จำนวน 2 เล่ม
- 6 ธ.ค. 2562

รายงานการวิจัย

ปัจจัยขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจาก *Bacillus cereus* PS53

Effect of Medium Composition for Thermotolerant Alkaline Protease Production by *Bacillus cereus* PS53

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

เชาวนีพร ชีพประสพ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

ชื่องานวิจัย ปัจจัยขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจาก *Bacillus cereus* PS53
ผู้วิจัย เชาวนีพร ชีพประสพ
คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ปี 2561

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ได้ดำเนินการเลี้ยง *Bacillus cereus* PS53 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย กลูโคส เพปโตน KH_2PO_4, $MgSO_4$ และ $FeSO_4$ ที่พีเอช 9 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในสภาวะของห้องปฏิบัติการเพื่อผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่าง และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส จึงได้ศึกษาผลของส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สำคัญ ๆ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ไอออนโลหะ และสารลดแรงตึงผิว ต่อผลของการผลิตเอนไซม์ โดยพบว่าแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดคือ น้ำตาลกลูโคสและทริปโตน (67.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) การเติมไอออนโลหะของ Fe^{2+}, Mg^{2+} และ Cu^{2+} ในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเพิ่มสูงขึ้น 125.43, 110.51 และ 108.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าในอาหารที่มีการเติม Ethylene diamine tetraacetic (EDTA) และ Sodium dodesyl sulfate (SDS) สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีขึ้นเป็น 119-139 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: ปัจจัยขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่าง บาซิลลัส

เลข Bibliography 1142825
วันที่ 15 เม.ย. 2562
เลขเรียกหนังสือ ว 572.7 ช517ป

Research Title Effect of Medium Composition for Thermotolerant Alkaline Protease Production by *Bacillus cereus* PS53

Researcher Chaowaneeporn chepprasop

Faculty Faculty of Science and Technology

Year 2018

Abstract

The present study was carried out under laboratory for the production of thermotolerant alkaline protease from *Bacillus cereus* PS53 in basal medium containing glucose, peptone, KH_2PO_4, $MgSO_4$ and $FeSO_4$ at pH 9, temperature of 50°C. In order to enhance the production of protease, the effects of major medium ingredients, such as carbon, nitrogen source, metal ions and surfactant on the production of the enzyme were investigated. Glucose as carbon sources and tryptone as nitrogen source has displayed the highest protease production (67.31 unit/mL). Supplementation of the culture medium with Fe^{2+}, Mg^{2+} and Cu^{2+} which influenced the maximum yield of this enzyme (125.43, 110.51 and 108.13%, respectively). The maximum amount of protease production was obtained in Ethylene diamine tetraacetic (EDTA) and Sodium dodesyl sulfate (SDS) (119-139%).

Keywords: effect of medium composition, thermotolerant alkaline protease *Baciilus* sp.

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยโครงการวิจัยเรื่อง ปัจจัยขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจาก *Bacillus cereus* PS53 ขอขอบพระคุณกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2559 จำนวน 60,000 บาท (หกหมื่นบาทถ้วน)

ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้สละเวลาในการแก้ไขข้อผิดพลาดและให้คำแนะนำที่ดีต่อการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่อื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ ในการทำการวิจัย รวมทั้งคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และนักศึกษาโปรแกรมวิชาเคมีและเคมีประยุกต์ ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือเสมอมา

และสุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด จนทำให้รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

เชาวนีพร ชีพประสพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สิงหาคม 2561

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ขอบเขตการวิจัย	2
นิยามศัพท์เฉพาะ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรีย	3
2.2 เอนไซม์โปรตีเอส	3
2.3 แหล่งของเอนไซม์โปรตีเอส	5
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่าง	8
2.5 ประโยชน์ของเอนไซม์โปรตีเอสในอุตสาหกรรม	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	16
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์	16
3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	18
3.3 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของอนไซม์โปรตีเอส	18
3.4 ปัจจัยขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจาก *Bacillus cereus* PS53	19

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	21
4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่าง	21
4.2 เปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่าง	25
4.3 ผลของไอออนต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่าง	27
4.4 ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่าง	28
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	31
บรรณานุกรม	32
ภาคผนวก	39

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 4.1	ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลกลูโคส) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	22
ภาพที่ 4.2	ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลฟรุคโตส) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	22
ภาพที่ 4.3	ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลกาแล็คโตส) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	23
ภาพที่ 4.4	ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลมอลโตส) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	23
ภาพที่ 4.5	ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลซูโครส) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	24

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 4.6 ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลแล็คโตส) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างชูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 24

ภาพที่ 4.7 ผลของแหล่งคาร์บอน (กากน้ำตาล) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างชูริมิ)ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 25

ภาพที่ 4.8 ผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 ในสภาวะที่แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 27

ภาพที่ 4.9 การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะต่างจากเชื้อ *Bacillus cereus* PS53 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งไอออนที่แตกต่างกัน 28

ภาพที่ 4.10 การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะต่างจาก *Bacillus cereus* PS53 ในอาหารเหลวที่มีสารลดแรงตึงผิวชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่างกัน 30

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โปรตีเอสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นเพปไทด์สายสั้นๆ หรือกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งสามารถแบ่งประเภทได้ดังนี้คือหนึ่ง แบ่งตามตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดสายพันธะเพปไทด์ คือแบบที่ตัดสายเพปไทด์จากด้านใน (endopeptidase: ECEC 3.4.21-99) และแบบที่ตัดสายเพปไทด์จากด้านนอก (exopeptidase: EC 3.4.11-19) สอง แบ่งตามช่วงของพีเอชที่มีผลให้เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด ดังนี้คือทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกรด (acidic protease: pH 2.0-6.0) ทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง (neutral protease: pH 6.0-8.0) และทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นด่าง (alkaline protease: pH 8.0-13.0) (Sabotic and Kos, 2012) โดยเอนไซม์กลุ่มนี้จะเป็นหนึ่งในกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดของเอนไซม์อุตสาหกรรมประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของยอดขายรวมของเอนไซม์ในโลก (Zambare *et al.*, 2011) รวมทั้งได้นำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหาร สารซักล้าง การจักรสาน สิ่งทอ การฟอกหนัง การบดเนื้อ นอกจากนั้นยังนำมาใช้ในทางเภสัชกรรมการวินิจฉัยทางการแพทย์ และการสลายตัวของเจลาตินบนแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (Rai and Mukherjee, 2010) เอนไซม์โปรตีเอสพบได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะเป็นแหล่งที่ต้องการมากที่สุดเนื่องจากสามารถผลิตได้ง่าย ค่าใช้จ่ายต่ำกว่า และผลิตได้ในปริมาณมากในระดับอุตสาหกรรม (Kocher and Mishra, 2009)

เอนไซม์ทนความร้อนเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีภายใต้อุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง ทนต่อความร้อนที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับความเหมาะสมของเอนไซม์ในการใช้งานอุตสาหกรรมเนื่องจากจะเพิ่มอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการในกระบวนการผลิตจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้จึงเป็นการลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ (Deore *et al.*, 2013) ซึ่งสมบัติดังกล่าวมีคุณค่าสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมตัวอย่างเช่น *Bacillus subtiliss*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus mojavensis* และ *Bacillus stearothermophilus* เป็นต้น (Shuai *et al.*, 2012)

จากการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากตัวอย่างตะกอนดินบริเวณบ่อน้ำร้อนอำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง สามารถคัดแยกแบคทีเรียและบ่งชี้สายพันธุ์โดยวิธี 16S rDNA ได้เป็น *Bacillus cereus* PS53 โดยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 9.0 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 52 ชั่วโมง (เชาวนีพร ชีพประสพ, 2558)

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาปัจจัยขององค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ไอออนของโลหะหนัก และสารลดแรงตึงผิวบางชนิดต่อการผลิตเอนไซม์

โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจาก *Bacillus cereus* PS53 ซึ่งผลที่ได้จะนำมาพัฒนาสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อสายพันธุ์นี้ให้ได้มากที่สุด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาปัจจัยขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ไอออนของโลหะ สารลดแรงตึงผิวบางชนิดต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจาก *Bacillus cereus* PS53

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถพัฒนาเป็นสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อสายพันธุ์นี้

1.3.2 สามารถนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมผงซักฟอก เป็นต้น

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาปัจจัยขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ไอออนของโลหะ สารลดแรงตึงผิวบางชนิดต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจาก *Bacillus cereus* PS53 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตะกอนดินของบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

เอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่าง หมายถึง เอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบที่มีพันธะเปปไทด์ในโครงสร้างได้ดีในสภาวะด่างที่มีอุณหภูมิสูง

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรีย

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนดินในบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง จำนวน 5 จุด ทำการคัดแยกได้ตัวอย่างดิน 25 เมื่อทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสโดยวิธีการ spread plate บนอาหารแข็ง nutrient agar ผสมกับ skim milk 2 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปรากฏเป็นวงใสรอบ ๆ โคโลนี จากตัวอย่างตะกอนดินของบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน ได้ทั้งหมดจำนวน 10 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 โดยสายพันธุ์ PS53 มีค่าRelative enzyme activity สูงสุดคือ 21.0 เมื่อนำมาคัดแยกอีกครั้งโดยวัดค่ากิจกรรมของการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย glucose, peptone, KH_2PO_4, $FeSO_4$. $7H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$ ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ PS53 ก็สามารถผลิตเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้มากที่สุดเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ PS53 มาทำการบ่งชี้สายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16s rDNA และพบว่าเป็น *Bacillus cereus* PS53 โดยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 52 ชั่วโมง (เชาวนีพร ชีพประสพ, 2558)

2.2 เอนไซม์โปรตีเอส

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ หรือกรดอะมิโนพบได้ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีบทบาทมากในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมถ่ายรูป การบำบัดของเสีย และโดยเฉพาะอุตสาหกรรมสารซักล้าง มีปริมาณการใช้และคิดเป็นมูลค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอุตสาหกรรมอื่นๆ (พิมล จำนง และคณะ, 2547) โปรตีเอสมีชื่อสามัญหลายชื่อได้แก่ เปปทิเดส (peptidase), โปรติเนส (proteinase), เปปไทด์ไฮโดรเลส (peptide hydrolase) และโปรติโอไลติก เอนไซม์ (proteolytic enzyme) TheInternational Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) ได้แนะนำให้ใช้เปปทิเดสในการเรียกเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ซึ่งอยู่ใน subclass E.C 3.4 ที่ทำ

หน้าที่ย่อยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) เปปทิเดสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มด้วยกัน มีทั้งชนิดที่ทำปฏิกิริยาย่อยแบบภายนอก เรียกว่าเอกโซเพปติเดส (exopeptidase) คือการย่อยพันธะจากด้านปลายของกรดอะมิโนปลายเอ็น (N-terminal) หรือปลายซี (C-terminal) และชนิดที่ทำปฏิกิริยาย่อยพันธะเพปไทด์ที่อยู่ภายในเรียกว่า เอนโดเพปติเดส (endopeptidase) เอนไซม์โปรตีเอสบางชนิดย่อยพันธะแบบสุ่ม แต่จะเป็นการย่อยจำเพาะกับกรดอะมิโน (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, 2556) เนื่องจากเอนไซม์โปรตีเอสเป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ที่มีสมบัติแตกต่างกัน และมีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน จึงมีเอนไซม์โปรตีเอสตามความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาเป็น 4 กลุ่มได้แก่

1. ซีรีนโปรตีเอส (serine protease)

เป็นเอนไซม์เอนโดเพปติเดสย่อยพันธะเพปไทด์ภายในสายโพลีเพปไทด์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และกลุ่มซับทิลิซีน (subtilisin) ส่วนใหญ่เอนไซม์เหล่านี้จะทำงานได้ดีในสภาวะด่าง ในกลุ่มไคโมทริปซิน ประกอบด้วย ทริปซิน และอีลาสเทส

1.1 ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) เป็นเอนไซม์ที่ผลิตโดยตับอ่อนอยู่ในรูปที่ยังไม่ทำงาน คือ ไคโมทริพซิโนเจน (chymotrypsinogen) แต่เมื่อถูกย่อยโดยทริปซินได้เป็นไคโมทริปซิน ซึ่งมีสายโพลีเพปไทด์ต่อกันด้วยพันธะซัลไฟด์ จึงจะทำให้ไคโมทริปซินสามารถทำงานได้

1.1.1 ทริปซิน (trypsin) เอนไซม์ที่ผลิตโดยตับอ่อนเช่นกันแต่ทำงานในลำไส้เล็กในสภาวะด่างมีค่าพีเอช 8 บริเวณตำแหน่งที่จับกับซับสเตรตนอกจากจะมีกรดอะมิโนซีรีนแล้วยังมีกรดแอสพาร์ติกหรือกรดกลูทามิกด้วยจึงย่อยเพปไทด์ที่มีประจุบวกคือ ไลซีนและอาร์จีนีน

1.1.2 อีลาสเทส (elastase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยอิลาสทิน (elastin) ซึ่งพบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ตรงตำแหน่งเอนไซม์จับกับซับสเตรตที่มีขนาดเล็กจึงสามารถย่อยพันธะเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนอะลานีน ไกลซีน และวาลีน

1.2 ซับทิลิซีน เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่ย่อยโปรตีนที่พบในโพรแคริโอตโดยเฉพาะ *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefacines*, *Bacillus licheniformis* มีตำแหน่งเอนไซม์จับกับซับสเตรตเป็นกลุ่มกรดอะมิโนสามตัว เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการแปรรูปอาหาร เครื่องสำอาง และผงซักฟอกทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและทนอุณหภูมิสูง

2. ซีสเตอีนโปรตีเอส (cysteine protease)

เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่เร่งปฏิกิริยาโดยมีกรดอะมิโนซิสเตอีนทำงานร่วมกับฮิสทิดีน พบมากในผลไม้นิยมใช้ในการทำให้เนื้อนุ่ม เช่น

2.1 ปาเปน (papain) จะมีมากในยางมะละกอ เอนไซม์ปาเปนจะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เบียร์ ไวน์ และเครื่องดื่มอื่น ๆ โดยจะทำหน้าที่ละลายโปรตีนในผลิตภัณฑ์ และให้สารละลายใสไม่ขุ่น เมื่อเก็บไว้นานหรือที่อุณหภูมิต่ำ ในโรงงานผลิตเนื้อสัตว์และปลาจะทำให้เนื้อสัตว์นั้นนุ่มเปื่อยเมื่อนำมาประกอบอาหาร ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5-9 ทนอุณหภูมิสูงจึงต้องใช้อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส จึงจะถูกทำลาย

2.2 โบรมีเลน (bromelain) เป็น endoprotease ที่อยู่ในกลุ่ม cysteine protease ที่พบในเนื้อเยื่อ ลำต้น ผล และใบของสับปะรด ซึ่งจัดเป็นพืชในตระกูล *Bromeliaceae* โบรมิเลนจากส่วนของลำต้นสับปะรด และโบรมิเลนจากส่วนของผลสับปะรดหรือ fruit bromelain เป็นโปรตีเนส ที่เรียกว่า glucoprotein proteinase มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส ถูกทำลายเมื่อให้ความร้อนสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส

2.3 ฟิซิน (ficin) เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในผลและยางมะเดื่อ ทำงานได้ในช่วงค่าพีเอช 5.0-7.5 อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส

3. แอสพาร์เทตโปรตีเอส (aspartate protease)

เป็นเอนไซม์ที่มีตำแหน่งที่จับกับซับสเตรทประกอบด้วยกรดแอสพาร์ติก 2 โมเลกุล ช่วยในการทำปฏิกิริยา ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดเป็นเอ็นโดเปปติเดส ได้แก่

3.1 เพปซิน (pepsin) พบในกระเพาะอาหาร เป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสารอาหารประเภทโปรตีนให้เป็นเพปไทด์ที่มีหมู่กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำโดยเฉพาะที่มีหมู่แอโรมาติกโดยผลิตจากกระเพาะในรูปเพปซิโนเจน (pepsinogen) เมื่อพบกับกรดจะถูกย่อยได้เป็นเพปซิน ทำงานได้ดีที่ค่าพีเอช 2 อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส และจะไม่ทำงานที่ค่าพีเอชสูงกว่า 7

3.2 คาเทปซีน (cathepsin) มักจะพบในเอนไซม์อยู่ในเซลล์ของตับ ทำงานได้ดีที่ค่าพีเอช 3.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, 2556)

3.3 เรนนิน (rinnin) เป็นเอนไซม์ที่มีต้นกำเนิดมาจากกระเพาะส่วนที่ 4 ของลูกวัวระยะไม่หย่านม (suckling calf) โดยจะปล่อยออกมาในรูปของไซโมเจนเรียกว่า prorennin แต่เมื่อกระตุ้นทริปซินเป็นเรนนินจะมีมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้นเป็นสารพอลีเพปไทด์หลายสายมาต่อกันระหว่างกัน การพัฒนาเอนไซม์จะเปลี่ยนแปลงไปตามธรรมชาติ เมื่อลูกวัวโตขึ้นอาหารจะค่อยๆเปลี่ยนจากนมเป็นหญ้าเปลี่ยนแหล่งโปรตีนจากนมเป็นพืช ดังนั้นเรนนินจึงหมดความจำเป็นในการย่อยอาหารเรนนินจะค่อย ๆ ลดลงและมีเปปซินเพิ่มขึ้นมาแทนให้สอดคล้องกับชนิดอาหารโปรตีนใหม่ที่มาแทน (วิราวรรณ สายชล และ นพพล เล็กสวัสดิ์, 2547)

4. เมทัลโลโปรตีน (metalloprotein) ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบร่วมไกลโคโปรตีน (glycoprotein) เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบร่วม หรือฮีมโปรตีน (heam-protein) เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีหมู่ฮีมร่วมอยู่ด้วย (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, 2556)

2.3 แหล่งของเอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์เป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทโปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นโดยสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีหน้าที่เร่ง (catalyze) ปฏิกิริยาต่าง ๆ แหล่งที่มาของเอนไซม์นั้นอาจจะเป็นได้ทั้งได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์โปรตีเอสจากพืช เช่น ปาเปน ในยางมะละกอดิบ โบรมิเลน จากสับปะรด และฟิซิน จากผลมะเดื่อ เป็นต้น โปรตีเอสจากสัตว์ เช่น เปปซิน และเรนนิน (หรือไคโมซิน) ที่เตรียมได้จากกระเพาะสัตว์ ทริปซิน และไคโมทริปซิน

เตรียมได้จากตับอ่อนของหมู ส่วนโปรตีเอสจากจุลินทรีย์ เช่น รา และแบคทีเรีย จะเป็นแหล่งที่ดีในการเตรียมเอนไซม์ให้มีปริมาณมากเพียงพอได้ง่ายเช่น serine protease จาก *Bacillus licheniformis* และ *neutralprotease* จาก *Aspergillus oryzae* (เข็มทอง อ่องทิพย์ และ นิอร โฉมศรี, 2554) เพราะฉะนั้นจึงมีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม โดยเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความซับซ้อนและมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับกับชนิดสารตั้งต้นกลไกการทำงานความเป็นกรด-ด่าง พีเอช อุณหภูมิ และความทนทานมีทั้งมีทั้งภายในเซลล์ภายนอกเซลล์แบ่งตามแหล่งที่มาได้ดังนี้ (เสาวนีย์ ธรรมสถิติ, 2547)

2.3.1 เอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตจากพืช

แหล่งของโปรตีเอสได้จากพืช เช่น ปาเปนในยางมะละกอดิบ โบรมิเลนจากสับปะรด และฟิซินจากผลมะเดื่อ เป็นต้น เอนไซม์ในกลุ่มนี้นำมาใช้เพื่อทำให้ใส (clearification) สำหรับเบียร์ ไวน์ และเครื่องดื่มอื่น ๆ โดยปาเปนจะทำหน้าที่ย่อยโปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่แขวนลอยในผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดตะกอนขุ่นให้มีโมเลกุลเล็กลงได้สารละลายใสไม่ขุ่นเก็บไว้ได้นาน ช่วยย่อยเนื้อสัตว์ที่เหนียวให้นุ่มเปื่อยเมื่อนำมาปรุงสุก (cooking) ปาเปนจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนที่มีกิจกรรมหลากหลาย รวมไปถึงเอนโดเพปทิเดส อะมิโนเพปทิเดส ไดเพปทิดิลเพปทิเดส และเอนไซม์ที่มีกิจกรรมทั้งเอกโซและเอนโดเพปทิเดส (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์, 2546) ในยางมะละกอซึ่งปกติจะประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน 4 ชนิดคือ papain, chymopapain A และ B และ papaya peptidase A โดย chymopapain เป็นเอนไซม์ที่พบมากที่สุดในยางมะละกอ รองลงมาคือ papain ซึ่งมีประมาณต่ำกว่าร้อยละ 10 และ papaya peptidase A มีปริมาณน้อยที่สุด เอนไซม์ chymopapain มีความอยู่ตัว ทนความร้อนและทนต่อสภาพกรดได้ดี และเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เนื้อมีความนุ่ม (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2551) ในอุตสาหกรรมการฟอกหนังให้นุ่มจำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดแต่หนึ่งในจำนวนนั้นก็คือเอนไซม์ปาเปน ทำให้เครื่องหนังมีคุณภาพที่นุ่ม ตัวอย่างเช่น รองเท้าและกระเป๋าหนังที่ผลิตในประเทศอิตาลีจะใช้เทคโนโลยีเอนไซม์นี้ในการฟอกหนัง อุตสาหกรรมเครื่องสำอางก็มีส่วนผสมของเอนไซม์ปาเปน ในสบู่และครีมล้างหน้าซึ่งจะไปช่วยขจัดเซลล์ผิวหนังที่ตายออก และอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ และไวน์ การทำให้เบียร์และไวน์ใส กระบวนการหนึ่งในการประหยัดต้นทุนในการผลิตคือการใช้เอนไซม์ปาเปนในการย่อยโปรตีนที่ผสมอยู่ในเบียร์และไวน์ ดังนั้นจะทำให้เบียร์และไวน์ใสไม่เกิดการตกตะกอนของโปรตีเอส (ทิพรัตน์ วงษ์เจริญ และคณะ, 2554)

โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ในกลุ่มซิสเตอีนโปรตีเอส (cysteine protease) พบในสับปะรดซึ่งเป็นตระกูล *Bromeliaceae* โบรมิเลนพบในส่วนเนื้อเยื่อ ลำต้น ผล และใบของสับปะรด โดยพบในส่วนของเนื้อมากที่สุด สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมทางอาหารและยา เช่น ผลิตผงทำให้เนื้อนุ่ม ทำให้เบียร์ใสผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท และผลิตยาช่วยย่อยอาหารและยาขับปัสสาวะ เป็นต้น (เข็มทอง อ่องทิพย์ และนิอร โฉมศรี, 2554)

2.3.2 เอนไซม์โปรตีเอสที่ได้ผลิตจากสัตว์

ชนิดของเอนไซม์มักขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์นั้น ๆ ด้วยเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ rennet ซึ่งนิยมใช้ในอุตสาหกรรมทำเนย นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ pancretin, pepsin, chymotrypsin, trypsin ได้มีการศึกษาการแยกเอนไซม์โปรตีเอสจากสัตว์หลากหลายชนิดเช่น การสกัดเอนไซม์โปรตีเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่ พบว่าเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8 และ 7.5 ตามลำดับ และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 103.96 และ 90.61 ไมโครกรัมไทโรซีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ตามลำดับ (พิมพ์พร ศรีสันติแสง และคณะ, 2556) หรือเปปซินและเรนิน (หรือไคโมซิน) ที่เตรียมได้จากกระเพาะสัตว์ ทริปซิน และไคโมทริปซิน เตรียมได้จากตับอ่อนของหมู (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2551) นอกจากนี้ไส้และตับอ่อนของสัตว์ปีกเป็นแหล่งเอนไซม์หลายชนิดโดยเฉพาะเอนไซม์โปรตีเอส ได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน คาร์บอกซีเปปติเดส และอะมิโนเปปติเดส โดยเอนไซม์โปรตีเอสมีหน้าที่สลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน นิยมใช้ในกระบวนการต่างๆ เช่น การแปรรูปอาหารการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท และสารซักฟอก เป็นต้น โดยส่วนใหญ่เอนไซม์โปรตีเอสทางการค้า มักมีราคาสูงจึงทำให้ต้นทุนในกระบวนการผลิตเพิ่มขึ้น (พิมพ์พร ศรีสันติแสง และคณะ, 2556)

2.3.3 เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่หลากหลาย ซึ่งส่วนใหญ่จะผลิตออกมาได้เพียงจำนวนน้อยและเข้าไปมีส่วนร่วมในกระบวนการของเซลล์ (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 ซึ่งคัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเยื่อกระดาษเชื้อชนิดนี้สามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงและค่อนข้างคงที่ในช่วง stationary phase เอนไซม์จากสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในช่วงพีเอช 8.0-11.0 และทนต่อพีเอชในช่วง 6.0 ถึง 11.0 อุณหภูมิที่สามารถทำงานได้และเสถียรอยู่ในช่วง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส (พิมล จำนง และคณะ, 2547) เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. KSM-K16 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่เอชที่เหมาะสมอยู่ที่ 11 (Kobayashi *et al.*, 1996) *Bacillus* sp.

PS719 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 9 (Towatana *et al.*,1999) *Bacillusbrevis* มีพีเอช ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่ 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

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่าง

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่าง ได้แก่ สายพันธุ์ของแบคทีเรีย พีเอช อุณหภูมิ อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ซึ่งมีดังนี้

2.4.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่เป็นเซลล์แบบโปรแคริโอต (prokariotic cell) พบทั่วไปในธรรมชาติ ดิน น้ำ อากาศ แบคทีเรียมีบทบาทสำคัญต่ออาหาร และการผลิตอาหารควรเริ่มต้นจากการใช้สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีคุณภาพดีในปริมาณที่มากพอสมควร ซึ่งต้องมีการคัดเลือกที่เหมาะสมได้ดังนี้ จากการศึกษาของจาตุรงค์ จงจีน และ สุพรรณี แก่นสาร อะโกอิ (2553) ได้ทำการคัดแยก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส และไคติเนสจากดิน พบว่า *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณน้ำพุร้อนเป็นแบคทีเรียชอบด่างเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงพีเอช 9.0-11.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส Ibrahim และ Norazila (2013) ทำการศึกษาอัลคาไลน์ซีรีนโปรตีเอสทนร้อนที่ได้จากสายพันธุ์ *Bacillus* ทนร้อนจากน้ำพุร้อน Lojing ในรัฐกะลันตา ประเทศมาเลเซีย และบ่งชี้ว่าเป็น *Bacillus substilis* 50 a และ *Bacillus licheniformis* 50 b สามารถทำงานได้ดีที่สุดค่าพีเอช 9 และอุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ Folasade และ Kevin (2013) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์และสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสทนร้อน จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SH-04 จากกากถั่วลิสง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ที่ 60 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 9 เป็นต้น

2.4.2 พีเอช

พีเอชในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ เอนไซม์แต่ละตัวจะมีค่าพีเอชที่ทำงานได้ดีที่สุดและส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่างพีเอช 5-9 แต่เอนไซม์บางชนิดอาจมีค่าพีเอชที่ทำงานได้ดีที่สุดต่ำมากหรือสูงมากก็ได้ ยกตัวอย่างเช่น การคัดแยกเชื้อ *Bacillus* sp. ที่ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากแหล่งต่าง ๆ ของพิมล จำนง และคณะ (2547) พบว่าการผลิตโปรตีเอสเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโต มีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของโปรตีเอสอยู่ในช่วง 8.0 ถึง 11.0 และสภาวะที่เสถียรในช่วงพีเอช 6.0 ถึง 11.0 นาน 1 ชั่วโมง และการรายงานของเอกสิทธิ์ ฟูเฟื่องสมบัติ และคณะ (2552) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส พบว่าสามารถผลิตได้ดีที่สุดที่พีเอช 8 และรายงานของ Johnvesly และ Naik (2001) ได้มีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในสภาวะด่างของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. JB-99 ในอาหาร synthetic medium ที่มีกรดซิตริกและแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์อยู่ที่ 9.0 หรือจากรายงานของ Shaheen และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในสภาวะด่างจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* BS1 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อยู่ที่พีเอช 11 รวมถึงการรายงานของ Nadeem และคณะ (2013) ในการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีเอสจาก *Bacillus coagulans* MTCC492 พบว่าที่พีเอช 9 เหมาะสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีที่สุด รวมไปถึงการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงและทนต่อสภาวะด่างจากตัวอย่างตะกอนดินที่เก็บได้จากท่าเรือ Cuddalore และระบุว่าเป็น *Bacillus licheniformis* มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานที่พีเอช 10.0 และสามารถผสมในผงซักฟอกทำให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นในการทำความสะอาดคราบเลือด คราบกาแฟ และคราบน้ำหมึก (Mani *et al.*, 2012)

2.4.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่มีผลต่อปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ปฏิกิริยาเคมีทั่ว ๆ ไปมีอัตราเร็วสูงขึ้นเพราะจะทำให้โมเลกุลของตัวทำปฏิกิริยามีพลังงานมากขึ้นและเพิ่มโมเลกุลที่มีพลังงานเพียงพอที่จะเข้าสู่สภาพเปลี่ยนแต่สำหรับปฏิกิริยาของเอนไซม์ การเพิ่มอุณหภูมิสูงเกินไปอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติอัตราเร็วจะลดลงทันที ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Uyar และคณะ (2011) สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์ถูกคัดเลือกจาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ CA 15 ซึ่งแยกได้จากดิน สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่ทนอุณหภูมิสูงได้ดีที่สุด 35 องศาเซลเซียส การศึกษาของ Kalaiarasi และ Sunitha (2009) ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ที่คัดแยกจากอาหารปนเปื้อนจากดิน สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียส การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* K-3 พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 40 องศาเซลเซียส (Khajuria *et al.*, 2009) การศึกษาของ Sugumaran (2012) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus thuringiensis* MTCC 1953 ที่สภาวะอุณหภูมิเหมาะสมที่ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้พบว่าการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก

Bacillus sp. N-40 จากดิน สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส (Nihan and Elif, 2011)

2.4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและพีเอชในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั่วไป ซึ่งประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งไอออนของโลหะ และแหล่งสารลดแรงตึงผิว ดังนี้

2.4.4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

แหล่งคาร์บอนเป็นสารที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์องค์ประกอบและพลังงานของเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงทั่วไปแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส น้ำเชื่อม กากน้ำตาล แป้งจากข้าวโพด มันฝรั่ง และมันสำปะหลัง หรือสตาร์ชไฮโดรไลเสท หรือข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ที่บดละเอียด หรืออาจใช้น้ำเวย์หลังจากการแยกโปรตีนในน้ำนมออกซึ่งมีแล็กโทสอยู่มาก (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, 2556) ตัวอย่างเช่น การรายงานของ Sugumaran (2012) พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดคือ กลูโคส และรายงานของ Akcan และ Uyar (2011) ศึกษาคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* RSKK96 โดยพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกาแล็กโตส นอกจากนี้ได้มีการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. BC0016 พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสคือ น้ำตาลกาแล็กโตส เช่นเดียวกันโดยให้ค่ากิจกรรมโปรตีเอสสูงสุดเท่ากับ 18.92 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Verma *et al.*, 2013)

2.4.4.2 ผลของไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

แหล่งไนโตรเจนมีทั้งสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ แหล่งที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น ยูเรีย ยีสต์สกัด เนื้อสกัด เปปโทน น้ำแช่ข้าวโพด กากถั่วเหลือง และแหล่งที่เป็นอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียม และเกลือไนเตรต เป็นต้น โดยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้แหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ตัวอย่างเช่น การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสโดยการแยกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. N-40 จากดินและคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่าแหล่งไนโตรเจนในรูปอินทรีย์มีการผลิตเอนไซม์สูงสุด คือ skim milk ช่วงค่าพีเอช 6-9 อุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 70-80 องศาเซลเซียส (Nihan and Elif, 2011) และการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Streptomyces pulveceus* โดยใช้วัตถุดิบการเกษตรที่แตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน คือ กากถั่วเหลือง สารสกัดจากยีสต์ และสารสกัดจากข้าวมอลต์ เปรียบเทียบกับการใช้ yest extract ในปริมาณ 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสคือ กากถั่วเหลือง สารสกัดยีสต์ และสารสกัดจากข้าวมอลต์ (Jayasree *et al.*, 1999) ยังมีการรายงานของ Aruna และคณะ (2014) ซึ่งจากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส พบว่าเชื้อ *Bacillus tequilensis*

SCSGAB0139 ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่สุดเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งไนโตรเจนเป็นเพปโทน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kumara และคณะ (2012) ศึกษาผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงจาก *Bacillus* sp. โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ พบว่าเพปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด เช่นเดียวกับการรายงานของ Panta และคณะ (2015) การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* พบว่าเพปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์โดยมีการผลิตเอนไซม์มากถึง 175.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/mL) นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* พบว่าเพปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด (Geethanjali and Anitha, 2011)

2.4.4.3 ผลของไอออนของโลหะหนักต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์เป็นสารที่มีความสำคัญและน่าสนใจยิ่ง เอนไซม์ไม่ใช่มีหน้าที่เพียงแต่ย่อยอาหารซึ่งเป็นซับสเตรต (substrate) ของปฏิกิริยาเคมีเท่านั้น แต่เป็นสารที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ ที่มีจำนวนมากมายหลายพันชนิดซึ่งเกิดขึ้นภายในเซลล์การค้นพบเอนไซม์จึงนับว่าเป็นสิ่งอัศจรรย์และมีความสำคัญอย่างยิ่งในการศึกษาชีววิทยานักวิทยาศาสตร์ไม่มีโอกาสที่จะเข้าไปดูการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ได้จึงต้องศึกษาการทำงานของเอนไซม์ภายนอกเซลล์ ซึ่งมีเงื่อนไขบางประการที่แตกต่างจากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ เอนไซม์ทุกชนิดทำงานในเซลล์แต่หลายชนิดยังสามารถทำงานนอกเซลล์ที่มีสภาพใกล้เคียงกับภายในเซลล์ ตัวอย่างเช่นการศึกษาของ Kalaiarasi และSunitha (2009) ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ได้ทำการคัดแยกจากอาหารปนเปื้อนจากดิน ซึ่งมีปัจจัยขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เวลาการบ่ม ค่าพีเอชและอุณหภูมิ สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส อุณหภูมิ 37 เซลเซียส พีเอช 9 ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 24 ชั่วโมง พบว่า แมกนีเซียมซัลเฟตมีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสนอกจากนี้การศึกษาของ Akcan และ Uyar (2011) การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสออกสู่ภายนอกนอกเซลล์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* RSKK 96 พบว่า แหล่งไอออนของโลหะ $FeSO_4.7H_2O$ สามารถทำให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดที่ 5759.2 ยูนิต/มิลลิกรัม รวมทั้งการศึกษาของ Nihan และ Elif (2011) พบว่าการเติมของไอออนโลหะของแมกนีเซียม และแคลเซียม ในระดับที่เหมาะสม ไอออนโลหะทั้งสองมีผลทำให้เกิดการเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น 51-55 เปอร์เซ็นต์

2.4.4.4 ผลของสารลดแรงตึงผิวบางชนิดต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

ในการใช้สารลดแรงตึงผิวในการผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์ที่ปล่อยออกจากภายนอกเซลล์ พบว่าบางครั้งการเติมสารลดแรงตึงผิวจะทำให้เอนไซม์เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากสารลดแรงตึงผิวมีผลทำให้เซลล์เมมเบรนเสียสภาพไป เช่น การเติม Tween-80 .ในความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารมีผลทำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสบีต้า–กลูโคซิเดสไซลาเนสเพิ่มขึ้น (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, 2556) มีการรายงานการผลิตและทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรตีเอสด้วยโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ที่มีอยู่ในไคติเนสและไคติน จากเชื้อ *Bacillus cereus* TKU022 โดยกระบวนการหมักพบว่า ในแหล่งสารลดแรง

ตึงผิวสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ที่พีเอช 9 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด คือ Tween-20 (Liang *et al.*,2012) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสออกสู่ภายนอกเซลล์ จากเชื้อ *Bacillus cereus* CA 15 พบว่ามีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ นมพร่องมันเนย, 1 เปอร์เซ็นต์ แป้ง และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4.7H_2O$ ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่ค่าพีเอช 8 และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากการรายงานพบว่า 1 เปอร์เซ็นต์ TritonX-100 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ถึง 110 เปอร์เซ็นต์ (Uyar *et al.*, 2011) ด้วยเหตุนี้จึงสามารถนำเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับการใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นอุตสาหกรรมผงซักฟอก เป็นต้น

2.5 ประโยชน์ของเอนไซม์โปรตีเอสในอุตสาหกรรม

เอนไซม์โปรตีเอสสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้หลากหลายรูปแบบ อาทิเช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมกระดาษ ผ้าและหนังอุตสาหกรรมสารซักล้าง ทั้งนี้เอนไซม์โปรตีเอสที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ย่อมมีประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรม

2.5.1 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์

ความต้องการในการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มีเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพตามที่ต้องการลดและทดแทนการใช้สารเคมีในกระบวนการผลิต และการลดต้นทุนการผลิต เป็นต้น การนำเอาเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ นำมาใช้เสริมในอาหารสัตว์เป็นวิธีการทางธรรมชาติวิธีหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมสัตว์ เพื่อให้สัตว์เจริญเติบโตเร็วและได้ผลผลิตที่สูง โดยทั่วไปอาหารสัตว์จะประกอบไปด้วยข้าวโพด กากถั่วเหลือง ธัญพืช เม็ดพืช รำข้าว กากพืชต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งสัตว์ประเภทกระเพาะเดี่ยวไม่สามารถย่อยหรือย่อยองค์ประกอบอาหารเหล่านี้ได้น้อย ทำให้สัตว์ไม่ได้รับสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารนั้น ๆ อย่างเต็มที่ ดังนั้นการเติมเอนไซม์เข้าไปในอาหารสัตว์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหาร โดยเอนไซม์จะไปย่อยสารอาหารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็กลง ทำให้ร่างกายของสัตว์สามารถดูดซึมสารอาหารนั้น ๆ ไปใช้ได้อย่างเต็มที่ ส่งผลให้การเจริญเติบโตของสัตว์ดีขึ้น ทำให้ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ได้ผลผลิตสัตว์ที่ดีตรงความต้องการมากยิ่งขึ้น (รัชดาภรณ์ ศรีปรางค์ โคบายาชิ, 2556) ในอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์ปีก เช่น เป็ด และไก่ มักจะส่งผลให้มีปริมาณของเหลือทิ้งจำนวนมาก ได้แก่ ขน หัว กระดูก และเครื่องใน เป็นต้น ซึ่งของเหลือบางส่วนจะนำมาบริโภค หรือใช้เป็นอาหารสัตว์ซึ่งมีมูลค่าเพิ่ม พบว่า ในไส้ และตับอ่อนของสัตว์ปีก เป็นแหล่งเอนไซม์หลายชนิดโดยเฉพาะเอนไซม์โปรตีเอส ได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน คาร์บอกซีเปปติเดส และอะมิโนเปปติเดส โดยเอนไซม์โปรตีเอสมีหน้าที่สลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน นิยมใช้ในกระบวนการต่าง ๆ เช่น การแปรรูปอาหาร การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต และสารซักฟอก เป็นต้น (พิมพ์พร ศรีสันติแสง และคณะ, 2556) และยังได้ทำการศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์โปรตีเอสต่อสมรรถภาพการผลิตของไก่เนื้อที่ได้รับอาหารจากวัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อในประเทศไทย

ในปัจจุบันได้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์มากขึ้นเนื่องจากเอนไซม์โปรตีเอสสามารถช่วยย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้การใช้ประโยชน์ได้ของสารอาหารจากวัตถุดิบกลุ่มโปรตีนเพิ่มมากขึ้น การเสริมเอนไซม์โปรตีเอสในอาหารไก่เนื้อที่ลดระดับโปรตีนรวมและกรดอะมิโน สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ได้ของโปรตีน เพิ่มสมรรถภาพการผลิตโดยเพิ่มน้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารของไก่เนื้อ ทำให้ต้นทุนการผลิตลดลงและสามารถใช้สารอาหารจากวัตถุดิบได้อย่างคุ้มค่า (สุพิชญา เจริญศิลป์ และคณะ, 2555)

2.5.2 อุตสาหกรรมอาหาร

การใช้อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus substilis* , *Bacillus licheniformis* มาใช้ประโยชน์การผลิตโปรตีนไฮโดรเสตจากเคซีน โปรตีนถั่วเหลือง เศษเนื้อ หรือ เศษเนื้อปลาเป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในการย่อยโปรตีนจากน้ำเวย์ที่ได้จากการทำเนย ซึ่งโปรตีนไฮโดรเสตที่เตรียมได้มีการนำไปเป็นอาหารเสริม และผสมในน้ำผลไม้และเครื่องดื่ม ในการผลิตเนยมีการใช้เอนไซม์เรนนินจากกระเพาะลูกวัว ในปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์จาก *Rhizomu cormiehei* ซึ่งผลิตเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คล้ายไคโมซีน แต่เนยที่ได้มักมีรสขม จึงมีการตัดต่อยีนไคโมซีน *Aspergillus niger* เพื่อผลิตไคโมซีน การใช้เอนไซม์โปรตีเอสในการตกตะกอนนมและสมบัติเอนไซม์ที่ใช้ นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์โปรตีนในการผลิตไส้กรอกหมักรวมทั้งใช้ในการย่อยขนนกและขนไก่เพื่อใช้เพิ่มโปรตีนในอาหารสัตว์ (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, 2556) เอนไซม์โปรตีเอสมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ทางเดินอาหารของสัตว์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของพีเอช และอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจากไส้ และตับอ่อนของเป็ดและไก่จึงทำการสกัดเอนไซม์โปรตีเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่ด้วยน้ำกลั่น และทำแห้งด้วยการอบแห้งแบบระเหิดน้ำแข็ง นำมาศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (พิมพ์พร ศรีสันติแสง และคณะ, 2556) นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส และไลเปส โดยวิธีทากูชิจากเมล็ดสบู่ดำ ด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง ราสายพันธุ์พวก *Aspergillus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มักอยู่ในพวกผักผลไม้ และแหล่งอาหารอื่น ๆ ราในกลุ่มนี้เป็นสาเหตุให้อาหารเกิดความเน่าเสีย รา *Aspergillus oryzae* มีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมการหมักต่าง ๆ เช่น การผลิตกรดแอซิติก การหมักซีอิ๊ว การผลิตเอนไซม์ เช่น ไซเลนเนส อะไมเลส เซลล์ลูโลส เบต้ากลูคาเนส และการผลิตสารปฏิชีวนะ เป็นต้น (อำพล เลือดสงคราม, 2553)

2.5.3 อุตสาหกรรมสารซักล้าง

ปัจจุบันผงซักฟอกและน้ำยาล้างจานที่ใช้ในการซักล้างและทำความสะอาดจะมีการเติมเอนไซม์โปรตีเอส เพื่อกำจัดคราบสกปรกที่เป็นโปรตีน เอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีสมบัติที่ทำงานได้ดีในอุณหภูมิที่กำหนด และต้องทนต่อสารประกอบที่มีผงซักฟอกและน้ำยาล้างจาน เช่น สารลดแรงตึงผิว สารฟอกขาว และน้ำหอม เป็นต้น เอนไซม์ในทางการค้าที่นิยมใช้คือ แอลคาเลส (alcalase) ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* ที่ทำงานได้ดีในช่วงค่าพีเอช 6.5 ถึง 8.5 และอุณหภูมิ 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ที่ใช้มักจะทำเป็นเม็ดขนาดเล็กเพื่อป้องกันการฟุ้งกระจาย (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, 2556) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอัลคาไลน์

โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. ทนสภาวะด่างเพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้าง ซึ่งคัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเยื่อและกระดาษ เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 8.0 ถึง 11.0 และทนต่อพีเอชในช่วง 6.0 ถึง 11.0 อุณหภูมิที่สามารถทำงานและมีเสถียรภาพสูงอยู่ในช่วง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส และสามารถทนต่อสารซักล้างได้หลายชนิด ดังนั้นอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากสายพันธุ์ B12 จึงมีสมบัติที่ดีที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้าง (พิมล จำนงค์ และคณะ, 2547) นอกจากนี้มีการเติมเอนไซม์ผงซักฟอกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำความสะอาด และชะล้างรอยปนเปื้อน ทำให้ผ้าขาวสะอาด และรักษาสีผ้าไม่ให้หมอง โดยเอนไซม์ที่ใช้ในผงซักซักฟอกมีความคงทน และทำงานได้ในสภาวะที่มีสารเคมีต่าง ๆ เช่น สารลดแรงตึงผิว สารลดความกระด้างของน้ำ สารรักษาระดับความเป็นด่าง สารกันคราบคืน สารเพิ่มความสดใส และสารป้องกันสีตก เป็นต้น มีการเติมเอนไซม์โปรตีเอส ในการขจัดคราบพวกโปรตีน เช่น นม ไข่ และเลือด เป็นต้นโดยเอนไซม์จะไปย่อยสลายคราบโปรตีน ให้เป็นเปปไทด์หรือกรดอะมิโนที่สามารถละลายน้ำ และถูกชะล้างออกจากเสื้อผ้าในที่สุด การเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพื่อย่อยคราบปนเปื้อนจากแป้ง สำหรับการใช้เอนไซม์ในน้ำยาทำความสะอาด อัลตราฟิลเตอร์ (ultra filter) นาโนฟิลเตอร์ (nano filter) และเมมเบรน (membrane) สำหรับใช้กรองน้ำ น้ำผลไม้ ไวน์ และเบียร์ เป็นต้น พบว่าการทำความสะอาดโดยใช้น้ำยาผสมเอนไซม์แทนการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโดยคลอรีน (chlorine) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกรองและยืดอายุการใช้งานของแผ่นกรองโดยเอนไซม์ที่ผสมในน้ำยาขึ้นกับชนิดของเครื่องดื่ม (รัชดาภรณ์ ศรีปรางค์ โคบายาชิ, 2556) การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมซักล้าง ซึ่งจะเป็นการสร้างเทคโนโลยีการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสเพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมซักล้างหรืออุตสาหกรรมอื่น ๆ ขึ้นภายในประเทศ ลดปัญหาการนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศ และลดปัญหาสิ่งแวดล้อมทางน้ำทำให้ทราบถึงศักยภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. ที่ทนสภาวะด่างต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้างการนำอัลคาไลน์โปรตีเอสไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมซักล้างจะทำให้เกิดเทคโนโลยีด้านนี้ขึ้นภายในประเทศอีกด้วย (กนก รัตนะกนกชัย และคณะ, 2545)

2.5.4 อุตสาหกรรมกระดาษ ผ้า และหนัง

ในอุตสาหกรรมการทำกระดาษจะมีการใช้แป้งเพื่อปรับปรุงความแข็งแรงและความเหนียวของกระดาษ แป้งตามปกติจะมีความเข้มข้นเหนียวเกินไปปาดลงบนผิวกระดาษ ส่วนในกระบวนการฟอกหนัง แต่เดิมทางการค้าจะใช้สารเคมีโซเดียมซัลไฟด์ และปูนขาวใช้ในกระบวนการ ซึ่งก่อให้เกิดของเสียเหลือใช้ที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม การใช้โปรตีเอสในสภาวะด่างจึงเริ่มเข้ามามีบทบาทเนื่องจากคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลาย elastin และ keratin ได้ดี การใช้เอนไซม์จะมีข้อดีคือเป็นสภาวะที่ไม่รุนแรง (mildi condition) ควบคุมง่ายรวดเร็วผลผลิตมีคุณภาพดีและที่สำคัญไม่ทำลายสภาพแวดล้อม (Kumar *et al*., 2002) นอกจากนี้การใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอเป็นอุตสาหกรรมที่มีการใช้เอนไซม์เป็นจำนวนมากและมีอัตราการเจริญเติบโตของการใช้เอนไซม์อย่างรวดเร็ว โดยความเป็นไปได้ของการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมผ้าฝ้ายและผ้าเดนิม (denim) มีการใช้เอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งที่ใช้ในการป้องกันเส้นใยจาก

กระบวนการทอผ้าในขั้นตอนการลอกแป้ง การใช้เอนไซม์เพคติเนสในการย่อยองค์ประกอบที่ไม่ต้องการ ผนังเซลล์จากเซลล์ลูโลสในขั้นตอนการขจัดสิ่งสกปรก (scouring) บนผ้าทอฝ้าย การใช้เอนไซม์แลคเคสใน ขั้นตอน pretreatment ฝ้ายเพื่อเพิ่มความขาวของเส้นใย การใช้เอนไซม์โปรตีเอสในการลอกกาวเซริซิน ซึ่งมาจากการสังเคราะห์ของต่อมหนอนไหม ซึ่งหลังจากการใช้เอนไซม์จะได้กาวเซริซินละลายออกมา ทำให้ได้เส้นไหมที่เรียกว่าไฟโบรอิน (fibroin) ซึ่งนำมาทอผ้า (รัชดาภรณ์ ศรีปรางค์ โคบายาชิ, 2556) การใช้โปรตีเอสในอุตสาหกรรมเครื่องหนังนั้นการฟอกหนังต้องมีการกำจัดผม ขนสัตว์และโปรตีนบางส่วนที่ไม่ต้องการ เพื่อให้หนังมีความนุ่มและยืดหยุ่น แต่ก่อนจะใช้วิธีการแช่หนังในมูลนกมูลไก่ เพื่อให้ได้การย่อยโปรตีนและลิพิดที่ติดมากับหนังสัตว์ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นเหม็น แต่ในปัจจุบันการใช้เอนไซม์โปรตีเอสและไลเพสในการฟอกหนัง ทำให้ได้หนังสัตว์ที่มีคุณภาพดี (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, 2556) เอนไซม์ในอุตสาหกรรมเครื่องหนังยังมีประโยชน์ในการปรับปรุงคุณภาพของหนัง เช่น เพิ่มความสะอาดและแข็งแรงของพื้นที่ผิวให้มากขึ้น เพิ่มความนุ่มของหนัง และลดปัญหาสิ่งแวดล้อมการใช้สารเคมี เป็นต้น (รัชดาภรณ์ ศรีปรางค์ โคบายาชิ, 2556)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Ammonium sulphate	Univar
Ammonium chloride	Univar
Ammonium nitrate	Univar
Calcium chloride	Unilab
Cobalt (II) chloride	Ajax
Copper (II) sulfate pentahydrate	QRëC™
Casein	Fluka
D-กรัมlucose	Ajax
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	RCI
Fructose	Ajax
Folin phenol reagent	Merck
Galctose	Ajax
Glycine	APS
Hydrochloric	Merck
Iron (II) sulfate tetrahydrate	Ajax
L-Tyrosine	Sigma
Magnesium sulfate	Ajax
Magnesium sulphate hydrated	Ajax
Manganese (II) sulfate monohydrate	QRëC™
Mercury (II) chloride	Univar
Maltose	Ajax
Nutrient agar	HIMEDIA
Nutrient broth	HIMEDIA

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Lactose	Ajax
Peptone	HIMEDIA
Potassium chloride	QRëC™
Potassium dihydrogen phosphate	Ajax
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Ajax
Sodium hydroxide	Merck
Sodium carbonate	Merck
Skim milk	HIMEDIA
Sucrose	Ajax
Trichloroacetic acid (TCA)	Merck
Tris (hydroxyl methyl) aminomethate	Ajax
Triton-x-100	Merck
Tryptose	HiMediaLabchm
Tween 20	Univar
Urea	HIMEDIA
Yeast Extract	LOBA

3.1.2 อุปกรณ์

1. **เครื่องชั่ง** 4 ตำแหน่ง (Balancer) **ยี่ห้อ** Mettler Toledo **รุ่น** Aกรัม-204
2. **เครื่องวัดการดูดกลืนแสง** (Spectrophotometer) **ยี่ห้อ** SHIMADZU **รุ่น** UV 1204 V
3. **เครื่องปั่นเหวี่ยง** (Centrifuge) **ยี่ห้อ** Hettichรุ่น 32R
4. **เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง** (pH meter)
5. **ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ** (Incubater) **ยี่ห้อ** Contherm**รุ่น** 5200 R
6. **ตู้อบความร้อน** (Hot Air Oven) **ยี่ห้อ** Labec **รุ่น** ODWF24
7. **หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค** (Autoclave)
8. **อ่างควบคุมอุณหภูมิ** (Water Bath) **ยี่ห้อ** Memmert
9. **อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ** (Loop)
10. **ตะเกียงแอลกอฮอล์** (Liquid Fuel Burner)
11. **เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ** (Orbital Shaker Incubator) **ยี่ห้อ** Forma scientific

3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ *Bacillus* cereus PS53 ซึ่งทำการคัดแยกจากตะกอนดินบ่อน้ำร้อนเขาชัยสน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง โดยทำการเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลว Nutrient broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{600} เท่ากับ 0.3 จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารที่ประกอบด้วย 0.5 กรัม glucose, 0.75 กรัม peptone, 0.5 กรัม KH_2PO_4, 0.01 กรัม $FeSO_4.7H_2O$, 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยทำการเขย่าเชื้อที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 52 ชั่วโมง (เชาวนีพร ชีพประสพ, 2556)

3.3 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อสามารถผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์โดยวิธีการของ Beg และ Gupta (2003) ซึ่งทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ glycine-NaOH (50 mM, พีเอช 9.0) โดยใช้เคซีน (casein) เป็นสารตั้งต้น นำสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร บ่มกับสารละลายเคซีน (เตรียมใน glycine-NaOH พีเอช 9.0) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 5 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรคลอโรอะซิติก ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปเซ็นตริฟิวซ์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ 1 มิลลิลิตร มาเติม 0.4 M. Na_2CO_3 5 มิลลิลิตร เติม Folin Phenol reagent 0.5 มิลลิลิตร จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน ซึ่งเตรียมโดยชั่งไทโรซีน 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 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของส่วนใสด้วย สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร

หนึ่งยูนิตของเอนไซม์โปรตีเอสหมายถึงปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ย่อยสลายเคซีนให้ปริมาณไทโรซีน 1 ไมโครโมล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 1 นาที

3.4 ปัจจัยขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจาก *Bacillus cereus* PS53

3.4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

ทำการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนจากกลูโคส (glucose) เป็นมอลโตส (maltose), ซูโครส (sucrose), แล็กโตส (lactose), ฟรุคโตส (fructose), กาแล็กโตส (galactose) และกากน้ำตาล แหล่งไนโตรเจนทั้งในรูปสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยทำการเปลี่ยนแปลงแหล่งไนโตรเจนจากเพปโทน (peptone) เป็นสกิมมิลล์ (skim milk), ทริปโตน (tryptone), ยีสต์สกัด (yeast extract), น้ำล้างซูริมิ น้ำนึ่งปลาทูน่า แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$), แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Uyar *et al.*, 2011) โดยเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว nutrient broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเท่ากับ 0.3 จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารที่ประกอบด้วย 0.5 กรัม glucose (เปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนที่ระบุไว้ข้างต้น) 0.75 กรัม peptone (เปลี่ยนแปลงแหล่งไนโตรเจนที่ระบุไว้ข้างต้น) 0.5 กรัม KH_2PO_4, 0.01 กรัม $FeSO_4.7H_2O$, 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยทำการเขย่าเชื้อที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 52 ชั่วโมง วัดปริมาณเอนไซม์ที่เชื้อผลิตได้ (ตามวิธีการในข้อ 3.3)

3.4.2 ผลของไอออนต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่าง

ทำการเปลี่ยนแปลงไอออนเป็น $FeSO_4.7H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, KCl, $CaCl_2$, $CoCl_2$, $ZnCl_2$, $MnSO_4$, $HgCl_2$ และ $CuSO_4$ ในความเข้มข้น 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว nutrient broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารที่ประกอบด้วย 0.25 กรัม glucose, 0.375 กรัม tryptone, 0.25 กรัม KH_2PO_4, 0.005 กรัม $FeSO_4.7H_2O$, 0.25 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ (เปลี่ยนแปลงเป็นไอออนที่ระบุไว้ข้างต้น) และสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 9.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 52 ชั่วโมง เขย่าเชื้อที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปใช้ในการหากิจกรรมของเอนไซม์ (ตามวิธีการในข้อ 3.3)

3.4.3 ผลของสารลดแรงตึงผิวบางชนิดต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่าง

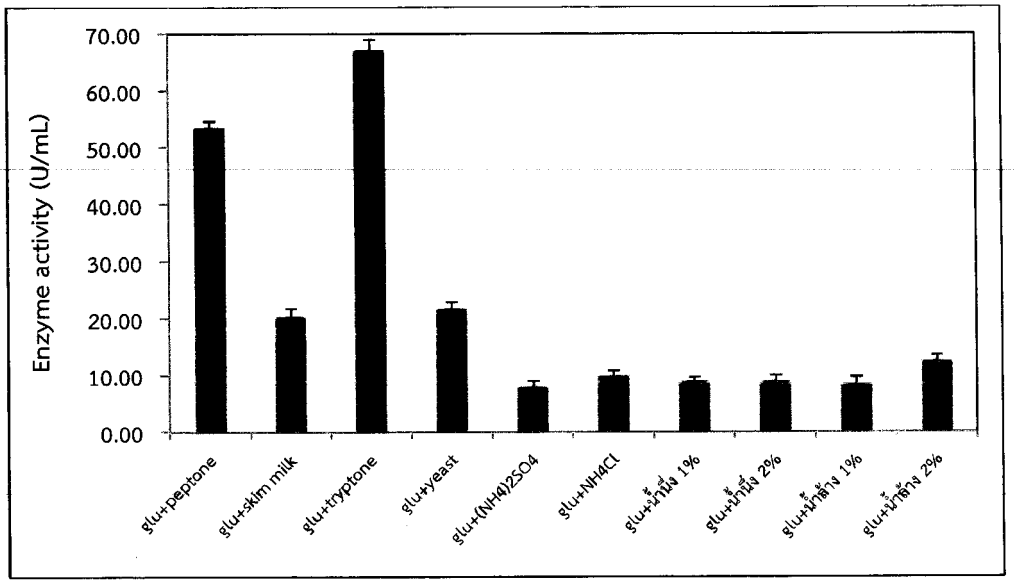
ทำการเพิ่มสารลดแรงตึงผิวเช่น tween-20, triton-x-100, Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) และ Sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว nutrient broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารที่ประกอบด้วย 0.25 กรัม glucose, 0.375 กรัม tryptone, 0.25 กรัม KH_2PO_4, 0.005 กรัม $FeSO_4.7H_2O$, 0.25 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ (เพิ่มสารลดแรงตึงผิวที่ระบุไว้ข้างต้น) นำไปบ่มในเครื่องเขย่า

ควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 52 ชั่วโมง เขย่าเชื้อที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปใช้ในการหากิจกรรมของเอนไซม์ (ตามวิธีการในข้อ 3.3)

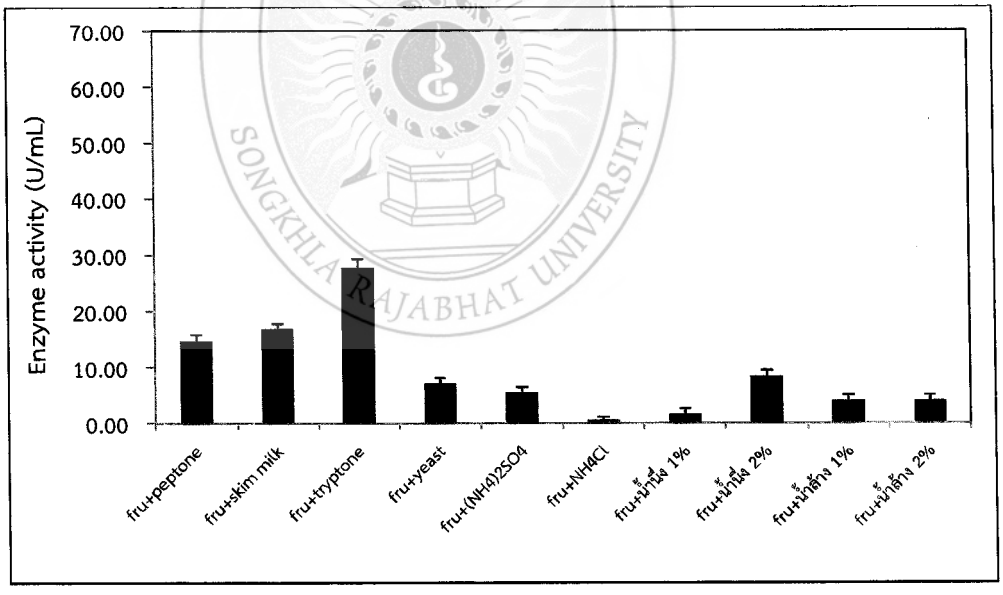
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่าง

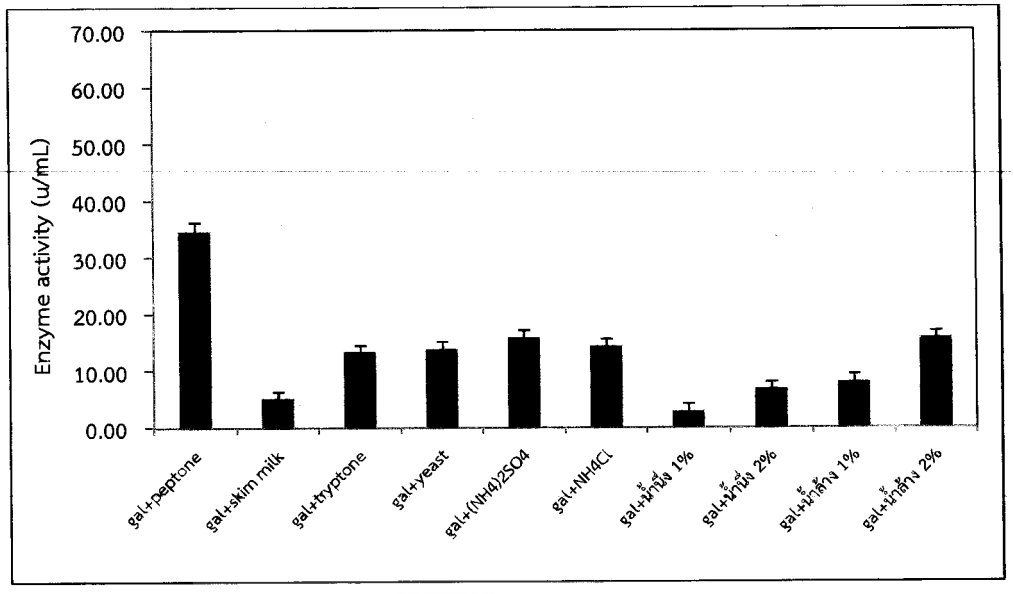
จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus cereus* PS53 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 0.5 กรัม glucose, 0.75 กรัม peptone, 0.5 กรัม KH_2PO_4, 0.01 กรัม $FeSO_4.7H_2O$, 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ โดยทำการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนจากกลูโคส (glucose) เป็นฟรุคโตส (fructose), กาแล็กโตส (galactose), มอลโตส (maltose), ซูโครส (sucrose), แล็กโตส (lactose) และกากน้ำตาล และแหล่งไนโตรเจนจากเพปโทน (peptone) เป็นสกิมมิลล์ (skim milk), ทริปโตน (tryptone), ยีสต์สกัด (yeast extract), น้ำล้างซูริมิ น้ำนึ่งปลาทูน่า แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$), แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 ที่ผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์ในสภาวะของแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส และกากน้ำตาล โดยที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นทริปโตนจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุด โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็น 67.31, 27.74, 22.67 และ 8.72 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.1, 4.2, 4.5, 4.7) ในขณะที่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกาแล็กโตส และน้ำตาลแล็กโตส จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดเมื่อมีแหล่งคาร์บอนเป็นเพปโทน โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็น 34.68 และ 28.32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.3, 4.6) และเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลมอลโตส พบว่าจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดเมื่อมีแหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์สกัด ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็น 21.44 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.4) โดยพบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เป็นวัสดุเหลือใช้จากธรรมชาติ เช่น กากน้ำตาล น้ำล้างซูริมิ และน้ำนึ่งปลาทูน่า มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ได้ค่อนข้างน้อย



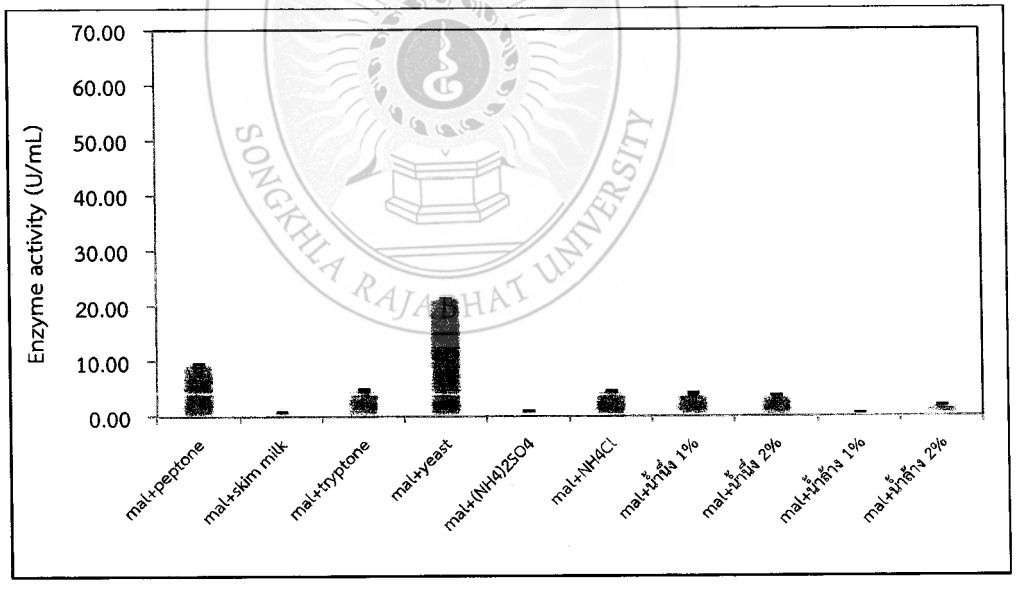
ภาพที่ 4.1 ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลกลูโคส) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส



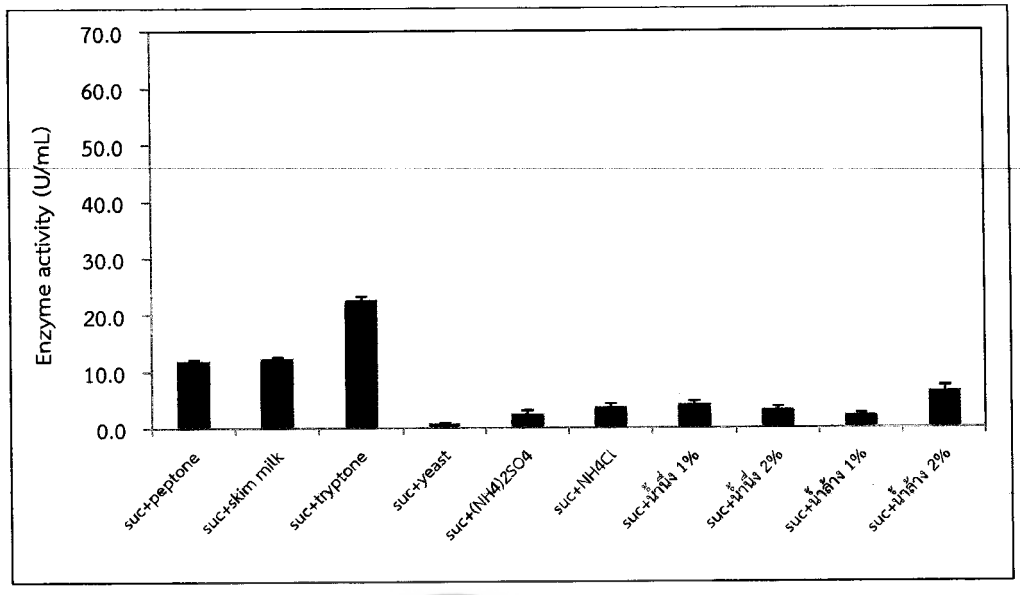
ภาพที่ 4.2 ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลฟรุคโตส) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส



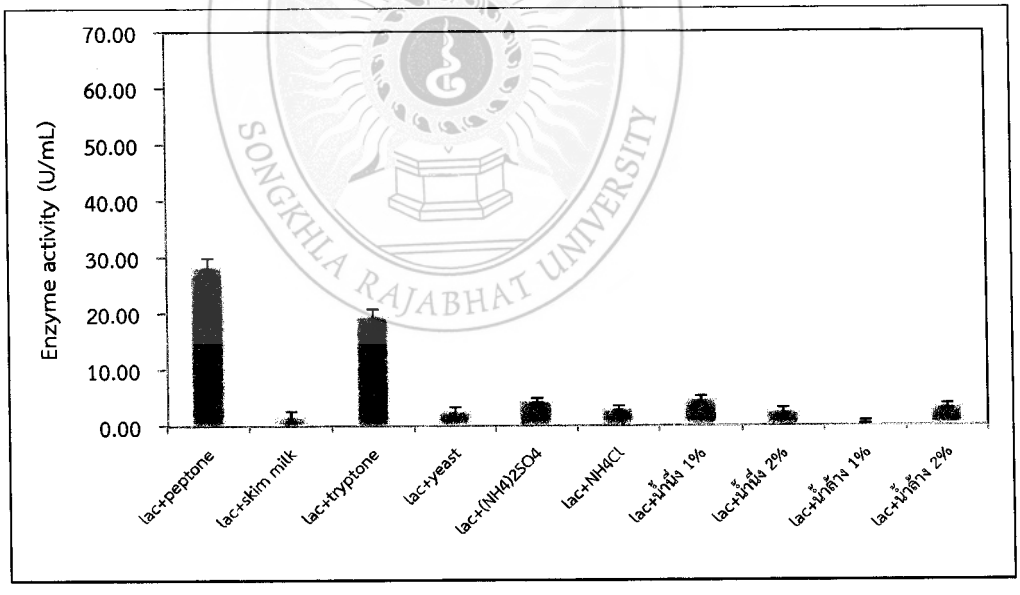
ภาพที่ 4.3 ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลกาแล็คโตส) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.4 ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลมอลโตส) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

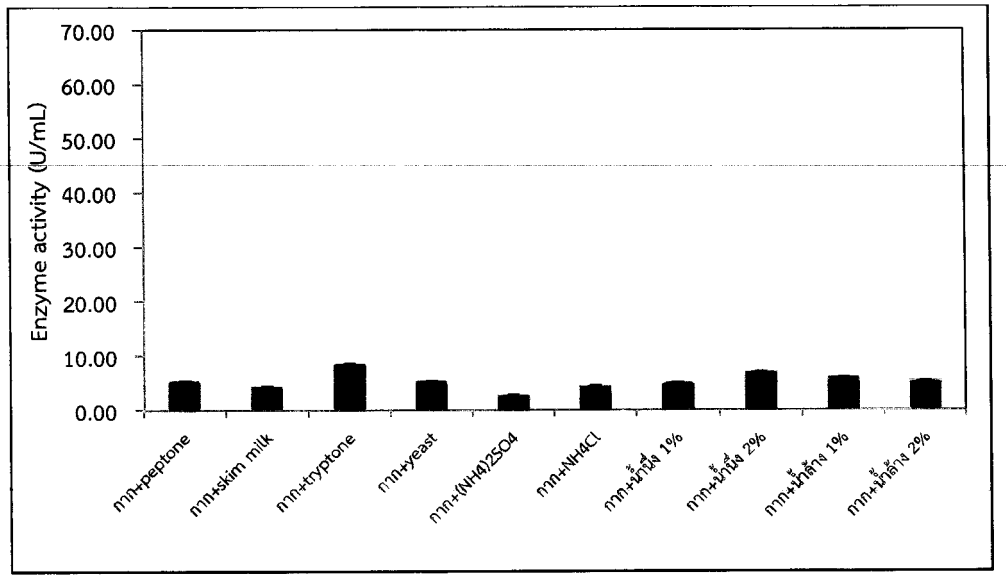


ภาพที่ 4.5 ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลซูโครส) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.6 ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลแล็คโตส) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศา

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา



ภาพที่ 4.7 ผลของแหล่งคาร์บอน (กากน้ำตาล) และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (เพปโทน สกิมมิลล์ ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ) ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

4.2 เปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่าง

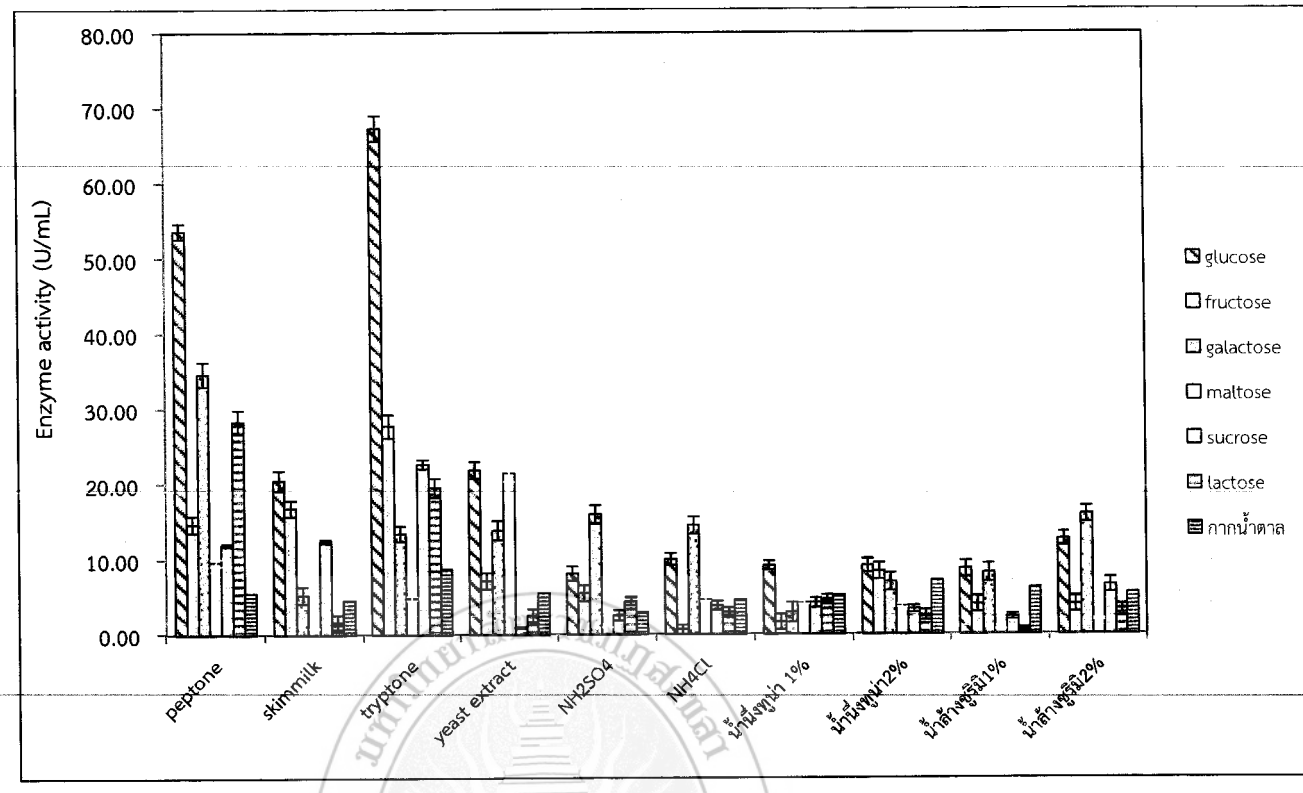
จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus cereus* PS53 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 0.5 กรัม glucose, 0.75 กรัม โดย peptone, 0.5 กรัม KH_2PO_4, 0.01 กรัม $FeSO_4.7H_2O$, 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ โดยทำการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนจากกลูโคส (glucose) เป็นฟรุคโตส (fructose), กาแล็กโตส (galactose), มอลโตส (maltose), ซูโครส (sucrose), แล็กโตส (lactose) และกากน้ำตาล และแหล่งไนโตรเจนจากเพปโทน (peptone) เป็นสกิมมิลล์ (skim milk), ทริปโตน (tryptone), ยีสต์สกัด (yeast extract), น้ำล้างซูริมิ น้ำนึ่งปลาทูน่า แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$), แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 ในแต่ละแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนพบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส และมีแหล่งไนโตรเจนเป็นทริปโตน โดยให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่ 67.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.8) และสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากกว่า 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อมีแหล่งไนโตรเจนเป็นเปปโทน ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus licheniformis*N-2 (Nadeem *et al*., 2008) หรือการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. N-40 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในระดับหนึ่งเมื่อมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน (Sevinc and Demirkan, 2011)

จ
ว572.7
ช517ป
25 เม.ย. 2557

รวมทั้ง *Bacillus pumilus* D-6 ซึ่งผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในแหล่งอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (83 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) (Bajaj and Jamwal, 2013) และ *Bacillus subtilis* IC-5 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงสุดเมื่อมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนที่เป็นเปปโทนและทริปโตน ก็มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในในระดับที่สูงเช่นเดียวกัน (Gul *et al*., 2015)

การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์อาจจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่เพิ่มสูงขึ้นในจุลินทรีย์บางชนิด (Homma *et al*.,1993) แต่อาจจะมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ในสายพันธุ์อื่น ๆ (Joo *et al*., 2002) โดยการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสถูกควบคุมโดยความพร้อมของแหล่งคาร์บอนในการใช้งานซึ่งมีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Lambert *et al*.,1997) ดั้งนั้นการควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสออกสู่ภายนอกเซลล์โดยใช้คาร์โบไฮเดรตที่ดูดซึมได้ง่ายจึงเป็นข้อมูลที่สามารถพบได้ในแบคทีเรียหลาย ๆ สายพันธุ์ (Litchfield and Prescot, 1970) ในส่วนของแหล่งไนโตรเจนพบว่าแหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลอย่างมากต่อการผลิตเอนไซม์เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นที่ดีที่สุดสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้แหล่งไนโตรเจนยังสามารถส่งผลต่อพีเอชของสารอาหารซึ่งจะมีผลต่อกิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์ (Nizamudeen and Bajaj, 2009) จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนทั้งในแบบสารอินทรีย์ และแหล่งไนโตรเจนแบบสารอนินทรีย์ พบว่าแหล่งไนโตรเจนแบบสารอินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ดีกว่าแบบสารอนินทรีย์เช่นเดียวกับอีกหลาย ๆ งานวิจัยที่ได้รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนแบบสารอินทรีย์ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนแบบสารอนินทรีย์ (Nadeem *et al*., 2008)

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

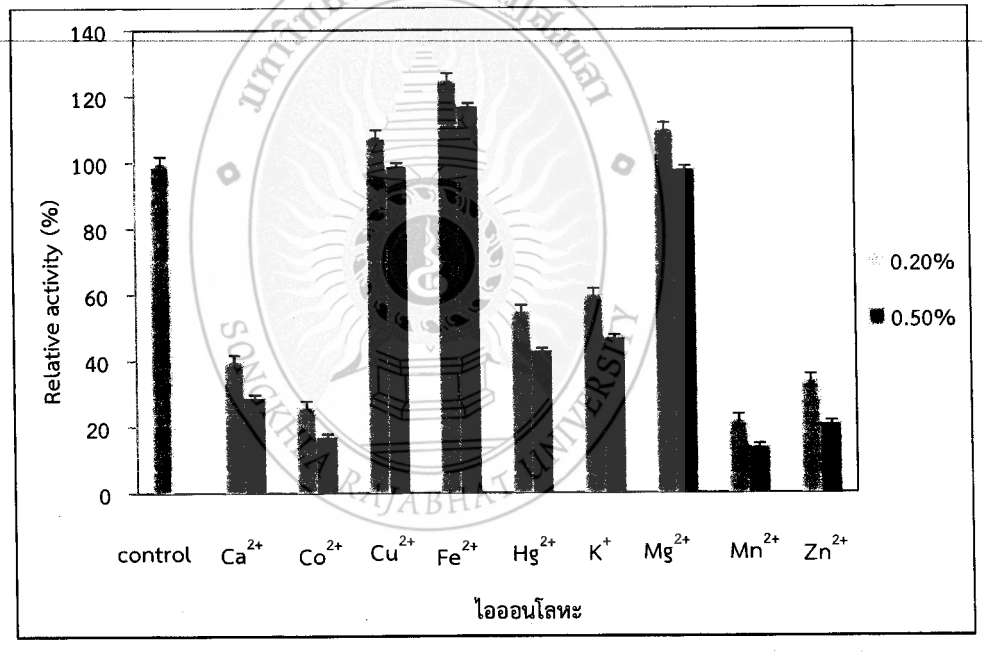


ภาพที่ 4.8 ผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus cereus* PS53 ในสภาวะที่แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

4.3 ผลของไอออนต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่าง

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* PS53 ในอาหารเหลวซึ่งประกอบด้วย glucose, tryptone, KH_2PO_4, $FeSO_4.7H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$ โดยทำการศึกษาไอออนของโลหะหนักเช่น $CaCl_2$,$CoCl_2$, $CuSO_4$, $FeSO_4.7H_2O$, $HgCl_2$, KCl, $MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4$ และ $ZnCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 52 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจวัดการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่าง พบว่า *Bacillus cereus* PS53 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่างที่ความเข้มข้นของไอออนโลหะ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ (relative activity) ดังนี้คือ 40.52, 26.77, 108.71, 125.36, 55.62, 60.78, 110.97, 22.46 และ 34.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ซึ่งไม่ใส่ไอออนโลหะชนิดใดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไอออนโลหะเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการผลิตเอนไซม์ลดลงแต่ในปริมาณที่ไม่มากนัก ดังนี้คือ 29.25, 17.12, 99.35, 117.51, 43.22, 47.11, 98.43, 14.32 และ 21.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไอออนโลหะเป็น Ca^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+} และ Zn^{2+} จะมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus cereus* PS53 ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไอออนโลหะเป็น Hg^{2+} และ K^{2+} แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้มากกว่าครึ่งหนึ่งของชุดควบคุม (control) (58-63 เปอร์เซ็นต์) และในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ที่มีไอออนโลหะเป็น Cu^{2+}, Fe^{2+} และ Mg^{2+} สามารถเหนียวนำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ดีคือ มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เท่ากับ 108.13, 125.43 และ 110.51 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.9 ซึ่งบ่งชี้ว่าเอนไซม์ต้องใช้ไอออนโลหะเป็นโคเฟคเตอร์โดยเฉพาะ Fe^{2+}, Mg^{2+} และ Cu^{2+} ซึ่งโคเฟคเตอร์เหล่านี้จะช่วยปกป้องเอนไซม์ต่อการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ในสภาวะที่อยู่ในอุณหภูมิสูงขึ้น (Donaghy and McKay, 1993) จากผลของไอออนโลหะที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของ *Bacillus cereus* PS53 สอดคล้องกับรายงานของ Akcan และ Uyar (2011) ซึ่งจากการศึกษาคัดเลือกแหล่งไอออนโลหะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* RSKK96 ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่สุดเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีไอออนโลหะเป็น Fe^{2+} และการศึกษาผลของไอออนโลหะในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AKRS3 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไอออนโลหะเป็น Fe^{2+} สามารถเหนียวนำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ดีที่สุด (Ravishankar *et al.*, 2012) เช่นเดียวกัน

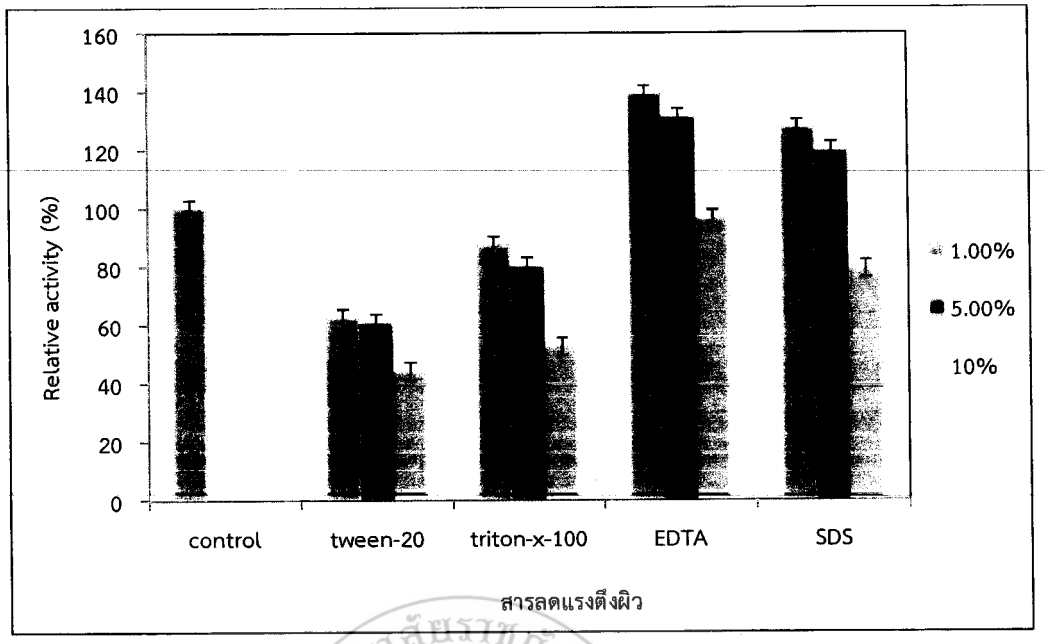


ภาพที่ 4.9 การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่างจากเชื้อ *Bacillus cereus* PS53 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งไอออนที่แตกต่างกัน

4.4 ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่าง

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* PS53 ในอาหารเหลวซึ่งประกอบด้วย glucose, tryptone, KH_2PO_4, $MgSO_4$ $7H_2O$, $FeSO_4$ $7H_2O$ โดยทำการเพิ่มสารลดแรงตึงผิวเช่น tween-20, triton-x-100, Ethylene diamine tetraaceticacid (EDTA), sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 52 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจวัดการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่าง พบว่า *Bacillus cereus* PS53 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่างได้ดีใกล้เคียงกันเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการผสมสารลดแรงตึงผิวเป็น EDTA และ SDS ทั้งที่ความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถผลิตได้ในช่วง 119-139 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้จะผลิตเอนไซม์ลดลง แต่อย่างไรก็ตามปริมาณที่ผลิตได้ก็มีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม (control) (79-97 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งไม่ใส่สารลดแรงตึงผิวชนิดใดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของการผสมสารลดแรงตึงผิวในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น tween-20 หรือ triton-x-100 พบว่าจะมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ดังแสดงในภาพที่ 4.10 ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวที่เป็น EDTA และ SDS อาจช่วยเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยการทำลายชั้นเมมเบรน (Goto *et al.*, 1997) ซึ่งจะเพิ่มการดูดซึมของสารอาหารเข้าไปในสิ่งมีชีวิต และมีผลให้การหลั่งของเอนไซม์ออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ความสามารถของสารลดแรงตึงผิวอาจมีผลต่อตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่ไม่ชอบน้ำ (Triggle, 1970) จากผลที่ปรากฏเทียบเคียงได้กับการศึกษา หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสออกสู่ภายนอกเซลล์จากเชื้อ *Bacillus cereus* CA15 พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเพิ่มขึ้นเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารลดแรงตึงผิวเป็น EDTA กับ SDS (Uyar *et al.*, 2011) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารลดแรงตึงผิวเหล่านี้มีผลต่อปริมาณของการผลิตเอนไซม์จากเชื้อสายพันธุ์ *Bacillus* sp. ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้อาจจะเป็นพื้นฐานในการนำเชื้อสายพันธุ์นี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก เนื่องจากกลุ่มสารลดแรงตึงผิวที่สำคัญที่เป็นส่วนผสมในผงซักฟอกโดยส่วนใหญ่คือ SDS โดยมี EDTA ทำหน้าที่เสริมประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวโดยทำให้น้ำเป็นด่างเหมาะแก่การปฏิบัติงานของผงซักฟอก สารลดความกระด้างมีหน้าที่ช่วยแก้ความกระด้างของน้ำ เนื่องจากความกระด้างของน้ำจะรบกวนการทำงานของสารลดแรงตึงผิวที่จะดึงสิ่งสกปรกออกจากผ้า นอกจากนี้สารลดความกระด้างยังช่วยควบคุมสมดุลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้อยู่ในระดับที่พอเหมาะและคงที่ได้ด้วย (pronone, 2011)



ภาพที่ 4.10 การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนอุณหภูมิสูงในสภาวะด่างจาก *Bacillus cereus* PS53 ในอาหารเหลวที่มีสารลดแรงตึงผิวชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่างกัน

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

จากการศึกษาปัจจัยขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจาก *Bacillus cereus* PS53 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สามารถสรุปได้ดังนี้

5.1.1. *Bacillus cereus* PS53 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีที่สุดเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน

5.1.2 *Bacillus cereus* PS53 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีที่สุดเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมไอออนโลหะของ Fe^{2+}, Mg^{2+} และ Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.2-0.5 เปอร์เซ็นต์

5.1.3 *Bacillus cereus* PS53 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีที่สุดเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวเป็น EDTA และ SDS ที่ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษาพบว่า *Bacillus cereus* PS53 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวเป็น EDTA และ SDS ที่ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นสารที่เป็นส่วนผสมในผงซักฟอก ดังนั้นจึงควรศึกษาถึงการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ชนิดนี้ พร้อมทั้งศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้

บรรณานุกรม

กนก รัตนะกนกชัย, สุวรรณา ศักดิ์ดาสถาพร และคินเลย์ คู. 2545. **การคัดเลือกเชื้อบาซิลัสที่ผลิต alkaline amylase และศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์. 614: 144-152.

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 2551. **การผลิตเอนไซม์ปาเปนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม**. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา http://libry.dip.go.th. สืบค้นเมื่อ 25 ธันวาคม 2560.

เข็มทอง อ่องทิพย์ และนิอร โฉมศรี. 2554. **การผลิตเครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสท**. สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา

จาตุรงค์ จงจีน และสุพรรณี แก่นสาร อะโกอิ. 2553. การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์. **Agricultural sciences Journal**. 41: 317-320.

เชาวนีพร ชีพประสพ. 2556. **การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสทนร้อนในสภาวะด่างจากบ่อน้ำร้อน**. มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

ทิพรัตน์ วงษ์เจริญ, รานี เหมมณี และสุรพงษ์ พินิจกลาง. 2554. **การสร้างมูลค่าเพิ่มของเอนไซม์ซิสเตอีนโปรติเนสจากพืช**. กรุงเทพฯ. หน้า 181-184.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2551. **เคมีอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 3. โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์ กรุงเทพฯ. 504 หน้า.

พิมพ์พร พรเฉลิมพงศ์, โสภิดา ปัญญานวล, สายพิณ ทานัชฌาสัย และวรรณวิบูลย์ กาญจนกถญชร. 2556. **ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 209-216.

พิมล จำนงค์, กนก รัตนะกนกชัย และคินเลย์ คู. 2547. **การศึกษาอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้าง**. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

รัชดาภรณ์ ศรีปรางค์ โคบายาชิ. 2556. **เอนไซม์และการประยุกต์**. ไทยเอฟเฟคสตูดิโอ: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

วิราวรรณ สายชล และนพพล เล็กสวัสดิ์. 2547. **เอนไซม์อินเวอร์เทส.** สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร. วิศวกรรมกระบวนการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุพิชญา เจริญศิลป์, ยุวเรศ เรืองพานิช, เสกสม อาตมางกูร และสุกัญญา รัตนทับทิมทอง. 2555. **ผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสต่อสมรรถภาพการผลิตของไก่เนื้อที่ได้รับอาหารจากวัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2547. **แบคทีเรียเทคโนโลยีชีวภาพ: เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์แบคทีเรีย**. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2556. **เทคโนโลยีเอนไซม์**. ก็อปปีคอร์เนอร์ดิจิตอลพริ้นท์เซ็นเตอร์: ภาควิชเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อำพล เลือดสงคราม. 2553. **การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสโดยวิธีทากูชิจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยวิธีการหมักแห้ง**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย.

เอกสิทธิ์ ฟูเฟื่องสมบัติ, ปทุมพร ฉิมเอนก, อมรรัตน์ พรหมบุญ และ สุณิสา สุวรรณพันธ์. 2552. **การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสลอกกาวไหมจากประเทศไทย**. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Aftab, S., Ahmed, S., Saeed, S. and Rasool, SJ. 2006. Screening and characterization of alkaline protease producing bacteria from Soil. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 9(11): 2122-2126.

Akcan, N and Uyar, F. 2011. Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus* subtilis RSKK96 with solid state fermentation. **EurAsian Journal of BioSciences**. 5: 64-72.

Andrade, D. K. B.; Ferreira, M. A.; Véras, A. S. C.; Wanderley, W. L.; Silva, L. E.; Carvalho, F. F. R.; Alves, K. S. and Melo, W. S. 2002. Apparent digestibility and absorption of Holstein cows fed diets with forage cactus (Opuntiaficus-indica Mill) in replacement of sorghum silage (Sorghum bicolor (L.) Moench). **Revista Brasileira de Zootecnia**. 31(5): 2088-2097.

Aruna, A., Nagavalli, M., Girijashankar, V., Ponamgi, S.P.D., Swathisree, V. and Venkateswar Rao L. 2014. Direct bioethanol production by amylolytic yeast *Candida albicans*. **Letters in Applied Microbiology**. 60: 229-236.

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., Sahai, V. and Gupta, R. 2003 Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. **Process Biochemistry**. 39: 203-209.

Deore, G.B., Limaye, A.S., Dushing, Y.A., Dhobale, S.B., Kale, S. and Laware, S.L. 2013. Screening of protease producing fungi for microbial digestion of seed proteins and synthesis of amino acids-metalnutrient chelates. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 16:86–91.

Donaghy, J.A. and McKay, A.M. 1993. Production and properties of analkaline protease by *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Applied Bacteriology**. 74: 662–666.

Folasade, M. O. and Kevin, I. E. 2013. Production of thermostable and organic solvent-tolerant alkaline protease from *Bacillus coagulans* PSB-07 under different submerged fermentation conditions. **African Journal of Biotechnology**. 12(21): 3341-3350.

Geethanjali, S. and Anitha, S. 2011. Optimization of protease production by *Bacillus subtilis* isolated from mid gut of fresh water fish *Labeorohita*. **World Journal of Fish and Marine Science**. 3(1): 88-95.

Goto, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P. 1997. **Hydrophobic Moiety of surfactant** (3rd ed) worth publishers, New York p. 3.

Gul, S., Rahman, M.R., Ajmal, M., Achakzai, A.K.K. and Iqbal, A. 2015. Effects of carbon and nitrogen sources on production of protease by *Bacillus subtilis* IC-5. **Bangladesh Journal of Botany**. 44(2): 285-292.

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

Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P. 2002. Bacterialalkaline proteases: molecular approaches and industrialapplications. **Applied Microbiology and Biotechnology**.59: 15-32.

Gupta, A., Roy, I., Patel, R. K., Singh, S. P, Kahre,S. K. and Gupta, M. N. 2005. One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. **Journal of Chromatography A**. 1(2):103–108.

Homma, M., Chibana, H. and Tanaka, K. 1993. Induction of extracellular proteinase in Candi-da albicans. **Journal of General. Microbiology**. 139: 1187-1193.

Ibrahim, N. A. and Norazila, Y. 2013. Thermostable alkaline serine protease from thermophilic *Bacillus* Species.**I nternational Research Journal of Biological Sciences**. 2(2): 29-33.

Jayasree, P.K., Asokan, M.P., Sobha, S., Ammal, L.S., Rekha, K., Kala, R.G., Jayasree, R. and Thulaseedharan, A. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of Heveabrasiliensis Mull. **Current Science**. 76: 1242-1245.

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

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

Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Kim, K.M., Paik, S.R. and Chang, C. S. 2002. Otimization of theproduction of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. **Process Biochemistry**. 38: 155 –159.

Kalaiarasi, K. and Sunitha, P. U. 2009. Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil. **African Journal of Biotechnology**. 8: 7035-7041.

Khajuria, C., Zhu, Y. C., Chen, M. S, Buschman, L. L. and Higgins, R. A. 2009. Expressed sequence tags from larval gut of the European corn borer (*Ostrinianubilalis*): exploring candidate genes potentially involved in *Bacillus thuringiensis* toxicity and resistance. **BMC Genomics**. 10(286): 1-14.

Kobayashi, T., Hakamada, Y. and Hitomi, J. 1996. Purification of alkalineproteases from *Bacillus* strain and their possible interrelationship. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 45: 63-71.

Kocher, G.S. and Mishra, S. 2009. Immobilization of *Bacillus circulans* MTCC 7906 for enhanced production of alkaline protease under batch and packed bed fermentation conditions. **Internet Journal of Microbiology**. 7(2): 359-378.

Kumar, C.G. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. **Letters in Applied Microbiology**. 34(1): 13-17.

Kumar R. P., Rana, S. and Tyagi, H. 2012. Studies on Compatibility of fungal alkaline protease with commercially available detergents. **International Journal of Modern Biochemistry**. 1(1): 41-56.

Lambert, M., Blanchin, R. S., Louedec, F.L., Lepingle, A. and Gaillardin, C. 1997. Genetic analysis of regulatory mutantsaffecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101 homolog. **Molecular and Cellular Biology**.17: 3966–3976.

Liang, L., Liu, S., Yang, J., Meng, Z., Lei, L. and Zhang, K. 2011. Comparison ofhomology models and crystal structures of cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi: structural basis of nematicidal activity. **Federation of American Societies for Experimental Biology.** 25(6): 894-1902.

Litchfield, C.D. and Prescott, J.M. 1970. Regulation of proteolytic enzyme production by *Aeromonas* proteolytical. extracellular endopeptidase. **Canadian Journal of Microbiology**. 16: 17-22.

Mani, P., Johnbastin, T. M. M., Arunkumar, R., Lalithambikai, B., Brindha, B., Prabha, E. S., Rinikarunya, R., Manigandan, R., Marimuthu, C. and Kannan, V. R. 2012. Thermostable alkaline protease from thermophilic andalkaliphilic *Bacillus licheniformis* and its applicationas a laundry detergent additive. **International Journal of Medicine and Biosciences**.1: 18-26.

Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S. and Syed, Q.A. 2008. Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*-2. **Food Technology and Biotechnology**. 46(4): 388–394.

Nadeem, M., Qazi, J. I., Syed, Q. and Gulsher, M. 2013. Purification and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis* UV-9 for detergent formulations. **Songklanakari Journal of Science and Technology**. 35:187-195.

Negi, S. and Banerjee, R. 2006. Optimization of amylase and protease production from *Aspergillus awamori* in single bioreactor through EVOP factorial design technique. **Food Technology and Biotechnology**. 44 (2): 257–261.

Nihan, S. and Elif, D. 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.

Nizamudeen, S. and Bajaj, B. K. 2009. A novel thermo-alkalitolerant endoglucanase production using cost-effective agricultural residues as substrates by a newly isolated *Bacillus* sp NZ. **Food Technology and Biotechnology**.47: 435–440.

Pant, G., Prakash, A., Pavani, J. V. P., Bera, S., Devirama, G.V.N.S., Kumar, A., Panchpurib, M. and Prasuna, R.G. 2 0 1 5 . Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. **Journal of Taibah University for Science** 9: 50–55.

Pronone. 2011. **สารต่างๆ ในผงซักฟอก**. Retrieved December 8, 2017, from http://www.vcharkarn.com/varticle/42845.

Rai, SK. and Mukherjee, AK. 2010. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. **Biochemical Engineering Journal**. 48: 173–180.

Ravishankar, K. 2012. Isolation of alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKRS3. **African Journal. Biotechnology**. 11: 13415–13427.

Sabotic, J. and Kos, J. 2012. Microbial and fungal protease inhibitors current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 93: 1351-1375.

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.

Shaheen, M., Shah, A., Hameed, A. and Hasan, F. 2008. Influence of cultureconditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1. **Pakistan Journal of Botany**. 40(5): 2161-2169.

Shuai, W., Xuezheng, L., Xiaohang, H., Li, A. and Zilda, D.S. 2012. Screening and characterization of alkaline protease isolated from PLI-1, a strain of *Brevibacillus* sp. collected from Indonesia's hot spring. **Journal of Ocean University of China**. 11(2): 213-218.

Singh, J, Barta, N. and Sobti, R.C. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. **Process Biochemistry**. 36: 781-785.

Towatana, N.H., Painupong, A. and Suntinanaler, P., 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS 719. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 87: 581-587.

Triggle, D. J. 1970. Some aspects of the role of lipids in lipid protein interactions and cell membrane structure and function. **Recent Progress in Surface Science**. 3: 273–290.

Uyar, F., Porsuk, I., Kizil, G. and Yilmaz, EI. 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 protease producing *Bacillus cereus* isolated from tannery effluent. **International Journal of Computer Science Issues**. 2(7): 23-29.

Zambare, V., Nilegaonkar, S., Kanekar, P. 2011.A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. **New Biotechnology**. 28: 173–181.

ภาคผนวก

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 นำไปตั้งไฟให้ร้อน แล้วถ่ายลงในหลอดทดลอง 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 จากนั้น เตรียม skim milk agar 10 % ในปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย skim milk agar 10% 3 กรัม และ (Tris-HCL buffer) 30 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด ปิดจุก นำไป autoclave เมื่อสารละลายอุ่น เท 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

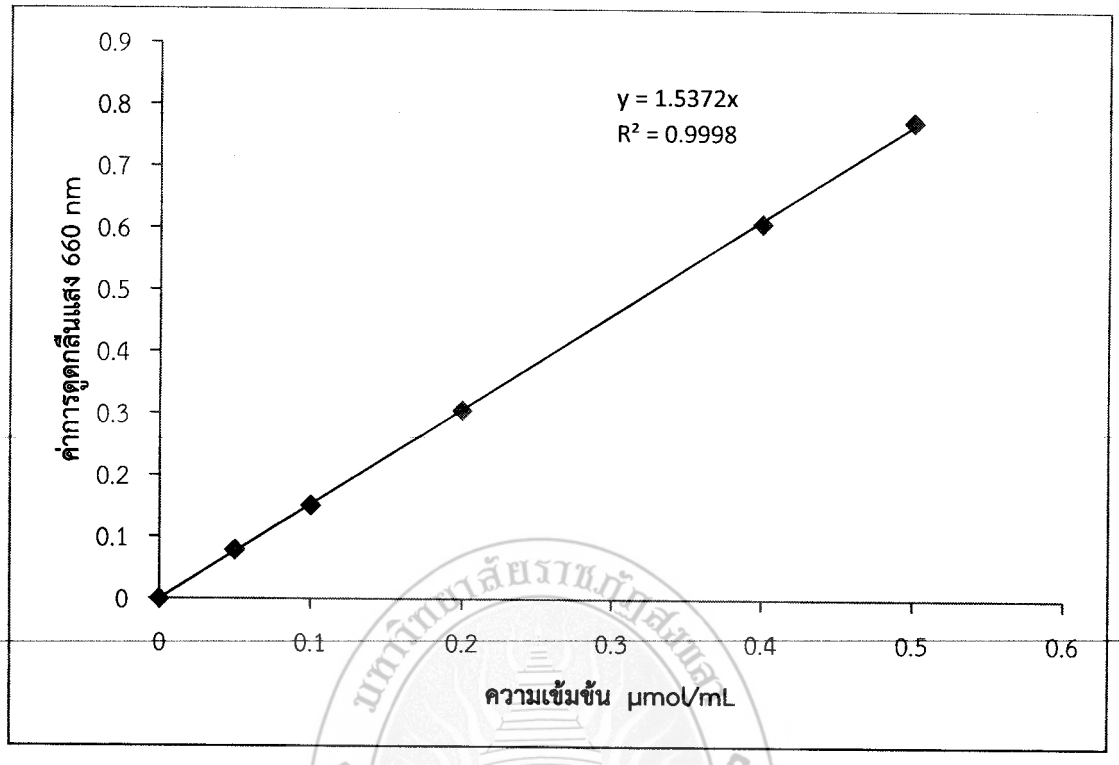
6. การเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน

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



แสดงกราฟมาตรฐานของไทโรซีน

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY