในการฟอกหนังนิยมนำเอนไซม์โปรติเอสมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการกำจัดขนสัตว์ โดยมีการนำเอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์มาใช้แทนสารเคมี เช่น โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ข้อดีของการใช้โปรติเอส ในขั้นตอนการกำจัดขนสัตว์ คือ ลดปัญหาการบำบัดของเสียจากโรงงานเนื่องจากสารเคมีซึ่งมีต้นทุนสูง และทำให้หนังสัตว์มีความนุ่มและยืดหยุ่น โดยมีการนำเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียมาใช้แทนเอนไซม์จากสัตว์แต่ไม่ได้ผลดีนัก ในปี ค.ศ. 1970 จึงมีการนำเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียมาใช้แทนการใช้ทริปซินและเพนกรีเอติน (pancreatin) ที่รวมทั้งมีการใช้แอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* ที่มีขายในปัจจุบันในชื่อการค้า ได้แก่ PIN, Pyrase, Novocor ตามลำดับ (วทัญญูตา ภูโยทิน, 2544)

### 2.1.5.6 การสังเคราะห์เพปไทด์ (จิตติมา เจริญพานิช, 2552)

ในปัจจุบันนิยมนำเพปไทด์มาใช้ในอุตสาหกรรมที่หลากหลายอาทิเช่น เครื่องดื่มที่ผสมกรดอะมิโน โปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate) สารให้ความหวานเทียมในรูปของไดเพปไทด์ซึ่งในการสังเคราะห์จะใช้เอนไซม์โปรติเอสเร่งปฏิกิริยาในทิศทางกลับของปฏิกิริยาการสลาย ที่จะเกิดปฏิกิริยาในสภาวะที่มีน้ำน้อยหรือในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ และต้องการเอนไซม์ โปรติเอสที่มีความเสถียรในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์และช่วงค่าพีเอชกว้าง

### 2.1.5.7 การทำซีอิ้วและเนยแข็ง

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

### 2.1.5.8 การผลิตผงซักฟอก (วทัญญูตา ภูโยทิน, 2544)

ผงซักฟอกจะประกอบไปด้วยส่วนประกอบหลักๆ คือ สารลดแรงตึงผิว (surfactants หรือ สารกำจัดคราบสกปรก) 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 ขอบเขตของการดำเนินการวิจัยในปีที่ 1

การดำเนินการวิจัยในปีที่ 1 ของโครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลักคือ (1) การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบเกลือและอุณหภูมิสูง และทนโครเมียมที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสหรือเอนไซม์โปรติเอส (2) การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะและหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เพื่อเร่งให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปสหรือเอนไซม์โปรติเอสปริมาณสูง และ (3) การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสหรือเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ซึ่งสามารถสรุปแผนงานตลอดโครงการได้ดังภาพที่ 3

การคัดเลือกและระบุชนิดจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสหรือโปรติเอส



การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะและหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้



การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์

ภาพที่ 3 ภาพรวมขอบเขตของการดำเนินการวิจัยในโครงการ



## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ตัวอย่างดินในบริเวณบ่อน้ำพุร้อน และตัวอย่างตะกอนทะเลจากทะเลในเขตอ่าวไทย ทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 10 กรัม โดยใช้พลั่วตักที่ความลึกลงไป 10 ซม. จากพื้นผิว เก็บเข้าหลอดปลายแหลมและแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยจะเก็บตัวอย่างไว้ไม่เกินหนึ่งสัปดาห์ ตารางที่ 2 สรุปแหล่งที่มาของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 2 แหล่งของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างที่	แหล่งของตัวอย่าง
1	บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง
2	เกาะจาน แสมสาร จังหวัดชลบุรี
3	ทะเลบ้านกรูด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

#### 3.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ซึ่งตัวอย่างดินหรือตะกอนทะเล 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) บนอาหารแข็งนิวเทรียนส์ (Nutrient agar) สำหรับตัวอย่างดิน และบนอาหารแข็งมารีน (Marine agar) สำหรับตัวอย่างตะกอนทะเล บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะโคโลนีและสีหรือรูปร่างแตกต่างกัน มาทำให้บริสุทธิ์โดยการเลี้ยงซ้ำบนอาหารแข็งชนิดเดิมจนไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อโคโลนีอื่น

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ข้างต้น มาทดสอบการย่อยโปรตีนโดยนำมาเพาะเชื้อแบบลงเชื้อตำแหน่งเดียว (point inoculation) บนอาหารแข็งskim milk (skim milk) ที่ประกอบไปด้วยผงskim milk (skim milk powder) ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร), เปปโทน (peptone) ร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร), ยีสต์เอ็กซ์แทรก ร้อยละ 0.25 (น้ำหนักต่อปริมาตร), กลูโคส (glucose) ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ NaCl ร้อยละ 2.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เลือกโอโซนที่ให้บริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนี มาวัดความกว้างของบริเวณใสเทียบกับความกว้างของโคโลนีทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน พร้อมทั้งตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ขับออกมาออกเซลล์ของเชื้อที่เลี้ยงเจริญในอาหารเหลว LB ที่อุณหภูมิ 25 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามวิธีที่จะอธิบายในหัวข้อ 3.3 เลือกไอโซเลทที่แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสสูงที่สุดมาทำการระบุชนิดต่อไป

### 3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส

#### 3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

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

#### 3.3.2 การวิเคราะห์ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส

ดูดเชื้อเจริญปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ทำการแยกเซลล์ออก โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำส่วนใสซึ่งเรียกว่าส่วนสกัดเอนไซม์มาติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอะโซเคซีน (azocasein hydrolysis) (นิตยา เยาว์แสง, 2552) โดยทำการผสมอะโซเคซีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับ ส่วนสกัดเอนไซม์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ทิ้งไว้ 15 นาที ปั่นเหวี่ยงตะกอนอะโซเคซีนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารโฟลีน (folin reagent) อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คำนวณเทียบค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสกับกราฟมาตรฐานของ L-tyrosine (ภาคผนวกที่ 2) ในการวัดค่าแอกติวิตีแต่ละครั้งจะทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาแล้วทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่กำหนด

### 3.4 การระบุชนิดของแบคทีเรียได้ทะเลที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

การระบุชนิดของแบคทีเรียได้ทะเลผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่คัดแยกได้จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณลักษณะทางชีวเคมี ตามวิธีของ “API Skills Bacterial Identification Method” และลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA (Weisburg et al., 1991) ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน 16S rRNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ของยีน 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  $\text{MgCl}_2$  ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ไพร์เมอร์แต่ละสายที่ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์ บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1X และเอนไซม์แทคทีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) 2.5 หน่วย (เติมทีหลัง) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมต่อไปนี้ คือ ความร้อนเริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดเครื่องชั่วคราว เพื่อเติมเอนไซม์แทคทีเอ็นเอโพลีเมอเรส ต่อมา

ทำปฏิกิริยาจำนวน 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 ทำปฏิกิริยาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ (ขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส) โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเจล GF-1 GEL DNA RECOVER KIT (Vivantis) ตามวิธีที่แนะนำจากบริษัท จากนั้นเชื่อมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เตรียมได้เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pTG19T ที่มีปลายโอลิโกไทมีน ทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E.coli* DH5 $\alpha$  และสกัดพลาสมิดสายผสมที่ได้ด้วยชุดสกัดพลาสมิด GF-1 PLASMID DNA EXTRACTION KIT (Vivantis) นำพลาสมิดสายผสมที่ผ่านการยืนยันว่ามีชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แต่ละสายพันธุ์ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีไดค็อกซีนิวคลีโอไทด์ (Sanger et al., 1977) เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ (Basic local alignment search tool; BLAST) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์โลก (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และจัดจำพวกนิวคลีโอไทด์ (alignment) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>) เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) โดยอาศัยความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ และสร้างแผนภาพวงศ์วานวิวัฒนาการ (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)

### 3.5 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

#### 3.5.1 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) มาวัดปริมาณวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และวัดแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้แล้วในหัวข้อ 3.3

#### 3.5.2 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอส

นำส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.1 มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ผ่านการบดละเอียดปริมาณตามที่ระบุในตารางมาตรฐานน้ำหนักเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวกที่ 3) ลงในส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้นปริมาณ 500 มิลลิลิตร ที่ละน้อยๆ โดยใช้ช้อนตักสารขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็นลำดับขั้น ดังนี้ ร้อยละเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 0-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, และ 70-80 เมื่อพบว่าเอนไซม์

โปรตีนของแบคทีเรียตกตะกอนมากที่สุด ที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวเท่าใด จึงทดลองตกตะกอนเกลือใหม่กับสารละลายเอนไซม์โปรตีนเริ่มต้นปริมาตร 10 ลิตร กวนอย่างต่อเนื่องเพื่อให้เกิดการละลายอย่างสมบูรณ์ตลอดเวลาบนน้ำแข็ง เมื่อทำการเติมเกลือจนครบปริมาณแล้วจะทำการกวนอย่างต่อเนื่องต่อเป็นเวลา 30 นาที บนน้ำแข็ง ปั่นเก็บตะกอนโปรตีนที่ได้ในแต่ละชั้น โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาทำการไดอะไลซิส (dialysis) โดยละลายตะกอนโปรตีนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าพีเอช 7.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบรรจุลงในถุงไดอะไลซิส ทำการไดอะไลซิสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ปริมาตร 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งจะเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ทุก 4 ชั่วโมง เป็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอนไซม์ ก่อนที่จะทำเข้มข้นด้วยการทำอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) ที่มีมวลโมเลกุลคัดกรอง 15 กิโลดาลตัน นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นไปทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบคัดกรองขนาด (gel-permeable column chromatography) ที่บรรจุ Sephadex G-75 เป็นเรซิน (resin) คัดกรอง นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในแต่ละชั้นไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ต่อไป ตลอดจนการทดลองจะทำการวัดปริมาณ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และวัดแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีนที่ได้ในทุกขั้นตอนการทำบริสุทธิ์และคำนวณค่าแอกติวิตีจำเพาะ (specific activity) ร้อยละปริมาณเอนไซม์คงเหลือ (% yield) และจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ (purification factor) และรายงานในรูปของตารางสรุปการทำบริสุทธิ์เอนไซม์

### 3.5.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรตีนโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรตีนที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจลแยก (separating gel) ที่มีความเข้มข้นอะคริลามิด ร้อยละ 15 การวิเคราะห์ทำโดยการผสมตัวอย่างสารละลายโปรตีนและสารระบุตำแหน่ง (dye) ในอัตราส่วน 1:6 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะหยอดลงในช่องของเจล ให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลคงที่ 150 โวลต์ เมื่อสีระบุตำแหน่งเคลื่อนที่ถึงปลายเจล นำเจลที่ได้มาย้อมด้วยสารละลายย้อมสีคูเมซีบลู (ประกอบด้วยกรดอะซิติก ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เมทานอล ร้อยละ 40 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และสีคูเมซีบลู ร้อยละ 0.25 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายผสมของกรดอะซิติก ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ เมทานอล ร้อยละ 40 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งพื้นหลังของเจลไม่มีสี เพื่อชะเอาสีคูเมซีบลูในส่วนที่เป็นพื้นหลังออก เพื่อให้แถบแบนของโปรตีนปรากฏออกมา นำเจลที่ได้ไปสแกนด้วยเครื่องสแกน นำไปประมาณมวลโมเลกุลสัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรตีนโดยใช้การเคลื่อนที่ของแถบเอนไซม์เทียบกับของโปรตีนมาตรฐาน

## 3.6 การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

### 3.6.1 ผลของค่าพีเอชต่อแอกติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรตีน

การหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดำเนินการโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากหัวข้อ 3.5 กับสับสเตรทที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่างกันคือ ค่าพีเอช 3-6 (ใช้บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์), ค่าพีเอช 6-8 (ใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์), ค่าพีเอช 7-9 (ใช้บัฟเฟอร์ทริสความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์) และค่าพีเอช 9-12 (ใช้บัฟเฟอร์โซเดียม

คาร์บอน ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์) และติดตามค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ คำนวณเป็นค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพันธ์ (% relative activity) โดยใช้ผลการทดลองที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดเป็นร้อยละ 100 สำหรับการศึกษาผลของค่าพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ จะดำเนินการทดลองคล้ายกันแต่จะบ่มสารละลายเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่างๆ เป็นเวลานานแตกต่างกันก่อนทำปฏิกิริยา คำนวณค่าร้อยละแอกติวิตีคงเหลือ (% residual activity) โดยเทียบผลการทดลองที่ค่าพีเอชที่ให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุดเป็นร้อยละ 100

### 3.6.2 ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ดำเนินการโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ในชนิดของบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมที่หาได้ในหัวข้อ 3.6.1 ที่อุณหภูมิต่างกันตั้งแต่ 10 ถึง 90 องศาเซลเซียส จากนั้นติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์และคำนวณเป็นค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพันธ์โดยเทียบผลการทดลองที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงที่สุดเป็นร้อยละ 100 สำหรับการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ จะทำโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และติดตามวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างกัน คำนวณเป็นค่าร้อยละแอกติวิตีคงเหลือโดยเทียบค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ชั่วโมงที่ศูนย์เป็นร้อยละ 100

### 3.6.3 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส

บ่มสารละลายเอนไซม์ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดความเข้มข้นร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ระหว่างการบ่มปฏิกิริยาจะทำการเขย่าสารผสมอย่างต่อเนื่องที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างกัน จากนั้นติดตามค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นำมาศึกษาได้แก่ เมทานอล (methanol มีค่า  $\log P_{o/w} = -0.8$ ), เอทานอล (ethanol มีค่า  $\log P_{o/w} = -0.24$ ), โพรพานอล (propanol มีค่า  $\log P_{o/w} = 0.05$ ), ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ (isoamylalcohol มีค่า  $\log P_{o/w} = 1.3$ ), เบนซีน (benzene มีค่า  $\log P_{o/w} = 2.0$ ), เฮกเซน (hexane มีค่า  $\log P_{o/w} = 3.5$ ), เฮปเทน (heptane มีค่า  $\log P_{o/w} = 4.0$ ), เดคเคน (decane มีค่า  $\log P_{o/w} = 5.6$ ), และ เฮกซาเดคเคน (hexadecane มีค่า  $\log P_{o/w} = 8.8$ ) รายงานผลการทดลองเป็นค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพันธ์โดยเทียบค่าแอกติวิตีโปรติเอสของชุดควบคุมที่ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์เป็นร้อยละ 100

### 3.6.4 ผลของสารเคมีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การศึกษาผลของสารเคมีต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทำโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ในสภาวะที่มีสารเคมีต่างๆ ความเข้มข้นต่างกัน ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และติดตามค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ รายงานผลการทดลองเป็นค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพันธ์โดยเทียบค่าแอกติวิตีโปรติเอสของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารเคมีเป็นร้อยละ 100 สารเคมีที่ใช้ศึกษาได้แก่ NaCl, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, PMSF, EDTA และ DTT

### 3.6.5 ผลของดีเทอร์เจนต์ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การติดตามการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีดีเทอร์เจนต์ทำโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่มีสารดีเทอร์เจนต์ ได้แก่ SDS, Tween80 และ Triton X-100 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายต่างกัน ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์ คำนวณค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพันธ์โดยเทียบค่าแอกติวิตีโปรติเอสของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมดีเทอร์เจนต์เป็นร้อยละ 100

### 3.6.6 ผลของสารฟอกขาวต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การติดตามการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีสารฟอกขาวทำโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่มีสารฟอกขาว ได้แก่ Hydrogenperoxide ( $H_2O_2$ ), Sodium dihydrogen orthophosphate, Sodium carbonate, Sodium carboxymethyl cellulose, Sodium perborate, Sodium percarbonate, Sodium pyrophosphate tetrabasic, Sodium p-toluene sulfonate, Sodium alkaline silicate, Sodium tripolyphosphate, Sodium xylenesulfonate, Sodium lauryl ether sulfate, Tetra sodiumphosphate, Alcohol ethoxylate (lauryl alcohol ethoxylate), Alkylphenol ethoxylate, Alkylbenzene sulfonate sodium salt, Sodium nitrotriacetate, Sodium percarbonate และ Zeolite ที่ความเข้มข้นสุดท้ายต่างกัน ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์ คำนวณค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์โดยเทียบค่าแอกติวิตีโปรติเอสของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารฟอกขาวเป็นร้อยละ 100

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากตัวอย่างดินและตะกอนทะเล

เมื่อซั่งตัวอย่างดินและตะกอนทะเล อย่างละ 1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายตัวอย่างและทำการเจือจางตัวอย่าง 5 เท่า และ 10 เท่า ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ไม่ได้เจือจาง, เจือจาง 5 เท่า และ 10 เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มากระจายให้ทั่ว (spread) บนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB และอาหารแข็งมารีน (Marine agar) ตามลำดับ บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะโคโลนีและสีหรือรูปร่างแตกต่างกัน มาทำให้บริสุทธิ์โดยการเลี้ยงซ้ำบนอาหารแข็งชนิดเดิมจนไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อโคโลนีอื่น พบแบคทีเรียที่มีความแตกต่างของลักษณะโคโลนี ขนาด และสี จำนวนทั้งสิ้น 30 ไอโซเลท ซึ่งเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มาทดสอบการย่อยโปรตีนโดยนำมาเพาะเชื้อแบบลงเชื้อตำแหน่งเดียว (point inoculation) บนอาหารแข็งskim milk (skim milk) ที่ประกอบไปด้วยผงskim milk (skim milk powder) ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร), เปปโตน (peptone) ร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร), ยีสต์เอ็กซ์แทรก ร้อยละ 0.25 (น้ำหนักต่อปริมาตร), กลูโคส (glucose) ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ NaCl ร้อยละ 2.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เลือกไอโซเลทที่ให้บริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนี มาวัดความกว้างของบริเวณใสเทียบกับความกว้างของโคโลนีทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน พร้อมทั้งตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสับสเตรทอะโซเคซีน (azocasein hydrolysis) ตามวิธีที่อธิบายมาแล้วในบทที่ 3 ผลการทดลองที่ได้พบว่า เมื่อสังเกตจากบริเวณใสรอบโคโลนีที่เกิดขึ้น ซึ่งมีแนวโน้มว่าจะเป็นไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลทที่แสดงวงใสรอบโคโลนี และเมื่อวิเคราะห์ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสพบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท ที่ให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด คือแบคทีเรียไอโซเลทที่ 5 และไอโซเลทที่ 9 ที่ให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสไม่แตกต่างกัน คือเท่ากับ  $6.50 \pm 0.03$  หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร ด้วยเหตุนี้จึงเลือกแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมาทำการระบุชนิดต่อไป

#### 4.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่คัดแยกได้

การระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่คัดแยกได้ จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีตามวิธี API Skill bacterial identification ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16S rRNA ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียไอโซเลทที่ 5 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์คะแทเลส (catalase) แต่ให้ผลลบกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และสามารถใช้น้ำตาลหลายชนิด ได้แก่ ดี-กลูโคส (D-glucose), ดี-ฟรุคโทส (D-fructose), ดี-มอลโตส (D-maltose), ดี-ทรีฮาโรส (D-trehalose), ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) และ ดี-แซคคาโรส (D-

saccharose) แต่ให้ปฏิกิริยาที่เป็นลบกับน้ำตาลดี-แมนโนส (D-mannose), ดี-แลคโตส (D-lactose), ไซลิตอล (xylitol), ดี-เมลลิโบส (D-melibiose), ดี-แรฟฟิโนส (D-raffinose) และ ดี-ไซโลส (D-xylose) รวมทั้งให้ผลบวกกับการทดสอบวีพี (VP test) และการทดสอบยูเรีย (urea test) แต่ให้ผลลบกับการทดสอบไนเตรท (nitrate test) รวมทั้งไม่สามารถทำปฏิกิริยากับเมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) และเอ็น-อะซีทิล-กลูโคซามีน (N-acetyl-glucosamine) แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับแอล-อาร์จินีน (L-arginine) ได้ตั้งสรุปในตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์สามารถสรุปได้ว่า แบคทีเรียไอโซเลทที่ 5 คือ *Staphylococcus warneri* โดยมีระดับความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์เท่ากับร้อยละ 97.4 แต่ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 5 พบความเหมือนร้อยละ 99 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน 16S rRNA ของ *Staphylococcus saprophyticus* หลายสายพันธุ์ เช่น *S. saprophyticus* strain SCD3-3 (Accession no. KF476047), *S. saprophyticus* strain T86 (Accession no. HQ407261), *S. saprophyticus* strain RW26 (Accession no. EU419913) เป็นต้น และเมื่อหาความสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 5 กับแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus* พบว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่ 5 จัดอยู่ในกลุ่มของ *S. saprophyticus* มากกว่า *S. warneri* จึงระบุชนิดของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 5 เป็น *S. saprophyticus* ดังแสดงในภาพที่ 4

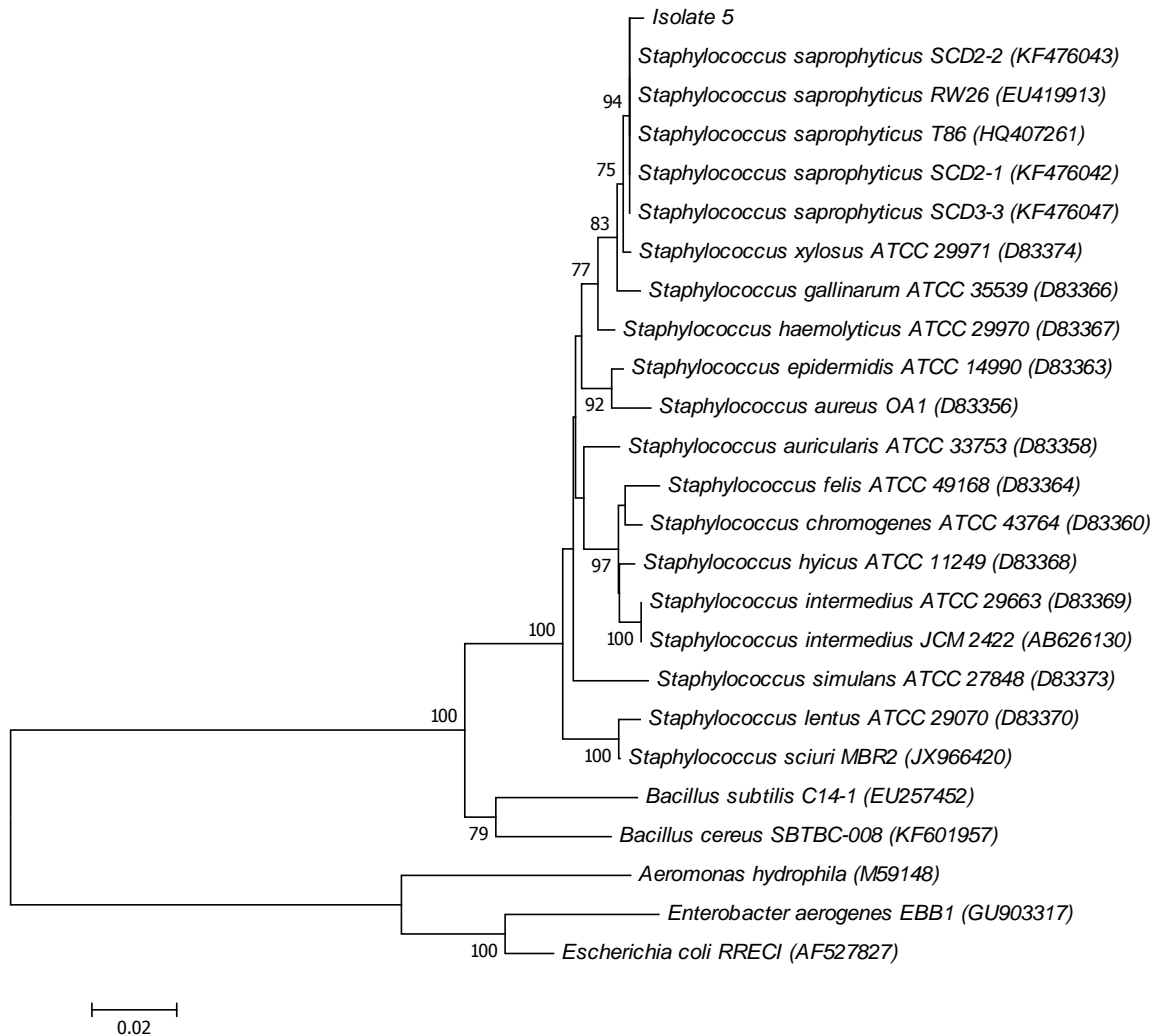
สำหรับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 9 พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์คะตะเลส (catalase) และสามารถผลิตกลีเซอรอล (glycerol), อะไมดาลิน (amygdalin), ซาลิซิน (salicin), เอสคูลิน-เฟอร์ริกซิเตรท (esculin ferric citrate), อาบูติน (arbutin), อะไมดอน (amidon) และไกลโคเจน (glycogen) แต่ไม่สามารถผลิตเอ็น-อะซีทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) และอินูลิน (inulin) ได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด เช่น แอล-อะราบินโนส (L-arabinose), ดี-ไรโบส (D-ribose), ดี-กลูโคส (D-glucose), ดี-ฟรักโทส (D-fructose), อินอสิทอล (inositol), ดี-แมนนิทอล (D-mannitol), ดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose), ดี-มอลโตส (D-maltose) และ ดี-แซคคาโรส (D-saccharose) เป็นต้น ดังสรุปในตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์พบว่า แบคทีเรียไอโซเลทที่ 9 คือ *Bacillus subtilis* โดยมีระดับความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์เท่ากับร้อยละ 98.6 ซึ่งให้ผลสรุปที่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ห้วงศ์วานวิวัฒนาการที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 9 เทียบกับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ดังแสดงในภาพที่ 5



ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 5 ที่คัดเลือกได้เมื่อวิเคราะห์ตามวิธี API Skill bacterial identification

ปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบ	ผลการวิเคราะห์
การย้อมแกรม (gram stain)	แกรมบวก, รูปร่างกลม
การทดสอบปฏิกิริยาเอนไซม์คะแทเลส (catalase test)	+
ดี-กลูโคส (D-glucose)	+
ดี-ฟรุคโทส (D-fructose)	+
ดี-แมนโนส (D-mannose)	-
ดี-มอลโตส (D-maltose)	+
ดี-แลคโตส (D-lactose)	-
ดี-ทรีฮาโรส (D-trehalose)	+
ดี-แมนนิทอล (D-mannitol)	+
ไซลิตอล (xylitol)	-
ดี-เมลลิโบส (D-melibiose)	-
การทดสอบไนเตรท (Nitrate test)	-
อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase)	-
การทดสอบวีพี (VP test)	+
ดี-แรฟฟิโนส (D-raffinose)	-
ดี-ไซโลส (D-xylose)	-
ดี-แซคคาโรส (D-saccharose)	+
เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside)	-
เอ็น-อะซีทิล-กลูโคซามีน (N-acetyl-glucosamine)	-
แอล-อาร์จินีน (L-arginine)	+
การทดสอบยูเรีย (Urea test)	+
ผลสรุป	<i>Staphylococcus warneri</i> (ความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ร้อยละ 97.4)

หมายเหตุ - หมายถึงให้ผลลบ  
+ หมายถึงให้ผลบวก



ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ห้วงศ์วานวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 5 ที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเล โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันยีนอนุรักษ์ 16S rRNA เทียบกับแบคทีเรียในกลุ่มที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน ตัวเลขที่ระบุถัดจากจุดแยกของกิ่งเป็นค่าร้อยละความเชื่อมั่นของการวิเคราะห์ซึ่งจะแสดงเมื่อมีค่ามากกว่าร้อยละ 70 จากการวิเคราะห์ฐานราก (bootstrap analysis) จำนวน 1000 ครั้ง ระยะห่างทางวิวัฒนาการ (evolutionary distances) คำนวณโดยใช้วิธี Kimura 2-parameter และอยู่ในหน่วยจำนวนของเบสที่เปลี่ยนไปต่อตำแหน่ง

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 9 ที่คัดเลือกได้เมื่อวิเคราะห์ตามวิธี API Skill bacterial identification

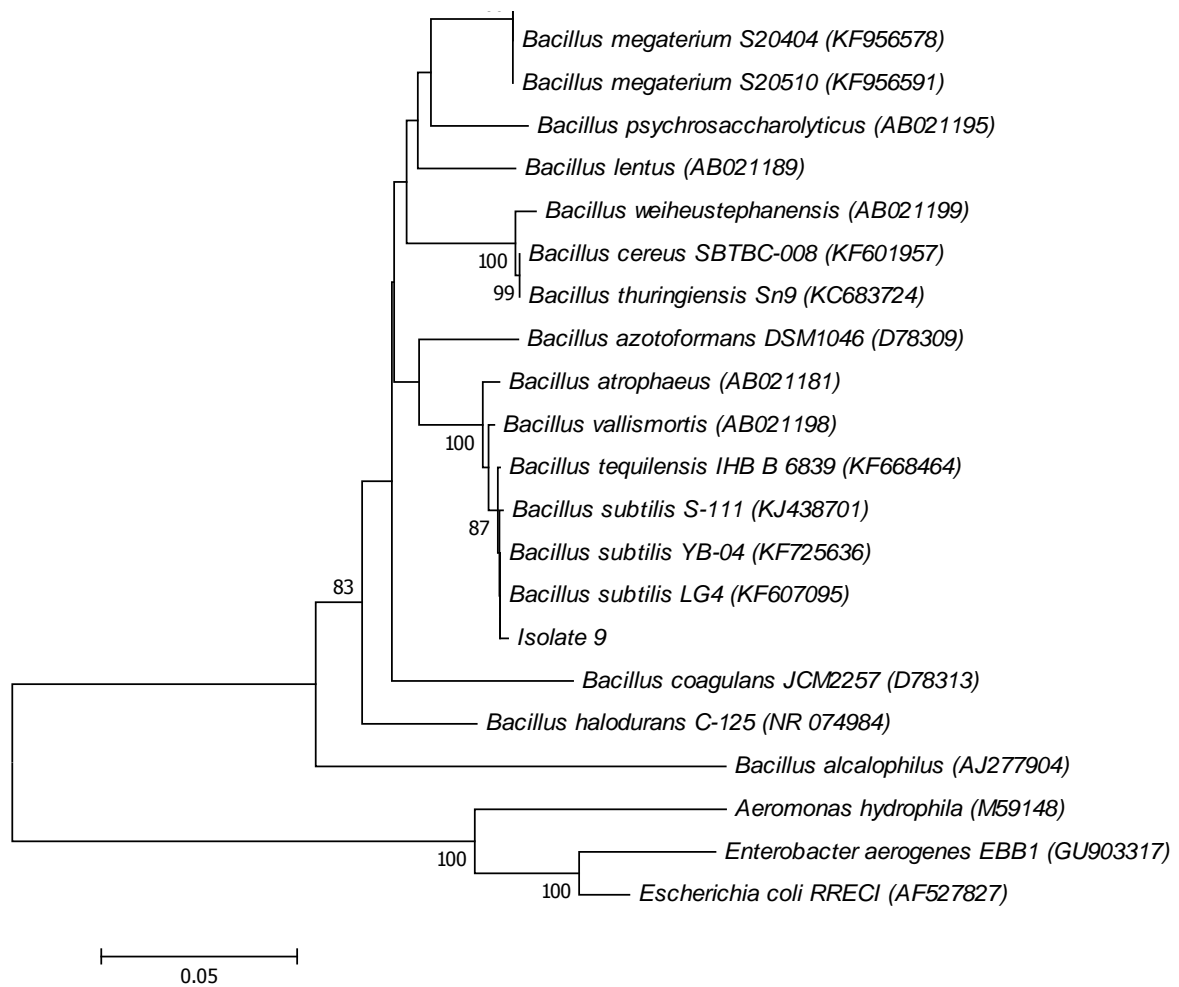
ปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบ	ผลการวิเคราะห์
การย้อมแกรม (gram stain)	แกรมบวก, รูปร่างท่อน
การทดสอบปฏิกิริยาเอนไซม์คะตะเลส (catalase test)	+
กลีเซอรอล (glycerol)	+
อีริทริทอล (erythritol)	-
ดี-อะราบีโนส (D-arabinose)	-
แอล-อะราบีโนส (L-arabinose)	+
ดี-ไรโบส (D-ribose)	+
ดี-ไซโลส (D-xylose)	-
แอล-ไซโลส (L-xylose)	-
ดี-อะโดนิทอล (D-adonitol)	-
เมทิล-เบต้า-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (methyl- $\beta$ -D-xylopyranoside)	-
ดี-กาแลกโทส (D-galactose)	+
ดี-กลูโคส (D-glucose)	+
ดี-ฟรุคโทส (D-fructose)	+
ดี-แมนโนส (D-mannose)	+
แอล-ซอร์โบส (L-sorbose)	-
แอล-รามโนส (L-rhamnose)	-
คูซิทอล (ducitol)	-
อินอซิทอล (inositol)	+
ดี-แมนนิทอล (D-mannitol)	+
ดี-ซอร์บิทอล (D-sorbitol)	+
เมทิล-แอลฟา-ดี-แมนโนไพราโนไซด์ (methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside)	-
เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside)	+
เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine)	-
อะไมดาลิน (amygdalin)	+
อาบูติน (arbutin)	+
เอสคูลิน เฟอริก ซิเตรท (esculin ferric citrate)	+
ซาลิซิน (salicin)	+

หมายเหตุ - หมายถึงให้ผลลบ  
+ หมายถึงให้ผลบวก

ตารางที่ 4 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 9 ที่คัดเลือกได้เมื่อวิเคราะห์ตามวิธี API Skill bacterial identification

ปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบ	ผลการวิเคราะห์
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)	-
อะไมโดนจากแป้ง (Amidon; starch)	+
ไกลโคเจน (glycogen)	+
ไซลิตอล (xylitol)	-
เจนทิโอไบโอส (gentiobiose)	-
ดี-ทูรานอส (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 2-คีโตกลูโคเนต (potassium 2-ketogluconate)	-
โพแทสเซียม 5-คีโตกลูโคเนต (potassium 5-ketogluconate)	-
ผลสรุป	<i>Bacillus subtilis</i> (ความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ร้อยละ 98.6)

หมายเหตุ - หมายถึงให้ผลลบ  
+ หมายถึงให้ผลบวก



ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ห้วงศ์วานวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 9 ที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเล โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันยีนอนุรักษ์ 16S rRNA เทียบกับแบคทีเรียในกลุ่มที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน ตัวเลขที่ระบุถัดจากจุดแยกของกิ่งเป็นค่าร้อยละความเชื่อมั่นของการวิเคราะห์ซึ่งจะแสดงเมื่อมีค่ามากกว่าร้อยละ 70 จากการวิเคราะห์ฐานราก (bootstrap analysis) จำนวน 1000 ครั้ง ระยะห่างทางวิวัฒนาการ (evolutionary distances) คำนวณโดยใช้วิธี Kimura 2-parameter และอยู่ในหน่วยจำนวนของเบสที่เปลี่ยนไปต่อตำแหน่ง

### 4.3 การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Staphylococcus saprophyticus*

#### 4.3.1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus*

เลี้ยง *S. saprophyticus* ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าต่อเนื่องที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเก็บส่วนใสซึ่งคือส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสตั้งต้น (crude protease) มาทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็น

ลำดับชั้น ดังนี้ ร้อยละเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 0-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70 และ 70-80 พบว่า เอนไซม์โปรติเอสของ *S. saprophyticus* ตกตะกอนมากที่สุด ที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัวร้อยละ 70-80 โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 41 เท่า (ตารางที่ 5) ทำการปั่นเก็บตะกอนโปรตีนที่ได้ที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาทำการไดอะไลซิส (dialysis) โดยละลายตะกอนโปรตีนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าพีเอช 7.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบรรจุลงในถุงไดอะไลซิส ทำการไดอะไลซิสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ปริมาตร 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งจะเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ทุก 4 ชั่วโมง เป็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอนไซม์ ก่อนที่จะทำเข้มข้นด้วยการทำอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) ที่มีมวลโมเลกุลคัตกรอง 15 กิโลดาลตัน นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นไปทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบคัดกรองขนาด (gel-permeable column chromatography) ที่บรรจุ Sephadex G-75 เป็นเรซิน (resin) คัตกรอง ได้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 70 เท่า ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์ SDS-PAGE ผลการทดลองพบเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 6

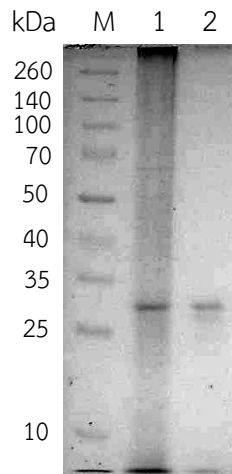
#### 4.3.2 การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus*

##### 4.3.2.1 ผลของค่าพีเอชต่อแอกติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส

การวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus* ที่ค่าพีเอชต่างกัน พบว่า เอนไซม์โปรติเอสสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอะโซเคซีนโดยแสดงค่าแอกติวิตีมากกว่าครึ่งได้ทุกค่าพีเอชตั้งแต่ 3 ถึง 12 ซึ่งพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อยู่ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11.0 ดังแสดงในภาพที่ 7 ก สำหรับการศึกษาผลของค่าพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยทำการบ่มสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่างกันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์ยังคงสามารถรักษาความเสถียรได้มากกว่าร้อยละ 80 ที่ค่าพีเอชในช่วงกว้าง ตั้งแต่ 3-12 (ภาพที่ 7ข)

ตารางที่ 5 ตารางสรุปการบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus*

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	แอกติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อ มิลลิกรัม)	จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์	ร้อยละคงเหลือ
สารละลายเอนไซม์โปรติเอสตั้งต้น	20,600.64	2.49	8,273.35	1	100
การตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว ร้อยละ 70-80	1,446.99	0.0043	336,509.30	40.67	7.02
โครมาโทกราฟีแบบคัดกรองขนาด Sephadex G-75	2,378.32	0.0041	580,078.05	70.11	11.55



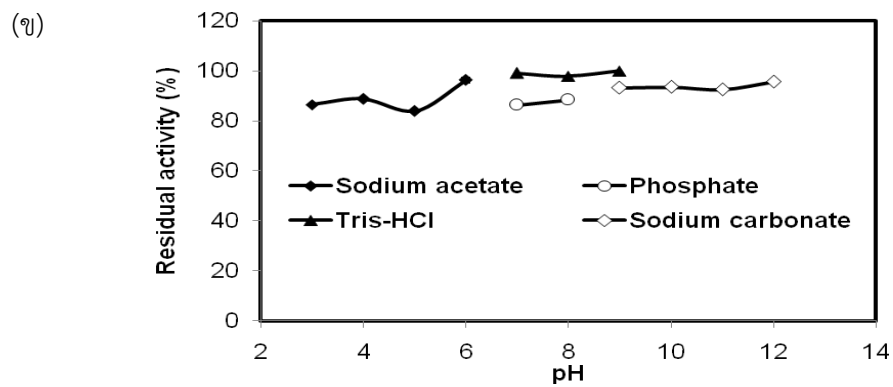
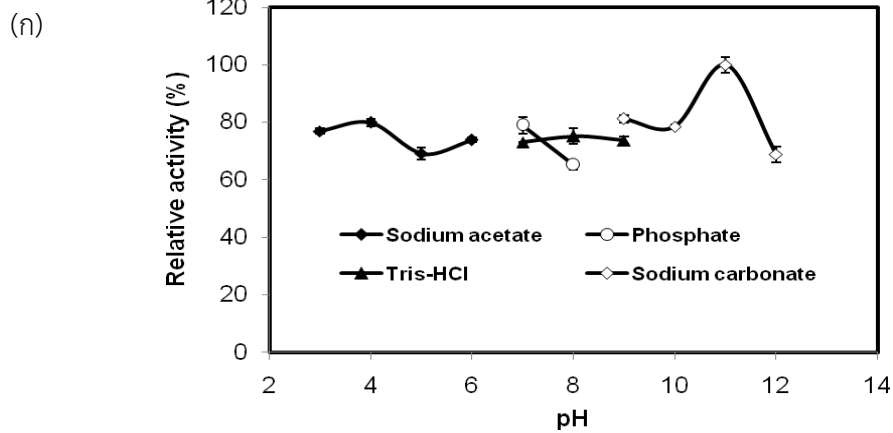
ภาพที่ 6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus* โดยเทคนิค SDS-PAGE กำหนดให้ช่อง M คือ โปรตีนมาตรฐาน, ช่อง 1 คือ สารละลายโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัวร้อยละ 70-80 และการไดอะไลซิส, ช่อง 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบคัดกรองขนาด Sephadex G-75

#### 4.3.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส

การวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิต่างกัน เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus* สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ในอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 10-80 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 8ก เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิสูงต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ในทุกอุณหภูมิที่ทำการศึกษา เอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus* ยังคงรักษาแอกติวิตีของเอนไซม์ได้มากกว่าครึ่ง เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ในทุกค่าอุณหภูมิเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงเหลือแอกติวิตีมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อทำการบ่มต่อเนื่องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 8ข

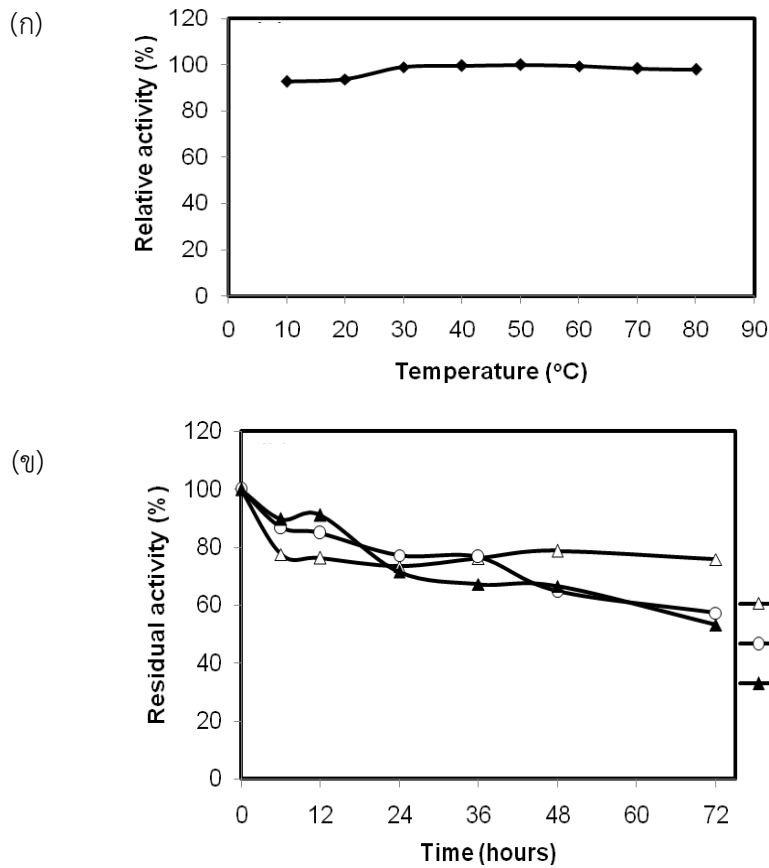
#### 4.3.2.3 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การศึกษาคความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิด พบว่าการบ่มเอนไซม์ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว คือ เบนซีน เฮกเซน เฮปเทน เดคเคน และเฮกซาเดคเคน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ไม่ส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus* ขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วจะส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางส่วน แต่ในสภาวะดังกล่าวเอนไซม์โปรติเอสยังคงรักษาแอกติวิตีไว้ได้มากกว่าครึ่ง ดังแสดงในตารางที่ 6



ภาพที่ 7 ผลของค่าพีเอชต่อการทำงาน (ก) และความเสถียร (ข) ของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *S. saprophyticus* ทำการติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่ค่าพีเอชต่างกัน ระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ อะซิเตท (ค่าพีเอช 3.0-6.0, สัญลักษณข้าวหลามตัดทึบ), ฟอสเฟต (ค่าพีเอช 7.0-8.0, สัญลักษณวงกลมเปิด), ทริสไฮโดรคลอริก (ค่าพีเอช 7.0-9.0, สัญลักษณสามเหลี่ยมทึบ) และ คาร์บอเนท (ค่าพีเอช 9.0-12.0, สัญลักษณข้าวหลามตัดเปิด) สำหรับการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์จะวัดแอกติวิตีของเอนไซม์คงเหลือหลังจากบ่มที่ค่าพีเอชต่างกันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้ผลการทดลองที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดเทียบเป็นร้อยละ 100





ภาพที่ 8 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงาน (ก) และความเสถียร (ข) ของเอนไซม์โปรตีนเอสบริสุทธิจาก *S. saprophyticus* ทำการติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอนเนท ค่าพีเอช 11.0 ที่อุณหภูมิต่างกันตั้งแต่ 10-80 องศาเซลเซียส สำหรับการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์จะวัดแอกติวิตีของเอนไซม์คงเหลือหลังจากบ่มที่อุณหภูมิต่างกันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้ผลการทดลองที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดเทียบเป็นร้อยละ 100

ตารางที่ 6 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *S. saprophyticus*

ตัวทำละลายอินทรีย์	$\log P_{o/w}$	ร้อยละแอกติวิตีคงเหลือ*
ชุดควบคุม (ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์)	-	100
เมทานอล	-0.8	58
เอทานอล	-0.24	60
ไอโซโพรพานอล	0.05	56
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	1.1	85
เบนซีน	2.0	94
เฮกเซน	3.6	93
เฮปเทน	4.0	95
เดคเคน	5.6	93
เฮกซาเดคเคน	8.8	97

\*ค่าแอกติวิตีที่วัดได้มาจากการบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ต่างกันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

#### 4.3.2.4 ผลของสารเคมีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การติดตามการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีไอออนโลหะชนิดต่างกัน เป็นระยะเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า การบ่มเอนไซม์ในสภาวะที่มีโลหะไอออน  $\text{Na}^+$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไม่ส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ขณะที่  $\text{Ba}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$   $\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{Hg}^{2+}$  ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย ซึ่งให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกันกับตัวยับยั้ง EDTA, DTT และ PMSF (ตารางที่ 7)

#### 4.3.2.5 ผลของดีเทอร์เจนท์ สารออกซิไดส์ และสารฟอกขาวต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

เมื่อทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีดีเทอร์เจนท์และสารออกซิไดส์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่า ไม่ส่งผลยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสของ *S. saprophyticus* ดังแสดงในตารางที่ 8 ซึ่งให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกันกับในสภาวะที่มีสารฟอกขาว และเมื่อติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีสารฟอกขาวความเข้มข้นสูงขึ้นไปพบว่า แอกติวิตีของเอนไซม์มีค่าลดลงตามความเข้มข้นของสารฟอกขาวที่เพิ่มขึ้น แต่เอนไซม์ยังคงเร่งปฏิกิริยาได้มากกว่าร้อยละ 70 เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีสารฟอกขาวความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ยกเว้นสารฟอกขาว sodium carboxymethyl cellulose ดังสรุปในตารางที่ 9

#### 4.3.2.6 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอส

การทดสอบความจำเพาะกับสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus* พบว่าเอนไซม์ชอบที่จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทสังเคราะห์ที่เป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีประจุ L-leucine-p-nitroanilide และ L-alanine-p-nitroanilide มากกว่าสับสเตรทที่เป็นไดเพปไทด์และกรดอะมิโนที่มีประจุ ดังแสดงในภาพที่ 9 ตารางที่ 7 ผลของไอออนโลหะและตัวยับยั้งต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *S. saprophyticus*

ไอออนโลหะและตัวยับยั้ง	ร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์*		
	6 ชม.	24 ชม.	48 ชม.
ชุดควบคุม (ไม่มีไอออนโลหะหรือตัวยับยั้ง)	100	100	100
Na <sup>+</sup>	104	100	100
Ba <sup>2+</sup>	100	95	96
Ca <sup>2+</sup>	100	84	144
Mg <sup>2+</sup>	97	93	96
Hg <sup>2+</sup>	90	86	81
EDTA	107	94	94
DTT	94	95	98
PMSF	100	99	92

\* ค่าแอกติวิตีที่วัดได้มาจากการบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีไอออนโลหะและตัวยับยั้งชนิดต่างกัน ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 8 ผลของดีเทอร์เจนต์และสารออกซิไดส์ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *S. saprophyticus*

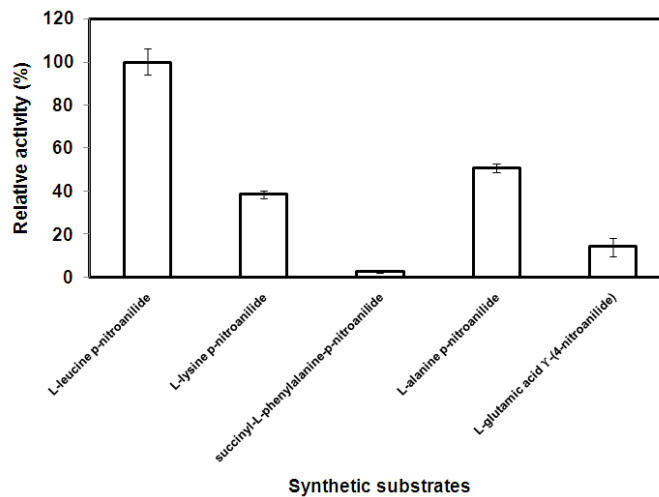
ดีเทอร์เจนต์และสารออกซิไดส์	ร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์*
ชุดควบคุม (ไม่มีดีเทอร์เจนต์และสารออกซิไดส์)	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	137
SDS	100
Triton X-100	102
Tween 80	97

\* ค่าแอกติวิตีที่วัดได้มาจากการบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีดีเทอร์เจนต์และสารออกซิไดส์ชนิดต่างกัน ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนัก (ปริมาตร) ต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 9 ผลของสารฟอกขาวต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *S. saprophyticus*

สารฟอกขาว	ร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์*		
	ร้อยละ 1	ร้อยละ 5	ร้อยละ 10
ชุดควบคุม (ไม่มีสารฟอกขาว)	100	100	100
Nitriloriacetic acid trisodium salt monohydrate	103	107	100
Sodium dihydrogen orthophosphate monohydrate	100	94	80
Sodium carbonate anhydrous	93	90	93
Sodium carboxymethyl cellulose	60	55	52
Sodium perborate	106	105	91
Sodium perborate tetrahydrate	100	95	71
Sodium pyrophosphate tetrabasic	109	110	83
Sodium <i>p</i> -toluene sulfonate	107	102	75
Sodium silicate	103	92	84
Sodium tripolyphosphate	103	94	80
Sodium xylenesulfonate	99	96	77
Zeolite	108	100	88

\* ค่าแอกติวิตีที่วัดได้มาจากการบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีสารฟอกขาวชนิดต่างกัน ความเข้มข้นร้อยละ 1, 5 และ 10 (น้ำหนัก (ปริมาตร) ต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *S. saprophyticus*

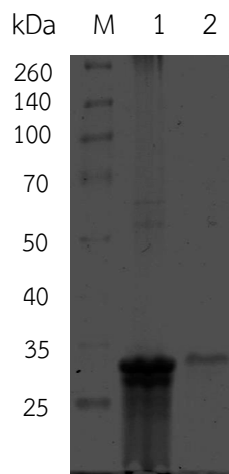
#### 4.4 การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis*

##### 4.4.1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis*

เมื่อนำส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสตั้งต้นของ *B. subtilis* มาทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็นลำดับขั้นจาก 0-30 ถึง 80-90 พบว่าเอนไซม์โปรติเอสตกตะกอนได้มากที่สุด ที่ความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 80-90 โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.5 เท่า (ตารางที่ 10) นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาทำการไตอะไลซิสและทำเข้มข้นด้วยการทำอัลตราฟิลเตรชัน ที่มีมวลโมเลกุลคัตกรอง 15 กิโลดาลตัน ต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบคัตกรอง Sephadex G-75 ได้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 14.36 เท่า นำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์ SDS-PAGE พบเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 10

ตารางที่ 10 ตารางสรุปการบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis*

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	แอกติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อ มิลลิกรัม)	จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์	ร้อยละคงเหลือ
สารละลายเอนไซม์โปรติเอสตั้งต้น	26,455	1.39	19,032	1	100
การตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ร้อยละ 80-90	143	0.001	143,000	7.51	0.54
โครมาโทกราฟีแบบคัตกรองขนาด Sephadex G-75	1,093	0.004	273,250	14.36	4.13



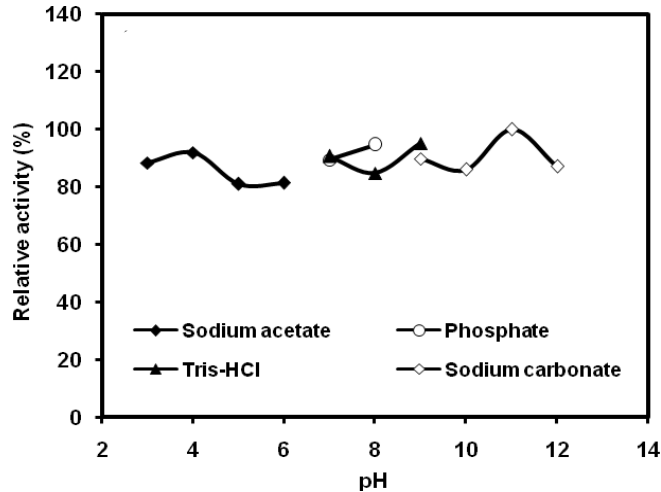
ภาพที่ 10 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* โดยเทคนิค SDS-PAGE กำหนดให้ช่อง M คือ โปรตีนมาตรฐาน, ช่อง 1 คือ สารละลายโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 80-90 และการไตอะไลซิส, ช่อง 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบคัตกรองขนาด Sephadex G-75

#### 4.4.2 การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis*

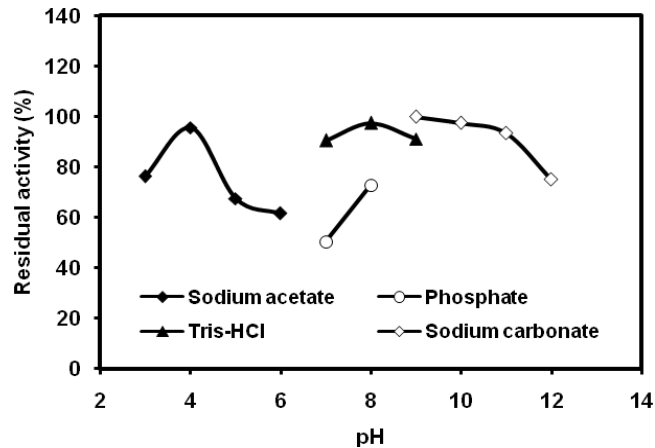
##### 4.4.2.1 ผลของค่าพีเอชต่อแอกติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส

การหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ของ *B. subtilis* พบเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอะซิเคซีนได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11.0 (ภาพที่ 11ก) และมีความเสถียรเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ค่าพีเอชในช่วงต่างตั้งแต่ 7.0-11.0 ดังแสดงในภาพที่ 11ข

(ก)



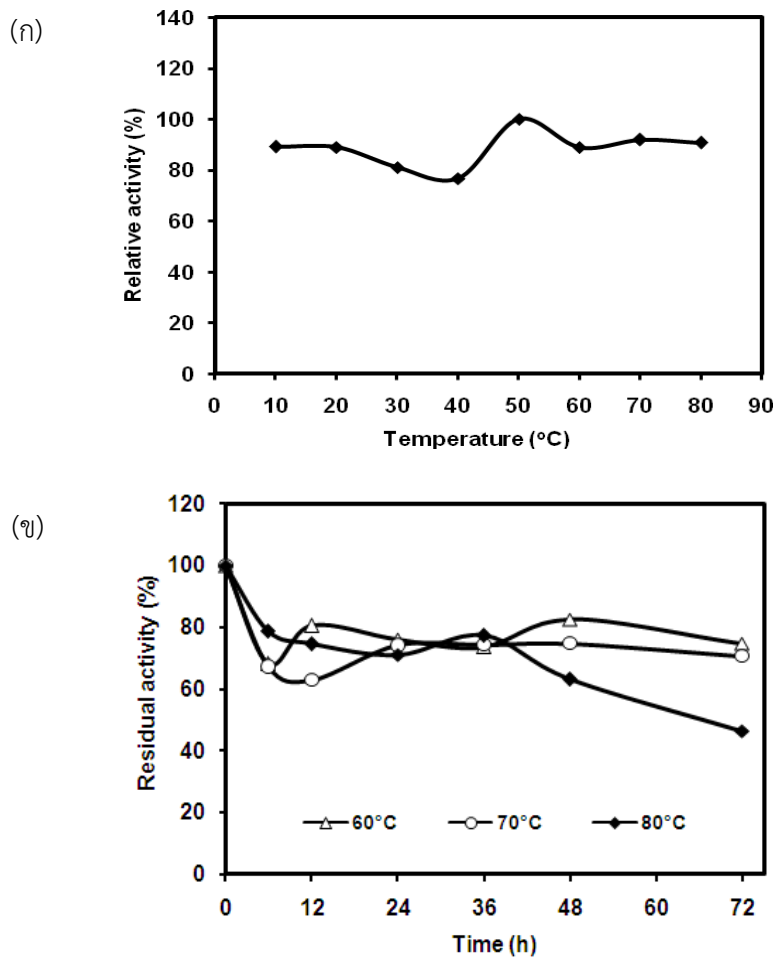
(ข)



ภาพที่ 11 ผลของค่าพีเอชต่อการทำงาน (ก) และความเสถียร (ข) ของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *B. subtilis* ทำการติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่ค่าพีเอชต่างกัน ระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ อะซิเตท (ค่าพีเอช 3.0-6.0, สัญลักษณ์ข้าวหลามตัดทึบ), ฟอสเฟต (ค่าพีเอช 7.0-8.0, สัญลักษณ์วงกลมเปิด), ทริสไฮโดรคลอริก (ค่าพีเอช 7.0-9.0, สัญลักษณ์สามเหลี่ยมทึบ) และ คาร์บอเนต (ค่าพีเอช 9.0-12.0, สัญลักษณ์ข้าวหลามตัดเปิด) สำหรับการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์จะวัดแอกติวิตีของเอนไซม์คงเหลือหลังจากบ่มที่ค่าพีเอชต่างกันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้ผลการทดลองที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดเทียบเป็นร้อยละ 100

#### 4.4.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* พบว่าเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้มากกว่าร้อยละ 80 ในช่วงอุณหภูมิกว้าง ตั้งแต่ 10-80 องศาเซลเซียส และทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 12ก) เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิสูงต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* ยังคงรักษาแอกติวิตีของเอนไซม์ได้มากกว่าร้อยละ 80 เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ในที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงเหลือแอกติวิตีมากกว่าร้อยละ 60 เมื่อทำการบ่มต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะสูญเสียแอกติวิตีเหลือเพียงร้อยละ 40 ในเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 12ข



ภาพที่ 12 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงาน (ก) และความเสถียร (ข) ของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *B. subtilis* ทำการติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอนเท ค่าพีเอช 11.0 ที่อุณหภูมิต่างกันตั้งแต่ 10-80 องศาเซลเซียส สำหรับการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์จะวัดแอกติวิตีของเอนไซม์คงเหลือหลังจากบ่มที่อุณหภูมิต่างกันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้ผลการทดลองที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงที่สุดเทียบเป็นร้อยละ 100

#### 4.4.2.3 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* มีความเสถียรในตัวทำละลายที่ไม่มีขี้ คือ เบนซีน เฮกเซน เฮปเทน เดคเคน และเฮกซาเดคเคน ได้นานถึง 72 ชั่วโมง ขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขี้ส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไปครึ่งหนึ่ง ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *B. subtilis*

ตัวทำละลายอินทรีย์	log P <sub>o/w</sub>	ร้อยละแอกติวิตีคงเหลือ*				
		6 ชม.	12 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.
ชุดควบคุม (ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์)	-	100	100	100	100	100
เมทานอล	-0.8	63	59	56	50	50
เอทานอล	-0.24	63	68	60	57	53
ไอโซโพรพานอล	0.05	55	54	54	53	52
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	1.1	95	93	92	87	84
เบนซีน	2.0	100	98	97	89	89
เฮกเซน	3.6	148	100	98	97	92
เฮปเทน	4.0	99	98	97	96	90
เดคเคน	5.6	105	99	95	95	94
เฮกซาเดคเคน	8.8	102	101	100	99	95

\*ค่าแอกติวิตีที่วัดได้มาจากการบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ต่างกันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

#### 4.4.2.4 ผลของสารเคมีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

การบ่มเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* ในสภาวะที่มีโลหะไอออนและตัวยับยั้งต่างกัน เป็นเวลาต่างกันพบว่า ไอออนโลหะทุกชนิดส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย ขณะที่ตัวยับยั้ง EDTA, DTT และ PMSF ส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ประมาณร้อยละ 20 เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 12



ตารางที่ 12 ผลของไอออนโลหะและตัวยับยั้งต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *B. subtilis*

ไอออนโลหะและตัวยับยั้ง	ร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์*				
	1 ชม.	6 ชม.	12 ชม.	24 ชม.	48 ชม.
ชุดควบคุม (ไม่มีไอออนโลหะหรือตัวยับยั้ง)	100	100	100	100	100
Na <sup>+</sup>	99	92	91	85	85
Ba <sup>2+</sup>	97	93	93	87	83
Ca <sup>2+</sup>	98	92	92	92	87
Mg <sup>2+</sup>	103	101	93	93	90
Hg <sup>2+</sup>	105	97	87	85	77
EDTA	95	91	85	82	76
DTT	105	99	93	93	88
PMSF	104	93	86	75	58

\* ค่าแอกติวิตีที่วัดได้มาจากการบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีไอออนโลหะและตัวยับยั้งชนิดต่างกัน ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่เวลาต่างกัน

#### 4.4.2.5 ผลของดีเทอร์เจนท์ สารออกซิไดส์ และสารฟอกขาวต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

ดีเทอร์เจนท์และสารออกซิไดส์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตรต่อปริมาตร) ไม่ส่งผลยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* ดังแสดงในตารางที่ 13 ซึ่งให้ผลในการทำงานเดียวกันกับในสภาวะที่มีสารฟอกขาวชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตรต่อปริมาตร) และเมื่อติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีสารฟอกขาวความเข้มข้นสูงขึ้นไปพบว่า แอกติวิตีของเอนไซม์จะมีค่าลดลงตามความเข้มข้นของสารฟอกขาวที่เพิ่มขึ้น แต่เอนไซม์ยังคงเร่งปฏิกิริยาได้มากกว่าร้อยละ 70 และร้อยละ 50 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารฟอกขาวเป็นร้อยละ 5 และร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ ดังสรุปในตารางที่ 14

ตารางที่ 13 ผลของดีเทอร์เจนท์และสารออกซิไดส์ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *B. subtilis*

ดีเทอร์เจนท์และสารออกซิไดส์	ร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์*
ชุดควบคุม (ไม่มีดีเทอร์เจนท์และสารออกซิไดส์)	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	120
SDS	100
Triton X-100	102
Tween 80	97

\* ค่าแอกติวิตีที่วัดได้มาจากการบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีดีเทอร์เจนท์และสารออกซิไดส์ชนิดต่างกัน ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนัก (ปริมาตร) ต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

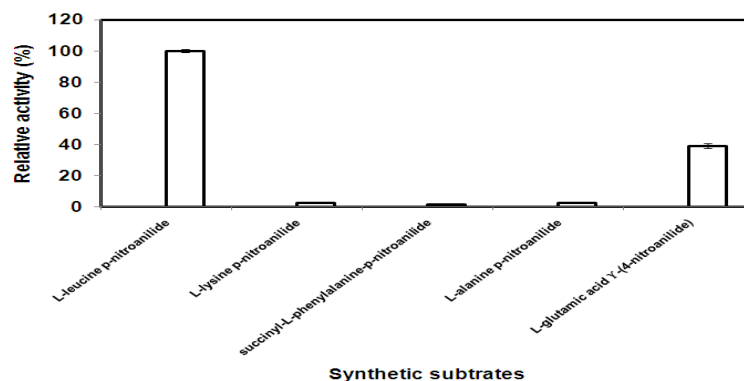
ตารางที่ 14 ผลของสารฟอกขาวต่อแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *B. subtilis*

สารฟอกขาว	ร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์*		
	ร้อยละ 1	ร้อยละ 5	ร้อยละ 10
ชุดควบคุม (ไม่มีสารฟอกขาว)	100	100	100
Nitriloriacetic acid trisodium salt monohydrate	107	92	82
Sodium dihydrogen orthophosphate monohydrate	95	75	50
Sodium carbonate anhydrous	117	101	90
Sodium carboxymethyl cellulose	72	70	70
Sodium perborate tetrahydrate	116	88	70
Sodium percarbonate	95	86	68
Sodium pyrophosphate tetrabasic	110	80	59
Sodium <i>p</i> -toluene sulfonate	102	71	53
Sodium silicate	103	102	92
Sodium tripolyphosphate	94	73	51
Sodium xylenesulfonate	96	77	53
Zeolite	108	77	56

\* ค่าแอกติวิตีที่วัดได้มาจากการบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีสารฟอกขาวชนิดต่างกัน ความเข้มข้นร้อยละ 1, 5 และ 10 (น้ำหนัก (ปริมาตร) ต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

#### 4.4.2.6 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอส

การทดสอบความจำเพาะกับสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus* พบว่าเอนไซม์ชอบที่จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทสังเคราะห์ที่เป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว L-leucine-*p*-nitroanilide มากกว่าสับสเตรทที่เป็นไดเพปไทด์และกรดอะมิโนที่มีประจุ ดังแสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *B. subtilis*

## บทที่ 5

### อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

การฟอกหนังเป็นอุตสาหกรรมที่มีการปลดปล่อยสารปนเปื้อนที่ย่อยสลายทางชีวภาพได้ต่ำออกมากับน้ำทิ้งระหว่างกระบวนการฟอกหนังจำนวนมากและนำไปสู่ปัญหาในการกำจัด หนึ่งในของเสียหลักที่มีการปลดปล่อยออกมาก็คือสารอินทรีย์ เช่น โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ที่ปลดปล่อยออกซิเจนที่ละลายน้ำของแหล่งน้ำใกล้เคียง ซึ่งยังไม่สามารถกำจัดได้อย่างสมบูรณ์ด้วยวิธีทางกายภาพ-เคมี และวิธีการทางชีวภาพ หรือใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะสร้างท่อบำบัดน้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการฟอกหนัง เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการกำจัดสารปนเปื้อนที่เกิดจากกระบวนการฟอกหนังเป็นอันดับหนึ่ง ในปี 1 ของโครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีศักยภาพสูง เพื่อนำมาใช้เป็นวัสดุร่วมสำหรับการสร้างท่อบำบัดน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังต่อไป จากข้อเท็จจริงที่ว่าในเวทวิทย์ได้ทะเลเป็นสภาวะที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงที่ประกอบด้วยเกลือความเข้มข้นสูง ความดันของน้ำ และอาจพบการปนเปื้อนของโลหะหนัก ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ใต้ทะเลจึงต้องสามารถปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่แปรปรวนแบบนี้ได้ และหากแบคทีเรียสามารถผลิตสารตัวกลางหรือเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการนำไปดำรงชีพก็น่าจะมีสมบัติที่น่าสนใจซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพได้หลากหลาย ดังเช่น เคยมีรายงานพบแบคทีเรียใต้ทะเล *Bacillus subtilis* ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนต่อความเข้มข้นเกลือสูงได้ (Maruthiah et al., 2013) หรือการพบ *B. cereus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้ (Shah et al., 2010)

เมื่อนำตัวอย่างตะกอนทะเลที่ระดับความลึก 9 เมตรและ 24 เมตร จากบริเวณเกาะจาน เขตแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ที่อาจมีการปนเปื้อนจากของเสียและสารพิษที่ปล่อยมาจากนิคมอุตสาหกรรมที่รายล้อมมาทำการคัดเลือกแบคทีเรียใต้ทะเล พบแบคทีเรียที่มีความแตกต่างของลักษณะโคโลนีปรากฏเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าและสามารถยับเอนไซม์โปรติเอสออกมานอกเซลล์ จากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยการเลี้ยงในอาหารแข็งสกีมมิลค์ ที่มีส่วนประกอบของโปรตีนเคซีนจากนม ที่อาศัยหลักการที่ว่าถ้าเซลล์แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมานอกเซลล์ได้ จะต้องไฮโดรไลซ์โปรตีนเคซีนในอาหารเลี้ยงได้เป็นเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระที่จะมองเห็นเป็นบริเวณใสรอบโคโลนีของแบคทีเรีย (<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1176/protease>) จำนวน 2 ไอโซเลท เมื่อยืนยันผลการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสับสเตรทอะโซเคซีน พบว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสสูงประมาณ 6-7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ด้วยเหตุนี้จึงเลือกแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมาทำการระบุชนิดตามวิธี API Skill bacterial identification และลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16S rRNA ต่อไป ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้คือ *Staphylococcus saprophyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียทั่วไปที่พบในปัสสาวะของมนุษย์ (Hovelius and Mårdh, 1984) และ *Bacillus subtilis* ที่เคยมีรายงานวิจัยคล้ายกันของ Das และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก

ชายฝั่งทะเลเบงกอลตะวันตก ประเทศอินเดีย พบ *Bacillus* จำนวน 3 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ คือ *B. cereus*, *B. pumilus* และ *B. cibi*

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *S. saprophyticus* พบว่า เอนไซม์โปรติเอสตกตะกอนได้ดีในช่วงความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 70-80 โดยให้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 41 เท่า แต่มีค่าร้อยละเอนไซม์คงเหลือเพียง 7.02 ปริมาณเอนไซม์คงเหลือที่น้อยมากนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์สูญเสียแอกติวิตีหลังจากการทำไดอะไลซิส ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเอนไซม์อาจต้องการไอออนขนาดเล็กที่สามารถสูญเสียไปได้จากการทำไดอะไลซิสช่วยในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสในแบคทีเรีย (Sana et al., 2006; Haddar et al., 2009) เมื่อนำสารละลายโปรตีนที่ผ่านการไดอะไลซิสมาทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบคัดกรองขนาด Sephadex G-75 ได้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 70 เท่า และมีเอนไซม์คงเหลือร้อยละ 12 เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรติเอส โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus* มีขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน สำหรับการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสที่ขับออกจากเซลล์ของ *Bacillus subtilis* พบว่าสามารถทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ได้ในวิธีที่คล้ายกัน คือการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 80-90 และคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบคัดกรองขนาด Sephadex G-75 ซึ่งให้ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 14 เท่า และเหลือปริมาณโปรตีนคงเหลือประมาณร้อยละ 4 ซึ่งให้ขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์บริสุทธิ์ประมาณ 30 กิโลดาลตัน

การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *S. saprophyticus* พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ในค่าพีเอชช่วงกว้างตั้งแต่ 3.0 ถึง 12.0 โดยแสดงค่าแอกติวิตีสูงสุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11.0 และมีความเสถียรเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในช่วงพีเอชระหว่าง 3.0-12.0 คุณลักษณะดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ในค่าพีเอชช่วงกว้างที่แตกต่างจากเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากแบคทีเรียชนิดอื่น การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 10-90 องศาเซลเซียส โดยแสดงแอกติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าแอกติวิตีอย่างมีนัยสำคัญจนถึงที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรเป็นเวลา 72 ชั่วโมงในช่วงอุณหภูมิสูงตั้งแต่ 60-80 องศาเซลเซียส ในงานวิจัยก่อนหน้าเคยมีรายงานพบเอนไซม์โปรติเอสจาก *Staphylococcus* sp. มีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส และเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่มักมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานในช่วง 30-50 องศาเซลเซียส (Houmard and Drapeau, 1972; Akram et al., 2014; Shaw et al., 2005) ดังนั้นความสามารถในการทำงานในค่าพีเอชและอุณหภูมิช่วงกว้าง รวมทั้งความเสถียรของเอนไซม์ในสภาวะดังกล่าวส่งผลให้เอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus* สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมได้ (Bhunja et al., 2013; Iyer and Ananthanarayan, 2008)

สำหรับค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* คือ ค่าพีเอช 11.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ยังคงรักษาความเสถียรได้ดีเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในช่วงค่าพีเอชเป็นต่าง ระหว่าง 8.0-11.0 และยังคงทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงตั้งแต่ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จึงสามารถจัดเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* ให้อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic protease) และเป็นแอลคาลิฟิลิกโปรติเอส (alkaliphilic protease) ที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่ต้องการสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูงในการทำงาน เช่น การผลิตผงซักฟอก (วฑูญฤตา ภูโยthin, 2544) ซึ่งเคย

มีรายงานพบแอลคาไลฟลิคโปรตีนเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* หลายสายพันธุ์ เช่น *B. mojavensis* A21 (Haddar et al., 2010) และ *B. cereus* (Shah et al., 2010) เป็นต้น ผลการทดลองที่ได้ใกล้เคียงกับผลของ เอนไซม์โปรตีนเอสจาก *Bacillus* sp. ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา คือ 37 องศาเซลเซียส (Patel et al., 2006) หรือเอนไซม์โปรตีนเอสของ gamma-Proteobacterium ที่ยังคงรักษาความเสถียรได้ในช่วงอุณหภูมิ 30 - 70 องศาเซลเซียส (Sana et al., 2006)

เมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *S. saprophyticus* และ *B. subtilis* ในสถานะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์พบว่าเอนไซม์โปรตีนเอสจากแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทยังคงรักษาความเสถียรได้ในสถานะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์แบบไม่มีขี้ผึ้ง ขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขี้ผึ้งส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขี้ผึ้งไปรบกวนความสามารถในการจับกันของเอนไซม์และสับสเตรท (Laane et al., 1987) เนื่องจากส่งผลต่อความสามารถในการละลายของเอนไซม์ที่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพไปบางส่วนได้ (Sugihara et al., 1991) นอกจากนี้แอลกอฮอล์สายสั้นๆ ยังมีความสามารถในการละลายที่ต่ำในอะซิโตน ทำให้ไปก่อตัวเป็นชั้นน้ำใหม่ที่ความเข้มข้นปานกลางและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (Shimada et al., 1999) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับเอนไซม์โปรตีนเอสของ *Bacillus* หลายสายพันธุ์ เช่น *Bacillus* sp. (Reddy et al., 2008) และ *B. cereus* (Shah et al., 2010) เป็นที่ทราบกันดีว่าในปัจจุบันมีการนำเอนไซม์โปรตีนเอสมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์เพปไทด์และทางเภสัชกรรมเพิ่มมากขึ้น (Rao et al., 1998; Raval et al., 2014) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เร่งปฏิกิริยาในสถานะที่ไม่มีน้ำ ดังนั้นความเสถียรในสถานะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขี้ผึ้งของเอนไซม์โปรตีนเอสจากแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทจึงเป็นข้อดีที่จะนำเอนไซม์นี้มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมดังกล่าวได้

การศึกษาผลของไอออนโลหะต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์พบว่า การเติมไอออนโลหะลงในปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *S. saprophyticus* ส่งผลเสริมแอกติวิตีของเอนไซม์ ขณะที่การมีไอออนโลหะในปฏิกิริยาไม่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *B. subtilis* ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่เอนไซม์โปรตีนเอสของแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทจะจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์โปรตีนเอสทนโลหะ (metal-tolerant protease) สำหรับความเสถียรของเอนไซม์ในสถานะที่มีไอออน  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  และ  $Hg^{2+}$  นั้น เป็นสมบัติที่ดีต่อการประยุกต์ใช้เอนไซม์เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมการผลิตสารซักล้าง และเป็นไปได้ว่าการจับกันของเอนไซม์กับไอออนโลหะนี้อาจจะช่วยรักษาความเสถียรของโครงสร้างเอนไซม์และช่วยป้องกันการเสียสภาพเมื่อเจอความร้อนได้ (Brockerhoff and Jensen, 1974) ผลการทดลองที่ได้ให้ผลที่คล้ายกันกับเอนไซม์โปรตีนเอสจากแบคทีเรียได้ทะเลกลุ่ม gamma-Proteobacterium ที่มีความเสถียรที่ความเข้มข้นของ  $Na^+$  ร้อยละ 30 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Sana et al., 2006) และเคยมีรายงานว่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีนเอสจะเพิ่มสูงขึ้นในสถานะที่มี  $Ca^{2+}$  ในปฏิกิริยา (Ghorbel et al., 2003) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรตีนเอสมีกรดอะมิโนสำคัญ 3 ตัว คือ เซรีน ฮิสติดีน และแอสปาเตท ซึ่งเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มที่มีขี้ผึ้งหรือมีประจุที่สามารถสร้างสะพานเกลือ (salt bridge) กับเกลือทั้งสองชนิด ทำให้เกิดการส่งถ่ายอิเล็กตรอนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น จึงทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นได้ จากสมบัติในการทนเกลือของเอนไซม์โปรตีนเอสจากแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกหนัง ที่จำเป็นต้องอยู่ในสถานะที่มีความเข้มข้นเกลือสูงได้ การศึกษาผลของสารเคมีต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์พบว่า การเติมไอออนโลหะแบบไดวาเลนต์ (divalent ion) ช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส โดยให้ผลสอดคล้องกับของเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *Bacillus* sp. ที่

แอกติวิตีของเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสถานะที่มี  $Mn^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (Jain et al., 2012) และจากข้อเท็จจริงที่ว่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการเติมไอออนประจุบวกที่มีรัศมีไอออนกว้าง ยกตัวอย่างเช่นการเติม  $Ca^{2+}$  ซึ่งมีขนาดรัศมีไอออนเท่ากับ 0.099 นาโนเมตร สามารถเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. cereus* ได้ (Shah et al., 2010) ในลักษณะเดียวกันการเติม  $Mn^{2+}$  ซึ่งมีขนาดรัศมีไอออนเท่ากับ 0.082 นาโนเมตร ก็อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นได้เช่นกัน

สำหรับผลของการเติมสารยับยั้งคือ PMSF DTT และ EDTA ที่ไม่ส่งผลต่อค่าแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลท ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากธรรมชาติในบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์โปรติเอสที่มีการดอมีนเซรีนเป็นองค์ประกอบ จึงทำให้ทนต่อตัวยับยั้ง PMSF ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของเอนไซม์เซรีนโปรติเอส (Dharmsthiti et al., 1998) และเมื่อเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทอยู่ในสถานะที่มีดีเทอร์เจนท์พบว่า ดีเทอร์เจนท์ชนิดประจุลบ (SDS) และดีเทอร์เจนท์ชนิดไม่มีประจุ (Tween-80 และ Triton X-100) รวมทั้งสารฟอกขาวแทบจะไม่ส่งผลยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์เลยแม้ความเข้มข้นจะสูงถึงร้อยละ 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 ร่วมกับการทำงานได้ดีในสถานะที่เป็นต่าง ประกอบกับการเสริมค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เมื่อเติม  $Ca^{2+}$  และ  $Mn^{2+}$  ที่พบได้มากในน้ำกระด้าง (<http://www.foodnet-worksolution.com/wiki/word/2006/water-hardness>) ของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทนี้จึงทำให้เหมาะที่จะนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอกได้

แม้การศึกษาเอนไซม์โปรติเอสจาก *Staphylococcus* sp. และ *Bacillus* sp. จะมีรายงานมากพอสมควร แต่ยังไม่เคยมีรายงานถึงเอนไซม์โปรติเอสที่มีคุณลักษณะเฉพาะที่น่าสนใจต่อภาคอุตสาหกรรมหลายอย่าง เช่น การทำงานได้ในค่าพีเอชและอุณหภูมิช่วงกว้าง ความเสถียรในสถานะที่มีค่าพีเอชเป็นต่าง ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง ความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ เกลือ โลหะหนัก ดีเทอร์เจนท์ และสารฟอกขาว จึงทำให้เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งสองไอโซเลทที่ทำการศึกษาในโครงการวิจัยนี้มีลักษณะที่น่าสนใจมากกว่าเอนไซม์โปรติเอสที่เคยมีรายงานมาแล้ว และมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำไปต่อยอดประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่างๆ รวมทั้งในการบำบัดน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังได้

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียได้ทะเลที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ 2 ไอโซเลท ซึ่งสามารถระบุชนิดได้คือ *Staphylococcus saprophyticus* และ *Bacillus subtilis* เมื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจาก *S. saprophyticus* ด้วยการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิมัตว์ร้อยละ 70-80 และคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบคัดกรองขนาด Sephadex G-75 พบเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 70 เท่า โดยมีมวลโมเลกุลสัมพัทธ์ประมาณ 28 กิโลดาลตัน เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค SDS-PAGE เอนไซม์ทำงานได้ดีในค่าพีเอชช่วงกว้างคือ ค่าพีเอช 3.0-12.0 และในช่วงอุณหภูมิ 10-80 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรในช่วงค่าพีเอชที่เป็นต่างคือ ค่าพีเอช 6.0-9.0 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และยังคงรักษาความเสถียรได้ในช่วงอุณหภูมิสูง 60-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โลหะไอออน ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ) ไม่ส่งผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ แต่กลับเสริมการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์มีความเสถียรในสภาวะที่มีดีเทอร์เจนท์ เช่น SDS,  $\text{H}_2\text{O}_2$  และ Zeolite รวมทั้งรักษาความเสถียรได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เช่น เบนซีน เฮกเซน เฮกซาเดคเคน อีกด้วย

สำหรับการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* ด้วยการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิมัตว์ร้อยละ 80-90 และคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบคัดกรองขนาด Sephadex G-75 พบเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 14 เท่า และมีขนาดมวลโมเลกุลสัมพัทธ์โดยประมาณเท่ากับ 30 กิโลดาลตัน เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีกับสับสเตรทอะโซเคซีนที่ค่าพีเอช 11.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยมีความเสถียรในค่าพีเอชช่วงต่างคือ ค่าพีเอช 8.0-11.0 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และในช่วงอุณหภูมิสูง 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าตัวยับยั้ง ดีเทอร์เจนท์ และสารฟอกขาว ไม่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ และเอนไซม์ยังคงรักษาความเสถียรได้ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วและโลหะไอออนอีกด้วย

## บรรณานุกรม

- กรมโรงงานอุตสาหกรรม. (2549). คู่มือมาตรฐานการตรวจสอบโรงงานฟอกหนัง. สำนักโรงงานอุตสาหกรรมรายสาขา 2. กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 75 หน้า.
- จิตติมา เจริญพานิช. (2552). หลักการและสภาวะการณ์ปัจจุบันของการสังเคราะห์เพปไทด์. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. ปีที่ 14: 128-137.
- นิตยา เยาว์แสง. (2552). การตรึงโปรตีนเอสบนโคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปราณี อ่านเป็รื่อง. (2543). เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- มยุรฉัตร เอกธรรมกิจ และสุจิตรา ยนต์สิงห์. (2548). การศึกษาเอนไซม์โปรตีนเอสที่สกัดจากถั่วเหลืองหมักชนิดต่างๆ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วาทัญญูตา ภูโยทิน. (2544). การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของโปรตีนเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียชอบเค็ม *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อภิรดี อุดมสิน. (2546). การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตนิวทรัลโปรตีนร้อนจาก *Bacillus cereus*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Adeel, S. S., Wajid, A., Hussain, S., Malik, F., Sami, Z., Ul-Haq, I., Hameed, A., and Channa, R. A. (2012). Recovery of chromium from the tannery wastewater by use of *Bacillus subtilis* in Gujranwala, Pakistan. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2(2): 36-45.
- Akram, M., Shafaat, S., Bukhari, D. A., and Rehman, A. (2014). Characterization of a thermostable alkaline protease from *Staphylococcus aureus* S-2 isolated from chicken waste. Pakistan Journal of Zoology. 46 (4): 1125-1132.
- Aunstrup, K. (1979). Proteinases. Applied Biochemistry and Bioengineering. 2: 49-114.
- Bhunja, B., Basak, B., Mandal, T., Bhattacharya, P., and Dey, A. (2013). Effect of pH and temperature on stability and kinetics of novel extracellular serine alkaline protease (70 kDa). International Journal of Biology and Macromolecules. 54: 1-8.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., Edelstein, S. J. (1996). Protein Methods 2<sup>nd</sup> edition. Wiley-Liss, Inc 650 Third Avenue. United States of America.
- 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.
- Brockerhoff, H., and Jensen, R. G. (1974). Lipolytic Enzymes. Academic Press: New York.



- Das, S. et al. (2012). Bacterial isolates of marine coast as commercial producer of protease. *Biological Sciences*. 12: 96-107.
- Dhaneshwar, R. S. (1990). Tannery wastewater treatment and disposal-state of art. *Indian Journal of Environmental Protection*. 10: 131-141.
- Dharmsthiti, S., Pratuangdejkul, J., Theeragool, G., and Luchai, S. (1998). Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *Journal of General and Applied Microbiology*. 44 (2): 139-145.
- Durai, G., and Rajasimman, M. (2011). Biological treatment of tannery wastewater-A review. *Journal of Environmental Science and Technology*. 4(1): 1-17.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
- Fogarty, W. M., and Kelly C. T. (1990). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. 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.
- Goltara, A., Martinez, J., and Mendez, R. (2003). Carbon and nitrogen removal from tannery wastewater with a membrane bioreactor. *Water Science and Technology*. 48 (1): 207-214.
- Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Kamoun, A. S., and 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.
- Hamadia, N. K., Chena, X. D., Farid, M. M., and Lub, M. G. Q. (2001). Adsorption kinetics for the removal of chromium (VI) from aqueous solution by adsorbents derived from used tyres and sawdust. *Chemical Engineering Journal*. 84: 95-105.
- Haydar, S., Aziz, J. A., and Ahmad, M. S. (2007). Biological treatment of tannery wastewater using activated sludge process. *Pakistan Journal of Engineering and Applied Science*. 1: 61-66.
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Review*. 101: 4501-4523.
- Hinteregger, C., and Streichsbier, F. (1997). *Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic wastewater. *Biotechnology Letters*. 19: 1099-1102.
- Houmard, J., and Drapeau, G. (1972). Staphylococcal protease: A proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 69 (12): 3506-3509.
- Hovelius, B., and Mårdh, P. A. (1984). *Staphylococcus saprophyticus* as a common cause of urinary tract infections. *Reviews in Infection Disease*. 6 (3): 328-337.

- Iyer, P. V., and Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*. 43: 1019-1032.
- Jain, D., Pancha, I., Mishra, S. K., Shrivastav, A., and 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.
- Jawahar, A. J., Chinnadurai, M., Ponselvan, J. K. S., and Annadurai, G. (1998). Pollution from tanneries and options for treatment of effluent. *Industrial Journal of Environmental Protection*. 18: 672.
- Kadam, R. V. (1990). Treatment of tannery wastes. *Industrial Journal of Environmental Protection*. 10: 212.
- Kadirvelu, K., Thamaraiselvi, K., and Namasivayam, C. (2001). Removal of heavy metals from industrial wastewaters by adsorption onto activated carbon prepared from an agricultural solid waste. *Bioresources Technology*. 76: 63-65.
- Kargi, F., and Uygur, A. (1997). Biological treatment of saline wastewater in a rotating biodisc contactor by using halophilic organisms. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 17: 81-85.
- Khan, S. R., Kawaja, M. A., Khan, A. M., Ghani, H., and Kazmi, S. (1999). Environmental impacts and mitigation costs associated with cloth and leather exports from Pakistan. A Report on Trade and Sustainable development Submitted by Sustainable Development Policy Institute and IUCNP to IISD Canada for the IISD/IUCN/IDRC Project on Building Capacity for Trade and Sustainable Development in Developing Countries, Islamabad.
- 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.
- Kubo, M., Hiroe, J., Murakami, M., Fukami, H., and Tachiki, T. (2001). Treatment of hypersaline-containing wastewater with salt-tolerant microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91 (2): 222-224.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., and Veeger, C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*. 30: 81-87.
- Lefebvre, O., Vasudevan, N., Torrijos, M., Thanasekaran, K., and Moletta, R. (2005). Halophilic biological treatment of tannery soaks liquor in a sequencing batch reactor. *Water Research*. 39: 1471-1480.

- Maruthiah, T., Esakkiraj, P., Prabakaran, G., Palavesam, A., and 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., and Listky, W. (1976). *Microbial Enzyme*. Industrial Microbiology. Mc Graw-Hill INC.,
- Moon, B. H., Seo, G. T., Lee, T. S., Kim, S. S., and Yoon, C. H. (2003). Effects of salt concentration on floc characteristics and pollutants removal efficiencies in treatment of seafood wastewater by SBR. *Water Science and Technology*. 47 (1): 65-70.
- Nandy, T., Kaul, S. N., Shastry, S., Manivel, W., and Deshpande, C. V. (1999). Waste-water management in cluster of tanneries in Tamilnadu through implementation of common treatment plants. *Journal of Science Industrial and Research*. 58: 475-516.
- Neelamegam, A., Rajeswari, M. V., and 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*. 92 (4): 335-342.
- Netzer, A., Wilkinson, P., and Beszedits, S. (1974). Removal of trace metals from wastewater by treatment with lime and discarded automotive tires. *Water Research*. 8: 813-817.
- Outtrup, H., and Boyce, C. O. L. (1990). *Microbial Proteinases and Biotechnology*. 2<sup>nd</sup> edition. Fogarty, M. W., and Kelly, C. T. (eds). Elsevier Applied Science. London.
- Patel, R. K., Dodia, M. S., Joshi, R. H., and 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, and Sullivan, B. J. (1990). Isolation and characterization of a novel extracellular metalloprotease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 172: 1019–1023.
- Pillai, P., Mandge, S., and Archana, G. (2011). Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13. *Process Biochemistry*. 46: 1110-1117.
- Poutanen, K. (1997). Enzyme: An important tool in the improvement of the quality of cereal foods. *Trends Food Science and Technology*. 8: 300-306.
- Precigou, S., Wieserl, M., Pommares, P., Goulasl, P., and Duran, R. (2004). *Rhodococcus pyridinovorans* MW3, a bacterium producing a nitrile hydratase. *Biotechnology Letters*. 26: 1379-1384.
- Rajamani, S., Ramasami, T., Langerwerf, J. S. A., and Schappman, J. E. (1995). Environmental management in tanneries-feasible chromium recovery and reuse system. *Proceedings of*

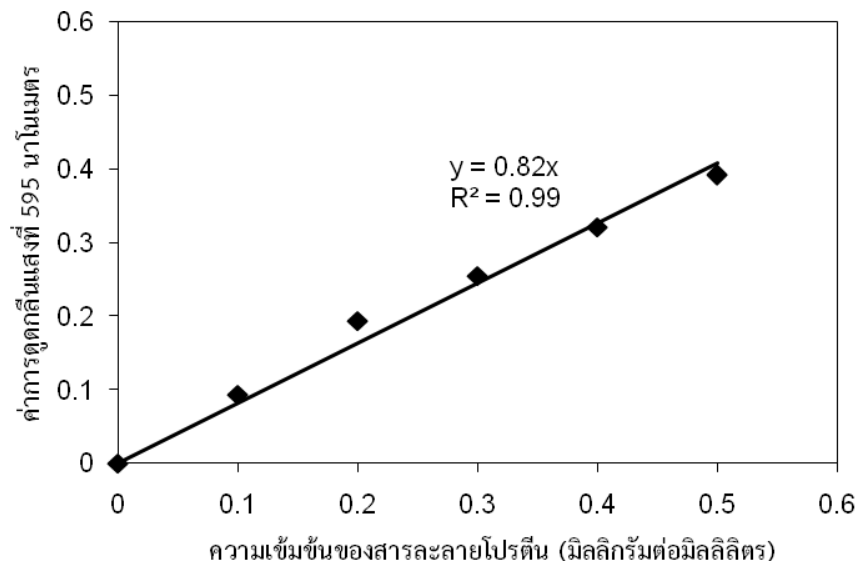
- the 3<sup>rd</sup> International Conference on Appropriate Waste Management Technologies for Developing Countries, (AWMTDC'95), Nagpur, India, pp: 965-969.
- Ramanujam, R. A., Ganesh, R., and Kandasamy, J. (2009). Wastewater treatment technology for tanning industry. In Vigneswaran, S. ed. *Water and Wastewater Treatment Technologies*. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) Publishers, Ontario, Canada.
- Ranganathan, K. (2000). Chromium removal by activated carbons prepared from *Casurina equisetifolia* leaves. *Bioresources Technology*. 73: 99-103.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *American Society for Microbiology*. 62: 597-635.
- Rao, J. R., Thanikavelan, P., Sreeram, K. J., and Nair, B. U. (2002). Green route for the utilization of chrome shavings (chromium-containing solid waste) in tanning industry. *Environmental Science and Technology*. 36: 1372-1376.
- Rao, M., Parwate, A. V., and Bhole, A. G. (2002). Removal of Cr<sup>6+</sup> and Ni<sup>2+</sup> from aqueous solution using bagasse and fly ash. *Waste Management*. 22: 821-830.
- Reddy, L. V. A., Wee, Y. J., and 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., and 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., and 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., and Mukherjee, J. (2006). Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-Proteobacterium isolated from the marine environment of the Sundarbans. *Process Biochemistry*. 41: 208–215.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of National Academic Sciences USA*. 74: 5463-5467.
- Santos, C. A., Vieira, A. M., Fernandes, H. L., Empis, J. A., and Novais, J. M. (2001). Optimisation of the biological treatment of hypersaline wastewater from *Dunaliella salina* carotenogenesis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 76: 1147-1153.
- Shah, K., Mody, K., Keshri, J., and 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.

- Shaw, L. N., Golonka, E., Szmyd, G., Foster, S. J., Travis, J., and Potempa, J. (2005). Cytoplasmic control of premature activation of a secreted protease zymogen: Deletion of Staphostatin B (SspC) in *Staphylococcus aureus* 8325-4 yields a profound pleiotropic phenotype. *Journal of Bacteriology*. 187 (5): 1751-1762.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., and Samukawa, T. (1999). Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 76 (7): 789-793.
- Sivaprakasam, S., Dhandapani, B., and Mahadevan, S. (2011). Optimization studies on production of a salt-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain BC1 and its application of tannery saline wastewater treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 1506-1515.
- Sivaprakasam, S., Mahadevan, S., Sekar, S., and Rajakumar, S. (2008). Biological treatment of tannery wastewater by using salt-tolerant bacterial strains. *Microbial Cell Factories*. 7: 15.
- Sugihara, A., Tani, T., & Tominaga, Y. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *Journal of Biochemistry*. 109 (2): 211-216.
- Sundar, J. V., Raghavrao, J., Muralidharan, C., and Mandal, A. B. (2011). Recovery and utilization of chromium-tanned proteinous wastes of leather making: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 41: 2048-75.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- Terrence, D. M., and Osna, N. A. (2003). *Intracellular Proteolytic Systems in Alcohol-Induced Tissue Injury*. Nebraska Medical Center, Omaha.
- Uberoi, N. K. (2003). *Environmental Management*. Excel Books Publisher, New Delhi. pp: 269.
- Valdimir, S., and Danish, J. M. (2002). Characterization and metal sorptive properties of oxidized active carbon. *Journal of Colloid and Interface Science*. 250: 213-220.
- Verachtert, H., and de Mot R. (1990). *Yeast Biotechnology and Biotechnology*. Maedel Dekker: New York.
- Verheijen, L. A. H. M., Weirsema, D., Hwshoffpol, L. W., and Dewit, J. (1996). *Live stock and the environment: finding a balance management of waste from animal product processing*. International Agriculture Centre, Wageningen, The Netherlands.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*. 173 (2): 697-703.
- Youssef, A. M., El-Nabarawy, T. H., and Samra, S. E. (2004). Sorption properties of chemically-activated carbons 1. Sorption of cadmium (II) ions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 235: 153-163.

- [Online] แหล่งเข้าถึง <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1176/protease> [สืบค้นเมื่อ 10 มีนาคม 2557]
- [Online] แหล่งเข้าถึง [http://www.rosehulman.edu/~brandtChem330/Enzyme\\_mech\\_examples.pdf](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) ได้สมการเส้นตรงที่มีค่าพารามิเตอร์คือ ความชันของกราฟ = 0.82 และค่า  $R^2 = 0.99$  ซึ่งสามารถนำมาคำนวณปริมาณโปรตีนของสารละลาย ตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ได้จากสมการ

$$A = \epsilon bc$$

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

$\epsilon$  = ความชันของกราฟที่มีค่าเท่ากับ 0.82

b = ระยะทางที่แสงเคลื่อนที่ (ความกว้างของคิวเวต) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร

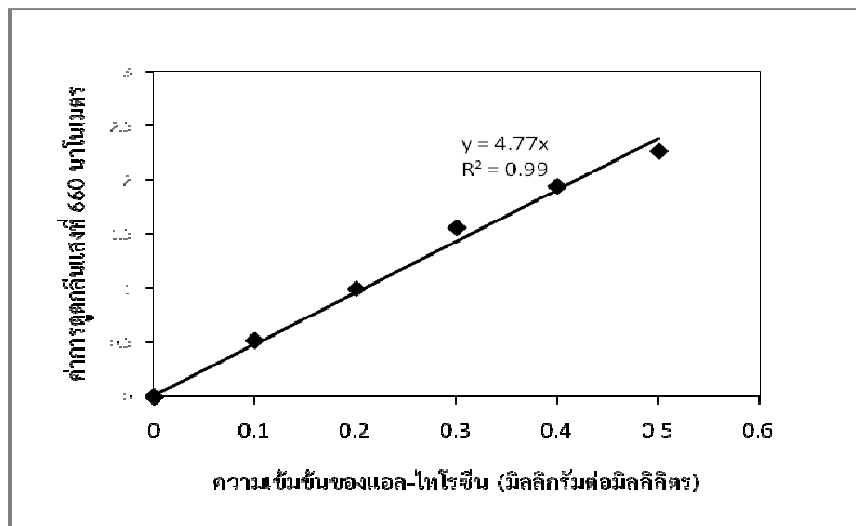
c = ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

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

ปริมาณโปรตีนทั้งหมด = ความเข้มข้นโปรตีน × ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายส่วนใสที่เก็บได้

## ภาคผนวกที่ 2

### กราฟมาตรฐานของแอล-ไทโรซีน วิธีการคำนวณแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส และค่าพารามิเตอร์ต่างๆ



จากกราฟมาตรฐานของแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) ได้สมการเส้นตรงที่มีค่าพารามิเตอร์คือ ความชันของกราฟ = 4.77 และค่า  $R^2 = 0.99$  ซึ่งสามารถนำมาคำนวณแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) ได้จากสมการต่อไปนี้

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

1 หน่วยเอนไซม์ = ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายอะโซเคซีน ได้ผลิตภัณ์ที่เป็นไทโรซีนอิสระ 1 มิลลิกรัมในเวลา 1 นาที

$$\text{แอกติวิตีทั้งหมด (หน่วย)} = \text{แอกติวิตีเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)}$$

$$\text{แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)} = \text{แอกติวิตีเอนไซม์โปรติเอสทั้งหมด} / \text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}$$

วิธีการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์

1. การคำนวณหาร้อยละปริมาณเอนไซม์คงเหลือ =  $\frac{\text{แอกติวิตีทั้งหมดจากแฟรคชันนั้นๆ (หน่วย)} \times 100}{\text{แอกติวิตีทั้งหมดของส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้น (หน่วย)}}$
2. การคำนวณความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ =  $\frac{\text{แอกติวิตีจำเพาะของแฟรคชันนั้นๆ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)}}{\text{แอกติวิตีจำเพาะของส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้น (หน่วยต่อมิลลิกรัม)}}$



### ภาคผนวกที่ 3

ตารางแสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตามความเข้มข้นอิมิต์ต่างกัน  
เทียบกับสารละลายเอนไซม์ปริมาตรหนึ่งลิตร

ความเข้มข้น เริ่มต้น (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)

ตารางแสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตามความเข้มข้นอิมิตัวต่างกัน  
เทียบกับสารละลายเอนไซม์ปริมาตรหนึ่งลิตร

ความเข้มข้น เริ่มต้น (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)

ตารางแสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตามความเข้มข้นอิมิต์ต่างกัน  
เทียบกับสารละลายเอนไซม์ปริมาตรหนึ่งลิตร

ความเข้มข้น เริ่มต้น (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