สำนักหอสมุดกลาง
จำนวน 3 เล่ม
- 7 มี.ค. 2560

รายงานการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากบ่อน้ำร้อน

Isolation of Thermostable Alkaline Protease Producing Bacteria from Hotspring

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

เชาวนีพร ชีพประสพ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ชื่องานวิจัย การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากบ่อน้ำร้อน
ผู้วิจัย เชาวนีพร ชีพประสพ
คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ปี 2558

บทคัดย่อ

แบคทีเรียทนร้อนเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรม การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการคัดแยกและศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง และบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย จังหวัดสตูล โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียทนร้อนได้ 41 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกันเมื่อทำการทดสอบบนอาหารแข็ง skim milk อย่างไรก็ตามพบว่าสายพันธุ์ PS53 ที่แยกได้จากบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน และสายพันธุ์ AN41 ที่แยกได้จากบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย แสดงบริเวณวงใสรอบโคโลนีสูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์พบว่าสายพันธุ์ PS53 บ่งชี้สายพันธุ์ได้เป็น *Bacillus cereus* ในขณะที่สายพันธุ์ AN41 บ่งชี้สายพันธุ์ได้เป็น *Bacillus tequilensis* การศึกษาสภาวะของพีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส พบว่า *Bacillus cereus* สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในเวลา 52 ชั่วโมง (163.86 U/ml) และ *Bacillus tequilensis* สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 10 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 52 ชั่วโมง (127.32 U/ml)

คำสำคัญ: บาซิลลัสทนร้อน เอนไซม์โปรตีเอสในสภาวะด่าง 16S DNA สภาวะที่เหมาะสม

เลข Bibli 1400[illegible]
วันที่ 27 มี.ค. 2560
เลขเรียกหนังสือ [illegible]

Research Title Isolation of thermostable alkaline protease producing bacteria from hotspring

Researcher Chaowaneeporn chepprasop

Faculty Faculty of Science and Technology

Year 2015

Abstract

Thermotolerant bacteria are group of microorganisms which are important due to the ability of valuable industrial enzymes production. In this research, thermotolerant bacteria from Khaochaison and Thungnui hotspring (Phatthalung and Satun province, respectively) were isolated and studied for protease production. Each isolate exhibited various protease activities on skim milk agar test. Among forty one isolates, PS53 and AN41 (from Khaochaison and Thungnui hot spring, respectively) showed the maximum clear zone after incubation at 50°C for 24h. Based on the 16S rDNA gene sequencing analysis, isolates PS53 was identified as *Bacillus cereus* whereas isolates AN41 was identified as *Bacillus tequilensis*. The optimum conditions for protease production including pH, temperature and incubation period were observed and found to be pH 9, 60°C (163.86 U/ml) at 52h and pH 10, 50°C, (127.32 U/ml) at 52h for *Bacillus cereus* and *Bacillus tequilensis*, respectively.

Keywords: thermophilic *Bacillus*, alkaline protease, 16S rDNA, optimum conditions

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยโครงการวิจัยเรื่อง การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากบ่อน้ำร้อน ขอขอบพระกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2557 จำนวน 60,000 บาท (หกหมื่นบาทถ้วน)

ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้สละเวลาในการแก้ไขข้อผิดพลาดและให้คำแนะนำที่ดีต่อการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่อื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ ในการทำการวิจัย รวมทั้งคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และนักศึกษาโปรแกรมวิชาเคมีและเคมีประยุกต์ ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือเสมอมา

และสุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด จนทำให้รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

เชาวนีพร ชีพประสพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สิงหาคม 2558

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ขอบเขตการวิจัย	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 สภาวะทั่วไปของบ่อน้ำร้อนที่ใช้ในการศึกษา	4
2.2 เอนไซม์โปรตีเอส	6
2.3 ประเภทของเอนไซม์โปรตีเอส	6
2.4 แหล่งของเอนไซม์โปรตีเอส	9
2.5 เอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากแบคทีเรีย	11
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส	13
2.7 ประโยชน์ของเอนไซม์โปรตีเอส	18
บทที่ 3 การทดลอง	24
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	24
3.2 วิธีการทดลอง	25
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	30
4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างบนอาหารแข็ง skim milk	30
4.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างในอาหารเหลว	32

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการทดลองละวิจารณ์ผล

4.3 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในเบื้องต้น 34

4.4 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 39

4.5 การติดตามการเจริญเติบโตและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 43

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 47

เอกสารอ้างอิง 49

ภาคผนวก 58

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียของตัวอย่างตะกอนดินจากบ่อน้ำร้อน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง 31

ตารางที่ 4.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียของตัวอย่างตะกอนดินจากบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย อำเภอเขาควนกาหลง จังหวัดสตูล 32

ตารางที่ 4.3 แสดงบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S rDNA จาก (5' -> 3') ของสายพันธุ์ PS53 37

ตารางที่ 4.4 แสดงบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S rDNA จาก (5' -> 3') ของสายพันธุ์ AN41 38

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์โดยวิธีการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA 39

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน	4
ภาพที่ 2.2 ลักษณะทางกายภาพของบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย	5
ภาพที่ 4.1 การผลิตเอนไซม์เอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง	33
ภาพที่ 4.2 การผลิตเอนไซม์เอนโปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำร้อนทุ้งนุ้ย อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล	34
ภาพที่ 4.3 ลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการย้อมสีแบบแกรม (gram's stain)	36
ภาพที่ 4.4 พีเอชและอุณหภูมิเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างของ *Bacillus cereus* (53) ที่แยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง	41
ภาพที่ 4.5 พีเอชและอุณหภูมิเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างของ *Bacillus tequilensis* AN41 ที่แยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำร้อนทุ้งนุ้ยอำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล	43
ภาพที่ 4.6 การติดตามการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนจาก *Bacillus cereus* PS53	44
ภาพที่ 4.7 การติดตามการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนจาก *Bacillus tequilensis* AN41	45

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โปรตีเอสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ซับซ้อนและทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีน (Gupta *et al.*, 2005) โดยเป็นกลุ่มหนึ่งของเอนไซม์ที่มีการใช้อย่างหลากหลายคิดเป็นสัดส่วนมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ของยอดขายเอนไซม์ทั้งหมด (Gupta *et al.*, 2002) ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้ได้นำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกหนังอุตสาหกรรมผงซักฟอกอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการบดเนื้ออุตสาหกรรมสิ่งทอนอกจากนั้นยังนำมาใช้ในทางเภสัชกรรมการวินิจฉัยทางการแพทย์และการสลายตัวของเจลาตินบนแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (Genckal and Tokatali, 2006)

เอนไซม์โปรตีเอสเป็นเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดบนโลกนี้ ไม่ว่าจะเป็นพวกโพรคารีโอต เชื้อรา พืช และสัตว์ สำหรับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงเศรษฐกิจพบว่ากลุ่มของจุลินทรีย์เป็นทางเลือกที่ดีที่สุด โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากสามารถทำการเลี้ยงในปริมาณที่มากได้ในเวลาอันสั้นโดยกระบวนการหมัก และยังสามารถให้ผลผลิตที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Gupta *et al.*, 2002) โดยเอนไซม์ทนร้อนซึ่งในปัจจุบันนี้พบว่าได้มีการนำเอนไซม์ทนร้อนจากเชื้อที่ทนร้อนหลากหลายชนิดมาใช้ในอุตสาหกรรม ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ราarcheobacteria และ actinomycete ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนได้เช่น *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mojaversis*, *Bacillus* sp. JB99, *Fervidobacterium pennivorans*, *Pyrococcus horikoshii*, *Thermophili cbacillus*, *Thermos aquaticus*, *Thermoplasma acidphilum*, *Thermus thermophilus* และ*Thermoanaerobacter yonseiensis* (Wang *et al.*, 2012) เอนไซม์ที่พัฒนาขึ้นใหม่จำนวนมากจะทนร้อนได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่มีอยู่ก่อนหน้านี้ โดยอุตสาหกรรมของกระบวนการหมักส่วนใหญ่ซึ่งมีสภาวะอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง แต่พบว่าเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่ได้มาจากแหล่งที่มีอุณหภูมิปานกลาง (Joseph *et al.*, 2002) การนำเอนไซม์ที่สามารถทนร้อนได้ที่อุณหภูมิสูง โดยเฉพาะอุณหภูมิที่สูงกว่า 50 องศาเซลเซียส มาใช้ในกระบวนการผลิต

จึงเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับการเพิ่มอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการในกระบวนการผลิตจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้สามารถช่วยลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ ดังนั้นความสนใจในการหาเอนไซม์ทนร้อนแหล่งใหม่ ๆ จึงได้รับการตอบรับอย่างมากมายบนพื้นฐานของข้อเท็จจริงที่ว่าเอนไซม์โปรตีเอสสามารถกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่รุนแรง เช่น ที่อุณหภูมิและค่าพีเอชสูง ๆ ได้ดี ซึ่งสมบัติดังกล่าวมีคุณค่าสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (Ladenstein and Antranikian, 1998)

การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนได้ดีในสภาวะด่าง จากตัวอย่างตะกอนดินบริเวณบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง และบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ยอำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล รวมทั้งบ่งชี้สายพันธุ์เบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากตะกอนดิน บริเวณบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุงและบริเวณบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล

1.2.2 เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.2.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนได้ดีในสภาวะด่างได้

1.3.2 ทราบสายพันธุ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้

1.3.3 นำองค์ความรู้ที่ได้ไปบูรณาการกับการเรียนการสอนในรายวิชา 4202301 (ชีวเคมี) 4202302 (ปฏิบัติการชีวเคมี) 4203301 (วิทยาเอนไซม์)

1.3.4 เพื่อเป็นข้อมูลในการวิจัย เรื่องการศึกษาปัจจัยของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

14.1 ทำการเก็บตัวอย่างตะกอนดินบริเวณบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง และบริเวณบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล

14.2 เตรียมอุปกรณ์ สารเคมี และรีเอเจนต์ต่าง ๆ ในการศึกษาสภาวะและจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่าง

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

เอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนได้ดีในสภาวะด่าง หมายถึง เอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบที่มีพันธะเปปไทด์ในโครงสร้างในสภาพด่างและที่มีอุณหภูมิสูง

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สภาวะทั่วไปของบ่อน้ำร้อนที่ใช้ในการศึกษา

2.1.1 บ่อน้ำร้อนเขาชัยสน

ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน
ที่มา: http://www.sci.tsu.ac.th/

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ลักษณะทางกายภาพ

บ่อน้ำร้อนเขาชัยสน ตั้งอยู่ที่หมู่ที่ 3 ตำบลเขาชัยสน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง อยู่ห่างจากอำเภอเมืองพัทลุงประมาณ 25 กิโลเมตร ห่างจากองค์การบริหารส่วนตำบลเขาชัยสน ประมาณ 500 เมตร ลักษณะบ่อเกิดอยู่เชิงเขาหินปูนเขาชัยสนอายุเพอร์เมียน เป็นบ่อธรรมชาติ 1 บ่อ ความกว้างของบ่อประมาณ 8X6 จากบ่อแม่มาจะเป็นธาร ที่มีทั้งธารน้ำร้อนและธารน้ำเย็นแยกเป็น 2 ธาร ไหลลงมายังแอ่งน้ำที่มีรัศมีประมาณ 12 เมตร บ่อน้ำร้อนหรือพุน้ำร้อนเป็นสถานที่ที่มีน้ำร้อนจากใต้ดินเป็นน้ำพุ่งขึ้นมาผ่านตามช่องเปิดใต้ดินที่มีโครงสร้างหลายลักษณะต่างกัน

ลักษณะทางเคมี

บ่อน้ำร้อนที่ปรากฏจะมีลักษณะน้ำใส ไม่มีกลิ่นกำมะถัน อุณหภูมิสูงประมาณ 60 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 7.70 ปริมาณมวลสารทั้งหมดและแร่ธาตุอื่น ๆ 265 ppm.

ลักษณะของสิ่งมีชีวิต

บริเวณบ่อน้ำร้อนพบสาหร่ายเขียว-เหลือง ผลึกคาร์บอนเนตสีจางเล็กน้อย โดยรอบของบ่อมีธรรมชาติที่สวยงามและอุดมสมบูรณ์

2.1.2 บ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย

ภาพที่ 2.2 ลักษณะทางกายภาพของบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย

ที่มา: http://www.tungnuisilathong.co.th/

ลักษณะทางกายภาพ

บ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย ตั้งอยู่ที่บ้านโตนปาหนัน หมู่ที่ 4 ตำบลทุ่งนุ้ย อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล ลักษณะบ่อเป็นหินแกรนิตบริเวณขอบบ่อเป็นน้ำพุร้อนเล็กๆ หลายบ่อ ไหลลงมารวมเป็นบ่อขนาด 2x6 เมตร เกิดอยู่ริมคลอง

ลักษณะทางเคมี

บ่อน้ำร้อนที่ปรากฏจะมีลักษณะน้ำใสสะอาด ไม่มีกลิ่นกำมะถัน มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 8.42 โดยไม่มีรายงานปริมาณมวลสารทั้งหมดและแร่ธาตุอื่นๆ

ลักษณะของสิ่งมีชีวิต

บริเวณบ่อน้ำร้อนพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ตามทางที่น้ำร้อนไหล

2.2 เอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์โปรตีเอส (proteases enzyme) เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต พบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โปรตีนและโพลีเปปไทด์ให้ได้เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้น ๆ (Cronk *et al.*, 2010) นอกจากนี้โปรตีเอสยังเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางการตลาดและมียอดจำหน่ายสูงถึงร้อยละ 60 ของยอดขายเอนไซม์ทั้งหมด (Merheb *et al.*, 2007) โปรตีเอสถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมหลาย ๆ ประเภท เช่น การผลิตผงซักฟอก การผลิตน้ำยาทำความสะอาด การผลิตเบียร์ การทำให้เนื้อนุ่ม การผลิตเครื่องหนังและอุตสาหกรรมนม โปรตีเอสมีชื่อสามัญหลายชื่อได้แก่ เปปติเดส (peptidase) โปรตีเนส (proteinase) เปปไทด์ไฮโดรเลส (peptide hydrolase) และโปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) The International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) ได้แนะนำให้ใช้ “เปปติเดส” (peptidase) ในการเรียกชื่อเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ซึ่งอยู่ใน subclass E.C 3.4 ที่ทำหน้าที่ย่อยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) เปปติเดสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มด้วยกันคือ เอนโดเปปติเดส (endopeptidases) ที่จะตัดพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุลของโปรตีนและเอกโซเปปติเดส (exopeptidases) ที่ทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์จากปลายด้าน N หรือ C ของโปรตีน

2.3 ประเภทของเอนไซม์โปรตีเอส

2.3.1 เอกโซเปปติเดส (exopeptidase) มีหน้าที่ในการสลายพันธะเปปไทด์จากปลายของสายเปปไทด์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท (Watson, 1979)

2.3.1.1 อะมิโนเปปติเดส (aminopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่สลายพันธะเปปไทด์จากปลายด้าน N-terminal ($-NH_2$) ของสายเปปไทด์ และได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโนอิสระ ไดเปปไทด์หรือไตรเปปไทด์ โดยทั่วไปเป็นเอนไซม์จำพวก intracellular enzymes พบได้อย่างกว้างขวางทั้งแบคทีเรียและรา เช่น *Escherichia coli, Bacillus licheniformis* และ *Aspergillus oryzae* เป็นต้น

2.3.1.2 คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidases) เป็นเอนไซม์ที่สลายพันธะเปไทด์จากปลายด้าน C-terminal (-COOH) ของสายเปปไทด์ และได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโนอิสระ หรือไดเปปไทด์ ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มขึ้นกับหมู่อะมิโนที่อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site)

2.3.2. เอนโดเปปติเดส (endopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ที่อยู่ด้านในของสายโพลีเปปไทด์หรือโปรตีน ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ โดยอาศัยความแตกต่างของสภาวะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (อัจฉราภรณ์ อ่อนทรวง, 2552)

2.3.2.1 ซีรินโปรตีเอส (serinprotease) หรืออัลคาไลน์โปรตีเอส (alkaline protease) จะมีซีรินเรสซิดิวส์ (serine residues) อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชมากกว่า 7 หรือช่วง 7 ถึง 11 และมีความเสถียรสูงสุดในช่วงค่าพีเอช 5.0-9.0 สามารถยับยั้งการทำงานโดยการเติม di-isopropyl fluphosphate (DIF) และ penylmethliufonyfluoride (PMSF) โดยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอมไซม์โปรตีเอสได้แต่จะทนต่อภาวะที่มี ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) แคลเซียมอิออนช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่มีคุณสมบัติคล้ายกับทริปซิน และไคโมรทริปซินในสัตว์พบได้ทั่วไปทั้งในแบคทีเรียและรา โดยในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* จะผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสที่เป็นที่รู้จักกันดีและนิยมใช้ในอุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอก การฟอกหนัง และอุตสาหกรรมอาหาร และมีความสำคัญในทางเศรษฐกิจมากที่สุด (กัลยากร วงศ์กาฬสินธุ์, 2540) ตัวอย่างแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส เช่น *Bacillus pseudofirmus, Cohnellathermotoleran s*และ *Bacillus odyssey* (Tiwari *et al*., 2015)

2.3.2.2 ซิสเตอีนโปรตีเอส (cysteine protease) หรือไธออลโปรติเอส (thiol protease) เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนอยู่ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยสภาวะการทำงานที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงของความเป็นกรดด่าง 6.0-7.5 จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์ (reducing agent) ได้แก่ hydrogencyanide (HCN) และสารประกอบที่มีหมู่ไธออล EDTA และ เมอร์แคปโตเอทานอล (mercaptoethanol) ซิสเตอีนโปรตีเอสสามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยโลหะหนักและสารที่มีหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl) เช่น *p*-chloromercury benzoate (PCMB) เอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ โบรมิเลน ปาเปน และไฟซิน (Boller, 1986) กล่าวว่าเอนไซม์โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อพืชตระกูล *Bromeliaceae* เช่น สับปะรด (*Ananascomosus Merr.*) ซึ่งพบในส่วนลำต้น เปลือก แกน ใบและผล โดยที่เอนไซม์โบรมิเลนมีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ที่มีกลุ่ม

คาร์บอนิล (carbonyl group) หรืออะมิโนที่มีลักษณะโครงสร้างแบบอะโรมาติก (aromatic amino acid) เช่น ไทโรซีน หรือฟีนิลอะลานีน มีค่าพีเอชที่เหมาะสมช่วง 6-8 สามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาด้วยสารโลหะหนัก เช่น สารพวกปรอท (mercurial compounds) และสามารถกระตุ้นการทำงานด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน และเมอร์แคปโตเอทานอล

2.3.2.3 เมทัลโลโปรตีเอส (metallo protease) หรือนิวทัลโปรติเอส (neutral protease) เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะอยู่ในโครงสร้างซึ่งมักจะเป็นสังกะสี (Zn) หรือเหล็ก (Fe) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35,000-45,000 ดาลตัน สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับกรดอะมิโนไลซีน และมีสภาวะการทำงานที่เหมาะสมอยู่ในช่วงพีเอช 7-8 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมทัลโลโปรตีเอสจะมีความเสถียรเพิ่มขึ้นเมื่อมีแคลเซียมไอออนเป็นองค์ประกอบและสามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วย EDTA เข้มข้นเพียง 10 มิลลิโมลาร์ เมทัลโลโปรตีเอสจะรวมถึงเอนไซม์จากแหล่งต่างๆ เช่น คอลลาจิเนส (collagenases) จากสิ่งมีชีวิตชั้นสูง สารพิษฮีโมราจิก (hemorrhagic toxins) จากงูพิษและเทอร์โมไลซิน (thermolysin) จากแบคทีเรีย เนื่องจากมีความเสถียรต่ำ จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ค่อนข้างจำกัด แต่ก็พบว่ามีการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น อุตสาหกรรมการฟอกหนัง ผลิตเบียร์ ขนมอบ และอุตสาหกรรมอาหาร ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เทอร์โมไลซิน (thermolysin) และนิวเทรส (neutrase)

2.3.2.4 แอซิดโปรตีเอส (acid protease) หรือแอสปาร์ติกโปรติเอส (aspartic protease) จะมีปฏิกิริยาจำเพาะกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้าง (side chain) เป็นวงอะโรมาติก (aromatic amino acid) เช่น ไทโรซิน ทริปโตเฟน และฟีนิลอะลานิน เป็นต้น ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารจำพวกไดอะโซคีโตน (diazoketone) แต่ไม่ถูกยับยั้ง ด้วยสารจำพวก EDTA และ DFP แอซิดโปรตีเอสทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 3-4 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000-40,000 ดาลตัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การหมักถั่วเหลือง ข้าวและธัญพืชเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว และเนยแข็ง

2.4 แหล่งของเอนไซม์โปรตีเอส (Protease)

เอนไซม์โปรตีเอสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการย่อยโปรตีน ซึ่งมีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ แหล่งของเอนไซม์สามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความซับซ้อนและมีความหลากหลาย โดยขึ้นอยู่กับชนิด สารตั้งต้น กลไกการทำงาน บริเวณเร่ง ความเป็นกรด-ด่าง พีเอช อุณหภูมิ และความทนทานมีทั้งแบบภายในเซลล์ ภายนอกเซลล์ แบ่งตามแหล่งที่มาได้ดังนี้ คือ

2.4.1 เอนไซม์โปรตีเอสจากสัตว์

เอนไซม์โปรตีเอสจากสัตว์ที่เป็นแหล่งเริ่มต้นคือ ทริปซิน ไคโมทริปซินเปปซิน และเรนนิน โดยทริปซินจะเป็นเอนไซม์หลักในลำไส้เล็กที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนในอาหาร ซึ่งเป็นชนิดของเซอรีนโปรตีเอส ทำหน้าที่ย่อยสลายหมู่คาร์บอกซี (carboxy group) ตรงตำแหน่งของกรดอะมิโนไลซีน และอาร์จีนีน เอนไซม์โปรตีเอสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ ไคโมทริปซิน ทริปซิน และอีลาสเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่หลั่งมาจากตับอ่อน โปรตีนเหล่านี้ถูกสังเคราะห์ที่ตับอ่อนในรูปไซโมเจนซึ่งเป็นเอนไซม์ในรูปที่ไม่พร้อมทำงาน (inactive form) และสามารถถูกกระตุ้นให้มีการทำงาน (active form) ในการทำหน้าที่ย่อยโปรตีนได้ที่ลำไส้เล็ก (Christopher and Robert, 1981) นอกจากนี้ได้มีการศึกษากิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไลเปส ในระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาว (*Latescalcarifer*) น้ำหนัก 23.0± 0.15 กรัม โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับกิจกรรมเอนไซม์ที่สกัดจากใน ตับ กระเพาะ ไส้ติ่ง (cecum) และลำไส้ ที่พีเอช 2-12 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในตับ กระเพาะ ไส้ติ่ง และลำไส้ มีค่าสูงที่พีเอช 7-12, 2, 6-12 และ 7-12 ตามลำดับ (เจษฎา ธีรศรัณยานนท์ และคณะ, 2557) หรือการศึกษาการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาโมงบดโดยทำการบ่มเนื้อปลาโมงบดที่อุณหภูมิ 45-65 องศาเซลเซียส และพีเอช 2.0-12.0 พบว่าการย่อยสลายตัวสูงสุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอชเท่ากับ 4.0 และ 9.0 ซึ่งสามารถวัดปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ดังนั้นเอนไซม์โปรตีเอสที่พบในเนื้อปลาโมงบดเป็นเอนไซม์โปรตีเอสชนิดแอสพาติกและซิสเตอีน (นิสากร ศรีธัญรัตน์ และศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ, 2011)

2.4.2 เอนไซม์โปรตีเอสจากพืช

เอนไซม์โปรตีเอสจากพืชที่สำคัญทางการค้ามี 3 ชนิด คือ ปาเปน (papain) โบรมิเลน (bromelain) และ ฟิซิน (ficin) เอนไซม์ปาเปนเป็นเอนไซม์ที่สกัดจากน้ำยางจากผลของมะละกอ (*Carica papaya*) สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 5-9 และคงสภาพการทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์โปรมิเลน สกัดได้จากก้านในและน้ำจากผลสับปะรด หรืออาจเรียกเป็นเซรีนโปรตีเอส (serine protease) มีความคงสภาพการทำงานได้น้อยกว่าปาเปน ส่วนฟิซินเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จาก *Ficus carica* สำหรับนิวทรัลโปรติเอส (nutral protease) ได้จากใบของ *Raphanus sativus* แอสพาติกโปรตีเอส (aspartic protease) พบได้ในใบของมันฝรั่ง และไทออลโปรตีเอส (thiol protease) ได้จากใบของสับปะรดเป็นต้น (http://www.biotecharticles.com) Hebbar และคณะ (2008) ได้ศึกษาส่วนที่เหลือทิ้งจากโรงงานสับปะรด คือ เปลือก แกน ใบ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 35 ของผลสับปะรด โดยการสกัดโบรมิเลนด้วยน้ำ และสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ แล้วตรวจสอบค่ากิจกรรมโบรมิเลนทั้งในส่วนของแกน เปลือก จุก และลำต้น พบว่าการสกัดโดยใช้สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ

2.4.3 เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่หลากหลาย ซึ่งส่วนใหญ่จะผลิตออกมาได้เพียงจำนวนน้อย และเข้าไปมีส่วนร่วมในกระบวนการของเซลล์ (Andrade *et al.*,2002) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสสามารถพบได้ทั้ง เชื้อรา แบคทีเรีย ยีสต์ และ actinomycete โดยเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้แก่กลุ่มของ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Humicola* และ *Mucor* (Gupta *et al.*, 2002) ในกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นกลุ่มหลักของการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ได้แก่ *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นแหล่งที่พบมากที่สุด เช่น สายพันธุ์ของ *Bacillus lichiniformis*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquifaciens* นอกจากนี้ก็ยังมีแบคทีเรียในกลุ่มของ *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Halobacterium*, *Vibrio*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Alcaligenes* ซึ่งได้รับการสำรวจพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้เช่นเดียวกัน ส่วนในกลุ่มของ actinomycetes สายพันธุ์ของเชื้อ *Streptomyces*, *Nocardia* และ *Nocardiopsis* เป็นกลุ่มที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดี

โดยทั่วไปการผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์จะสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์เป็นจำนวนมากได้เมื่อมีการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม เอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอย่างมากมายและเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไป (Gupta *et al.*, 2005) ตัวอย่างเช่น *Bacillus* sp. B12 ซึ่งคัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเยื่อกระดาษ แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงและค่อนข้างคงที่ในช่วง stationary phase เอนไซม์จากสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในช่วงพีเอช 8.0 ถึง 11.0 และทนต่อพีเอชในช่วง 6.0 ถึง 11.0 อุณหภูมิที่สามารถทำงานได้และเสถียรอยู่ในช่วง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส (พิมล จำนงค์, 2547) เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. KSM-K16 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่เอชที่เหมาะสมอยู่ที่ 11 (Kobayashi *et al.*, 1996) *Bacillus* sp. PS719 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 9 (Towatana *et al.*,1999) *Bacillus brevis* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่ 10.5 (Gupta *et al.*, 1999) ส่วนเอนไซม์จากเชื้อ *Bacillus* sp. SSR1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช10 (Singh *et al.*, 2001) *Bacillus* sp. JB-99 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่พีเอช 11 (Johnvesly and Naik, 2001) *Bacillus horikoshii* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 9 (Joo *et al.*, 2002) ส่วนเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus pumilus* จะผลิตเอนไซม์ได้ดีในช่วงพีเอช 10.5 ถึง 12 และผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 11.5 ที่อุณหภูมิระหว่าง 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส (Kumar *et al.*, 2002) เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus mojavensis* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่ 10.5 และอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส (Beg and Gupta, 2003) สำหรับเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่สร้างโดยเชื้อ *Bacillus* sp. I-312 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 11 จากการศึกษาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ชอบด่างจากทุ่งนาหลายที่ของเมือง Karashi โดย Joo และ chang (2005) สามารถทำการคัดแยกได้ 53 ไอโซเลต และพบว่า 25 ไอโซเลตที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนต่อสภาวะด่างโดยมี *Bacillus brevis* SSA1 ที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเท่ากับ 800 หน่วยต่อมิลลิลิตร (AU/mL) (Aftab *et al.*, 2006) เป็นต้น

2.5 เอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากแบคทีเรีย

เอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบที่มีพันธะเปปไทด์ในโครงสร้างในสภาพด่างและที่มีอุณหภูมิสูง พบได้ทั้งผลิตจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเฉพาะที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียมีความสำคัญอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์ที่ใช้ในผงซักฟอกหรือน้ำยาทำความสะอาดต่างๆ การทำงานของโปรตีเอสในสภาวะด่างในสารซักล้างขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น พีเอชอุณหภูมิ

ส่วนประกอบของสารซักล้าง และเครื่องซักผ้า เป็นต้น ซึ่งสิ่งสำคัญในการใช้โปรตีเอสในสภาวะด่างเป็นส่วนประกอบในสารซักล้างคือมีความเสถียรภาพของเอนไซม์ในสารซักล้าง (อมรรัตน์ ชมญาติ, 2551) ดังนั้นจึงได้มีการค้นหาโปรตีเอสในสภาวะด่างชนิดใหม่ที่มีสมบัติที่ดีโดยสามารถทำงานและมีเสถียรภาพในสารซักล้าง ซึ่งการใช้โปรตีเอสในสภาวะด่างเป็นส่วนประกอบในสารซักล้างสามารถลดปริมาณการใช้สารซักล้าง ลดสารเคมีที่ผสมอยู่ในสารซักล้างที่อาจทำให้เกิดมลพิษในน้ำ และสำหรับประเทศไทยหากสามารถผลิตโปรตีเอสมาใช้ในสารซักล้างได้ภายในประเทศจะช่วยลดปริมาณการนำเข้าโปรตีเอสได้ โดยในปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเอนไซม์มากกว่า 700 ล้านบาทต่อปี (พิมล จำนง และคณะ, 2547)

สำหรับแบคทีเรียทนร้อนในสภาวะด่าง แบคทีเรียเหล่านี้มีความทนทานต่อสภาพรุนแรงของอุณหภูมิที่สูง ๆ ได้ เช่น ในกระบวนการฟอกหนัง หรืออุตสาหกรรมอาหารความน่าสนใจในแบคทีเรียกลุ่มนี้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพอีกอย่างหนึ่ง คือความหลากหลายในทางชีวเคมีที่ทำให้สามารถปรับตัวอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง (extream conditions) ต่างๆได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง และสภาพความเป็นด่างได้ดี มีหลายชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้แม้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียสหรือมีอุณหภูมิต่ำสุดที่ยังเติบโตได้ที่ระดับอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส เป็นต้น คุณสมบัติการทนต่ออุณหภูมิสูงนี้เป็นที่ต้องการอย่างมากในทางเทคโนโลยีชีวภาพเนื่องจากเอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีเรียพวกนี้จะทนทานได้ดีต่ออุณหภูมิสูง ทำให้ทนทานต่อระดับอุณหภูมิสูงในการผลิตทางอุตสาหกรรม และมีอายุการใช้งานที่นาน ทั้งยังทนทานต่อสารที่มักทำลายโปรตีนได้ ตัวอย่างของแบคทีเรีย รวมทั้ง archaebacterial ที่สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูงในระดับปานกลาง ได้แก่ *Bacillus caldolyticus, Geobacillus stearothermophilus, Thermoactinomyces vulgaris, Clostridium thermohydrosulfuricum, Thermoanaerobacter ethanolicus, Thermoplasma acidophilum* ที่สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูงมาก ได้แก่ *Thermus aquaticus, T. thermophilus, Thermodesulfobacterium commune, Sulfolobus acidocaldarius, Thermomicrobium roseum, Dictyoglomus thermophilum, Methanococcus vulcanicus, Sulfurococcus mirabilis, Thermotoga mritima* รวมทั้งที่สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูงมากที่สุดได้แก่ *Methanoccus jannaschii, Acidianus infernos, Archaeoglobus profundus, Methanopyrus kandleri, Pyrobaculum islandicum, Pyrococcus furiosus, Pyrodictium occultum, Pyrolobus fumarii, Thermococcus littoralis, Ignicoccus islandicum, Nannoarchaeum equitans* (Satyanarayana *et al*., 2005)

ในส่วนของเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากแบคทีเรีย เช่น เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. JB99 ซึ่งคัดแยกจากกากน้ำตาล สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช 10 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าอย่างต่อเนื่องที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Johnvesly and Naik, 2001) หรือการศึกษาของ Naidu และDevi (2005) พบว่าเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. K-30 ซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณโรงงานซักล้าง สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้รำข้าวเป็นสารตั้งต้นที่พีเอช 9 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus* species ได้แก่ *Bacillus macerans* IKBM-11, *Bacillus licheniformis* IKBM-11, *Bacillus subtilis* IKBM-10 ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่พีเอช 8 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Olajuyigbe and Ajele, 2005) เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus licheniformis* LBBL-11 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 18.4 U/mL เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่พีเอช 8.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Olajuyigbe and Ajele, 2008) *Bacillus cereus* FJ10 สามารผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่พีอช 9 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Jabeen and Qazi, 2011) เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Brevibacillus* sp. PLI-1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช 8-9 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Shuai *et al.*, 2012) เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* SHS-04 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด (1616.21U/mL) เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าอย่างต่อเนื่องที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่พีเอช 9 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Olajuyigbe, 2013) เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* ซึ่งคัดแยกจากน้ำทิ้งบริเวณโรงงานฟอกหนัง สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 410 U/mL เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 35-50 องศาเซลเซียส (Verma and Baiswar, 2013) เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ S8 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 205U/mL เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าอย่างต่อเนื่องที่ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่พีเอช12 (Lakshmi *et al.*, 2014)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรียแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง และอัตราการให้อากาศ เป็นต้น ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ได้มีผู้ทำการศึกษาไว้ดังนี้

2.6.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย

การผลิตเอนไซม์ควรเริ่มต้นจากการใช้สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีคุณภาพดีในปริมาณที่มากพอสมควร ที่มาของแบคทีเรียได้จากหน่วยงานที่มีการสะสมจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ ไว้ หรือจากธรรมชาติ ซึ่งต้องมีการคัดเลือกที่เหมาะสม โดยส่วนใหญ่การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสมักจะทำการคัดแยกโดยเทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง skim milk เพื่อดูบริเวณการย่อยสลายโปรตีนบนอาหารโดยเกิดเป็นวงใสรอบโคโลนี (clear zone) เช่นการคัดแยกเอนไซม์โปรตีเอสจาก Actinomycetes ที่ทนเกลือ ซึ่งสามารถคัดแยกได้ 5 สายพันธุ์ (Ningthoujam *et al.*, 2009) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากทะเลบริเวณมหาสมุทรอินเดีย (Fulzele *et al.*, 2011) หรือการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. N-40 จากดิน (Sevincand Demirkan, 2011) การศึกษาของ Habib และคณะ (2012) โดยทำการคัดแยกเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากแบคทีเรียในน้ำทิ้งบริเวณโรงงานฟอกหนังการคัดแยก *Bacillus* sp. จากทะเลประเทศซาอุดิอาระเบีย (Alnahdi, 2012) หรือการคัดแยกเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสทนเกลือจาก *Bacillus* sp. ซึ่งสามารถคัดแยกได้ 10 สายพันธุ์ ที่สามารถแสดงวงใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง skim milk (Lakshm *et al.*, 2014)

2.6.2 การรู้จักลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์

เชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตควรทดสอบว่า สายพันธุ์ที่ใช้มีการเจริญสูงสุด ณ เวลาใด มีการสร้างเอนไซม์สูงสุดเวลาใด เพื่อจะได้ทราบเวลาที่เหมาะสมที่จะหยุดกระบวนการหมัก และเก็บผลผลิตเอนไซม์ระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างจากดิน ซึ่งสามารถบ่งชี้สายพันธุ์ได้เป็น *Bacillus brevis* SSA1 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Aftab *et al.*, 2006) ผลการศึกษาระยะเวลาในการ *Bacillus* spp. *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 และ *Bacillus subtilis* โดยการใช้เค็กถั่วและข้าวสาลีต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Kumar *et al.*, 2008) การศึกษาของ Lakshmi และคณะ (2014) ในการคัดแยกเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างจาก *Bacillus* sp. ที่ทนเค็ม และบ่งชี้สายพันธุ์เป็น *Bacillus cereus* S8 พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่พีเอช 12 (205 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

จากการศึกษาข้างต้นโดยส่วนใหญ่พบว่าเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดในช่วงการเจริญเติบโตคงที่ซึ่งเป็นไปตามความสัมพันธ์ตามธรรมชาติ นั้นคือในช่วงต้นเชื้อจะใช้สารอาหารส่วนใหญ่เพื่อการเจริญเติบโต (exponential phase) และได้สะสมสารอาหารภายในเซลล์เมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) และจะปล่อยเอนไซม์ออกมาเมื่อมันไม่มีความจำเป็นที่จะย่อยสลายโปรตีนสำหรับการเจริญเติบโตอีก (Razak *et al.*, 1997)

2.6.3 พีเอช/ค่าความเป็นกรด-ด่าง

พีเอชในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ตลอดจนโครงสร้าง และหน้าที่ของเอนไซม์ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างจากพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โดยเอนไซม์จะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานที่ต่างกันตามชนิดของเอนไซม์ เอนไซม์โดยทั่วไปจะถูกยับยั้งที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 หรือพีเอชสูงกว่า 9.0 โดยทั่วไปพีเอชจะมีผลต่อการเกิดเอนไซม์สับสเตรตคอมเพล็กซ์ (enzyme substrate complex) การแตกตัวของสับสเตรต โคแฟกเตอร์และผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้พีเอชยังมีผลต่อการคงตัวและกิจกรรมของเอนไซม์เช่นการคัดแยก *Bacillus* sp. จากตัวอย่างดินบริเวณสวน Lavizan Jungle ประเทศอิหร่านซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช 8 (Sepahy and Jabalameli, 2011) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากดินบริเวณอะนาโทเรีย ประเทศตุรกี ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีที่สุดที่พีเอช 8 (Uyar *et al.*, 2011) การศึกษาของ Palsaniya และคณะ (2012) ซึ่งทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในสภาวะด่างจากดิน และทำการบ่งชี้สายพันธุ์คือ *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilus*, *Escherichia coli* และ *Serratia marscens* ซึ่งเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี ณ ค่าพีเอชที่แตกต่างกันดังนี้คือ *Escherichia coli* (พีเอช8) *Pseudomonas fluorescens* (พีเอช7) *Bacillus subtilus* และ *Serratia marscens* (พีเอช10) การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงโดย Actinomycetes: *Saccharomonospora viridis SJ-21* โดยเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถเจริญเติบโตตั้งแต่พีเอช 7-10 แต่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 9.5 (Jani *et al.*, 2012) หรือการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในสภาวะด่างจากบ่อน้ำร้อนในประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งบ่งชี้สายพันธุ์คือ *Brevibacillus* sp. PLI-1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช 8-9 (Wang *et al.*, 2012)

การคัดแยกเอนไซม์โปรตีเอสในสภาวะด่างจาก *Bacillus subtilis* SHS-04 พบว่าเชื้อเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ไปพร้อมๆ กันในช่วงการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (exponential phase) โดยสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 9 เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Olajuyigbe, 2013) การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างจาก *Bacillus circulans* MTCC 7942 ซึ่งคัดแยกจากแหล่งที่อยู่ที่มีสารไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อน สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 412 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่พีเอช 10 (Patil and Chaudhari, 2013) การศึกษาคัดแยกแบคทีเรียทนความเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างจากทะเลสาปโลนาร์ ประเทศอินเดีย โดยคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ ณ ค่าพีเอชที่แตกต่างกัน คือ *Bacillus pseudofirmu* (พีเอช10), *Cohnella thermotolerans* (พีเอช9) และ *Bacillus odyssey* (พีเอช9.5) (Tambekar and Tambekar, 2013) การศึกษาคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณภูมิสูงจากน้ำทิ้งบริเวณโรงงานผลิตสบู่ ซึ่งสามารถบ่งชี้สายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis* ที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช 8 (Thakur and Tiwari, 2013)

การคัดแยกเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างจาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ S8 โดย Lakshmi และคณะ (2014) พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 12 โดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 160.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างจากบริเวณชายฝั่ง รัฐทมิฬนาฑู ประเทศอินเดีย ซึ่งบ่งชี้สายพันธุ์ได้คือ *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis* , *Escherichia coli*, *Serratia*sp.และ *Bacillus cereus* ซึ่งเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช 9 (Nisha and Divakaran, 2014) และการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสโดย *Bacillus subtilis* NS ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทะเลชายฝั่งคัดดาเลอร์ ทาเมล์นาดู ประเทศอินเดีย สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 123.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่พีเอช 9 (Nisha and Divakaran, 2014)

2.6.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่มีผลต่อปฏิกิริยาเคมีเอนไซม์โดยจะมีผลต่อการสลายตัวของสับสเตรตเกิดเป็นเอนไซม์สับสเตรต คอมเพล็กซ์ (enzyme-suubstrate complex) เอนไซม์กับโคแฟกเตอร์และเอนไซม์กับตัวยับยั้ง นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่อการแตกตัวของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง ซึ่งแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน โดยเฉพาะแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงเนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถที่จะทนต่อสภาวะ

การผลิตในอุตสาหกรรมที่มีอุณหภูมิสูงๆ ได้ (Ladenstein and Antranikian, 1998) จึงได้มีการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูง ๆ ได้ เช่นการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่างจาก Actinomycetes: *Saccharomonospora viridis SJ-21* ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 35-60 องศาเซลเซียส แต่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Jani *et al.*, 2012) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในสภาวะด่างจากบ่อน้ำร้อนในประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งบ่งชี้สายพันธุ์คือ *Brevibacillus* sp. PLI-1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Wang *et al.*, 2012) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยบางกาลอร์ ประเทศอินเดีย ซึ่งพบว่าเป็น *Bacillus* sp. KSM P-1 และสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Swamy *et al.*, 2012)

การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างจาก *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณทะเลพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Dam *et al.*, 2013) เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* SHS-04 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Olajuyigbe, 2013) การคัดแยก *Bacillus* sp. ทนอุณหภูมิสูงที่สามารถเอนไซม์โปรตีเอสจากบ่อน้ำร้อนทอร์ลาบาโร่ เมืองโอดิชา ประเทศอินเดีย ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 90 องศาเซลเซียส และบ่งชี้สายพันธุ์เป็น *Bacillus amyloliquefaciens* (Panda *et al.*, 2013) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณภูมิสูงจากน้ำทิ้งบริเวณโรงงานผลิตสบู่ ซึ่งสามารถบ่งชี้สายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis* ที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (Thakur and Tiwari, 2013) การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจาก *Bacillus cereus* ซึ่งทำการคัดแยกจากน้ำทิ้งบริเวณโรงงานฟอกหนัง โดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Verma and Baiswar, 2013)

เอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. ที่ทนเค็มและทนอุณหภูมิสูงจากน้ำทะเล อ่าวแคมเบย์รัฐคุชราต และบ่งชี้สายพันธุ์เป็น *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TD โดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 442 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Desai and Vyas, 2014) การศึกษาคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส จากน้ำทะเลชายฝั่งคัดดาเลอร์ ทาเมล์ นาดู ประเทศอินเดีย ซึ่งบ่งชี้สายพันธุ์เป็น *Pseudomonas* sp, *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Serratia* sp. และ *Bacillus cereus* พบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

(Nisha and Divakaran, 2014) ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่าง จาก *Bacillus pumilus* BAAK-1 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 328 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียสยังคงผลิตเอนไซม์ได้ถึง 371 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Periyasamy *et al.*, 2014) รวมทั้งการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* ซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณข้างถนนใกล้สถาบันอามาทไบโอเทคเจนไน ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส และแม้ว่าอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 60-80 องศาเซลเซียส เชื้อก็สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้มากกว่าครึ่ง (Pant *et al.*, 2015)

2.7 ประโยชน์ของเอนไซม์โปรตีเอส

โปรตีเอสจัดเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมากกว่า 59 เปอร์เซ็นต์ ของตลาดทั่วโลก การใช้งานที่สำคัญของโปรตีเอสในอุตสาหกรรม เช่น ในอุตสาหกรรมทำความสะอาดและผงซักฟอก การแปรรูปเนื้อ ชีส การนำซิลเวอร์บนแผ่นฟิล์มกลับมาใช้ใหม่ การรักษาทางการแพทย์ในการอักเสบ และบาดแผลรุนแรง (Alemu, 2015) โปรตีเอสจากแบคทีเรียเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้ เนื่องจากสามารถเติบโตอย่างรวดเร็ว ง่ายต่อการดูแล และสามารถเข้าถึงพันธุกรรมได้ (Odu *et al.*, 2012)

2.7.1 การใช้เอนไซม์โปรตีเอสในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก

ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกได้มีการนำเอนไซม์โปรตีเอสมาใช้เป็นส่วนประกอบของผงซักฟอก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขจัดคราบสกปรก โดยเอนไซม์โปรตีเอสจะย่อยสารจำพวกโปรตีนเช่น เลือด นม ไข่ และคราบโปรตีนจากผิวหนัง ที่ติดอยู่ตามเนื้อผ้าให้เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก และละลายน้ำได้ดี เพื่อทำให้คราบต่างๆที่เกาะอยู่นั้นถูกขจัดออกได้ง่ายขึ้น ซึ่งเอนไซม์โปรตีเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกเป็นโปรตีเอสจากแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* sp. ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมปี 2541 ได้กำหนดคุณลักษณะของผงซักฟอก เมื่อทำให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร จะต้องมีพีเอชไม่เกิน 10.5 สำหรับผงซักฟอกชนิดซักด้วยมือและชนิดที่ซักด้วยมือหรือเครื่องซักผ้า และมีพีเอชไม่เกิน 11 สำหรับชนิดที่ซักด้วยเครื่องซักผ้า (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2541) ซึ่งช่วงพีเอช 10.5 ถึง 11เป็นสภาพที่เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส สามารถทำงานได้ ดังนั้นเอนไซม์ดังกล่าวจึงถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบหนึ่งในผลิตภัณฑ์นี้ โดยเอนไซม์จะย่อยโปรตีนที่ติดอยู่ในเนื้อผ้า เช่น คราบเลือด เหงื่อ หรือนม ให้มีขนาด

เล็กลงจนกระทั่งหลุดออกไปตั้งแต่ขั้นตอนการแช่ผ้า ช่วยให้การทำความสะอาดผ้าง่ายขึ้นและลดระยะเวลาในการซัก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการซักผ้าด้วยน้ำอุ่น วิธีนี้สามารถทำให้สิ่งสกปรกหลุดออกได้ง่ายเช่นกัน แต่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และการขยี้ผ้าหรือปั่นผ้าด้วยเครื่องซักผ้าจะทำให้เสื้อผ้าเสื่อมคุณภาพเร็วมีอายุการใช้งานลดลง ดังนั้นการเติมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสลงไปในผงซักฟอกนอกจากจะช่วยกำจัดสิ่งสกปรกได้ดีขึ้นแล้วยังช่วยลดการทำลายเนื้อผ้าเนื่องจากแรงขยี้หรือปั่นผ้าและประหยัดพลังงานโดยไม่ต้องใช้น้ำที่มีอุณหภูมิสูงในการทำความสะอาดผ้า (จุฑาพร แสวงแก้ว, 2543) นอกจากนี้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus* sp. RGR-14 เป็นเอนไซม์ที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก เนื่องจากทนต่อสารที่เป็นส่วนประกอบในผงซักฟอกได้หลายชนิด เช่น สารลดแรงตึงผิวทั้งประเภทไอออนิก เช่น SDS และ saponin และนอนไอออนิก เช่น tween 40, tween 60 และ tritron -X และนอกจากนี้เอนไซม์ยังทนต่อสาร EDTA ซึ่งเป็นสารลดความกระด้างของน้ำและทนต่อสารฟอกจำพวก sodium perborate และhydrogen peroxide (Oberoi *et al.*, 2001) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่ทนเค็มเพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้างเช่น *Bacillus* sp. B12 ซึ่งคัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเยื่อและกระดาษ สามารถเจริญและผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารราคาถูก โดยใช้กากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ในน้ำที่ปรับพีเอชเป็น 9.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยการผลิตเอนไซม์สัมพันธ์กับการเจริญ ซึ่งจัดเป็น growth-associated enzyme เชื้อชนิดนี้สามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงและค่อนข้างคงที่ในช่วง stationary phase เอนไซม์จากสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 8.0 ถึง 11.0 และทนต่อพีเอชในช่วง 6.0 ถึง 11.0 อุณหภูมิที่สามารถทำงานได้และเสถียรภาพอยู่ในช่วง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส สาร PMSF 1 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งการทำงานของ crude enzyme จาก *Bacillus* sp. B12 ได้สูงสุดและ EDTA 10 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสได้น้อยมาก เอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) จาก *Bacillus* sp. B12 สามารถทนต่อสารซักล้างได้หลายชนิด โดยเมื่อเติมเอนไซม์สกัดหยาบลงในสารซักล้างสามารถขจัดคราบเลือดจากผ้าด้ายดิบขาวได้ดีกว่าเมื่อใช้สารซักล้างเพียงอย่างเดียว ดังนั้นอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากสายพันธุ์ B12 จึงมีสมบัติที่ดีที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้าง (พิมล จำนง และคณะ, 2547)

2.7.2 การใช้เอนไซม์โปรตีเอสในอุตสาหกรรมอาหาร

ได้มีการนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากมาย เช่น เอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) เป็นเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตเป็นการค้า สามารถย่อยโปรตีนที่ได้จากพืช เนื้อปลา หรือเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ โดยการสลายพันธะเปปไทด์ของสายโปรตีน อาจนำมาย่อยเนื้อสัตว์เพื่อให้ได้กลิ่นและรสที่ดี นำไปเป็นซุปก้อนหรือซุปเข้มข้น โดยใช้กรดอะมิโนอิสระได-หรือไตรเปปไทด์ที่สามารถตกตะกอนได้ในการผลิต เป็นต้น (Pedersen *et al.*,1994) ปี 1989 นักวิชาการอเมริกันรายงานว่ามีการประยุกต์ใช้อัลคาไลน์โปรตีเอสในการย่อยโปรตีนที่มีสารที่ทำให้เกิดภูมิแพ้ในเด็กจากเคซีนเวย์โปรตีนและโปรตีนถั่วเหลือง

Gupta และคณะ (2002) ได้นำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารหลายอย่าง เช่น การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate) เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารสูงช่วยในการควบคุมแรงดันของเลือดเป็นส่วนประกอบในอาหารที่ใช้เลี้ยงทารกหรืออาหารสำหรับผู้ป่วย กระบวนการได้มาจากการใช้ย่อยสลายสับสเตรทที่เป็นโปรตีนธรรมชาติ เช่น เคซีน หางนม soy protein เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตอาหารสัตว์ (feed) จากแหล่งโปรตีนเหลือทิ้งต่าง ๆ เช่น เขา ขน เล็บ ของสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ปีก จากข้อมูลจากโรงฆ่าสัตว์พบว่าขนของสัตว์ปีกมีเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก คิดเป็นประมาณหลายล้านตันต่อปี เมื่อพิจารณาให้ดีจะเห็นว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่ดีแหล่งหนึ่งในการใช้ทำเป็นอาหารสัตว์ ในบางประเทศนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยผ่านกระบวนการภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง ทำให้คุณค่าทางอาหารลดลงและสิ้นเปลืองพลังงานมาก ขนสัตว์ปีกเป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นจากพันธะไดซัลไฟด์และเคราติน (keratin) เป็นองค์ประกอบ ทำให้ยากต่อการนำมาใช้งานเนื่องจากย่อยสลายได้ยาก Gessesse และคณะ (2003) จึงทำการทดลองแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายขนสัตว์ปีกได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพดี 2 ชนิด คือ *Bacillus pseudofirmus* และ *Nesterokonia* sp. ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง มีการนำเอนไซม์ chymosin หรือ rennin มาใช้ในกระบวนการผลิตเนื่องจาก chymosin หรือ rennin เป็นโปรตีเอสที่มีความจำเพาะต่อการย่อยพันธะเปปไทด์ (Phe105-Met106bond) ของโปรตีนเคซีนในนม โดยจะย่อยเคซีนได้เป็น para-κ-casein และ macroglycopeptide ส่วนหางนม (whey) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็ง ประกอบด้วยโปรตีนที่ไม่ละลายจะมีการใช้ทริปซิน เพื่อให้กลับมาละลายได้ ส่วนอุตสาหกรรมการทำขนมปังนั้นมีการเติมเอนไซม์โปรตีเอสลงไปในแป้งในขณะนวดเพื่อให้แป้งนวดง่ายและมีการจับตัวเป็นก้อน เนื่องจากในแป้งสำลีมีโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำเรียกว่า

gluten เป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของแป้งในเวลานวด ซึ่งโปรตีเอสที่ใช้เป็น exoprotease และ endoprotease ที่ได้จาก *Aspergillus oryzae* นอกจากนี้ได้มีการแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากดินของ Abashiri ประเทศญี่ปุ่นพบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Stenotrophomonas maltophilia* และให้ชื่อว่า S-1 แบคทีเรียนี้สามารถเจริญบนเคซีนซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โปรตีเอสที่บริสุทธิ์กำหนดชื่อให้เป็น *S. maltophilia* Protease-1 (SmP-1) พบว่ามีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยาคือ 50 องศาเซลเซียส มีลำดับกรดอะมิโนที่ปลายของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่บริสุทธิ์คือ NH_2-SASAPMVSGVAALVLE พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมนั้นมีความเป็นด่างที่ค่อนข้างสูงมากและเอนไซม์คงตัวต่อความร้อนทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอุตสาหกรรมอาหารและอื่นๆ (Miyaji *et al.*, 2005)

2.7.3 การใช้เอนไซม์โปรตีเอสในทางการแพทย์

ทางการแพทย์มีการนำโปรตีเอสมาใช้ในการรักษาโรคหลายชนิด เช่น ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของตับอ่อน เนื่องจากผู้ป่วยนั้นไม่สามารถหลั่งน้ำย่อยลงสู่ลำไส้เล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงมีการใช้เป็นยาเม็ดซึ่งเป็นส่วนผสมของโปรตีเอสไลเปส และอะไมเลส ที่เรียกว่าแพนครีติน (pancretin) เพื่อช่วยในการย่อยอาหารในผู้ป่วยลิ่มเลือดอุดตัน มีการใช้โปรตีเอสในการรักษาโดยการฉีดโปรตีเอสเข้าไปในหลอดเลือดเพื่อทำหน้าที่ละลายลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด ซึ่งขัดขวางการไหลเวียนของ เลือด และเป็นสาเหตุของโรคหัวใจ โดยโปรตีเอสที่ใช้ในการรักษานี้ เรียกว่ายูโรไคเนส (urokinase) ซึ่งแยกได้จากปัสสาวะของคนหรือสเต็ปโตไคเนส (streptokinase) ได้จาก *Steptococcus haemolyticus* นอกจากนั้นยังมีโปรตีเอสที่นำมาใช้ในทางการแพทย์อีก เช่น โปรมีเลน (bromelain) ใช้รักษาการอักเสบของเนื้อเยื่อ ไคโมปาเปน (chymopapain) ใช้รักษาโรคไขสันหลังอักเสบ คอลลาจีเนส (collagenase) ใช้รักษาโรคไขสันหลังอักเสบและไคโมทรอปซิน (chymotrypsin) ใช้ในการผ่าตัดเลนส์ตา เป็นต้น นอกจากนี้พบว่าเปปไทด์ของการบำบัดโรคสำหรับยุโรปและสหรัฐอเมริกา มีมูลค่าประมาณ 400 ล้านดอลลาร์ ในปี 1994 ใช้เกี่ยวกับการบำบัดโรคและทดสอบเกี่ยวกับคลินิก เป็นยาของอนาคต และปริมาณการสังเคราะห์จะเจริญก้าวหน้าไปอีก 20 ปี มีความเป็นไปได้ที่จะรักษาโรคอัมพาต (paralysis) โรควิกลจริตมีจิตเสื่อม (dementias) โรคเรื้อรัง (chronic) โรคประสาทเสื่อมอย่างรุนแรง (acute neurodegenerative) ความผิดปกติทางกาย ใจ (disorders) เช่น โรคของ Alzheimer และโรคความบกพร่องของกล้ามเนื้อ (muscular dystrophies) (Godfrey and West, 1996) และการศึกษาของ Anwar และ Saleemuddin (2000) มีรายงานว่าใช้อัลคาไลน์โปรตีเอสย่อย

สลายเจลลาตินัส (gelatinous) ที่โค๊ทอยู่บนฟิล์มX-ray ซึ่งสามารถนำซิลเวอร์กลับมาได้ และโปรตีเอสใช้ประโยชน์สำคัญเป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์เภสัชกรรม เช่น ตัวทำความสะอาดคอนแทคเลนส์ รวมทั้งการศึกษาพบว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนสนับสนุนกระบวนการรักษาโดยธรรมชาติซึ่งประสบความสำเร็จในการจัดการกับแผลเปื่อย โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัด necrotic material (Sjodahl *et al.*, 2002) และมีการนำเอนไซม์คอลลาจิเนสเข้ามาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ โดยทำหน้าที่ควบคุมปริมาณยาให้มีการปล่อยออกมาอย่างช้าๆ เอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง คืออีลาสโททีเรส (elastoterase) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายอีลาสติน (elastin) ได้ดีจะถูกนำไปใช้ตรงกับผ้าพันแผลที่นำไปรักษาแผลไฟไหม้ แผลมีหนองได้ดีนอกจากประโยชน์ที่กล่าวมาแล้วของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสยังสามารถนำเอนไซม์ไปใช้ในอุตสาหกรรมผ้าไหมในการย่อยสลายเซอริซิน (seriscin) ที่เป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 25 ของน้ำหนักไหมดิบแทนกรรมวิธีเดิมที่ใช้แป้งเข้ามาเกี่ยวข้องและเป็นกระบวนการที่ยุ่งยาก เสียค่าใช้จ่ายสูง การนำเอนไซม์ไปใช้ในการสังเคราะห์เปปไทด์ (peptide synthesis) โดยอาศัยกระบวนการย้อนกลับของปฏิกิริยา (reverse-enzyme reaction) ซึ่งมีความจำเพาะดีกว่าการใช้สารเคมี (Gupta *et al.*, 2002)

2.7.4 การใช้เอนไซม์โปรตีเอสในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

เอนไซม์ย่อยเคราติน (keratinase) มีกิจกรรมการย่อยเคราตินเท่ากับ 1,414 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีนเอนไซม์นี้จึงเหมาะสำหรับการใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกหนัง ส่วนกิจกรรมจำเพาะของการย่อยอีลาสติน (elastin) ของเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. no. AH-101 นี้เท่ากับ 495 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีนที่พีเอช 10.5 ซึ่งมีค่าต่ำกว่า subtilisins ; elastase ของ Ya-B ซึ่งมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 2,440 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนภายใต้สภาวะที่เหมือนกัน (Ebeling *et al.*, 1974) และมีการนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง เพื่อกำจัดขนสัตว์ออกจากหนังสัตว์ ซึ่งนอกจากจะประหยัดแล้วยังได้หนังสัตว์ที่นุ่มและมีคุณภาพดีกว่าเมื่อเทียบกับการฟอกด้วยวิธีการแช่ในโซเดียมซัลเฟต (sodium sulphat) ซึ่งในการกำจัดขนออกจากหนังสัตว์ (dehairing) โดยเอนไซม์จะไปทำลายโปรตีนเกิดการย่อยสลายอีลาสตินและเคราติน (Taylor *et al.*, 1987) ต่อมาTakami และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาอัลคาไลน์โปรตีเอส จาก *Bacillus* sp. no. AH-101 แสดงกิจกรรมการย่อยโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (fibrous proteins เช่น elastin และ keratin) ที่พีเอช 13.0 เท่ากับ 3,970 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนซึ่งสูงกว่าเป็น 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีเนสเค (Proteinase K) ซึ่งได้จากเชื้อรา *Tritirachium album* เป็นที่รู้จักดีว่าเป็นเอนไซม์ย่อยเคราติน ส่วนในสภาวะที่เป็น

ด่างจะทำให้รากขนโป่งพอง ทำให้ง่ายต่อการกำจัดขนและเป็นวิธีที่ง่ายกว่าการใช้โซเดียมซัลไฟด์ ทำให้ได้สินค้าที่ดีและหนังมีความนุ่ม (Malathi and Chakraborty, 1991) และการศึกษาการใช้สารละลายปูนขาวที่อิ่มตัวและโซเดียมซัลไฟด์ เป็นวิธีดั้งเดิมในการกำจัดขนออกจากหนังสัตว์ แต่เนื่องจากวิธีนี้ต้องเสียค่าใช้จ่ายมากและหนังสัตว์ที่ได้พองตัวมีคุณภาพไม่ดี นอกจากนี้ของเสียที่เกิดจากกระบวนการฟอกหนัง โดยใช้สารเคมีนั้นมีพิษต่อสิ่งแวดล้อมสูงการใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง เนื่องจากเอนไซม์มีความคงตัวและทำงานได้ดีในระหว่างการฟอกหนังที่มีสภาพพีเอชประมาณ 12 ซึ่งหนังสัตว์ที่ได้จะนุ่มและมีคุณภาพดีกว่าเมื่อเทียบกับการฟอกหนังด้วยสารเคมี (Anwar and Saleemuddin, 1998) นอกจากนี้ในการฟอกหนังกระบวนการทางเอนไซม์ เริ่มจากในสภาวะที่เป็นด่างทำให้เกิดการพองตัวของรากขน (hair root) จากนั้นเอนไซม์จึงเข้าทำปฏิกิริยากับ hair follicle protein ทำให้ง่ายต่อการกำจัดออก ต่อมาเกิดการย่อยสลายของอีลาสตินและเคราตินทำให้กำจัดขนที่เหลือออกไปได้หมด จากนั้นก็จะเกิดการหดตัวของคอลลาเจน จากกระบวนการเหล่านี้ก่อให้เกิดคุณภาพที่ดีของหนัง มีความอ่อนนุ่ม (Gupta *et al.*,2002)ร วมทั้งการศึกษาของ Dayanandan และคณะ (2003) ที่ได้ศึกษา *Aspergillus tamari* ซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณโรงฟอกหนัง สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทและเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงแบบsolid-state fermentation พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8 ถึง 9 และเมื่อนำเอนไซม์มาย่อยขนแพะ พบว่าคุณภาพหนังที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสดีกว่าการใช้วิธี lime sulphide และน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังด้วยเอนไซม์ดังกล่าวมีค่า Biochemical Oxygen Demand (BOD), Chemical Oxygen Demand (COD), Total Dissolved Solids (TDS) และค่า Total Suspended Solids (TSS) ต่ำกว่าที่วิเคราะห์ได้จากน้ำทิ้งจากการฟอกหนังด้วย lime sulfide

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Casein	Fluka
Folin -Ciocalteau 'sshenol reagent	Merck
Glucose	Fluka
glycine	ASP
Ferrous sulfate	Fluka
Magnesium sulfate	Ajax
Nutrient agar (NA)	Merck
Nutrient broth (NB)	Merck
Peptone	Merck
Potassium dihydrogen phosphate	Ajax
Skim milk agar	Sigma
Sodium crabonate	Ajax
Sodium hydroxide	Ajax
Trichloroacetic acid (TCA)	Merck
Tris (hydroxymethyl) aminomethate	Merck
L-Tyrosine	Sigma
Yeast extract powder	Merck

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

3.1.2 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Balance) :Mettler Toledo รุ่น AG-204
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) :SHIMADZU
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) :Memmert
4. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubater) :Contherm รุ่น 5200 R
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) :Hettich รุ่น 32 R
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) :Mettler Toledo รุ่น S20K
7. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave)
8. อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ (Loop)
9. บีกเกอร์ (Beaker)
10. ขวดรูปชมพู่ (Flask)
11. หลอดทดลอง (Tube)
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 ลักษณะทางกายภาพและการเก็บตัวอย่างตะกอนดิน

ทำการวัดอุณหภูมิและพีเอช ณ วันเก็บตัวอย่างตะกอนดินของบ่อน้ำร้อนทั้งสองแหล่ง และเก็บตัวอย่างตะกอนดินจากบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง จำนวน 5 จุด จุดที่ 1 บริเวณตรงกลางบ่อ (อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส พีเอช 7.90) จุดที่ 2 บริเวณขอบบ่อด้านใน (อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส พีเอช 7.92) จุดที่ 3 บริเวณบ่อกลางแจ้ง (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 8.14) จุดที่ 4 บริเวณต้นทางน้ำทิ้ง (อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 8.25) จุดที่ 5 บริเวณทางน้ำทิ้ง (อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 8.27) (ดังแสดงในภาคผนวก) ส่วนตัวอย่างตะกอนดินจากบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล จำนวน 4 จุด ซึ่งทำการแบ่งพื้นที่บ่อน้ำร้อน ออกเป็น 4 จุด (อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส พีเอช 8.4) และทำการเก็บตัวอย่างตะกอนดินในแต่ละจุดที่กำหนด (ดังแสดงในภาคผนวก ข)

27 มี.ค. 2560

3.2.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

นำตัวอย่างดินจากแต่ละจุดใส่บีกเกอร์ ประมาณ 0.5 กรัม เติมน้ำกลั่น100 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-6}และ 10^{-9}อย่างละ 100 ไมโครลิตร spread ลงในเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง skim milk (skim milk agar) ที่เตรียมไว้นำเพลทไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน จะปรากฏวงใสเกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี และทำการหาค่า relative enzyme activity (REA) จากเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการย่อยสลาย/เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ในหน่วยมิลลิเมตร) (Jani *et al*., 2012)

3.2.3 การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยนำเชื้อตัวอย่างที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.2 มา 1 loop ใส่ลงในหลอดที่มี nutrient broth พีเอช 9.0 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ (1 เปอร์เซ็นต์) ลงในขวดรูปชมพู่ที่ประกอบด้วย 0.5 กรัม glucose, 0.75 กรัม peptone, 0.5 กรัม KH_2PO_4, 0.01 กรัม $FeSO_4.7H_2O$, 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ และปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เป็น 9.0 นำมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Olajuyigbe and Ajele, 2005) ทำการหมุนเหวี่ยงด้วยเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เพื่อให้เซลล์ที่ไม่ต้องการตกตะกอน) (Naidu *et al*., 2011) นำส่วนใสที่ได้ไปใช้ในการหากิจกรรมของเอนไซม์

3.2.4 การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่าง

ตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ ทำตามวิธีที่ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Tsuchida และคณะ (1986) โดยการเติมสาระลายสับสเตรตเคซีน 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 9.0) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างเอนไซม์ที่ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (ส่วนใส) ปริมาตร1 มิลลิลิตร มาผสมรวมกับสับสเตรต ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายไตรคลอโรอะซิติก (TCA) เข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ 1 มิลลิลิตร เติม sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) เข้มข้น 0.44 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม folin phenol reagent

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของส่วนใสด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร แล้วนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ซึ่งทำการทดลองเช่นเดียวกันกับชุดทดลองข้างต้นแต่ลำดับการผสมต่างกัน คือ ชุดควบคุมจะทำการเติมสารละลายสับสเตรตเคซีน 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อน แล้วจึงผสมรวมกับตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการหยุดปฏิกิริยาแล้วด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น (TCA) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ตามสมการ ดังนี้

Unit/mL enzyme = (μmoL tyrosine equivalent released)(MW)(5)(1)(1)

MW = มวลโมเลกุลของ tyrosine

5 = ปริมาตร sodium bicarbonate ที่ใช้

1 = ปริมาตรfolin phenol reagent ที่ใช้

1 = ปริมาตรตัวอย่างเอนไซม์ที่ใช้

1 หน่วยเอนไซม์ (ยูนิต) หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในสภาวะด่างที่สามารถย่อยเคซีนได้เป็นกรดอะมิโนไทโรซีน ปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.2.5 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้เบื้องต้น

การย้อมสีแบคทีเรียที่คัดแยกได้สายพันธุ์ PS53 และ AN41 (สุวณีสุภเวชย์ และมาลัย วรจิตร, 2540) เพื่อให้เห็นรูปร่างลักษณะการเรียงตัว เพื่อจำแนกแบคทีเรียออกเป็นกลุ่มๆ ได้ตามลักษณะของการติดสี เป็นต้น

การย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) การย้อมสีแบบแกรมเป็นวิธีการเบื้องต้นในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบการย้อมแบบนี้จัดเป็นการย้อมแบบ differential staining ซึ่งหมายถึงการใช้สีย้อมตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปสีย้อมแรกเรียกว่า primary stain ซึ่งได้แก่สี crystal violet ส่วนสีที่ 2 เรียกว่า counter stain หรือ secondarystain สีที่ใช้คือ safranin o แบคทีเรียที่ย้อมติดสีแรกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียที่ย้อมติดสีที่ 2 เป็นแบคทีเรียแกรมลบระหว่างการย้อมสีแรกกับสีที่ 2 จะมีการใส่สารละลายไอโอดีนซึ่งทำหน้าที่เป็น mordant ช่วยให้ crystal violet จับกับแบคทีเรียแกรมบวกได้แน่นไม่หลุดเมื่อล้างออกด้วยสารละลายแอลกอฮอล์โดยทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้งเตรียมรอย smear และตรึงเซลล์ด้วย

ความร้อนหยดสี crystal violet ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาทีเทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำแล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอย smear และทิ้งไว้นาน 1 นาทีเทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95% จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าเกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบาๆซับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยการหยดสี safranin o ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาทีเทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งให้แห้งนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100x แบคทีเรียทีเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีน้ำเงิน ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง

3.2.6 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาโดยห้องปฏิบัติการกลางวิจัยไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน (Partial lengthsequencing) ของตำแหน่ง 16S rDNA ซึ่งเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Universal primers ในช่วง 20F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TTG TTA CGA CTT-3') และ 1500R (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3') แล้วทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มจำนวนแล้วด้วย PCR purification kits (GenepHlowTM) ตามวิธีการของบริษัท จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis และนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA Sequencer แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

3.2.7 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (ข้อที่ 3.2.3) โดยทำการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่าง ๆ ตั้งแต่พีเอช 9.0 (บัฟเฟอร์ Tris-HCl) พีเอช 10-12 (บัฟเฟอร์ Glycine-NaOH) และทำการเลี้ยงเชื้อในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) โดยการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันตั้งแต่ 50-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนใสไปเปรียบเทียบโดยหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์แต่ละค่าพีเอช และแต่ละอุณหภูมิ

3.2.8 การติดตามการเจริญเติบโตและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (ข้อ 3.2.3) ซึ่งทำการปรับพีเอชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากการศึกษาในข้อ 2.3.7 จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) โดยการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากการศึกษาในข้อ 2.3.7 ทำการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส ทุก ๆ 4 ชั่วโมง จนกระทั่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดต่ำลง

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างบนอาหารแข็ง Skim milk

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนดินในบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง จำนวน 5 จุด ทำการคัดแยกได้ตัวอย่างดิน 25 ตัวอย่าง และจากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนดินในบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล จำนวน 4 จุด ทำการคัดแยกได้ตัวอย่างดิน 20 ตัวอย่าง เมื่อทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสโดยวิธีการ spread plate บนอาหารแข็ง nutrient agar ผสมกับ skim milk 10 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปรากฏเป็นวงใสรอบ ๆ โคโลนี จากตัวอย่างตะกอนดินของบ่อน้ำร้อนเขาชัยสนได้ทั้งหมดจำนวน10 สายพันธุ์ คือ PS41, PS42, PS43, PS44, PS45, PS53, PS54, PS55, PS56 และ PS57 ซึ่งทำการหาค่า Relative enzyme activity (REA)พบว่ามีค่าเท่ากับ 16.0, 15.0, 20.0, 19.0, 19.0, 21.0, 17.0, 16.0, 15.0 และ 18.0 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า PS53 มีค่า Relative enzyme activity สูงสุดคือ 21.0 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ในขณะที่ตัวอย่างตะกอนดินจากบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ยสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปรากฏเป็นวงใสรอบ ๆ โคโลนี ได้จำนวน 8 สายพันธุ์ คือ AN21, AN22, AN23, AN24, AN41, AN42, AN43 และ AN44 ซึ่งเมื่อทำการหาค่า Relative enzyme activity พบว่ามีค่าเท่ากับ 18.5, 12.0, 10.5, 10.0, 20.0, 18.0, 16.0 และ 17.0 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า AN41 มีค่าRelative enzyme activity สูงสุดคือ 20.2 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียของตัวอย่างตะกอนดินจากบ่อน้ำร้อนอำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง

ตัวอย่างตะกอนดิน	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	Relative enzyme activity
ตะกอนดินจุดที่ 1 บริเวณตรงกลางบ่อ	PS11	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	PS12	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	PS13	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	PS14	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	PS15	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
ตะกอนดินจุดที่ 2 บริเวณขอบบ่อด้านใน	PS21	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	PS22	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	PS23	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	PS24	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	PS25	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
ตะกอนดินจุดที่ 3 บริเวณบ่อกลางแจ้ง	PS31	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	PS32	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	PS33	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	PS34	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	PS55	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
ตะกอนดินจุดที่ 4 บริเวณต้นทางน้ำทิ้ง	PS41	16.0
	PS42	15.0
	PS43	20.0
	PS44	19.0
	PS45	19.0
ตะกอนดินจุดที่ 5 บริเวณทางน้ำทิ้ง	PS53	21.0
	PS54	17.0
	PS55	16.0
	PS56	15.0
	PS57	18.0

ตารางที่ 4.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียของตัวอย่างตะกอนดินจากบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ยอำเภอเขาควนกาหลง จังหวัดสตูล (โดยการแบ่งพื้นที่ของบ่อน้ำร้อนออกเป็น 4 จุด)

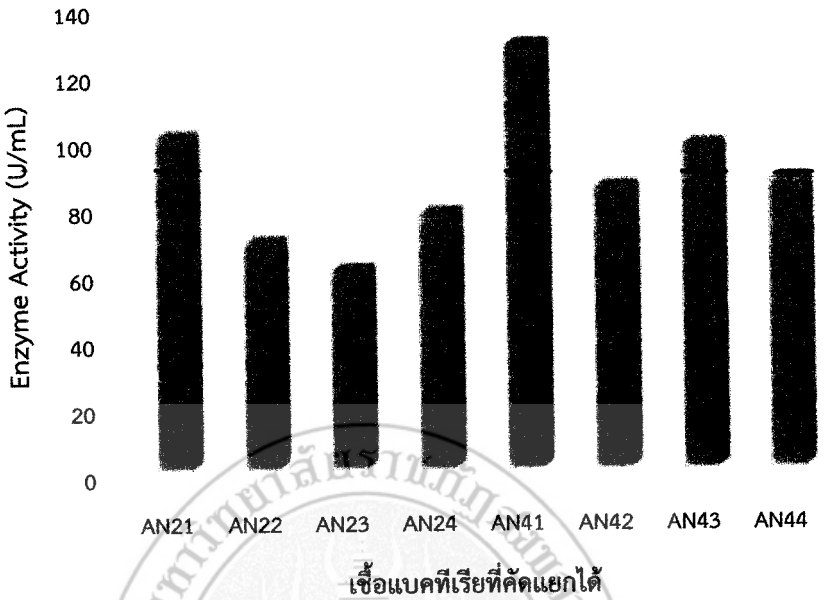
ตัวอย่างตะกอนดิน	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	Relative enzyme activity
ตะกอนดินจุดที่ 1	AN11	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	AN12	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	AN13	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	AN14	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
ตะกอนดินจุดที่ 2	AN21	18.5
	AN22	12.0
	AN23	10.5
	AN24	10.0
ตะกอนดินจุดที่ 3	AN31	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	AN32	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	AN33	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
	AN34	ไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี
ตะกอนดินจุดที่ 4	AN41	20.0
	AN42	18.0
	AN43	16.0
	AN44	17.0

4.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างในอาหารเหลว

จากตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำร้อนเขาชัยสนจำนวน 10 สายพันธุ์ และจากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ยจำนวน 8 สายพันธุ์ นำมาคัดแยกอีกครั้ง โดยวัดค่ากิจกรรมของการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย glucose, peptone, KH_2PO_4, $FeSO_4$. $7H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$ ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำร้อนเขาชัยสนแต่ละชนิดจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้ PS41 เท่ากับ 29.47 ยูนิตต่อมิลลิลิตร PS42 เท่ากับ 23.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตร PS43 เท่ากับ 58.94 ยูนิตต่อมิลลิลิตร PS44 เท่ากับ 20.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร PS45 เท่ากับ 110.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร PS53 เท่ากับ 163.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร PS54 เท่ากับ 121.61 ยูนิตต่อมิลลิลิตร PS55 เท่ากับ 28.88 ยูนิตต่อมิลลิลิตร PS56 เท่ากับ 46.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ PS57 เท่ากับ 98.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปรากฏว่าเชื้อ

แบคทีเรีย PS53 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ163.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.1) จึงคัดแยกเชื้อสายพันธุ์นี้เพื่อใช้ในการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในลำดับต่อไป ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ยแต่ละชนิดจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้ AN21 เท่ากับ 100.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร AN22 เท่ากับ 68.32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร AN23 เท่ากับ 59.83 ยูนิตต่อมิลลิลิตร AN24 เท่ากับ76.92 ยูนิตต่อมิลลิลิตร AN41 เท่ากับ 127.32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร AN42 เท่ากับ 84.65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร AN43 เท่ากับ 97.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ AN44 เท่ากับ 86.78 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรีย AN41 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 125.93 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.2) จึงคัดแยกเชื้อสายพันธุ์นี้เพื่อใช้ในการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในลำดับต่อไปเช่นเดียวกัน

ภาพที่ 4.1 การผลิตเอนไซม์เอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.2 การผลิตเอนไซม์เอนโปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4.3 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในเบื้องต้น

เมื่อทำการศึกษาการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ที่แยกได้โดยนำมาย้อมสีแบบแกรม (gram's stain) (สุวณี สุภเวชย์ และมาลัย วรจิตร, 2540) พบว่าลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่ยาว รูปร่างเซลล์เป็นแท่ง ติดสีแกรมบวกของสีย้อม cystal violet มีสปอร์ ซึ่งคุณสมบัติเบื้องต้นดังกล่าวเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ genus *Bacillus* ทำให้แยก genus *Bacillus* ออกจากเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ก. และ ข. เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะประกอบด้วยส่วนของเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่มีความหนา สาเหตุเนื่องมาจากการเรียงซ้อนกันของสายเปปทิโดไกลแคนหลาย ๆ สายเข้าด้วยกัน บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกพบกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ชื่อว่ากรดไทโซอิค (teichoic acids) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของไรบิทอลฟอสเฟต (ribitolphosphate) หรือกลีเซอรอลฟอสเฟต (glycerol phosphate) กรดอินทรีย์ชนิดนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิดย่อย คือกรดลิโปไทโซอิค (lipoteichoic acid) ที่พบฝังตัวอยู่

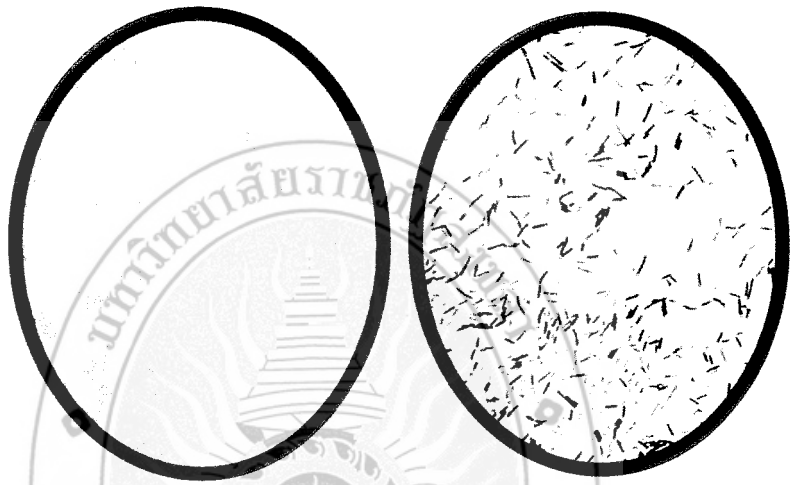
ตลอดชั้นของผนังเซลล์เรื่อยไปถึงส่วนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และกรดวอลไทโซอิค (wall teichoic acid) ที่พบบริเวณของผนังเซลล์เท่านั้น

ส่วนกรณีของแบคทีเรียแกรมลบโครงสร้างทางเคมีของผนังเซลล์นอกจากสายของเปปทิโดไกลแคนที่เรียงตัวซ้อนกันเป็นชั้นบาง ๆ และองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบไม่พบกรดไทโซอิคเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้โครงสร้างโดยภาพรวมและองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์จะมีความแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกกล่าวคือพบส่วนที่ปกคลุมชั้นของเปปทิโดไกลแคนอยู่ด้านบน ส่วนนี้เรียกว่าเมมเบรนด้านนอก (outer membrane) องค์ประกอบของเมมเบรนด้านนอกส่วนใหญ่เป็นลิพอพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่เกิดจากการเชื่อมยึดกันของลิปิดเอ (lipid A) และโอโพลีแซคคาไรด์ (O polysaccharide) หรือเรียกอีกชื่อว่า O side chain ฟอสฟอลิพิด (phospholipid) ลิพอโปรตีน(lipoprotein) นอกจากนี้พบโปรตีนอีกหลายชนิดที่สำคัญคือ Fribo (porin) ที่มีบทบาทในการควบคุมการผ่านเข้าและออกของสารต่างๆที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย (http://www.sci.nu.ac.th/Biology/Biodiversity)

จากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแกรมบวกมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าและมีความซับซ้อนขององค์ประกอบที่ผนังเซลล์น้อยกว่าเมื่อล้างสีด้วยแอลกอฮอล์จะทำให้เซลล์เหี่ยวเพราะเกิดจากการสูญเสียน้ำเยื่อหุ้มเซลล์มีขนาดเล็กลงสารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสารสีละลายออกมาไม่ได้ ทำให้เซลล์ยังคงติดสีม่วงและเมื่อย้อมทับด้วยสีซาฟรานินเซลล์จึงไม่ติดสีแดง (วิรุธน์ บัวงาม, 2541) ในขณะที่พวกแกรมลบจะมีปริมาณไขมันที่ผนังเซลล์สูงทำให้เมื่อชะล้างสีด้วย สารละลายแอลกอฮอล์ไขมันจะถูกล้างออกและสารประกอบเชิงซ้อน crystal violet–iodine จะหลุดออกจากเซลล์ได้ง่ายเพราะผนังเซลล์จะเกิดรูพรุนมากขึ้น

จากการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA มาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ได้ถึงในระดับสปีชีส์ จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ อาจเป็นไปได้ว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* sp. แต่ยังไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าเป็นสปีชีส์ใด จึงนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA (ตารางที่ 4.3 และ 4.4) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียตัวอย่างกับสายพันธุ์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PS53 มีความเหมือนกับ *Bacillus cereus* ในฐานข้อมูล 100 เปอร์เซ็นต์

และแบคทีเรียสายพันธุ์ AN41 มีความเหมือนกับ *Bacillus tequilensis* ในฐานข้อมูล 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันดังแสดงในตารางที่ 4.5



ก. ข.

ภาพที่ 4.3 ลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) กำลังขยาย 100x

ก. แบคทีเรียสายพันธุ์ PS53 ข. แบคทีเรียสายพันธุ์ AN41

ตารางที่ 4.3 แสดงบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA จาก (5' -> 3') ของสายพันธุ์ PS53

รหัสตัวอย่าง Sample code	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ Nucleotide region of	ลาดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3') Nucleotide sequence (5' -> 3')
53	16S rDNA	GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGA CAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC TCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCG CATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTAC AGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAANG GCTCACCAAGGCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC TGACGGAGCAACGCCGCGTGGTGATGAAGGTTTTCGGATC GTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAA TAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGTGGCAA GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCG GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGG GAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAGAGGA GAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT TGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA GTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGC ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAA ACTCAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT CTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTT CGGGGGCAGAGTGAAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA CCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAG GTGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGT CAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG CTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAAACCGCGAGGT TAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCATTCGGATCGCAGTC TGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACCCCGAAGT

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 4.4 แสดงบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA จาก (5' -> 3') ของสายพันธุ์ AN41

รหัสตัวอย่าง Sample code	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ Nucleotide region of	ลาดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3') Nucleotide sequence (5' -> 3')
41	16S rDNA	GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAG ACTGGGATAACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGGT TGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGG CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG GTGAGGTAANGGCTCACCAAGGCACGATGCGTAGCCGACC TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGGTGATGAAG GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG TACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCA GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAAC GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG GCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAG TGCAGAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTC TCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA GCGAACAGGATTGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG ATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCT GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC GCAAGACTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAA GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA CCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAG GACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGAAGGTGGTGCATGGTT GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTT GGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGG TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGG CTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAA ACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTC GGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCG CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTG TAACACCGAAGT

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์โดยวิธีการเปรียบเทียบลำดับเบส บริเวณ 16S rDNA

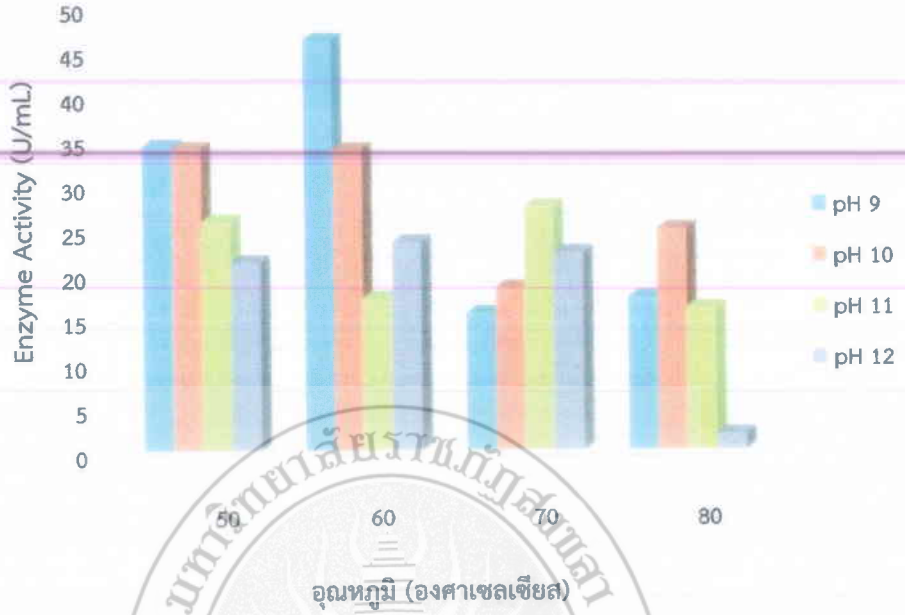
รหัสตัวอย่าง Sample code	วิธีการจำแนกชนิด Method of Identification	ผลการจำแนก Identify as	% ความเหมือน % Similarity
53	Double strand 16S rDNA sequencing	*Bacillus cereus*	100.00%
41	Double strand 16S rDNA sequencing	*Bacillus tequilensis*	100.00%

4.4 พีเอชและอุณหภูมิเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus cereus* PS53 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 0.5 กรัม glucose, 0.75 กรัม peptone, 0.5 กรัม KH_2PO_4, 0.01 กรัม $FeSO_4.7H_2O$, 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ โดยทำการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่าง ๆ ตั้งแต่พีเอช 9.0 ถึง 12.0 และทำการเลี้ยงเชื้อในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) โดยการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันตั้งแต่ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ *Bacillus cereus* PS53 ผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 45.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/mL) ดังแสดงในภาพที่ 4.4 และเมื่อเพิ่มค่าพีเอชเป็น 10.0 ถึง 12.0 อุณหภูมิ 70 ถึง 80 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้น้อยลง เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงมากเกินไปจนไม่เหมาะสมต่อการที่เชื้อสายพันธุ์นี้จะผลิตเอนไซม์ได้ นั่นหมายความว่า *Bacillus cereus* PS53 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในสภาวะพีเอชเป็นด่างที่ไม่สูงมากนักเช่นเดียวกับเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากสภาพแวดล้อมในภาวะด่าง ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ APB 1 สามารผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดเป็น 74.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มค่าพีเอชให้สูงขึ้นเป็น 10.0 ถึง 12.0 การผลิตเอนไซม์ก็ลดลงเช่นเดียวกัน (Smita *et al.*, 2012) การศึกษาของ Gomaa (2013) พบว่าเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus pumilus* ATCC 7061 สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดที่พีเอช 9.0 โดยผลิตเอนไซม์ได้ 23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างจากแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณฟาร์มนมซึ่งผลิตเอนไซม์ได้ตั้งแต่พีเอช 5.0 จนถึง 11.0 แต่ผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดที่พีเอช 9.0 ได้เป็น 124.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Sinha *et al.*, 2013) รวมทั้งเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างจาก *Bacillus* sp. ที่แยกได้

จากดินทะเล ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช 9.0 ให้ปริมาณเอนไซม์ 19.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Dam *et al*., 2013) นอกจากนี้สามารพบเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินและน้ำในเมืองกอนดาร์ ทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศโอธิโอเปีย ซึ่งสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีตั้งแต่พีเอช 8.0-10.0 (Bizuye *et al*., 2014) และเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* NS ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทะเลก็สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช 9.0 (123.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) (Nisha and Divakaran, 2014)

แต่เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง (60 องศาเซลเซียส) เช่นเดียวกับแบคทีเรียหลาย ๆ สายพันธุ์ เช่นเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตออกนอกเซลล์โดย *Bacillus* sp. N-40 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในเมืองของประเทศตุรกีซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (100 เปอร์เซ็นต์) โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียสเชื้อสายพันธุ์นี้ยังคงผลิตเอนไซม์ได้ดี (98 เปอร์เซ็นต์) (Sevinc and Demirkan, 2011) การศึกษาของ Zilda และคณะ (2012) ในการคัดแยกแบคทีเรียจากบ่อน้ำร้อนประเทศอินโดนีเซียสามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียได้สามสายพันธุ์คือ *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* และ *Brevibacillus thermoruber* โดยที่ *Bacillus subtilis* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) หรือจากการศึกษาคัดแยก *Bacillus* sp. จากดินทะเลโดย Dam และคณะ (2013) พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (19.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 60 องศาเซลเซียส ก็สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในระดับที่ดี (19.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เป็นต้น

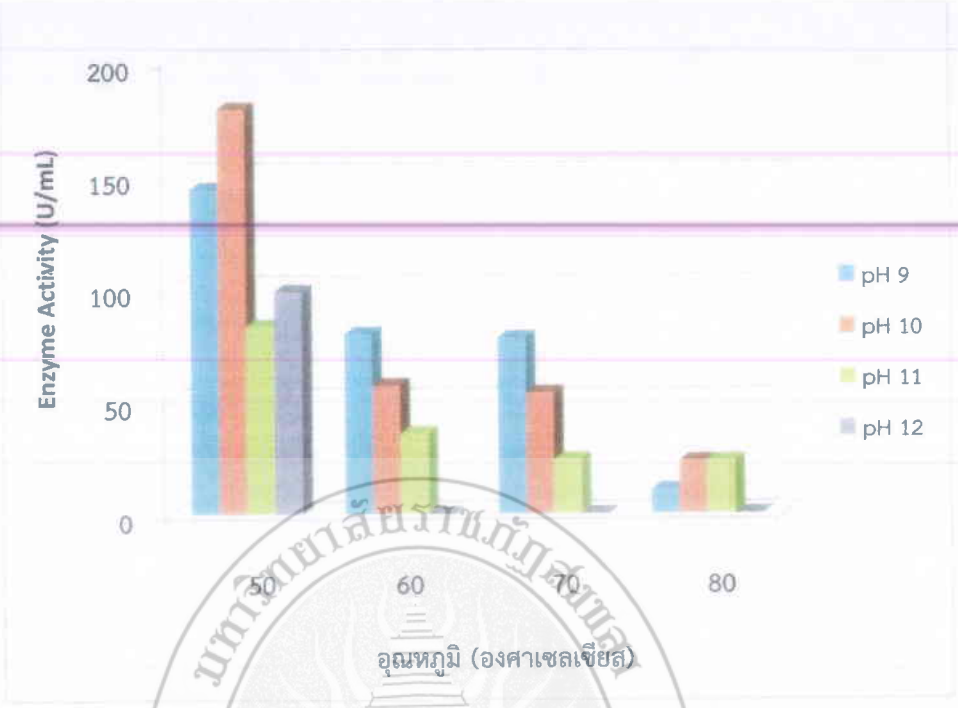


ภาพที่ 4.4 พีเอชและอุณหภูมิเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างของ *Bacillus cereus* (53) ที่แยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง ที่พีเอชที่แตกต่างกันตั้งแต่ 9.0 ถึง 12.0 และอุณหภูมิตั้งแต่ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส

และจากการเพาะเลี้ยง *Bacillus tequilensis* AN41 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 0.5 กรัม glucose, 0.75 กรัม peptone, 0.5 กรัม KH_2PO_4, 0.01 กรัม $FeSO_4.7H_2O$, 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ โดยทำการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่าง ๆ ตั้งแต่พีเอช 9.0 ถึง 12.0 และทำการเลี้ยงเชื้อในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) โดยการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันตั้งแต่ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อ *Bacillus tequilensis* AN41 ผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 10.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 179.19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/mL) ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และเมื่อเพิ่มค่าพีเอชเป็น 11.0 ถึง 12.0 อุณหภูมิ 60 ถึง 80 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ จะผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้น้อยลงนั่นหมายความว่า *Bacillus tequilensis* AN41 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีใน

สภาวะพีเอชเป็นด่างค่อนข้างสูง เช่นเดียวกับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน โดยพบว่า *Bacillus subtillis* และ *Serratia marscens* สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดพีเอช 10.0 (Palsaniya *et al.*, 2012) หรือเอนไซม์โปรตีเอสทนสภาวะด่างจาก *Bacillus circulans* MTCC 7942 ซึ่งคัดแยกจากแหล่งที่อยู่ที่มีสารไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อน สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 412 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่พีเอช 10 (Patil and Chaudhari, 2013) นอกจากนี้จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและน้ำในเมืองกอนดาร์ ทางตะวันออกเฉียงเหนือของเอธิโอเปีย สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้สามสายพันธุ์คือ ATCSsi, DSsiและ DWsi ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีที่พีเอช 8.0-10.0 (Bizuye *et al.*, 2014)

ส่วนการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ทนสภาวะด่างจาก *Bacillus tequilensis* AN41 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับการศึกษาของ Prakash และคณะ (2011) ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเมื่อใช้นมดิบเป็นสารตั้งต้น ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 4 สายพันธุ์คือ *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* และ *Enterobacter aerogengs* โดย *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris* สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลิตเอนไซม์ได้ 10.666 และ 8.666 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หรือการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนจากบ่อน้ำร้อนประเทศอินโดนีเซียซึ่งสามารคัดแยกแบคทีเรียได้หกสายพันธุ์ คือ *Bacillus licheniformis* (BII-1, BII-2 และ BII-6), *Bacillus subtilus* (BII-3 และ BII-4) และ *Brevibacillus thermoruber*(LII) โดย *Brevibacillus thermoruber*(LII) สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) (Zilda *et al.*, 2012) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและน้ำในเมืองกอนดาร์ ทางตะวันออกเฉียงเหนือของเอธิโอเปีย สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้สามสายพันธุ์คือ ATCSsi, DSsi และ DWsi ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีที่อุณภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Bizuye *et al.*, 2014)

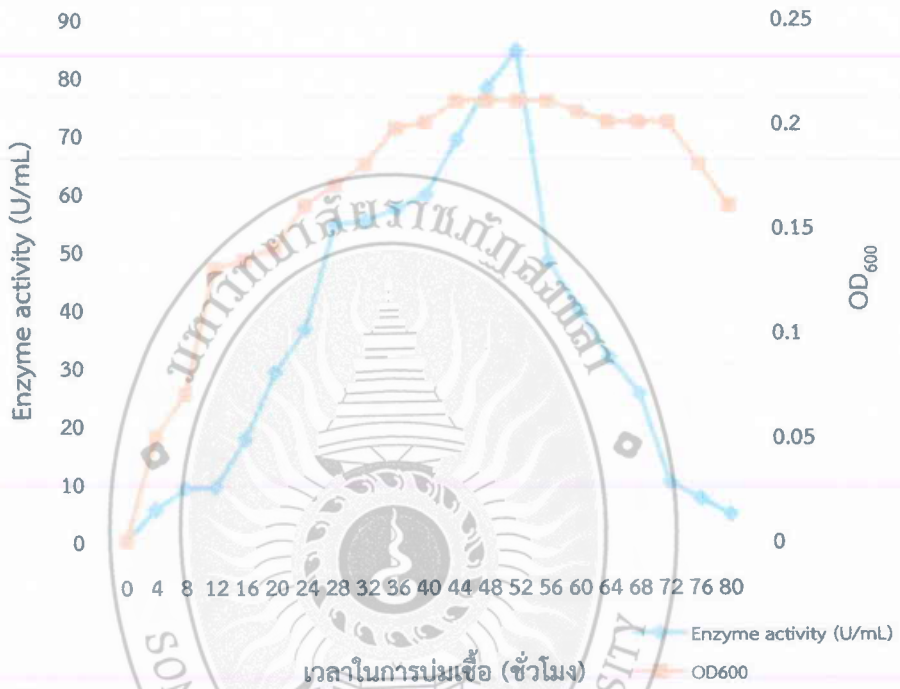


ภาพที่ 4.5 พีเอชและอุณหภูมิเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างของ *Bacillus tequilensis* AN41 ที่แยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินบ่อน้ำร้อนทุ้งนุ้ยอำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล ที่พีเอชที่แตกต่างกันตั้งแต่ 9.0 ถึง 12.0 และอุณหภูมิตั้งแต่ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส

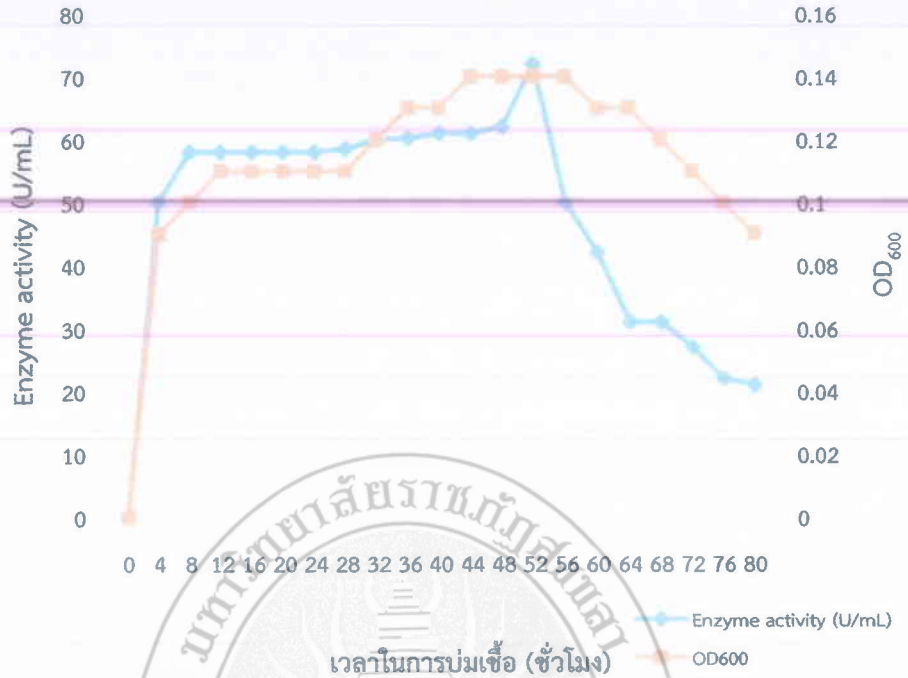
4.5 การติดตามการเจริญเติบโตและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

จากการนำเชื้อ *Bacillus cereus* PS53 และ *Bacillus tequilensis* AN41 เลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย glucose, peptone, KH_2PO_4, $FeSO_4.7H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$ ที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 10.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากนั้นทำการตรวจสอบการเจริญเติบโต และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ทุก ๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 80 ชั่วโมง ผลดังปรากฏในภาพที่ 4.6 และ 4.7 นั่นคือเชื้อ *Bacillus cereus* PS53 จะเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อจนถึงชั่วโมงที่ 40 (log phase) และเจริญเติบโตคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 44 (stationary phase) โดยการเจริญเติบโตจะเริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 72 (dead phase) ในขณะ *Bacillus tequilensis* AN41 จะเจริญเติบโตอย่าง

รวดเร็วใน 4 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ (log phase) และค่อย ๆ เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 52 จะเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) และเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 60 การเจริญเติบโตจะค่อยๆ ลดลง (dead phase)



ภาพที่ 4.6 การติดตามการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนจาก *Bacillus cereus* PS53 ในอาหารเหลว ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 80 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.7 การติดตามการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนจาก*Bacillus tequilensis* AN41 ในอาหารเหลวที่พีเอช 10.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 80 ชั่วโมง

ในส่วนการผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus cereus* PS53 พบว่าจะสามารถผลิตเอนไซม์ตั้งแต่ช่วงต้นของการเลี้ยงเชื้อ แต่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 52 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 86.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ *Bacillus tequilensis* AN41 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีพร้อม ๆ กับการเจริญเติบโตของเชื้อ และผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 52 เช่นเดียวกัน (72 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อทั้งสองสายพันธุ์เจริญเติบโตคงที่ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียได้ใช้สารอินทรีย์ในอาหารเหลวเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตอย่างเพียงพอแล้วเชื้อแบคทีเรียจึงเริ่มผลิตเอนไซม์โปรตีเอส หรือเป็นข้อสังเกตว่าช่วงการผลิตเอนไซม์ที่สูงสุดเกิดขึ้นเมื่อประชากรเซลล์มีการเจริญเติบโตคงที่นั่นหมายความว่าเมื่อแหล่งคาร์บอนในอาหารเริ่มลดลงจะมีผลเหนี่ยวนำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ออกมาได้ดีขึ้น (Cordeiro *et al.*, 2002) เช่นเดียวกับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรียหลาย ๆ สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีในช่วงที่เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตคงที่ เช่น เอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ AC15 ซึ่งผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดในช่วงของการเจริญเติบโตคงที่ในชั่วโมงที่ 96 โดยผลิตเอนไซม์ได้ 60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Uyar *et al.*, 2011) การผลิตเอนไซม์โดย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากดินบริเวณมหาวิทยาลัยบังกาลอร์ ประเทศอินเดีย ซึ่งผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในช่วงที่เชื้อมี

การเจริญเติบโตคงที่ในชั่วโมงที่ 48 (0.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) (Swamy *et al.*, 2012) หรือการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus coagulans* PSB-07 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในช่วง 48 ถึง 60 ชั่วโมง ในช่วงของการเจริญเติบโตที่คงที่ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ (Olajuyigbe and Ehiosun, 2013) นอกจากนี้พบว่า *Bacillus subtilis* SHS-04 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีในช่วงการเจริญเติบโตที่คงที่เช่นเดียวในชั่วโมงที่ 48 (Olajuyigbe, 2013)

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

จากการคัดแยกและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างที่ผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์แบคทีเรียซึ่งคัดแยกได้จากบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง และบริเวณบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล สามารถสรุปได้ดังนี้

5.1.1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากตัวอย่างตะกอนดินของบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน ได้ทั้งหมดจำนวน 10 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ PS53 มีค่า Relative enzyme activity สูงสุดคือ 21.0 ในขณะที่ตัวอย่างตะกอนดินจากบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมดจำนวน 8 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ AN41 มีค่า Relative enzyme activity สูงสุดคือ 20.2 มิลลิเมตร

5.1.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเอสทนร้อนในสภาวะด่างออกสู่ภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน และบ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย ในอาหารเหลวที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสายพันธุ์ PS53 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 163.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ AN41 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 125.93 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

5.1.3 การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ระบุ ได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PS53 มีความเหมือนกับ *Bacillus cereus* และ แบคทีเรียสายพันธุ์ AN41 มีความเหมือนกับ *Bacillus tequilensis*

5.1.4 การศึกษาพีเอชและอุณหภูมิเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ *Bacillus cereus* PS53 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ดีที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 45.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ *Bacillus tequilensis* AN41 สามารถผลิตเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 10.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 179.19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

5.1.5 การติดตามการเจริญเติบโตและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 52 ชั่วโมง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 แบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถนำไปศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ ต่อไป เช่น ปัจจัยของสารอาหารที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ความเสถียรของเอนไซม์ต่อพีเอชและอุณหภูมิ

5.2.2 เป็นแนวทางในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

เอกสารอ้างอิง

กัลยากร วงศ์กาฬสินธุ์. 2540. *การโคลนยีนโปรตีเอสจาก Bacillus subtilis TISTR25 สู่ Escherichia coli ด้วยระบบหลอมกับจีเอสทียีน.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จุฑาพร แสวงแก้ว. 2543. *การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เจษฎา ธีรศรัณยานนท์, อรพินท์ จินตสถาพร และศรีน้อย ชุ่มคำ. 2557. การศึกษากิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไลเปสในระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาว (*Latescalcarifer*). *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52.* สาขาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, *4-7 ภุมภาพันธ์ 2557,* 318-325.

พิมล จำนง,คินเลย์ คู และกนก รัตนะกนกชัย. 2547. อัลคาไลน์โปรติเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 และการนำไปใช้ในสารซักล้าง. *วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.* 27(2), 227-243.

นิสากรศรีธัญรัตน์ และศุภวรรณถาวรชินสมบัติ. 2011. *สมบัติของเอนไซม์โปรตีเนสในเนื้อปลาโมงบด.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิรุธน์ บัวงาม. 2541. *แบคทีเรีย.* สืบค้นจาก: http://www.l3nr.org.com. [30 ภุมภาพันธ์ 2557]

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2541. *มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมผงซักฟอก.* มอก. 78-2541.

สุวณี สุภเวชย์ และ มาลัย วรจิตร. 2540. *แบคทีเรียพื้นฐาน.* โรงพิมพ์ศิริยอด: กรุงเทพ.248 หน้า.

อัจฉราภรณ์ อ่อนทรวง. 2552. *กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสของจุลินทรีย์ผลิตกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านประเภทเนื้อและปลา.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

อมรรัตน์ ชมญาติ. 2551. *การผลิตอลคาไลน์โปรตีเอสโดยรา Aspergillus oryzae 3087 บนอาหาร KMP และอาหารที่มีส่วนผสมของปลาป่นกับโมลาส.* โครงการวิจัยภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยทักษิณ.

Aftab, U., Ashraf, M. and Jiang, Z. 2006. Low protein diets for broilers. World's Poult. *Science journals*. 62, 688-701.

Alemu, F. 2015. Isolation and screening of protease enzyme producing bacteria from cheese at DillaUniversity, Ethiopia. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 4(2), 163-168.

Alnahdi, H.S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new Isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2(9), 071-074.

Andrade, V.S., Sarubbo, L.A., Fukushima, K., Miyaji, M., Nishimura, K. and Takaki, G.M.C. 2002. Production of extracellular protease by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33,106–110.

Anwar, A. and Saleemuddin, M. 1998. Alkaline protease: A review. *Bioresource Technology*. 64, 175-183.

Bajaj, BK., Sharma, N. and Singh, S. 2013. Enhanced production of fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* NS-2 using cotton seed cake as nitrogen source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2, 204-209.

Beg, Q.K. and Gupta, R. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 32, 294-304.

Bizuye, A., Sago, A., Admasu, G., Getachew, H., Kassa, P. and Amsaya, M. 2014. Isolation, optimization and characterization of protease producing bacteria from soil and water in Gondar town, North West Ethiopia.*International Journal of Bacteriology, Virology and Immunology*. 1(3), 20-24.

Boller, T. and Wiemken, A. 1986. Dynamics of vacuolar compartmentation. *Plant Physiology*. 37, 137-164.

Chauhan, B. and Gupta, R. 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochemistry*. 39, 2115-2122.

Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L. and Luciano, A.B. 2002. Production and properties of α-amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33, 57-61.

Cronk, L., Gerkey and Drew. 2010. Why do we need to coordinate when classifying kin. *Journal of Behavioral and Brain Science*. 33: 385-386.

Dam, P., Das, M.P.,Rebecca, L. and Sharmila, S. 2013. Production and optimization of extracellular alkaline proteases from *Bacillus* sp. isolated from marine soil. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 4(2), 1-8.

Desai, D. and Vyas, T.K. 2014. Alkaline protease production by thermophilic and alkalophilic halotolerant *Bacillus* sp. strain TD: a promising enzyme producer for biotechnological application. *Trends in Biotechnology Research*. 3(1), 12-17.

Fulzele, R., DeSa, E., Yadav, A., Shouche, Y. and Bhadekar, R. 2011. Charecterization of novel extracellular protease produced by marine bacteria from the Indian ocean. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42, 1364-1373.

Gessesse, A., Kaul, R.H., Gashe, B.A., Mattiasson, B. 2003. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*. 32, 519-524.

Gupta, H. V., S. Sorooshian, and P. O. Yapo. 1999. Status of automatic calibration for hydrologic models: comparison with multilevel expert calibration. *Journal of Hydrologic Engineering*. 4(2), 135-143.

Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59, 15-32.

Gupta, A., Roy, I., Khare, S.K. and Gupta, M.N. 2005. Purification and characterization of asolvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Journal of Chromatography*. 1069, 155-161.

Genckal, H. and Tari, C. 2006. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 703–710.

Gomaa, E.Z. 2013. Optimization and characterization of alkaline protease and carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus pumillus* grown on *Ficus nitida* wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(2), 529-537.

Hebbar, H.U., Sumana, B. and Raghvarao, K.S.M.S. 2008. Use of reverse micellar sytemfor the extraction and purification and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresource Technology*. 99, 4896-4902.

Jabeen, F. and Qazi, J.I. 2011. Production and optimization of detergent compatible thermostable alkaline protease from *Bacillus cereus* FJ10. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 70, 1042-1048.

Jani, S.A., Chudasama, C.J., Patel, D.B., Bhatt, P.S. and Patel, H.N. 2012. Optimization of extracellular protease production from alkali thermo tolerant Actinomycetes: *Saccharomonos poraviridis* SJ-21. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. 1(6), 84–92.

Johnversly, B. and Naik, G.R. 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*. 37, 139-144.

Joo, H-S., Kumar, C.G., Park, G.C., Kim, K.T., Paik, S.R., and Chang, C.S. 2002. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry*. 38, 155-159.

Joo, H.S. and Chang, C.S. 2005. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*. 40, 1263-1270.

Joseph, F.H., Jacques, T. and Volker S.B. 2002. Thermophilic Protease-Producing *Geobacillus* from Buranga Hot Springs in Western Uganda. *Current Microbiology*. 45, 144–150.

Kobayashi, T., Hakamada,Y., Koike, K. and Ito, S. 1996. Purification of alkaline protease from a *Bacillus* strain and their possible inter relationship. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45, 63-71.

Kumar, C.G., Tiwari, M.P. and Jany, K.D. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Letters* in *Applied Microbiology*. 34, 13-17.

Kumar, PPK.,Mathivanan, V., Karunakaran, M., Renganathan, S. andSreenivasan, RS. (2008) Studies on the effects of pH and incubation period on protease production by *Bacillus* spp. using groundnut cake and wheat bran. *Indian Journal of Science Technology*. 1(4), 1-4.

Ladenstein, R. and Antranikian, G. 1998. Proteins from hyperthermophil esstability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 61, 37-85.

Lakshmi B.K.M., Ratna Sri, P.V., Ambika D.K. and. Hemalatha KP.J (2014). Media optimization of protease production by *Bacillus licheniformis* and partial characterization of Alkaline protease. *International Journal of Current Microbiology* and *Applied* Sciences. 3(5), 650-659.

Merheb, C.W., Cabral, H., Gomes, E. and Da-Silva, R. 2007. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus arantiacus* and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*. 104, 127-131.

Miyaji,T., Otta,Y.T., Shibata, K., Mitsui,T., Nakagawa,T., Watanabe,Y., Niimura and Tomizuka, N. 2005. Purification and characterization of extracellular alkaline serine protease from *Stenotrophomonas maltophilia* strain S-1. *Letters in Applied Microbiology*. 41, 253-257.

Naidu, K.S.B., Devi, K.L. and Adam, K.J. 2011. Evaluation of different matrices for production of alkaline protease from Bacillus subtilis –K 30 by entrapment technique. *African Journal of Biochemistry Research*. 5(7), 220-225.

Ningthoujam, D.S., Kshetri, P., Sanasam, S. and Nimaichand, S. 2009. Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkali thermotolerant Indigenous Actinomycetes. *World Applied Sciences Journal*. 7 (7), 907-916.

Nisha, N.S. and Divakrn, J. 2014. Optimization parameters of alkaine protease poduction using bacterial isolated from different coastel regions of Tamil Nadu, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(8), 500-505.

Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K. and Gupta, R. 2001. Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17, 493-497.

Odu, N.N. and Akujobi,C.O. 2012. Protease production capabilities of *Micrococcus Luteus* and *Bacillus* species isolated from abattoir environment. *Journal of Microbiology Research*. 2(5), 127-132.

Olajuyigbe, F.M. and Ajele, J.O. 2005. Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology.* 4 (8), 776-779.

Olajuyigbe, F.M. and Ajele, J.O. 2008. Some properties of extracellular protease from *Bacillus licheniformis* Lbb1-11 isolated from "iru" a tradionally fermented African locus bean condiment. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 3, 42-46.

Olajuyigbe, F.M. 2013. Optimized production and properties of thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* SHS-04 grown on groundnut (*Arachishypogaea*) meal. *Advances in Enzyme Research*. 1(4), 112-120.

Olajuyigbe, F.M. and Falade, A.M. 2013. Purification and partial characterization of serine alkaline metalloprotease from *Bacillus brevis* MWB-01. *Bioresources and Bioprocessing*. 1-8.

Palsaniya, P., Mishra, R., Beejawat, N., Sethi, S. and Gupta, B.L. 2012. Optimization of alkaline protease production from Bacteria isolated from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 2(6), 858-865.

Panda, M.K., Sahu, M.K. and Tayung, K. 2013. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. *Iranian Journal of Microbiology*. 5(2), 159-165.

Patil, U. and Chaudhari, A. 2013. Production of Alkaline protease by solvent-tolerant alkaliphilic *Bacillus circulans* MTCC 7942 isolated from hydrocarbon contaminated habitat: process parameters optimization. *ISRN Biochemistry*. Article ID 942590, 10 pages.

Panta,G., Prakasha, A., Pavania, J.V.P., Beraa, S., Devirama, G.V.N.S., Kumara, A., Panchpurib, M. and Prasunaa,R.G. 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science.* 9, 50–55.

Pedersen, H.H., Olsen, H.S. and Nielsen, P.M. 1994. Method for production of meat hydrolyzate and a use of the meat hydrolyzate. *PCT Patent Applie. WO 01003.*20 p.

Periyasamy, A., KrishnaRaj, H.R. and Balu, A. 2014. Prototype for alkaline protease production purification and characterization from *Bacillus pumilus* BAAK-1 and its beneficence in synthetic surfactant sector.*Journal of Biotechnological Sciences*. 2(2), 1-18.

Prakash, S., Kannapiran, E., Ramasubburayan, R., Iyapparaj, P., Ananthi, S., Palavesam, A., Immanuel, G. 2011. Production and partial purification of protease by selected bacterial strains using raw milk as substrate.*Malaysian Journal of Microbiology*. 7(4), 192-200.

Rao, M.B., Tankasale, A.M., Ghatage, M.S. and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63, 597-635.

Razak, C., Tang, S., Basri, M. and Salleh, A. 1997. Prelimenary study on the production of extracellular protease from a newly isolated Bacillus sp. (no.1) and the physical factors affecting its production. *Pertanika Journal of Science and Technology*. 5, 169–177.

Satyanarayana, T., Raghukumar, C.and Shivaji, S. 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*. 89(1), 78-90.

Sepahy, A.A. and Jabalameli, L. 2011. Effect of culture conditions on the production of an extracellular protease by *Bacillus* sp. Isolated from soil sample of Lavizan Jungle Park. *Enzyme Research*. Article ID: 219628.

Sevinc, N. and Demirkan, E. 2011. Production of Protease by *Bacillus* sp. N-40 Isolated from Soil and Its Enzymatic Properties. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 5(14), 95-103.

Singh, J., Vohra, R.M. and Sahoo, D.K.. 2001. Purification and characterization of two extracellularalkaline proteases from a newly isolated obligate alkalophilic *Bacillus sphaericus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26, 387-393.

Sinha, P., Singh, R.K, Srivastva, R., Sharma, R. and Tiwari, S. P. 2012. Charecterization and optimization of alkaline protease enzyme produced by soil borne bacteria. *Trends in Life Science*. 2(2), 38-46.

Smita, G.S., Ray, P. and Mohapatra, S. 2012. Quantification and Optimisation of bacterial isolates for production of alkaline protease. *Society of Applied Sciences*. 3(1), 180-186.

Swamy, M. K., Kashyap, S.S.N., Vijay, R., Tiwari, R. and Anuradha, M. 2012. Production and optimization of extracellular protease from *Bacillus* sp. Isolated from soil. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 3(2), 564-569.

Tambekar, S.D. and Tambekar, D.H. 2013. Optimization of the production and partial characterization of an extracellular alkaline protease from thermo-halo-alkalophilicLonar Lake bacteria. *Bioscience Discovery*. 4(1), 30-38.

Thakur, S. and Tiwari, E. 2013. Isolation and Characterization of Thermostable Protease Producing Bacteria from Soap Industry Effluent. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 6(2), 50-52.

Tiwari, O.N., Devi, T.B., Devi, K.S., Oinam, G., Indrama, T., Ojit, K., Avijeet, O. and Ningshen, L. 2015. Isolation and optimization of alkaline protease producing Bacteria from undisturbed soil of NE-region of India falling under Indo-Burma biodiversity hotspots. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 3(4), 25-31.

Towatana, N.H., Painupomg, A. and Suntimamalert, P. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719.*Journal of Bioscience* and *Bioengineering.* 87(5), 581-587.

Tsuchida, O., Yamagota, Y., Ishizuka, J., Arai, J., Yamada, J., Ta-keuchi, M. and Ichishima, E. 1986. An alkaline proteinase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Current Microbiology. 14, 7-12.*

Uyar, F., Porsuk, I., Kizil, G. and Yilmaz, E.I. 2011. Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15. *EurAsian Journal of BioSciences*. 5, 1-9.

Verma, T. and Baiswar, V. 2013. Isolation and characterization of extracellular thermoalkaline Journal of Engineering Protease Producing *Bacillus cereus* isolated from Tannery Effluent. *The International and Science*. 2(7), 23-29.

Wang, S., Xin, X., Huang, X., Zheng, Li and Deswita, Z. 2012. Screening and characterization of the alkaline protease isolatrd from PLI-1, a strain of *Brevibacillus* sp. collectd from Indonesia's hot spring*Journal of Ocean University of China*. 11(2), 213-218.

Watson, J.1979. *Nursing: the Philosophy and Science of Caring*. Boston: Little, Brown.

Zilda, D. S., Harmayani, E., Widada, J., Asmara, W., Irianto, H.E., Patantis, G. and Fawzya, Y.N. 2012. Screening of thermostable protease producing microorganism isolated from Indonesian hotspring. *Squalen*.7, 105-114.

http://www.biotecharticles.com :เข้าถึงเมื่อวันที่ 11 ก.ค. 2556

http://www.siamfreestyle.com/travel-attraction/pattalung/kao-chai-son.html: เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 ธันวาคม

http://www.sci.tsu.ac.th : เข้าถึงเมื่อวันที่ 30 ธันวาคม2557

http://www.tungnuisilathong.co.th : เข้าถึงเมื่อวันที่ 30 ธันวาคม2557

http://www.tungnuisilathong.co.th/knowledge/detail/26: เข้าถึงเมื่อวันที่ 30 ธันวาคม 2557

http://www.biotecharticles.com: เข้าถึงเมื่อวันที่ 30 ธันวาคม2557

http://www.sci.tsu.ac.th/ : เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 มกราคม2558

http://www.siamfreestyle.com/travel-attraction/pattalung/kao-chai-son.html
: เข้าถึงเมื่อวันที่ 3 กุมภาพันธ์2558

http://www.tungnuisilathong.co.th/ : เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 กุมภาพันธ์2558

http://www.tungnuisilathong.co.th/knowledge/detail/26: เข้าถึงเมื่อวันที่ 10กุมภาพันธ์ 2558

http://www.biotecharticles.com: เข้าถึงเมื่อวันที่ 12 มีนาคม2558

http://www.sci.nu.ac.th/Biology/Biodiversity: เข้าถึงเมื่อวันที่ 15 เมษายน 2558

ภาคผนวก ก.

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองในปริมาณ 1 ลิตรประกอบด้วย Nutrient agar (NA) จำนวน 28 กรัม ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0

1.2 การเตรียมอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ

สารเคมีที่ใช้

1. Nutrient agar (NA)
2. น้ำกลั่น

วิธีการเตรียม

นำ Nutrient agar (NA) 8.4 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร นำไปตั้งไฟให้ร้อนแล้วถ่ายลงในหลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตรทำการ autoclave แล้ววางทำมุม 45 องศา ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3 การเตรียมอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อสำหรับใส่เพลท

สารเคมีที่ใช้

1. Nutrient agar (NA)
2. น้ำกลั่น
3. Skim milk agar 10 %

วิธีการเตรียม

เตรียม Nutrient agar (NA) ในปริมาตร 300 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย nutrient agar (NA) 8.4 กรัม และ (Tris-HCL buffer) 300 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด ปิดจุก นำไป autoclave จากนั้นเตรียม skim milk agar 10 % ในปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย skim milk agar 10% 3 กรัม และ (Tris-HCL buffer) 30 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด ปิดจุก นำไป autoclave เมื่อสารละลายอุ่นเท skim milk agar 10 % ลงในขวด nutrient agar เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทอาหารลงในเพลท

1.4 การเตรียมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ

สารเคมีที่ใช้

1. Nutrient broth (NB)
2. น้ำกลั่น

วิธีการเตรียม

นำ Nutrient broth (NB) 1.3 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทำการ autoclave 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid)

วิธีการเตรียม

เตรียม 10 % ของ Trichloroacetic acid (TCA) 5 กรัม ใส่ขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

3. การเตรียมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

วิธีการเตรียม

เตรียม 0.44 M ของโซเดียมคาร์บอเนต 11.6589 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่น ใส่ขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

4. การเตรียม Folin phenol reagent

วิธีการเตรียม

นำสารละลาย Folin phenol reagent มา 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

5. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

5.1 การเตรียมสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCL buffer)

วิธีการเตรียม

เตรียม 0.05 M ของ Tris (hydroxy methyl) aminomethane 6.0 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.05 M ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 9.0 ใส่ขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

5.2 การเตรียมสารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (glycine-NaOH buffer)

วิธีการเตรียม

เตรียม 0.05 M ของ glycine 1.126 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.05 M ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 10.0, 11.0 และ 12.0 ใส่ขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรให้ได้ 300 มิลลิลิตร

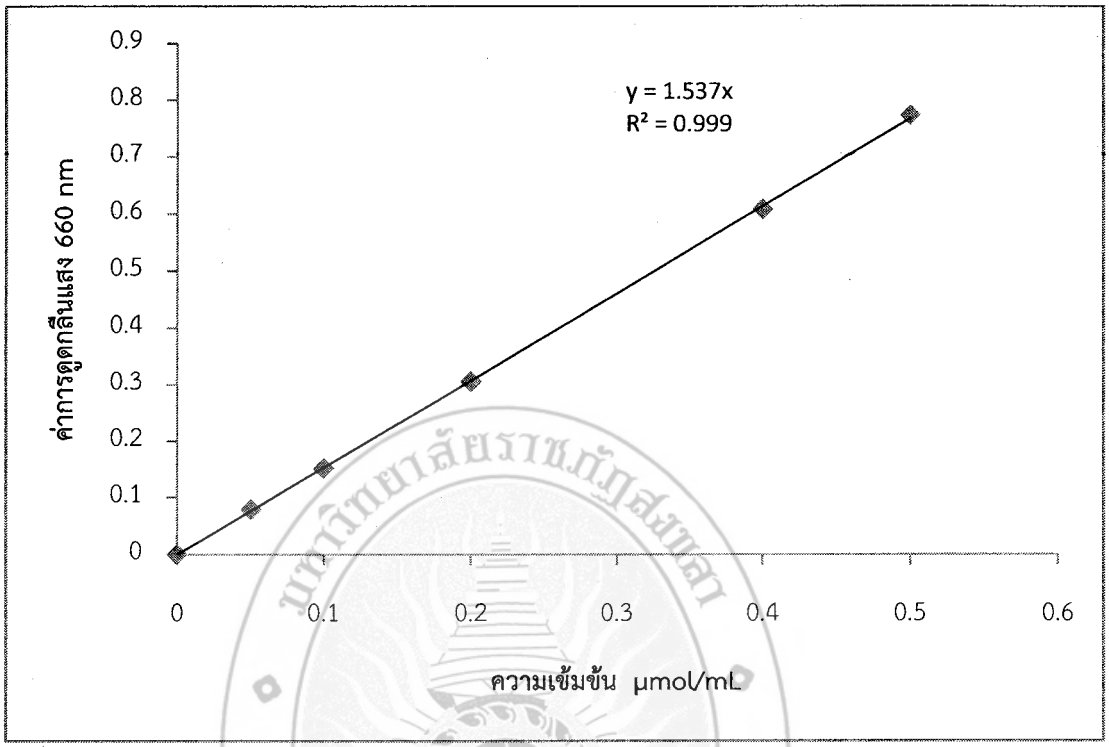
6. การเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน

สารเคมีที่ใช้

1. ไทโรซีน

วิธีการเตรียม

ชั่งไทโรซีน 0.002 กรัม ใส่ขวดวัดปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายไทโรซีนที่ได้ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ เติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำแต่ละหลอดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.44 M 5 มิลลิลิตร และเติม Folin phenol reagent 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของส่วนใสด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร



รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานของไทโรซีน

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก ข.

1. รูปภาพจากแหล่งเก็บตัวอย่างดิน 5 จุด ณ บ่อน้ำร้อนเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง

จุดที่ 1 บริเวณตรงกลางบ่อ อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส พีเอช 7.90

จุดที่ 2 บริเวณขอบบ่อด้านใน อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส พีเอช 7.92

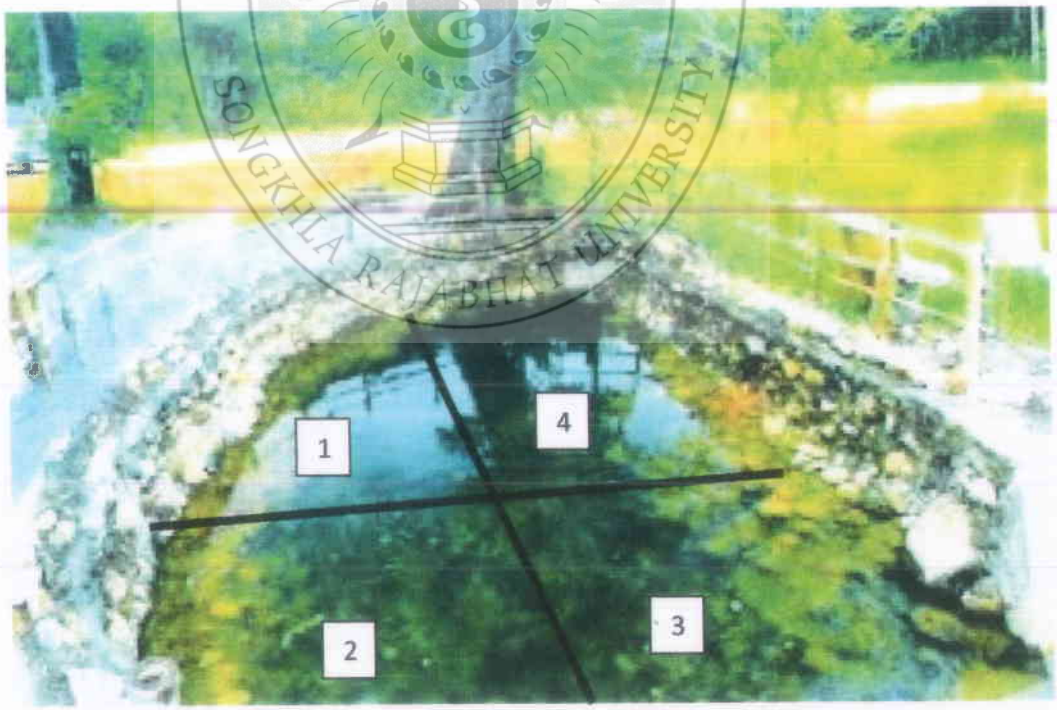
จุดที่ 3 บริเวณบ่อกลางแจ้ง อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 8.14

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

จุดที่ 4 บริเวณต้นทางน้ำทิ้ง อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 8.25

จุดที่ 5 บริเวณทางน้ำทิ้ง อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 8.27

2. รูปภาพจากแหล่งเก็บตัวอย่างดิน 4 จุด ณ บ่อน้ำร้อนทุ่งนุ้ย จังหวัดสตูล



มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY