การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของโปรติเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียชอบเค็ม *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis*

นางสาววทัญญุตา ภู่โยธิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISB 974-03-1083-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PARTIAL PURIFICATION OF PROTEASE PRODUCED BY HALOPHILIC *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis*

Miss Vatanyuta Phooyothin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2001

ISBN 974-03-1083-4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของโปรติเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียชอบเค็ม *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis*
โดย	นางสาววทัญญุตา ภู่โยธิน
ภาควิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา ชาญสง่าเวช

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา ชาญสง่าเวช)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วทัญญุตา ภู่โยธิน : การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของโปรติเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียชอบเค็ม *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis* (PARTIAL PURIFICATION OF PROTEASE PRODUCED BY HALOPHILIC *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis*) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.กาญจนา ชาญสง่าเวช, 80 หน้า. ISBN 974-03-1083-4.

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสในอาหารแข็งสูตรมีเดียม 73 ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ และพีเอช 5.5 จาก 45 ไอโซเลต โดยใช้บรรทัดฐานการมีค่าอัตราส่วนสูงที่สุด ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี พบไอโซเลต SA.02 ซึ่งแยกจากเกลือสมุทรที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊วระดับห้องปฏิบัติการ มีอัตราส่วนดังกล่าวสูงที่สุด และเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีในอาหารสูตรมีเดียม 73 ที่มี 5-10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ผลการจำแนกชนิดไอโซเลต SA.02 พบว่ารูปร่างเซลล์เป็นแท่ง ติดสีแกรมบวก มีสปอร์ ชนิดของแฟลกเจลลาแบบเพอริไทรคัส เพิ่มจำนวนเซลล์เฉพาะในที่มีอากาศ และทดสอบด้านชีวเคมี รวมถึงหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าไอโซเลต SA.02 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Halobacillus trueperi* 99 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบด้านชีวเคมีเพิ่มเติม เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างไอโซเลต SA.02 กับ *Halobacillus trueperi* และ *Halobacillus thailandensis* พบว่ามีผลการทดสอบทางชีวเคมีคล้ายกับ *Halobacillus trueperi* มากกว่าคล้ายกับ *Halobacillus thailandensis* จึงสรุปผลการทดลองว่า ไอโซเลต SA.02 อาจเป็น subspecies หนึ่งของ *Halobacillus trueperi* งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่พบ *Halobacillus* sp. ในเกลือสมุทร ผลการทำโปรติเอสจาก *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis* ให้บริสุทธิ์ พบว่าแบคทีเรียนี้ขับโปรติเอสแอคติวิตีสูงสุด (65.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ในอาหารสูตรมีเดียม 73 สูตรปรับปรุงที่มีสารสกัดจากยีสต์เพิ่มขึ้นเป็น 1.5 กรัมต่อลิตร ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วย 0-50 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว และการทำดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ, เซฟาเดกซ์ จี-50 เจลฟิวเตรชัน และ SDS-PAGE คู่กับการย้ายแถบโปรตีนจาก SDS-PAGE เจลไปยัง ซับสเตรต-PAGE เจล พบว่า สามารถทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์ขึ้น 1.5 เท่า แต่มีร้อยละการตรวจพบแอคติวิตีเหลือเพียง 0.25 โปรติเอสมีน้ำหนักโมเลกุล 31 กิโลดาลตัน พบว่า 5 มิลลิโมลาร์ EDTA ยับยั้งการทำงานของโปรติเอสเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ จึงจัดเป็น metalloprotease

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต _____

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ _____

ปีการศึกษา 2544

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4272381223: MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: halophilic bacteria/ *Halobacillus trueperi* / purification/ protease

VATANYUTA PHOOYOTHIN : PARTIAL PURIFICATION OF PROTEASE PRODUCED BY HALOPHILIC *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis* THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR KANJANA CHANSA-NGAVEJ, Ph.D. 80 pp. ISBN 974-03-1083-4.

Selection of halophilic protease-producing bacteria in M73 agar medium with 20% sodium chloride, pH 5.5, from 45 isolates based on a criterion of the highest ratio between diameter of clear zone and diameter of colony showed that the highest ratio was obtained for the isolate SA.02 isolated from sea salt, used in lab-scale production of soy sauce. The isolate grew well in Medium 73 with 5-10% sodium chloride. Identification was based on rod-shaped, Gram positive, spore production, peritrichous flagellation, strictly aerobes and other biochemical tests including sequencing of 16S rDNA. Homology comparisons with 16S rDNA sequences deposited at GenBank revealed that the isolate's 16S rDNA was 99 % homology with that of *Halobacillus trueperi*. Additional biochemical tests revealed that isolate SA.02 more closely resembled *Halobacillus trueperi* than *Halobacillus thailandensis*. It was concluded that isolate SA.02 was a subspecies of *Halobacillus trueperi*. This is the first report on the isolation of *Halobacillus* sp. from sea salt. Optimization of Medium 73 led to an increased protease activity (65.6 unit.ml^{-1}) when yeast extract was increased from 1.0 to 1.5 g.l^{-1}. The enzyme was purified 1.5 folds with 0.25% recovery by 0-50% ammonium sulfate precipitation, DEAE Bio-gel A column chromatography, Sephadex G-50 gel filtration. SDS-PAGE followed by transfer of polypeptide bands to casein-polyacrylamide gel revealed the molecular weight of the enzyme was 31 kD. EDTA was found to almost 100% inhibit this protease activity therefore the enzyme was a metalloprotease.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Microbiology Student's signature _____

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature _____

Academic year 2001

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา ชาญสง่าเวช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล และ รองศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ ที่ให้กรุณาเป็นคณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์ และช่วยปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอบพระคุณ คุณรุจิพร ประทีปเสน และคุณศิริเพ็ญ เวชชการัณย์ ที่อำนวยความสะดวกในการเตรียมตัวอย่างและใช้เครื่องมือถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ขอบคุณคุณปฏิมา เพิ่มพูนพัฒนา และคุณวีระศักดิ์ จงเฟื่องปริญญา ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ วิชัย และคุณแม่ สมศรี ภู่โยธิน และขอบคุณคุณโตมร ทองน้ำวนและคุณทรรศนีย์ ตั้งสกุล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ฌ

บทที่

1.บทนำ..... 1

2. ตรวจเอกสาร..... 2

3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง..... 14

4.ผลการทดลอง..... 28

5.สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 57

รายการอ้างอิง..... 60

ภาคผนวก 67

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 80

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่1 แสดงอัตราส่วนระหว่างค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อค่าเฉลี่ย..... 28
เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอส ซึ่งแยกได้
จากน้ำซีอิ๊วระหว่างการหมัก และจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊ว
ระดับห้องปฏิบัติการ 12 ไอโซเลตที่ผลิตโปรติเอสสูงไปต่ำ เมื่อเลี้ยง
ในอาหารสูตรมีเดียม 73 ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ พีเอช
5.5 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน
ตารางที่2 ลักษณะจำเพาะที่แยกกลุ่มแบคทีเรียใน Section 15 ของ Bergey's..... 31
Manual of Systematic Bacteriology
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบทางจุลชีววิทยาและชีวเคมีของไอโซเลต SA.02 เพื่อ..... 47
เปรียบเทียบกับ *Halobacillus* spp. ที่มีผู้รายงาน (Spring และ
คณะ, 1996; Chaiyanan และคณะ, 1999)
ตารางที่ 4 ผลการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสแอคติวิตีสูง 49
โดยการปรับปรุงสูตรอาหารเหลวมีเดียม 73
ตารางที่ 5 แสดงการทำให้บริสุทธิ์ของโปรติเอส โดยผ่านขั้นตอนการทำให้..... 52
บริสุทธิ์ต่างๆเมื่อไม่มี5มิลลิโมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ใน 0.1 โมลาร์
ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0
ตารางที่ 6 แสดงการทำให้บริสุทธิ์ของโปรติเอส โดยผ่านขั้นตอนการทำให้..... 52
บริสุทธิ์ต่างๆ เมื่อมี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ใน 0.1 โมลาร์
ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0
ตารางที่ 7 แสดงผลของ EDTA และ PMSF ต่อการทำงานของโปรติเอส..... 55

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 1 Sequencing strategy ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ..... 20
16 SrDNA ของไอโซเลต SA.02

รูปที่ 2 กราฟการเพิ่มจำนวนเซลล์และค่าอัตราการเจริญจำเพาะ..... 29
ของแบคทีเรียไอโซเลต SA.02 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม
73 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ปริมาณต่างๆ

รูปที่ 3 ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต SA.02 ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น..... 30
Tryptic Soy Agar ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์

รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนนิ่งของ..... 30
เซลล์ไอโซเลต SA.02 เมื่อเลี้ยงในอาหารวุ้นมีเดียม 73
ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ที่ 30 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 1 วัน กำลังขยาย 5,000 เท่า

รูปที่ 5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด 32
กำลังขยาย 12,450 เท่า (12 มม. เท่ากับ 1 ไมครอน)
ไอโซเลต SA.02 มีแฟลกเจลารอบเซลล์ (peritrichous
flagella)

รูปที่ 6 ภาพแสดงลักษณะเซลล์ที่ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ของ..... 33
แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร EYGA
เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 6 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 3 วัน

รูปที่ 7 การแยกโครโมโซมัลดีเอ็นเอของไอโซเลต SA.02 เพื่อใช้..... 34
เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มชิ้นส่วน 16S rDNA โดย
วิธีพีซีอาร์

รูปที่ 8 แสดง 16S rDNA ที่ได้จากเพิ่มชิ้นส่วนโดยวิธีพีซีอาร์ 34

รูปที่ 9 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของท่อน 16S rDNA ต่างๆของ..... 36
ไอโซเลต SA.02 ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดย
ใช้ไพร์เมอร์ 27f, 343r, 787r,1100r, 1241f และ 1492r

รูปที่ 10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA ของไอโซ..... 43
เลต SA.02 เมื่อผ่านโปรแกรม BioEdit

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์ไอโซเลต SA.02 โดยใช้เปอร์เซ็นต์..... 44
ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA
เครื่องหมาย * แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เหมือน
กัน จำนวน 14 แห่ง ซึ่งรวมช่องว่างที่เติมเข้าไปจำนวน
4 แห่ง
รูปที่ 12 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรติเอสที่ความเข้มข้น..... 48
แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวช่วง 0-100 เปอร์เซ็นต์
รูปที่ 13 แสดงแอคติวิตีจำเพาะของโปรติเอสที่พีเอช และที่..... 50
เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ต่างๆ
รูปที่ 14 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจลเอ..... 51
รูปที่ 15 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50..... 51
รูปที่ 16 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสโดยการทำ 53
SDS-PAGE และ Activity Staining
รูปที่ 17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนัก..... 54
โมเลกุลกับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บน SDS-PAGE
รูปที่ 18 ผลของความเข้มข้นของ SDS ต่อการเร่งปฏิกิริยาของโปรติเอส..... 54
รูปที่ 19 ผลของไอออนต่อการทำงานของโปรติเอส..... 55
รูปที่ 20 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-30 มิลลิโมลาร์..... 56
ต่อการเร่งปฏิกิริยาของโปรติเอส
รูปที่ 21 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอส..... 56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียชอบเค็ม (Halophilic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนได้มากเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ ในปัจจุบันยังมีผู้วิจัยการนำแบคทีเรียชอบเค็มมาใช้ในอุตสาหกรรมหรือนำมาผลิตผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์น้อยมาก ผลงานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียชอบเค็มส่วนใหญ่ได้แก่ การศึกษากลไกการชอบเค็มหรือกลไกการทนเค็ม (Bremer และ Kramer, 2000) วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อ

1. คัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโปรติเอส
2. จำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโปรติเอสจำนวน 1 สายพันธุ์
3. ทำโปรติเอสที่ขับออกนอกเซลล์แบคทีเรียชอบเค็มดังกล่าวให้บริสุทธิ์

ทั้งนี้เพื่อนำโปรติเอสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาศึกษาสมบัติเพื่อประกอบการประยุกต์เชิงพาณิชย์ อุตสาหกรรมหนึ่งที่อาจใช้โปรติเอสที่แยกได้จากแบคทีเรียชอบเค็มได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตซีอิ๊วโปรตีนสูง เพื่อให้ได้รับตรามาตรฐานอุตสาหกรรมจากกระทรวงอุตสาหกรรม สมบัติหนึ่งของซีอิ๊วที่จะได้รับตรามาตรฐานอุตสาหกรรมคือ มีปริมาณโปรตีน ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีเคดัลเท่ากับ 5.5 เปอร์เซ็นต์ (มอก.252-2521)

ในปี พ.ศ. 2540 สุดาวดี ลีโทชวลิต รายงานว่าการเติมผงโปรติเอสปริมาณ 250 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่แยกจากแบคทีเรียทนเค็ม *Bacillus* sp. K1 และตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟต หลังจากนั้นทำการไดอะลิซีส และไลโอฟิไลเซชัน และเติมผงโปรติเอสในวันที่แปดของระยะโมโรมิของการหมักซีอิ๊ว ผลการทดลองพบว่า ปริมาณโปรตีนในน้ำซีอิ๊วก่อนการพาสเจอไรซ์ เพิ่มจากเดิม 7.4-7.8 เปอร์เซ็นต์เป็น 9.5-9.9 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นการเพิ่มปริมาณโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเติมผงโปรติเอสในระยะโมโรมิ เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนในน้ำซีอิ๊วเพื่อผลิตซีอิ๊วโปรตีนสูง เป็นการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์เพื่อบริโภคภายในประเทศและเพื่อการส่งออก

นอกจากนี้โปรติเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียชอบเค็มยังอาจใช้ในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายเนื้อกุ้งทะเล เนื้อปูทะเล ฯลฯ จากเปลือกกุ้งทะเล เปลือกปูทะเล ฯลฯ ในการทำไคตินให้บริสุทธิ์ (Yang และคณะ, 2000)

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ชนิดของโปรติเอส

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีน โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่นำมาใช้อย่างแพร่หลาย ในปี ค.ศ. 1998 Rao และคณะ รายงานว่า มีมูลค่าในการซื้อขายเอนไซม์ในทางอุตสาหกรรมถึง 1 ล้านล้านเหรียญสหรัฐ ซึ่งโปรติเอสเป็นกลุ่มที่มีการซื้อขายมากถึง 60 เปอร์เซ็นต์

เนื่องจากโปรติเอสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาสำหรับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต จึงมีความหลากหลายและผลิตโดยสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เช่น พืช, สัตว์ และ จุลินทรีย์

โปรติเอสจากพืช ที่เป็นที่รู้จักกันดี คือ Papain ซึ่งสกัดได้จากยางของมะละกอ Bromelain สกัดจากสับปะรด

โปรติเอสจากสัตว์ ส่วนใหญ่ผลิตจากตับอ่อน เช่น Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin และ Rennin เป็นต้น

โปรติเอสจากจุลินทรีย์ ผลิตได้จากแบคทีเรีย รา ไวรัส แต่ส่วนใหญ่โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมจะได้จากแบคทีเรีย และเป็นนิวทรัลโปรติเอสกับแอลคาไลน์โปรติเอสเป็นส่วนใหญ่ นิวทรัลโปรติเอสจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ช่วงพีเอชกว้างคือ 5.0–8.0 (Rao และคณะ, 1998) นิวทรัลปรติเอสจากแบคทีเรีย จะเหมาะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมมากกว่าโปรติเอสจากสัตว์ เพราะผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความขมน้อยกว่า ส่วนแอลคาไลน์โปรติเอสจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 10.0 และมีความจำเพาะต่อซับสเตรตกว้าง ซึ่งเหมาะจะใช้ในอุตสาหกรรมซักฟอก

เนื่องจากโปรติเอสมีความหลากหลายมาก ทั้งในด้านกลไกการเร่งปฏิกิริยาและโครงสร้าง จึงไม่ง่ายนักที่จะจัดกลุ่มได้ตามระบบปกติ ตามการจัดของ Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology โปรติเอสถูกจัดอยู่ใน subgroup ที่ 4 ของเอนไซม์กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่ม Hydrolases การจัดกลุ่มของเอนไซม์อยู่บนพื้นฐาน 3 ข้อคือ 1. ชนิดของปฏิกิริยาเร่ง 2. ลักษณะด้านเคมีของบริเวณที่เกิดการเร่งปฏิกิยา (Chemical Nature of Catalytic Site) 3. ความสัมพันธ์ด้านวิวัฒนาการของโครงสร้าง (Structural Evolution Relationship)

Barrett (1990) และ Rao และคณะ(1998) แบ่งโปรติเอสออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ซึ่งขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาการตัดพันธะเปปไทด์ คือ

1.Exopeptidases ตัดพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งปลาย N ซึ่งจะเรียกว่า

Aminopeptidase และจะเรียกว่า Carboxypeptidase เมื่อตัดตรงตำแหน่งปลาย C

2.Endopeptidases ตัดพันธะเปปไทด์ภายในสายของโพลีเปปไทด์

นอกจากนี้ KeayและWildi (1970) รายงานว่า ยังแบ่งโปรติเอสได้ตามพีเอชที่เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดี คือ

1. Acidic proteases ส่วนใหญ่พบใน ราและยีสต์ พบน้อยในแบคทีเรีย เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอชระหว่าง 3.0–4.0 แต่ Pepsin มีการเร่งปฏิกิริยาที่พีเอช 2.0 หรือต่ำกว่านั้น ไม่ถูกยับยั้งด้วย serine protease inhibitors เช่น diisopropylfluoro phosphate (DFP) หรือ Thiol group reagents เช่น p–chloromercuribenzoate (PCMB) แต่ถูกยับยั้งด้วยสารประกอบ diazoketone เช่น diazoacetyl-DL-norleucine methylester (Morihara, 1974)

2. Neutral proteases เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าพีเอชระหว่าง 7.0-8.0 ถูกยับยั้งด้วย metal chelating agents เช่น EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) บางครั้งจะอยู่ในกลุ่ม Metalloenzymes

3. Alkaline proteases เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าพีเอชระหว่าง 9.0-11.0 สามารถตัดพันธะเปปไทด์ได้หลายชนิด ไม่ถูกยับยั้งด้วย metal chelating agents แต่ถูกยับยั้งด้วย DFP

โปรติเอสสามารถแบ่งได้ตามกลไกการเร่งปฏิกิริยา คือ

1. Serine proteases เป็นเอนไซม์ที่มี serine ตรงตำแหน่ง active site มีการตัดพันธะเปปไทด์ทั้งแบบ exopeptidase และ endopeptidase ตรง catalytic triad ประกอบด้วย Serine (nucleophile), Histidine (base) และ Aspartate (electrophile) เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอชที่เหมาะสมช่วงพีเอช 7.0–11.0 มี Isoelectric point อยู่ระหว่างพีเอช 4.0–6.0 และมีความจำเพาะต่อซับสเตรตกว้าง มีมวลโมเลกุล 18–35 กิโลดาลตัน ยกเว้น serine protease จาก *Blakeslea trispora* มีมวลโมเลกุล 126 กิโลดาลตัน Serine proteases สามารถถูกยับยั้งแบบ reversible โดย 3,4-dichloro isocoumarin (3,4-DCI), L-3-Carboxytrans-2,3–epoxypropyl-leucylamido(4-guanidine) (E-64), diisopropylfluoro phosphate (DFP), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) Serine proteases บางชนิดถูกยับยั้งโดย thiol reagents เช่น p–chloromercuribenzoate (PCMB) ตรง Cysteine residue ใกล้บริเวณเร่งของ Serine proteases

Serine proteases สามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้เป็น 4 กลุ่ม (Morihara, 1974)

1.1 Trypsin-like serine proteases ตัดพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ให้หมู่คาร์บอกซิลในการสร้างพันธะเปปไทด์ มี side chain เป็น basic (positive) charge เช่น Lysine และ Arginine มีพีเอชเหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 8.0 ถูกยับยั้งโดย DFP, Soybean trypsin inhibitor และ TLCK มีมวลโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน และมี Isoelectric point เท่ากับ 9.0

1.2 Chemotrypsin-like serine alkaline proteases ตัดพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ให้หมู่คาร์บอกซิลในการสร้างพันธะเปปไทด์ มี side chain เป็น aromatic หรือ hydrophobic groups เช่น Tyrosine, Phenylalanine และ Leucine พีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาสูงถึง 10.0 มีค่า Isoelectric point คือ 9.0 มีมวลโมเลกุล 15–30 กิโลดาลตัน ถูกยับยั้งโดย DFP และ Potato protease inhibitor แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย tosyl-L-Phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) และ TLCK โปรติเอสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ Subtilisin เช่น Subtilisin Carlsberg ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* และ Subtilisin Novo(BPN') ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens*

1.3 Elastase-like serine proteases ตัดพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ให้หมู่คาร์บอกซิลเป็นกรดอะมิโน มี side chain เป็น aliphatic groups เช่น Alanine เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 9.0 ถูกยับยั้งโดย DFP มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 20 กิโลดาลตัน

1.4 Staphylococcal proteinases ตัดพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ให้หมู่คาร์บอกซิล มี side chain ที่มีประจุสุทธิเป็นลบ เช่น Aspartic acid และ Glutamic acid มีมวลโมเลกุล 12 กิโลดาลตัน เร่งปฏิกิริยาได้ดี ที่พีเอช 3.5-9.5 ถูกยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาโดย DFP

2. Aspartic proteases (acidic proteases) ส่วนใหญ่ผลิตจาก ยีสต์ และรา พบน้อยในแบคทีเรีย ตัดพันธะเปปไทด์แบบ endopeptidases มี Aspartic residue ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย Aspartate, Xaa และ Glycine (Xaa อาจเป็น Serine หรือ Threonine) เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 3.0–4.0 มี Isoelectric point อยู่ระหว่างพีเอช 3.0–4.5 มีมวลโมเลกุล 30–45 กิโลดาลตัน ถูกยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาโดย Pepstatin, Diazo acetyl-DL-norleucine methyl ester (DAN) และ 1,2 epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane (EPNP) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ 2.1 Pepsin-like enzymes ผลิตโดย *Aspergillus* spp. และ *Penicilium* spp. 2.2 Rennin-like enzymes ผลิตโดย *Endothia* spp. และ *Mucor* spp.

3. Cysteine/Thiol proteases ที่ catalytic triad ประกอบด้วย Cysteine 25, Histidine 159 และ Asparagine 175 มีแอคติวิตีในสภาวะที่มี reducing agent เป็น HCN และ Cysteine พีเอชที่เหมาะสมคือสภาวะที่เป็นกลาง มีการเร่งปฏิกิริยาบ้างเล็กน้อยที่พีเอชต่ำ การเร่งปฏิกิริยาถูกยับยั้งได้โดย thoil group reagents เช่น PCMB แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย DFP หรือ metal chelating reagents

4. Metalloproteases เป็นโปรติเอสที่มีลักษณะจำเพาะ คือต้องการ divalent metal ions สำหรับเร่งในปฏิกิริยา มีทั้งแบบ exopeptidases และ endopeptidases เช่น Thermolysin จาก

Bacillus stearothermophilus ซึ่งเป็นนิวทรัลโปรติเอสที่เป็นเปปไทด์สายเดี่ยวไม่มี disulfide bridge มีมวลโมเลกุล 34 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย Zn^{++} อะตอมฝังในโครงสร้างพับตัวของโปรตีนและมี Ca^{++} 4 อะตอม ซึ่งทำให้โปรติเอสชนิดนี้ทนความร้อน

Rao และคณะ(1998) รายงานว่า ได้มีการนำสมบัติของเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรม โดยแบ่งตามความจำเพาะต่อซับสเตรต เช่น

1. Chymotrypsin เป็นเอนไซม์ที่พบในสารสกัดจากตับอ่อนของสัตว์ มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะเปปไทด์บริเวณที่กรดอะมิโนที่ให้หมู่คาร์บอกซิลในการสร้างพันธะเปปไทด์ มี side chain เป็นกลุ่มอะโรเมติก เช่น Phenylalanine, Tyrosine มีมวลโมเลกุล 23.8 กิโลดาลตัน เอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีราคาแพง ส่วนใหญ่นำมาใช้ในงานวินิจฉัยและงานวิเคราะห์

2. Trypsin เป็นเอนไซม์หลักที่เร่งปฏิกิริยาสำหรับการย่อยอาหารในลำไส้ Trypsin เป็น serine protease มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะเปปไทด์บริเวณที่กรดอะมิโนที่ให้หมู่คาร์บอกซิลในการสร้างพันธะเปปไทด์มี side chain ที่มีประจุสุทธิเป็นบวก เช่น Lysine และ Arginine เอนไซม์นี้มีข้อจำกัดในอุตสาหกรรมอาหาร เพราะผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยมีรสชาติขม

3. Glutamic acid specific protease อยู่ในกลุ่ม serine proteases มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ตรงกรดอะมิโนที่ให้หมู่คาร์บอกซิลในการสร้างพันธะเปปไทด์เป็น Glutamic acid พบได้จาก *Bacillus subtilis* (Okamoto และคณะ,1997) และ *Bacillus licheniformis* (Kakudo และคณะ,1992) เป็นต้น

4. Leucine aminopeptidase (Lee และคณะ, 1998)อยู่ในกลุ่ม cellular exoprotease ตัดพันธะเปปไทด์ตรงกรดอะมิโนที่เป็นกลุ่มให้หมู่คาร์บอกซิลในการสร้างพันธะเปปไทด์ ที่มี side chain เป็น hydrophobic เช่น Leucine ที่ปลายด้าน N พบได้จาก *E.coli* และ *Aeromonas proteolytica*

2.2 การหาโปรติเอสแอคติวิตี

มีการใช้ซับสเตรตหลายชนิดในการหาแอคติวิตีของโปรติเอส ซับสเตรตที่ใช้ส่วนใหญ่ได้แก่

Casein	McConn และคณะ, 1964; Ohta, 1967; Norberg และ Hofsten, 1969; Yasunobu และ McConn, 1970; Drapeau และคณะ, 1972; Durham และคณะ,1987; Aderibigbe และ Odunfa, 1988; Fujio และ Kume, 1991; Shimogaki และคณะ , 1991; Van den burg, และคณะ, 1991; Fukuda และคณะ,

	1997; Matta และ Punj, 1998; Moriyama และคณะ, 1998; Kim และ Choi, 2000; Yang, และคณะ, 2000;
Hammersten casien	Horikoshi, 1971; Qua และคณะ, 1981; Takami และคณะ, 1989; Aoki, 1995; Kobayashi และคณะ, 1995; Kumar และคณะ, 1999
Azocasein	Izotova และคณะ, 1983; Roitsh และ Hageman, 1983; Rufo และคณะ, 1990; Rahman และคณะ, 1994; Ohta และคณะ, 1995; Takii และคณะ, 1998
Azocoll	Yang และคณะ, 1984; Sloma และคณะ, 1990
Azure	Sidler และ Zuber, 1980
Hemoglobin	Wang และคณะ, 1974; Wu และ Hang, 1998
Hemoglobin และ BSA	Strongin และคณะ, 1978
Fluorescein isothiocyanated labled casien	Yamamoto และคณะ, 1993; Samacchi และ Gobbetti, 1999

2.3 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์

เนื่องจากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่าโปรติเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียชอบเค็มสายพันธุ์ SA.02 เป็นนิวทรัลโปรติเอส (Phooyothin และคณะ, 2000) การตรวจเอกสารต่อไปจึงจำกัดเพียงการทำนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์

McConn, Tsuru และ Yasunobu ปี ค.ศ 1964 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus subtilis* โดยนำ crude powder มาละลายใน 10 มิลลิโมลาร์ ทรีส มาเลตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.4ที่มี 2 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมอะซิเตต นำดีอีเออี เซลลูโลส (DEAE- cellulose) มาเติมลงใน crude enzyme กวน 30 นาที นำมากรองเอาดีอีเออี เซลลูโลสออก ปรับพีเอช

7.4 ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.6 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์เดิมและไดอะไลส์ นำมาผ่านลงในคอลัมน์ซีเอ็ม เซลลูโลส (CM-cellulose) ตกตะกอนโปรตีนอีกครั้งด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์เดิม และไดอะไลส์ นำมาผ่านลงในคอลัมน์ซีเอ็ม เซลลูโลส โดยทุกขั้นตอนทำที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์เหลือแอคติวิตี 28.1 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล 30-40 กิโลดาลตัน

Yasunobu และ McConn ปี ค.ศ.1970 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Bacillus subtilis* เลี้ยงแบบ submerged culture นำ crude enzyme 30 กรัมมาละลายใน 400 มิลลิลิตร ของ 1 มิลลิโมลาร์ ทรีส มาเลตบัฟเฟอร์ ที่มี 2 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมอะซิเตต พีเอช 6.4 นำดีอีเออี เซลลูโลส มาเติมลงใน crude enzyme กวน 30 นาที นำมากรองเอาดีอีเออี เซลลูโลสออก นำมาตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนที่เย็น 66 เปอร์เซ็นต์ (-15 องศาเซลเซียส) นำมาปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายใน 10 มิลลิโมลาร์ ทรีส มาเลตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.4 ที่มี 2 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมอะซิเตท นำมาผ่านลงในคอลัมน์ซีเอ็ม เซลลูโลส ชะโดย10 มิลลิโมลาร์ ทรีส มาเลตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.4 ที่มี 2 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมอะซิเตท พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 20.4 เท่า เหลือแอคติวิตี 24 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 6.5-7.5 และอุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียสที่มีแคลเซียมคลอไรด์ มีน้ำหนักโมเลกุล 44.7 กิโลดาลตัน

Sidler และ Zuber ปี ค.ศ.1980 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์ จาก *Bacillus stearothermophilus* โดยทำ crude filtrate ให้เข้มข้นด้วยการระเหยในเครื่องปั่นเหวี่ยง ในสูญญากาศ ที่ 38–40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 60-90 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น ปั่นแยกส่วนที่ไม่ละลายออก นำไปไดอะไลส์ในน้ำกลั่น นำมาผ่านลงในคอลัมน์ดีอีเออี เซลลูโลส ชะโดย 30 มิลลิโมลาร์ เมส (MES) บัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่มี 10 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมอะซิเตต รวมส่วนที่มีแอคติวิตีมาทำให้เข้มข้นโดยใช้อุลตราฟิวเทรชั่น ตกตะกอนด้วยอะซิโตน แล้วผ่านลงในคอลัมน์ Affinity 4B-Sepharose พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 223 เท่า เหลือแอคติวิตี 22.9 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7.2 มีน้ำหนักโมเลกุล 35 กิโลดาลตัน

Qua, Simidu และ Taga ปี ค.ศ.1981 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์ จาก *Pseudomonas sp.* โดยการนำ crude filtrate มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50-90 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทรีส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.8 นำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดียวกับข้างต้น นำมาผ่านลงในคอลัมน์ดีอีเออี เซลลูโลส ชะด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทรีส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.8 ที่มี 10 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ และ10 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ ทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต นำมาปั่นแยกตะกอน และละลายตะกอนใน 50 มิลลิโมลาร์ ทรีส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.8 ที่มี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ นำมาผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 (Sephadex G-200) ชะด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทรีส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.8 ที่มี 10 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์, 10 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และ 1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 485 เท่า เหลือแอคติวิตี 22เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 8.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Aderibigbe และ Odunfa ปี ค.ศ. 1988 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์ จาก *Bacillus subtilis* BS2 โดยการนำ crude filtrate มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50-70 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ ทรีส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.8 นำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดียวกับข้างต้น นำมาผ่านลงในคอลัมน์ดีอีเออี เซฟาเดกซ์ (DEAE-Sephadex) ชะแบบเกรเดียนต์ นำมาผ่านลงในคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาโรส (CM Sepharose) ชะโดย 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 นำมาผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 75(Sephadex G-75) และผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 50(Sephadex G-50) พบว่าเอนไซม์ 3 ชนิดแตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 23.8, 38.4 และ 29.4 กิโลดาลตัน

Rufo และคณะ ปี ค.ศ. 1990 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์ จาก *Bacillus subtilis* โดยการนำ crude filtrate มาทำให้เข้มข้นขึ้น 5-10 เท่า โดยวิธีCH_2PR concentration system ด้วย S1Y10 spiral cartidge นำมาผ่านลงในคอลัมน์ดีอีเออี เซฟาเซล (DEAE-Sephacel) ชะด้วย 50 มิลลิโมลาร์ เมส (MES) บัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 รวมส่วนที่มีแอคติวิตีมาปรับพีเอชให้เป็น 7.5 นำมาผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาโรส ซีเอล-6บี(CM Sepharose CL-6B) ชะด้วย 50 มิลลิโมลาร์ มอบส์ บัฟเฟอร์ (MOPS) พีเอช 7.5 นำไปไดอะไลส์ใน 50 มิลลิโมลาร์ เมส (MES) บัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 นำมาผ่าน HPLC weak cation exchanger และผ่านHPLC TSK gel filtration 2 ครั้ง พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 6,897 เท่า

เหลือแอคติวิตี 4 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน

Kohlmann และคณะ ปี ค.ศ. 1991 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์ จาก *Pseudomonas fluorescens* M316 โดยการนำ crude filtrate มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 10, 30 และ75 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 นำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดียวกับข้างต้น นำมาผ่านลงในคอลัมน์ DE-52 cellulose anion exchange resin (Whatman) ชะด้วยบัฟเฟอร์เดียวกับข้างต้น นำไปไดอะไลส์และระเหิดแห้ง นำผงโปรตีนที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น นำมาผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 (Sephadex G-100) ที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 106.6 เท่า เหลือแอคติวิตี 7.6 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 8.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน

Ohta, Katoh และ Fujio ปี ค.ศ.1995 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสทนร้อนให้บริสุทธิ์ จาก *Bacillus stearothermophilus* No.2 โดยการนำ crude filtrate มาตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนที่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) นำมาปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายใน 10 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 นำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดียวกับข้างต้น แล้วผ่านลงในคอลัมน์ Hydroxylapatite รวมส่วนที่มีแอคติวิตี นำมาผ่านลงในคอลัมน์ดีอีเออี เซฟาเดกซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) มาทำให้เข้มข้นโดยใช้อุลตราฟิวเทรชั่น แล้วผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 75 (Sephadex G-75 superfine) พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 46.32 เท่า เหลือแอคติวิตี 8.2 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7.5-8.0 และอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล 35 กิโลดาลตัน

Matta และ Punj ปี ค.ศ.1998 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสทนร้อนให้บริสุทธิ์ จาก *Bacillus polymyxa* B-10 โดยการนำ crude filtrate มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 45-70 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ที่มี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ นำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดียวกับข้างต้น นำมาผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 (Sephadex G-100) รวมส่วนที่มีแอคติวิตีนำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดียวกับข้างต้น พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 40.38 เท่า เหลือ

แอคติวิตี 78.35 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7.5 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน

Secades และ Guijarro ปี ค.ศ.1999 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์ จาก *Yersinia ruckeri* โดยการนำ crude filtrate มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 60 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทรีส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 นำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดียวกับข้างต้น นำมาผ่านลงในคอลัมน์ดีอีเออี เซฟาเซล (DEAE-Sephacel) รวมส่วนที่มีแอคติวิตีไปไดอะไลส์ ทำให้เข้มข้นโดยการระเหิดแห้ง เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 82.15 เท่า เหลือแอคติวิตี 2.07 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 8.0 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล 47 กิโลดาลตัน

Toma, Ichinose และ Iwanaga ปี ค.ศ.1999 ศึกษาการทำนิวทรัล(ซิงค์ เมทัลโล)โปรติเอสให้บริสุทธิ์ โดยการนำ crude filtrate มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายใน 20 มิลลิโมลาร์ ทรีส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.6 นำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดียวกับข้างต้น นำมาผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-100 (Sephadex G-100) แล้วผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 (Sephadex G-50 superfine) จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7.0 และ มีน้ำหนักโมเลกุล 34 กิโลดาลตัน

Kim และ Choi ปี ค.ศ. 2000 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์ จาก *Bacillus sp.* strain DJ-4 โดยทำ crude filtrate ให้เข้มข้นด้วย อุลตราฟิวเทรชั่น (Ultrafiltration) นำมาเจือจาง 5 เท่าด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.3 นำมาผ่านลงในคอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาโรส ซีเอล-6บี (CM Sepharose CL-6B) รวมส่วนที่มีแอคติวิตีไปไดอะไลส์ ทำให้เข้มข้น นำไประเหิดแห้ง นำมาผ่านลงในคอลัมน์ ทีเอสเค เจลฟิลเทรชั่น (TSK gel filtration Toyopearl HW-5JF) ทุกขั้นการทดลองทำที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 8.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล 29 กิโลดาลตัน

Yang และคณะ ปี ค.ศ. 2000 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสให้บริสุทธิ์ จาก *Bacillus subtilis* โดยการนำ crude filtrate มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 608 กรัมต่อลิตร นำมาปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซัลเฟต

บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 นำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดียวกับข้างต้น นำมาผ่านลงในคอลัมน์ดีอีเออี เซฟาโรส ซีเอล 6บี (DEAE-Sepharose CL-6B) โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ชะแบบเกรเดียนต์ นำเอนไซม์ที่ได้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอีกครั้ง ปั่นแยกตะกอน นำตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ นำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดียวกับข้างต้น นำมาผ่านลงในคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 (Sephacryl S-200) ชะโดย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตต บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 37 เท่า เหลือแอคติวิตี 18 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 8.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล 44 กิโลดาลตัน

ผลการตรวจเอกสารเบื้องต้น สรุปได้ว่าการทำนิวทรัลโปรติเอสจากแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus* spp. และแบคทีเรียแกรมลบเช่น *Pseudomonas* spp., *Yersiner ruckeri* ประกอบด้วย การตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวในช่วง 50-90 เปอร์เซ็นต์ ไดอะลิซีส การทำ ion exchange chromatography และ gel filtration สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ใช้มีค่าในช่วง 50-90 เปอร์เซ็นต์ anion exchangers ที่นิยมใช้ เช่น DEAE cellulose, DEAE Sephadex และ DEAE Sephacel เป็นต้น cation exchangers ที่นิยมใช้ เช่น CM cellulose, CM Sepharose และ CM Sepharose CL-6B เป็นต้น Matrix ของ gel filtration columns ที่นิยมใช้ ได้แก่ Sephadex G-200, Sephadex G-100, Sephadex G-75, Sephadex G-50, Sephacryl S-200 เป็นต้น มีการเติม 2-10 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ และในบางกรณีมีการเติม 10 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะสารละลายออกจากคอลัมน์ด้วย บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ได้แก่ 1-100 มิลลิโมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอริก พีเอช 6.4-7.8

2.4 การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์

การผลิตและการนำโปรตีนไปใช้เป็นสิ่งสำคัญมากสำหรับสิ่งมีชีวิต วัตถุประสงค์ที่สำคัญคือการเพิ่มกรดอะมิโนที่จำเป็นในอาหาร ในทางตะวันตกโปรติเอสส่วนใหญ่นำมาจากพืชและสัตว์ แต่ในทางโลกตะวันออกใช้โปรติเอสจากจุลินทรีย์ในการถนอมอาหารจากวัตถุดิบ เช่น ถั่วเหลือง, ข้าว และปลา(Aunstrup, 1979) ในอุตสาหกรรมการหมักซึ่งมีการผลิตให้มีต้นทุนต่ำ โดยนำเอนไซม์จากจุลินทรีย์มาใช้แทนที่เอนไซม์จากสัตว์และพืช เพราะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลากหลายด้วยคุณสมบัติของเอนไซม์ การนำโปรติเอสมาใช้ในอุตสาหกรรมในปัจจุบันมีหลากหลายดังนี้

อุตสาหกรรมฟอกหนัง

การใช้โปรติเอสแบ่งตามวัตถุประสงค์ 2 ข้อ (Outtrup และ Boyce, 1990)

1. การกำจัดขนสัตว์ มีการนำซีรีนโปรติเอสจากจุลินทรีย์มาใช้แทนสารเคมี เช่น โปรติเอสจาก *Bacillus sp.* ชอบเค็ม ข้อดีของการใช้โปรติเอสคือลดปัญหาการบำบัดของเสียจากโรงงานเนื่องจากสารเคมีที่ใช้ แต่ต้นทุนจะสูง

2. การแช่หนังสัตว์ในด่าง (bating) เพื่อทำให้หนังมีความนุ่มและยืดหยุ่นมากขึ้น แต่เดิมการแช่หนังสัตว์ให้มีความนุ่มและยืดหยุ่นใช้เอนไซม์จากตับอ่อนเช่น Trypsin และ Pancreatin มีการนำซีรีนโปรติเอสจากแบคทีเรียมาใช้แทนที่เอนไซม์จากสัตว์แต่ได้ผลไม่ดีนัก ในปี ค.ศ.1970 จึงมีการนำแอลคาไลน์โปรติเอสมาใช้แทนซึ่งได้ผลดี แหล่งแอลคาไลน์โปรติเอสผลิตจาก *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* ที่มีขายในปัจจุบันในชื่อการค้าได้แก่ PIN, Pyrase, Novocor AD เป็นต้น (http://www.enzyme.Novo.dk/enzyme/Industries-food.htm)

ผงซักฟอก

การซักฟอกคือการขจัดคราบสกปรกออกจากเสื้อผ้าโดยวิธีต่างๆ ส่วนใหญ่สารซักล้างประกอบด้วย สารลดแรงตึงผิว (surfactants หรือ สารกำจัดคราบสกปรก) และด่าง เป็นต้น ในยุโรปมีการใส่ เปอร์บอเรต (perborate) ซึ่งเป็นสารฟอกขาว ส่วนในสหรัฐอเมริกาจะใช้ไฮเปอร์คลอเรตแทน(Aunstrup,1979) เสื้อผ้าที่สกปรกจะดูดซับสิ่งสกปรกจากสิ่งแวดล้อม หรือจากร่างกายมีทั้งคราบโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ในการซักฟอก ความร้อน ความเป็นด่าง สารลดแรงตึงผิว และ สารกำจัดคราบสกปรกจะช่วยขจัดคราบออก และสารฟอกขาวจะช่วยขจัดสีย้อมออกไป แต่โปรตีนจะไม่สามารถถูกขจัดออกไปได้และยังคงติดอยู่กับเส้นใยเสื้อผ้า เพราะโปรตีนจะแข็งตัวเป็นก้อน และไม่ละลายที่พีเอชด่าง(9.0-10.0) การใช้โปรติเอสในสารซักฟอกสามารถนำมาใช้แก้ปัญหาได้ เพราะเอนไซม์จะย่อยโปรตีนที่เกาะอยู่บนเสื้อผ้า ทำให้มีประสิทธิภาพในการซักล้างมากขึ้น โปรติเอสที่ซื้อขายในอุตสาหกรรมซักฟอกได้แก่ Alcalase จากบริษัท Novo Industrial ประเทศเดนมาร์ก

ในอุตสาหกรรมอาหารมีความต้องการปรับปรุงอาหารโดยใช้วิธีที่ไม่สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ นอกจากนี้ยังมีการจำกัดสารเติมแต่ง การใช้วิธีทางเคมีไม่เป็นที่ยอมรับเพราะเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรง การเกิดปฏิกิริยาไม่จำเพาะ และมีความยากในการแยกออกจากผลิตภัณฑ์ภายหลัง เอนไซม์มีข้อได้เปรียบคืออัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วแต่ไม่รุนแรง มีความจำเพาะสูงและสามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่าย วัตถุดิบที่เป็นโปรตีนมีมากมายหลากหลายตามความต้องการ ดังเช่น

อุตสาหกรรมการทำเนยแข็ง

การใช้เอนไซม์เรนเนตจากกระเพาะลูกวัว ทำให้เกิดการตกตะกอนของน้ำนมอย่างรวดเร็วในพีเอชที่เป็นกลางซึ่งมีการสลายตัวของโปรตีนในน้ำนมต่ำ แต่เอนไซม์เรนเนตจากกระเพาะลูกวัวมีข้อเสียคือต้องสกัดจากกระเพาะที่สี่ของลูกวัว ซึ่งมีราคาสูง จึงมีการนำเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่มีลักษณะใกล้เคียงมาแทน เช่น Renin-like enzyme จาก *Mucor miechi, Mucor pusillus* และ *Endothai parasitica* เป็นต้น

อุตสาหกรรมเบเกอรี

การนำโปรติเอสมาประยุกต์ใช้ 2 ข้อคือ 1.ปรับปรุงให้มีกลูเตนในโดล์สูง(Outtrup และ Boyce, 1990) ในการทำ cracker และ biscuit ส่วนมากใช้แอซิดโปรติเอสจากรา โดยโปรติเอสทำให้กลูเตนถูกย่อยสลายทำให้อากาศไม่สามารถถูกกักเก็บในโดล์ระหว่างการหมักจากยีสต์ จึงทำให้โดล์ไม่พอง เมื่อนำไปอบ จะได้ texture ที่กรอบมาก โปรติเอสที่ใช้เช่น จาก *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งเป็นนิวทรัลโปรติเอส 2. เพื่อทำให้มีรสชาติที่ดีขึ้นจากสารให้กลิ่นของกรดอะมิโนทำให้เกิดกลิ่นที่น่ารับประทาน (Poutanen, 1997)

อุตสาหกรรมการหมักเบียร์

การใช้โปรติเอสในการหมักเบียร์โดยมีวัตถุประสงค์ 2 ประการ ได้แก่ 1. ในขั้นตอนการผลิตจะนำข้าวบาร์เล่ย์มาหมักหรือเรียกว่า มอลต์ (malt) หลังจากหมักจะนำมากรองของเหลวที่มีรสหวาน นำมาต้มกับดอกฮอบส์ (hops) ของเหลวที่ได้จะถูกทำให้เย็นและเติมยีสต์ หลังจากหมักจะได้เป็นเบียร์สด แหล่งผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการหมักเบียร์ คือยีสต์ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญ ถ้ายีสต์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์น้อย เบียร์ที่ได้คุณภาพจะไม่ดี ยีสต์ที่ใช้เป็นยีสต์ที่มีชีวิตและยังต้องการสารอาหารเพื่อการเจริญเช่น โปรตีน ถ้ามีกรดอะมิโนอิสระไม่เพียงพอการหมักก็จะไม่ดี จึงมีการนำนิวทรัลโปรติเอสจากแบคทีเรียมาเติมในการหมักเพื่อเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งเป็นการปรับปรุงคุณภาพเบียร์ให้ดีขึ้น (http://www.enzyme.Novo.dk/enzyme/Industries-food.htm)
2.ในขั้นตอนการเก็บเบียร์ในอุณหภูมิต่ำจะเกิดความขุ่นเนื่องจากมีสารประกอบโพลีฟีนอล, คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน การใส่โปรติเอสจะทำให้เบียร์มีความใสมากขึ้น (Aunstrup,1979)

สารสกัดจากโปรตีน

ในอุตสาหกรรมการทำซีอิ๊ว (soy sauce) มีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากราในการย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลือง เช่น *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus sojae* เป็นต้น

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) รุ่น Gyromax™ 707R ของ Amerex Instrument, Inc.
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น T-42K ของ Kontron Instrument.
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น Centrifuge 5402 ของ Eppendrof.
4. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (Digital pH meter) รุ่น 8519 ของ Hanna Instruments.
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic® 401 ของ Miton Roy.
6. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น Labo Autoclave MLS 3000 ของ Sanyo Electric Co., Ltd.
7. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น VT-122 ของ ISSCO
8. เครื่องบ่มเชื้อ (incubator) รุ่น RO-8 ของ Memert
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของ Memert
10. เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) รุ่น Fried Electric M20/1 ของ Framo®
11. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของ Scientific Industries Inc.
12. เครื่องโครมาโทกราฟี (low pressure liquid chromatography) รุ่น Econo ของ BioRad
13. เครื่องอิเลคโทรโฟริซิสแบบแผ่น (slab gel electrophoresis equipment) รุ่น AE6531 PAGE RUN ของ ATTO
14. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น Gene Amp PCR System 2400 ของ Perkin elmer.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้ทดลอง

1. เคซีน(casein) ของ Sigma
2. Folin-Ciocalteu's reagent ของ Carlo Erba
3. ไตรคลอโรอะซิติกแอซิด (trichloroacetic acid) ของ Merk
4. โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) ของ Merk
5. แอมโมเนียมซัลเฟต(ammoniumsulfate) ของ BDH
6. DNAZol® ของ Life Technologies
7. ไพร์เมอร์ (primer) ของ Life Technologies
8. PCR Master Taq kit ของ Eppendrof Science
9. λ Ladder ของ Bio-Rad
10. ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (DEAE Bio-gel A) ของ Bio-Rad
11. เซฟาเดกซ์ จี-50 (Sephadex G-50) ของ Pharmacia
12. อะคริลาไมด์ (acrylamide) ของ Sigma
13. เอ็น, เอ็น, เอ็น', เอ็น'-เททระเมธิลีนไดเอมีน (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine, TEMED)
14. แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammmniumpersulfate) ของ Bio-Rad
15. สีคลูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250 (coomassie brilliant blue G-250) ของ Fluka
16. 2-เมอร์แคบโตเอธานอล (2-mercaptoethanol) ของ Sigma
17. โปรตีนมาตรฐาน ของ Bio-Rad

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนและผลิตโปรติเอสที่พีเอช 5.5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์

เนื่องจากค่าพีเอชของระยะโมโรมิเท่ากับ 5.5 และความเค็มของน้ำซีอิ๊วมีค่าเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ (Chansa-ngavej และ Singhaboonpong, 1994) จึงนำแบคทีเรีย 45 ไอโซเลตที่แยกได้จากน้ำซีอิ๊วระหว่างการหมักของโรงงานอุตสาหกรรมขนาดเล็กแห่งหนึ่ง ในจังหวัดชลบุรี (Chansa-ngavej และ Mahattanathavee, 1993) และจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊วระดับห้องปฏิบัติการ (สุดาวดี ลีโทชวลิต, 2540) มาจุดในอาหารสูตรมีเดียม 73 ที่มีเจลาตินเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน(ภาคผนวก ก) ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ พีเอช 5.5 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำมาราดทับโคโลนีด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ถ้าแบคทีเรียผลิตโปรติเอสจะเห็นเป็นวงใสรอบโคโลนี วัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสและเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโปรติเอสปริมาณสูง คือ อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่มีค่าสูง

3.2 การตรวจลักษณะชอบเค็มหรือทนเค็มของไอโซเลต SA.02

เลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต SA.02 ในอาหารเหลวสูตรมีเดียม 73 พีเอช 7.0 โดยแปรปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0-20 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส วัดการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยวัดความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Pharmacia Novaspec II คำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ(specific growth rate) โดยใช้สมการมาตรฐานต่อไปนี้ โดยใช้ค่า N_0, N, t จากกราฟผลการทดลองที่ได้

$$N = N_0 e^{\mu t}$$

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{t}$$

N_0 = ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

N = ค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา t ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ มีหน่วยเป็นชั่วโมง$^{-1}$

t = เวลาที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย มีหน่วยเป็นชั่วโมง

3.3 การจำแนกชนิดแบคทีเรีย SA.02 ที่คัดเลือกได้โดยการทดสอบทางชีวเคมีและจุลชีววิทยา (Gerhardt และคณะ, 1981)

3.3.1 ลักษณะโคโลนี นำเชื้อมาขีดให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ลงบนอาหารวุ้น Tryptic soy agar (TSA;Difco) ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ โดยบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

3.3.2 การศึกษารูปร่างภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนนิง (Scanning Electron Microscope, SEM) เลี้ยงแบคทีเรีย SA.02 บนอาหารวุ้น TSA ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ทำ SEM โดยตัดตัวอย่างที่เจริญบนวุ้นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ทำ fixation, post fixation และ dehydration ด้วยเอธานอล แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องทำให้ตัวอย่างแห้งที่จุดวิกฤต (critical point dryer) Model BALZER ติดตัวอย่างลงบนแท่งทองเหลืองสำหรับวางตัวอย่าง (stub) นำไปฉาบทองด้วยเครื่อง Ion sputter (BALZER) แล้วจึงนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนนิง (JEOL Model JSM – T20) ด้วยความต่างศักย์ 15 กิโลโวลต์ ถ่ายภาพด้วยฟิลม์ Verichrome pan VP 120 (Kodak)

3.3.3 การติดสีแกรม แตะน้ำกลั่นบนกระจกสไลด์ที่สะอาด เขี่ยเชื้อจากข้อ 3.3.1 และเกลี่ยให้กระจายในน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง ผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้งเพื่อให้เซลล์ติดบนกระจกสไลด์ได้ดี ย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลต 1 นาที ล้างน้ำ หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำ ล้างสีส่วนเกินด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล รีบล้างน้ำทันที ย้อมด้วยสีซาฟรานินโอ 20-30 วินาที ล้างน้ำ ซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ oil objective กำลังขยาย 100 เท่า

3.3.4 การย้อมสีสปอร์ ในการทดลองระยะแรกของการวิจัย เลี้ยงไอโซเลต SA.02 ในอาหารเหลว TSB(ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 1-7 วัน ในระยะหลังเลี้ยงไอโซเลต SA.02 ในอาหาร Seawater agar(Spring และคณะ, 1996) (ภาคผนวก ก) ย้อมสปอร์ด้วยสีมาลาไคต์กรีน โดยแตะน้ำกลั่นแตะบนกระจกสไลด์ที่สะอาด เขี่ยแบคทีเรีย SA.02 ที่เลี้ยงในอาหาร TSA หรือ Seawater agar เกลี่ยให้กระจาย ทิ้งให้แห้ง และผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ติดบนกระจกสไลด์ได้ดี หยด 5 เปอร์เซ็นต์มาลาไคต์กรีน ลงบนกระจกสไลด์ ใช้ไฟลนใต้สไลด์ให้เกิดไอ 1-2 นาที คอยหยดสีอย่าให้แห้ง ล้างด้วยน้ำ 30 วินาที ย้อมด้วยสีซาฟรานินโอ 1 นาที ล้างน้ำซับให้แห้ง ส่องกล้องจุลทรรศน์ดูด้วย oil immersion objective ถ้ามีสปอร์จะติดสีเขียว เซลล์ติดสีชมพู (positive control ที่ใช้ได้แก่ *Bacillus subtilis*, negative control ที่ใช้ได้แก่ *Lactobacillus* sp.)

3.3.5 ทดสอบการเพิ่มจำนวนในสภาวะปราศจากอากาศ (anaerobic growth) ขีดไอโซเลต SA.02 ในอาหารวุ้น TSA ใส่ใน anaerobic jar ที่มี BBL™ Gas Pak anaerobic system และ methylene blue indicator strip ซึ่งจะเห็นเป็นแถบกระดาษสีฟ้าในภาวะมีอากาศและไม่มีสีใน

สภาวะไร้อากาศ เปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนเซลล์กับไอโซเลตเดียวกัน ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรเดียวกัน แต่บ่มในอากาศที่ 30 องศาเซลเซียส

3.3.6 ทดสอบการเคลื่อนที่โดยการย้อมสีแฟลกเจลา เลี้ยงไอโซเลตในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง โดยย้อมสีด้วยวิธี negative staining หยดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไอโซเลต SA.02 หนึ่งหยดบน copper grid ที่มี form var ย้อมด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ยูเรนิลอะซิเตต ซับสีส่วนเกินแล้ว นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy) ถ่ายภาพด้วยฟิล์ม Verichrome pan VP 120 (Kodak)

3.3.7 การสร้างคาตาเลส หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ลงบนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารวุ้น TSA ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าแบคทีเรียผลิตคาตาเลส (positive control ที่ใช้ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis*, negative control ที่ใช้ได้แก่ *Streptococcus lactis*)

3.3.8 การเลี้ยงไอโซเลต SA.02 เพื่อตรวจระยะการมีเซลล์แบบแท่งและระยะการมีเซลล์ทรงกลม เลี้ยงแบคทีเรียแต่ละชนิดเหล่านี้: ไอโซเลต SA.02, *Arthrobacter citreus* TISTR 820, *Brevibacterium ammoniagenes* TISTR 362 และ *Corynebacterium glutamicum* TISTR 461 ขีดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร EYGA ตามวิธีที่รายงานโดย Cure และ Keddie(1973) สูตรอาหาร EYGA ดังรายงานในภาคผนวก ก บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 3 วัน นำมาย้อมการติดสีแกรมตามวิธีที่รายงานในข้อ 3.3.3 นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ oil immersion objective กำลังขยาย 100 เท่า

3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ประกอบด้วยการสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอ และการเพิ่มชิ้นส่วน 16S rDNA โดยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ 27f และ 1492r เป็น forward และ reverse primers ตามวิธีที่รายงานโดย Blackall(1999)

27f และ 1492r เป็นไพร์เมอร์ซึ่งประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 9-27 และลำดับที่ 1492-1512 ตามลำดับ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *E.coli* ดังนี้ (Dorch และ Strackebrandt, 1992)

27f มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'

1492r มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'

3.4.1 การสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอ

องค์ประกอบของสารละลายที่ใช้ในการสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอ มีดังรายงานในภาคผนวก ข ทำลาย RNAse และ DNAse ในสารละลายและ Eppendorf tubes, tips, spatula ฯลฯ โดยวิธี autoclave เลี้ยงไอโซเลต SA.02 ในอาหารเหลวสูตรมีเดียม 73 พีเอช 7.0 ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ปริมาณขนาดเท่าหัวไม้ขีด มาเติม 200 ไมโครลิตร ของ TES บัฟเฟอร์ เขย่าให้เข้ากัน เติม 80 ไมโครลิตรของ ไลโซไซม์ (2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย saline-EDTA) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เซลล์แตกดียิ่งขึ้นโดยวาง Eppendorf tubes ที่บรรจุเซลล์ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวาง Eppendorf tubes ดังกล่าวในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำเช่นนี้ซ้ำอีก 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติมสารเคมี DNAZol® (Life Technologies) 1 มิลลิลิตร ผสมโดยคว่ำและหงาย Eppendorf tube หลายๆครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใสใส่หลอด Eppendorf tube ใหม่ เติม 0.5 มิลลิลิตร 100 เปอร์เซ็นต์ เอธานอลที่เย็นจัด ผสมให้เข้ากัน โดยคว่ำและหงาย Eppendorf tube ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 600 ไมโครลิตร 70 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล(เย็น) ทิ้งไว้ให้ดีเอ็นเอแห้งในอากาศ หลังจากนั้นเติม 20-50 ไมโครลิตร น้ำกลั่น แยกสารละลายดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลกโตรโฟรีซีส และย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตามวิธีที่รายงานโดย Sambrook และคณะ(1989)

3.4.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน 16S rDNA ของไอโซเลต SA.02 โดยวิธีพีซีอาร์

ขั้นตอนการทำลาย RNase, DNase, การป้องกันการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของจุลินทรีย์อื่นมีดังรายงานโดย Eeles และ Stamps (1993)

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน 16S rDNA ของไอโซเลต SA.02 ใช้ชุดสำเร็จรูป PCR MasterTaq Kit ซึ่งประกอบด้วย

5x TaqMaster buffer additives	10	ไมโครลิตร
10x Taq buffer (Mg^{2+})	5	ไมโครลิตร
10 mM dNTP-mix	1	ไมโครลิตร
Primer 27f (200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
Primer 1492r (200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
DNA Template (10-100 นาโนกรัม)	2	ไมโครลิตร
Taq Polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร

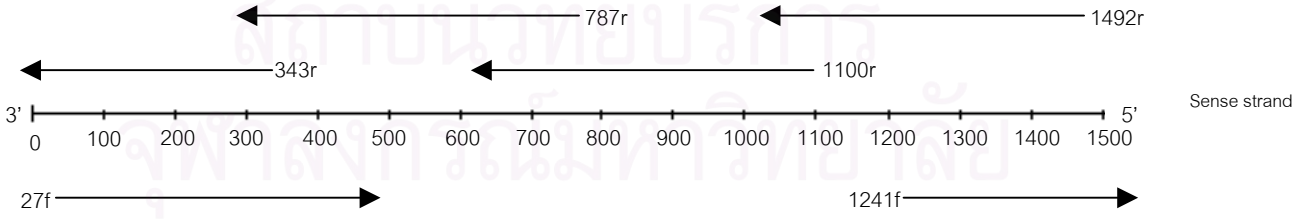
Double distilled, sterile water	30.5	ไมโครลิตร
รวม	50.0	ไมโครลิตร

โปรแกรมที่ใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วน 16S rDNA ทำตามที่รายงานโดย Blackall (1999) ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	30	นาที	
94 องศาเซลเซียส	60	วินาที	} 30 รอบ
48 องศาเซลเซียส	60	วินาที	
72 องศาเซลเซียส	120	วินาที	
48 องศาเซลเซียส	60	วินาที	
72 องศาเซลเซียส	300	วินาที	
4 องศาเซลเซียส	∞		

แยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเลกโตรโฟรีซีส ตามวิธีที่ระบุใน Sambrook และคณะ (1989) โดยใช้ 1 กิโลเบส λ Ladder เป็นขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน

หลังจากตรวจพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ซึ่งมีขนาด 1,500 คู่เบส บนอะกาโรสเจล ได้ส่งสารละลายที่เหลือในหลอดพีซีอาร์ ซึ่งมีชิ้นส่วน 16S rDNA ไปยังหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติเพื่อใช้บริการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems) โดยผู้วิจัยส่ง Sequencing strategy ดังแสดงในรูปที่1 ให้หน่วยบริการชีวภาพ ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับ 16S rDNA เลือกใช้ไพร์เมอร์ตามที่แนะนำโดย Blackall(1999) และ Dorsch และ Stackebrandt (1992) ดังนี้



รูปที่ 1 Sequencing strategy ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไอโซเลต SA.02

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์และลำดับที่ของนิวคลีโอไทด์เรียงตามลำดับที่นิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *E.coli* มีดังนี้

ไพร์เมอร์ (ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ใน *E.coli* 16S rDNA)ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5' ไป 3'

27f (9-27)	GAGTTTGATCCTGGCTCAG
343r (343-357)	CTGCTGCCTCCCGTA
787r (787-803)	CTACCAGGGTATCTAAT
1100r (1100-1115)	AGGGTTGCGCTCGTTG
1241f (1224-1241)	TACACACGTGCTACAATG
1492f (1492-1512)	ACGGCTACCTTGTTACGACTT

ผลการทดลองที่ได้รับจากหน่วยบริการชีวภาพ จะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA จำนวนทั้งหมด 6 ชิ้นส่วน ที่มีบริเวณทับกัน(overlapping) จากบริเวณทับกันเหล่านี้ได้ใช้โปรแกรม BioEdit(http://www.mbio.ncsu.edu) ในการเรียงให้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ sense strand หลังจากนั้นส่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ไปใช้โปรแกรม BLAST ที่ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อใช้เปอร์เซ็นต์ความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ในการจำแนกชนิดของไอโซเลต SA.02

3.5 การทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบสปีชีส์ของ *Halobacillus*

ผลการตรวจเอกสารหลังจากพบว่าไอโซเลต SA.02 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA เหมือนกับ *Halobacillus trueperi* 99 เปอร์เซ็นต์ พบว่า Spring และคณะ(1996) เป็นคณะผู้วิจัยที่ตั้งชื่อจีนัสนี้เป็นครั้งแรก โดยคณะผู้วิจัยระบุผลการทดลองทางชีวเคมีของ *Halobacillus halophilus* comb.nov. *Halobacillus litoralis* sp. nov., และ *Halobacillus trueperi* sp. nov. นอกจากนี้ Chaiyanan และคณะ(1999) รายงานการจำแนกชนิด *Halobacillus thailandensis* sp. nov. จากน้ำหมักในกระบวนการหมักน้ำปลาในประเทศไทย(คณะผู้วิจัยไม่ได้ระบุจังหวัด) ดังนั้นจึงได้ทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมเพื่อระบุรายละเอียดของสายพันธุ์ที่แยกได้ โดยการเพิ่มการทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มขึ้นมาดังนี้

3.5.1 การเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงไอโซเลต SA.02 บนอาหารวุ้น TSA ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจดูโคโลนี

3.5.2 การสร้างออกซิเดส หยดสารละลาย tetramethyl-p-phenylenediamine dihydro chloride 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมใหม่ๆ ลงบนกระดาษกรองที่ชื้น ใช้ลูปเขี่ยแบคทีเรียกระจายให้ทั่วกระดาษกรอง ถ้าแบคทีเรียสร้างออกซิเดสจะเป็นสีม่วงภายใน 10 วินาที (positive control ที่ใช้ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, negative control ที่ใช้ได้แก่ *Escherichia coli*)

3.5.3 การทดสอบ Voges–Proskauer เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสำเร็จรูป MRVP(Difco) 2 หลอด หลอดหนึ่งบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส อีกหลอดบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำ 1 มิลลิลิตร ของน้ำเลี้ยงแบคทีเรียของแต่ละหลอด เติม 0.6 มิลลิลิตร ของ 5 เปอร์เซ็นต์ α-napthol ที่ละลายใน absolute ethanol เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ 40 เปอร์เซ็นต์ aqueous KOH ผสมให้เข้ากัน บ่มโดยเอียงหลอด 15 –60 นาที จะเกิดสีแดงบนผิวหน้าอาหาร (positive control ที่ใช้ได้แก่ *Enterobacter aerogenes*, negative control ที่ใช้ได้แก่ *Escherichia coli*)

3.5.4 ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรตเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Nitrate broth(Difco) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หยดสารละลาย Sulfanilic acid และสารละลาย α - napthylamine(ภาคผนวก ข) อย่างละ 2–3 หยด ถ้าสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีแดงชมพูแสดงว่ามีการรีดิวซ์ไนเตรต (positive control ที่ใช้ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, negative control ที่ใช้ได้แก่ *Bacillus sphaericus*)

3.5.5 การทดสอบการผลิตกรดจากน้ำตาล เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว phenol base broth(Difco) ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลแต่ละชนิด ถ้าแบคทีเรียสร้างกรดสีอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง น้ำตาลที่ใช้ทดสอบได้แก่ D-fructose, D-galactose, Maltose, Sucrose, D-xylose, D-glucose, D-mannitol และ D-trehalose

3.5.6 การย่อยสลายเอสคิวลิน(esculin) เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มี 0.01 เปอร์เซ็นต์ เอสคิวลิน และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ เฟอร์ริกซิเตรต ถ้าแบคทีเรียสามารถย่อยเอสคิวลินได้ อาหารจะกลายเป็นสีน้ำตาลดำ (positive control ที่ใช้ได้แก่ *Streptococcus faecalis*, negative control ที่ใช้ได้แก่ *Streptococcus mitis*)

3.5.7 การย่อยเคซีน เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร skim milk agar(ภาคผนวก ก) ลากแบคทีเรียบนอาหาร ถ้าแบคทีเรียย่อยเคซีนจะเกิดส่วนใสรอบโคโลนี (positive control ที่ใช้ได้แก่ *Bacillus subtilis*, negative control ที่ใช้ได้แก่ *Mycobacterium phei*)

3.5.8 การย่อยสลายเจลาติน เลี้ยงแบคทีเรียใน nutrient broth(ภาคผนวก ก) ที่มีเจลาติน 12 เปอร์เซ็นต์ แทงแบคทีเรียลงในอาหาร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน นำหลอดที่บ่มเชื้อมาแช่ในน้ำแข็ง ถ้าแบคทีเรียย่อยเจลาตินได้ เจลาตินจะไม่แข็ง (positive control ที่ใช้ได้แก่ *Proteus vulgaris*, negative control ที่ใช้ได้แก่ *Escherichia coli*)

3.5.9 การย่อยสลายแป้ง เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร TSA ที่มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ soluble starch (โดยในสูตรอาหารไม่มี กลูโคส) autoclave ที่ 115 องศาเซลเซียส 10 นาที บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เททับด้วยสารละลายไอโอดีน ถ้าแบคทีเรียใช้แป้ง จะเกิดส่วนใส รอบโคโลนี (positive control ที่ใช้ได้แก่ *Bacillus subtilis*, negative control ที่ใช้ได้แก่ *Escherichia coli*)

3.5.10 การย่อย Tween80 เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารวุ้น Tween80 ดูการเกิดวงทึบรอบโคโลนี (positive control ที่ใช้ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, negative control ที่ใช้ได้แก่ *Alcaligenes bronchisepticus*)

3.5.11 การสร้างยูรีเอส ใส่แบคทีเรียลงในอาหารเหลวยูเรีย(ภาคผนวก ก) สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของฟีนอลเรดในอาหารจากสีเหลืองเป็นสีชมพู แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างยูรีเอสย่อยยูเรียได้แอมโมเนียม ทำให้อาหารเป็นด่าง (positive control ที่ใช้ได้แก่ *Proteus vulgaris*, negative control ที่ใช้ได้แก่ *Escherichia coli*)

3.5.12 การสร้างฟอสฟาเทส เลี้ยงแบคทีเรียใน nutrient agar ที่มีสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ Phenolphthalein phosphate sodium salt บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน หยด 0.1 มิลลิลิตร สารละลายแอมโมเนียความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ บนฝา นำจานที่เพาะเชื้อมาอัง ถ้าโคโลนีเป็นสีแดงแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างฟอสฟาเทส (positive control ที่ใช้ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, negative control ที่ใช้ได้แก่ *Micrococcus varius*)

หมายเหตุ: เฉพาะการทดสอบไอโซเลต SA.02 ใส่โซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.6 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสโดยไอโซเลต SA.02

3.6.1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสม นำแบคทีเรียไอโซเลต SA.02 1 ลูปมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรมีเดียม 73 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พีเอช 7.0 ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 9 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ นำมา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวมีเดียม 73 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่แปรค่าพีเอช ตั้งแต่ 6.0–9.0 ปรับปรุงสูตรอาหาร โดยแปรปริมาณ โซเดียมคลอไรด์ 0-20 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 5, 10, 15 กรัมต่อลิตร โปตัสเซียมคลอไรด์ 2.5, 5, 7.5 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.1, 0.2, 0.3 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 0.5, 1.0, 1.5 กรัมต่อลิตร เจลาติน 0.5, 1.0, 1.5 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นที่สองที่เป็นความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรมีเดียม 73(เดิม) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส วัดการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของโปรติเอสตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.2

3.6.2 การวัดแอคติวิตีของโปรติเอส วิธีวัดแอคติวิตีของโปรติเอสเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Keay และ Wildi (1970) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 มิลลิลิตร สารละลายโปรติเอสความเข้มข้นที่เหมาะสม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที เติม 1 มิลลิลิตร ของ 2 เปอร์เซ็นต์ เคซีน ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 มิลลิลิตร ของ 0.4 โมลาร์ ไตรคลอโรอะซิติกแอซิด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 20 นาที นำมาปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใส (TCA soluble fragment) 1 มิลลิลิตร มาเติม 5 มิลลิลิตร ของ 0.4 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต และ 1 มิลลิลิตร ของ สารละลายฟอร์ลิน-ฟีนอล (1:3) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ส่วนหลอดควบคุม เติม 0.4 โมลาร์ ไตรคลอโรอะซิติคแอซิด ก่อนเติมเคซีน กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยซับสเตรตได้เป็น TCA soluble fragments ที่ให้สีน้ำเงินเท่ากับสีน้ำเงินที่เกิดจากไทโรซีน 0.5 ไมโครกรัม ต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Bradford, 1976)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยนำสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแบรดฟอร์ด รีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตราฐานโดยใช้ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin) ปริมาณ 0–100 ไมโครกรัม

3.8 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เริ่มจาก crude enzyme ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงไอโซเลต SA.02 ในสูตรอาหารเหมาะสมที่พบในข้อ 3.6.1

3.8.1 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรติเอส นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณตามที่ระบุในตารางมาตรฐานน้ำหนักแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมในสารละลายเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมเป็นลำดับส่วนตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซ็นต์ แต่ละลำดับส่วน กวนสารแขวนลอยเอนไซม์เบาๆ ประมาณ 3 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอน ด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนโปรตีนของแต่ละลำดับส่วนด้วย 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ โดยใช้ปริมาณน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลซ์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ดังกล่าว เปลี่ยนบัฟเฟอร์

2-3 ครั้งจนแอมโมเนียมซัลเฟตหมด หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก วัดปริมาตร ปริมาณโปรตีนและโปรติเอสแอคติวิตี เพื่อหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมที่โปรติเอสตกตะกอน

3.8.2 การหาสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีโปรติเอส นำสารละลายโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต ทำไดอะไลซีส และมาทำให้เจือจางโดย 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 6.0,7.0,8.0 และ 9.0 แปรปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0–20 เปอร์เซ็นต์ในการวิเคราะห์ นำมาหาปริมาณโปรตีนและโปรติเอสแอคติวิตี

3.8.3 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์โดย DEAE Biogel A column chromatography โดยใช้เครื่อง Econosystem(Bio-rad) ใช้เครื่องมือทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี ซึ่งมีหน่วยวัดปริมาณโปรตีน เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

<u>การเตรียมคอลัมน์</u>

เทดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (Bio-Rad) 100 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น กวนเบาๆให้เข้ากัน ปล่อยทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทส่วนที่ไม่ตกตะกอนทิ้ง ทำซ้ำๆเพื่อเอาเม็ดเจลที่แขวนลอยออก นำไปดูดอากาศออก แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 0.5x20 เซนติเมตรให้ได้สูง 18.5 เซนติเมตร ผ่าน 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0

<u>การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ</u>

นำสารละลายโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม และไดอะไลซ์ จากข้อ 3.8.1 มาผ่านคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ซึ่งมีตัวกลางในการแลกเปลี่ยนประจุลบ ชะโดย 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 อัตราการชะ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที แยกเก็บส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร ติดต่อกันจนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์ เปลี่ยนเป็นชะด้วย Linear Salt Gradient ที่ 0–2 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ นำแต่ละหลอดมาหาโปรติเอสแอคติวิตี

3.8.4 การทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยSephadex G-50 gel filtration chromatography โดยใช้เครื่อง Econosystem

<u>การเตรียมคอลัมน์</u>

แซ่เซฟาเดกซ์ จี-50 (Pharmacia) ปริมาณ 10 กรัม ข้ามคืนใน 500 มิลลิลิตร น้ำกลั่น เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 0.5 x 50 เซนติเมตรให้สูง 49 เซนติเมตร ผ่าน 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0

<u>การทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยเซฟาเดกซ์ จี-50 เจลฟิลเตรชันคอลัมน์</u>

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.8.3 ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยนำมาระเหิดแห้ง นำมาละลายด้วย 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถละลายได้

ผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 ชะออกด้วย 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำแต่ละหลอดมาหาโปรติเอสแอคติวิตี

ทำข้อ 3.8.1 ถึงข้อ 3.8.4 ซ้ำโดยใช้บัฟเฟอร์ที่เติม 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์

3.9 **การตรวจความบริสุทธิ์และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอส**

Hummel และคณะ(1996) รายงานว่าสามารถตรวจความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสได้พร้อมกัน โดยทำ SDS-PAGE และกำจัด SDS และให้โปรตีนพับโมเลกุลกลับสู่สภาพเดิม ก่อนย้ายแถบโปรตีนจาก SDS-PAGE ไปยัง อะคริลาไมด์เจลที่โคโพลิเมอร์ไรซ์ด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ เจลาติน โดยวางซับสเตรตเจลทับบน SDS-PAGE

ในการทดลองนี้ได้หาผลของ SDS ต่อการทำงานของโปรติเอส เพราะถ้าพบว่า SDS ไม่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาโดยโปรติเอส ก็ไม่จำเป็นต้องกำจัด SDS ออกจาก SDS-PAGE เจล ก่อนย้ายแถบโปรตีนไปยังซับสเตรตเจล (Garcia-Carrent และคณะ, 1993) ทดลองหาผลของ SDS ต่อโปรติเอสแอคติวิตี โดยเติม 0-20 มิลลิโมลาร์ SDS ลงในสารละลายตะกอนโปรตีนที่ได้หลังจากทำให้เข้มข้นด้วย 0-50 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านการไดอะไลซีส หลังจากนั้นวิเคราะห์หาโปรติเอสแอคติวิตีและโปรตีน เปรียบเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะเมื่อไม่มี SDS ในสารละลายตะกอนโปรติเอส

นำตัวอย่างโปรตีนจากขั้นตอน crude enzyme, สารละลายโปรตีนจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-50 เปอร์เซ็นต์, สารละลายโปรตีนจากการผ่านคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอเจล เอ และสารละลายโปรตีนจากการผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-50 ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 15 ไมโครกรัม สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ย้อมสีแล้ว(prestained, Bio-rad) 6 ไมโครลิตร มาทำ SDS-PAGE โดยวิธีมาตรฐาน (Larmmli, 1970) บนมินิเจล ขนาด 6x12 เซนติเมตร หนา 1.5 มิลลิเมตร separating gel ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์(ภาคผนวก ข) stacking gel ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์(ภาคผนวก ข) หยอดโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่างลงในช่องตัวอย่างแล้วทำการอิเลกโตรโฟรีซีสที่ 15 มิลลิแอมป์ต่อเจล จนสีของบรอมฟีนอลบลู เคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล

การเตรียมแผ่นเจลที่มีซับสเตรต ทำโดยใช้ separating gel ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์เคซีนที่ใช้เป็น ซับสเตรต(ภาคผนวก ข) ขนาด 8x12 เซนติเมตร

แช่ SDS-PAGE เจลใน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ไทรทรอนเอ็กซ์-100 ใน 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ นาน 30 นาที นำมาประกบกับแผ่นเจลที่มีซับสเตรตโดยใช้กระจกรอง นาน 4 ชั่วโมง โดยมี0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอ

ซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ หล่อไว้ไม่แห้ง นำเจลทั้งสองไปย้อมสีโปรตีน(Dye staining) โดยใช้สี Coomassie Blue โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี(staining solution) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออก ด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) จนเห็นเจลที่ทำอิเลกโตรโฟรีซีสของโปรตีนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน แล้วแช่ในน้ำกลั่นจนพื้นหลังใส ส่วนเจลที่มีซับสเตรตจะมีแถบใสบริเวณที่มีแถบโปรติเอส ประมาณน้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสโดยพิจารณาจากการเคลื่อนที่ของโปรติเอสเทียบกับการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐาน

ผลของ SDS ต่อการเร่งปฏิกิริยาโดยโปรติเอส

โดยเติม 0-20 มิลลิโมลาร์ SDS ลงในสารละลายตะกอนโปรติเอสที่ได้หลังจากทำให้เข้มข้นด้วย 0-50 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านการไดอะไลซีส หลังจากนั้นวิเคราะห์หาโปรติเอสแอคติวิตีและปริมาณโปรตีน เปรียบเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะเมื่อไม่มี SDS ในสารละลายตะกอนโปรติเอส

3.10 การหาสมบัติบางประการของโปรติเอสของ *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis*

เนื่องจากการเติมผงโปรติเอสลงในระยะโมโรมิของกระบวนการหมักซีอิ๊ว เป็นการเติมผงโปรติเอส หลังจากตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ทำไดอะไลซีส และระเหิดแห้งเป็นผง ดังนั้นจึงวิจัยเบื้องต้นเพื่อหาสมบัติบางประการของโปรติเอสของ *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis* โดยใช้ 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ละลายตะกอนโปรติเอสที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 0-50 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ทำไดอะไลซีส และนำมาเจือจางให้อยู่ในความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อนำมาหาชนิดของโปรติเอส โดยการศึกษาผลของสารยับยั้งแอคติวิตีสองชนิด ได้แก่ EDTA หรือ PMSF ซึ่งหากยับยั้งแอคติวิตีแสดงว่าโปรติเอสเป็น metalloprotease หรือ serine protease ตามลำดับ นอกจากนี้ยังนำสารละลายโปรติเอสดังกล่าวมาศึกษาผลของไอออนโลหะบางชนิดที่เพิ่มปฏิกิริยา การเร่งการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ และศึกษาผลของอุณหภูมิต่อโปรติเอสแอคติวิตี โดยเติมสารในความเข้มข้นต่อไปนี้ในการวิเคราะห์หาโปรติเอสแอคติวิตี เปรียบเทียบกับโปรติเอสแอคติวิตีที่วิเคราะห์โดยไม่เติมสารเหล่านี้

- 1, 5 มิลลิโมลาร์ EDTA, 5, 10 มิลลิโมลาร์ PMSF
- 0.5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์, แมงกานีสซัลเฟต หรือ ซิงค์ซัลเฟต
- 0-30 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนและผลิตโปรติเอสที่ พีเอช 5.5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์

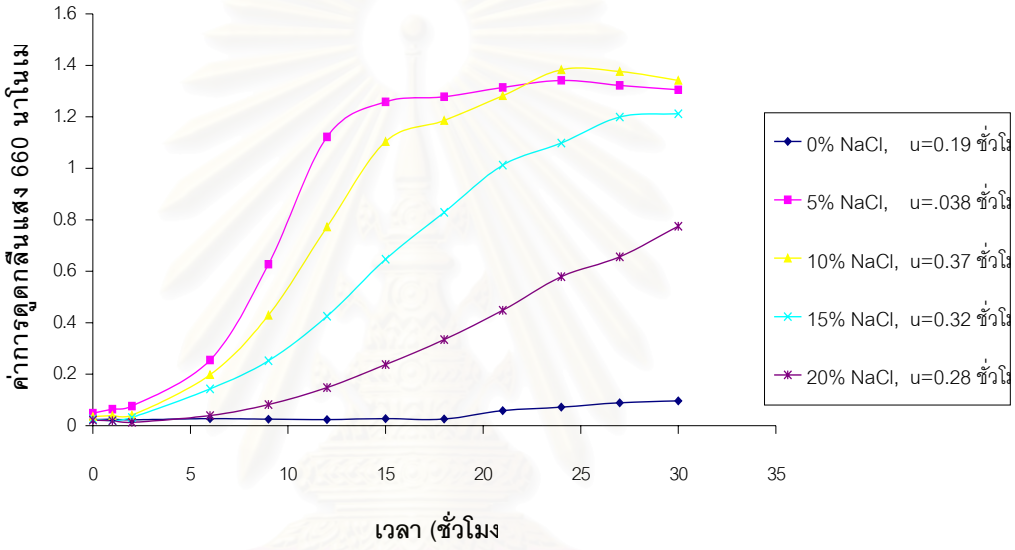
ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลตจากไอโซเลตซึ่งมีอัตราส่วนสูงไปต่ำตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าไอโซเลต SA.02 มีอัตราส่วนสูงที่สุดจึงนำไอโซเลตนี้มาใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนระหว่างค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสซึ่งแยกได้จากน้ำซีอิ๊วระหว่างการหมัก และจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊วระดับห้องปฏิบัติการ12 ไอโซเลต ที่ผลิตโปรติเอสมากไปน้อย เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ พีเอช 5.5 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลาง		อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อโคโลนี
	วงใส	โคโลนี	
SA.02	5.40	0.48	11.2
N5	2.40	0.25	9.6
N3	1.70	0.19	8.9
N16	2.42	0.36	6.7
Cl26	2.87	0.46	6.3
N22	2.50	0.43	5.8
M031	1.77	0.33	5.4
T7.1	2.57	0.59	4.4
Cl24.1	2.13	0.56	3.8
K24	2.16	0.63	3.4
K24.1	2.70	1.66	1.6
Cl24	1.09	0.77	1.4

4.2 **ผลการตรวจลักษณะชอบเค็มหรือทนเค็มของไอโซเลต** SA.02

รูปที่ 2 แสดงกราฟการเพิ่มจำนวนเซลล์และค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรียไอโซเลต SA.02 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 0-20 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต SA.02 ชอบความเค็มเทียบเท่ากับ 5-10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.37–0.38 ชั่วโมง$^{-1}$ ระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ถึงระยะมิดล็อก 9 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองต่อๆไปจึงเติม 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ในอาหารเลี้ยงไอโซเลต SA.02



รูปที่ 2 กราฟการเพิ่มจำนวนเซลล์และค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรียไอโซเลต SA.02 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 0-20 เปอร์เซ็นต์ เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส

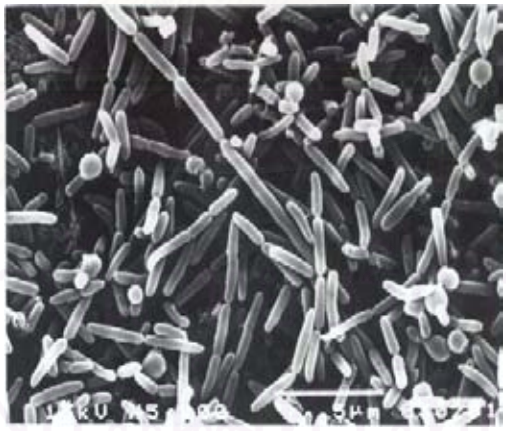
4.3 **การจำแนกชนิดแบคทีเรีย SA.02 ที่คัดเลือกได้โดยการทดสอบทางชีวเคมีและจุลชีววิทยา**

4.3.1 ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต SA.02

รูปที่ 3 แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต SA.02 ที่เพิ่มจำนวนบนอาหารวุ้น TSA ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ผลการทดลองพบว่าโคโลนีมีสีเหลืองส้ม กลม นูน ขอบเรียบ มีขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 –1.0 มิลลิเมตร)

รูปที่ 3 ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต SA.02 ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น Tryptic Soy Agar ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

4.3.2 ผลการศึกษารูปร่างภายนอกของเซลล์แบคทีเรีย SA.02 ผลการวิเคราะห์รูปร่างภายนอกของไอโซเลต SA.02 พบว่าเซลล์มีลักษณะแท่งและรูปกลม ขนาด 2–5 ไมโครเมตรดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนนิ่งของเซลล์ไอโซเลต SA.02 เมื่อเลี้ยงในอาหารวุ้น TSA ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (กำลังขยาย 5,000 เท่า) ———— 5 ไมโครเมตร

4.3.3 การติดสีแกรม การย้อมสีสปอร์ และการทดสอบทางชีวเคมี

ผลการย้อมสีแกรมพบว่าแบคทีเรีย SA.02 ติดสีแกรมบวก ผลการย้อมสปอร์เบื้องต้น หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลว TSA ไม่พบสปอร์ แม้ว่าจะพบสปอร์เมื่อเลี้ยง positve control ได้แก่*Bacillus subtilis*. ในสภาวะเดียวกัน ดังนั้นจึงสรุปเบื้องต้นว่าไอโซเลต SA.02 เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก ที่ไม่สร้างสปอร์ และมีเซลล์เป็นแท่งผสมกับเป็นรูปทรงกลม จึงจำแนกชนิดเบื้องต้นให้อยู่ในBergey's Manual of Systematic Bacteriology (Jones และ Collins, 1984) Section 15 : Irregular, nonsporing Gram-positive rods ผลการทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนภายใต้สภาวะมีอากาศและไร้อากาศ การเคลื่อนที่ การผลิตคาตาเลส และแหล่งที่แยกแบคทีเรีย ชี้ให้ในเบื้องต้นว่า ไอโซเลต SA.02 อาจเป็น *Arthrobacter* sp. เพราะเคลื่อนที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะจำเพาะที่แยกกลุ่มแบคทีเรียใน Section 15 ของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Jones และ Collins, 1984)

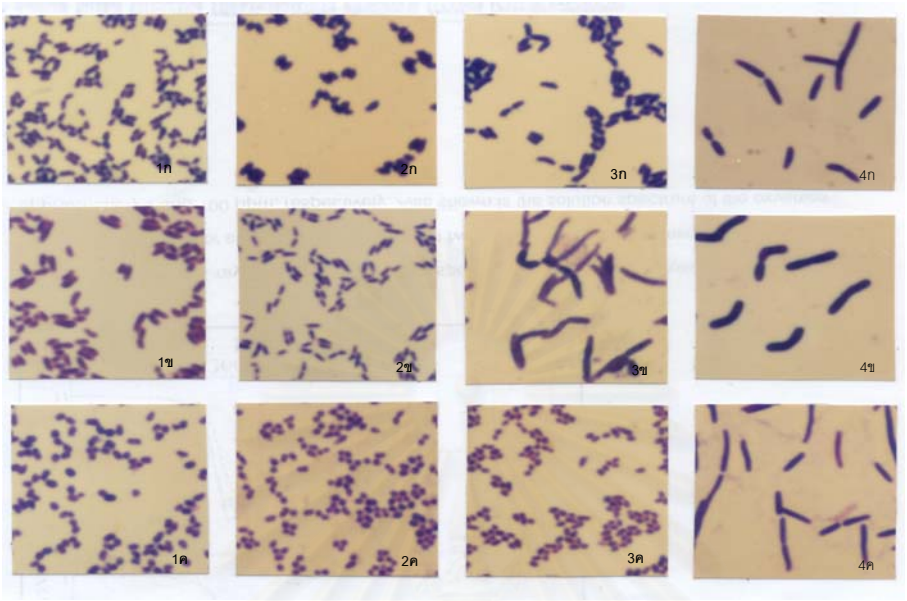
ลักษณะเฉพาะ	*Corynebacterium* spp.	*Arthrobacter* spp.	*Brevibacterium* spp.	SA.02
รูปร่างเซลล์	รูปร่างแท่งไม่แน่นอน	มีระยะที่เซลล์เป็นแท่งและระยะที่เซลล์เป็นทรงกลมอย่างชัดเจน	มีระยะที่เซลล์เป็นแท่งและระยะที่เซลล์เป็นทรงกลม	รูปร่างแท่งผสมกับทรงกลม
การติดสีแกรม	แกรมบวก	แกรมบวก	แกรมบวก	แกรมบวก
เพิ่มจำนวนในภาวะมีอากาศเท่านั้น	ได้	ได้	ได้	ได้
การเคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่	บางสปีชีเคลื่อนที่ได้ บางสปีชีเคลื่อนที่ไม่ได้	ไม่เคลื่อนที่	เคลื่อนที่ได้โดยมีแฟลกเจลา
การผลิตแคตาเลส	ผลิต	ผลิต	ผลิต	ผลิต
แหล่งที่พบ	พืช	ดิน	เนยแข็ง ผิวหนัง	เกลือจากนาเกลือสมุทร

รูปที่ 5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านกำลังขยาย 12,450 เท่า (12 มม. เท่ากับ 1 ไมครอน) ไอโซเลต SA.02 มีแฟลกเจลารอบเซลล์ (peritrichous flagella)

ในการพิสูจน์ว่าไอโซเลต SA.02 เป็น *Arthrobacter* sp. หรือไม่เป็นนั้น มีความจำเป็นต้องเลี้ยงไอโซเลต SA.02 เพื่อตรวจระยะการมีเซลล์แบบแท่ง และระยะการมีเซลล์ทรงกลม

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 6 แสดงให้เห็นว่า *Corynbacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Arthrobacter* sp. มีเซลล์ที่อยู่ระยะเป็นแท่ง และมีเซลล์ที่อยู่ในระยะที่เป็นทรงกลม แต่ไอโซเลต SA.02 ไม่มีลักษณะดังกล่าวข้างต้น จึงไม่ใช่ *Corynbacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Arthrobacter* sp.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



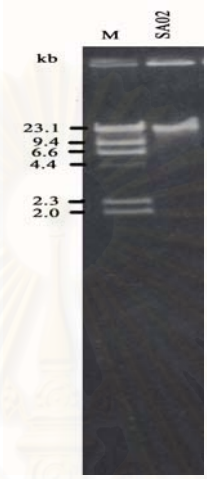
รูปที่ 6 ภาพแสดงลักษณะเซลล์ที่ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร EYGA เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (แถวบน), 24 ชั่วโมง (แถวกลาง), 3 วัน (แถวล่าง) กำลังขยาย 1,000 เท่า แบคทีเรียที่ใช้ได้แก่

คอลัมน์ที่หนึ่ง *Corynebacterium glutamicum* TISTR 461
คอลัมน์ที่สอง *Brevibacterium ammoniagenes* TISTR 362
คอลัมน์ที่สาม *Arthrobacter citreus* TISTR 820
คอลัมน์ที่สี่ ไอโซเลต SA.02

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.4 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16SrDNA ของไอโซเลต SA.02

รูปที่ 7 แสดงโครโมโซมัลดีเอ็นเอที่แยกได้จากไอโซเลต SA.02 ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าคุณภาพของดีเอ็นเอดีเพียงพอที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (target DNA) ในการเพิ่มชิ้นส่วน 16S rDNA

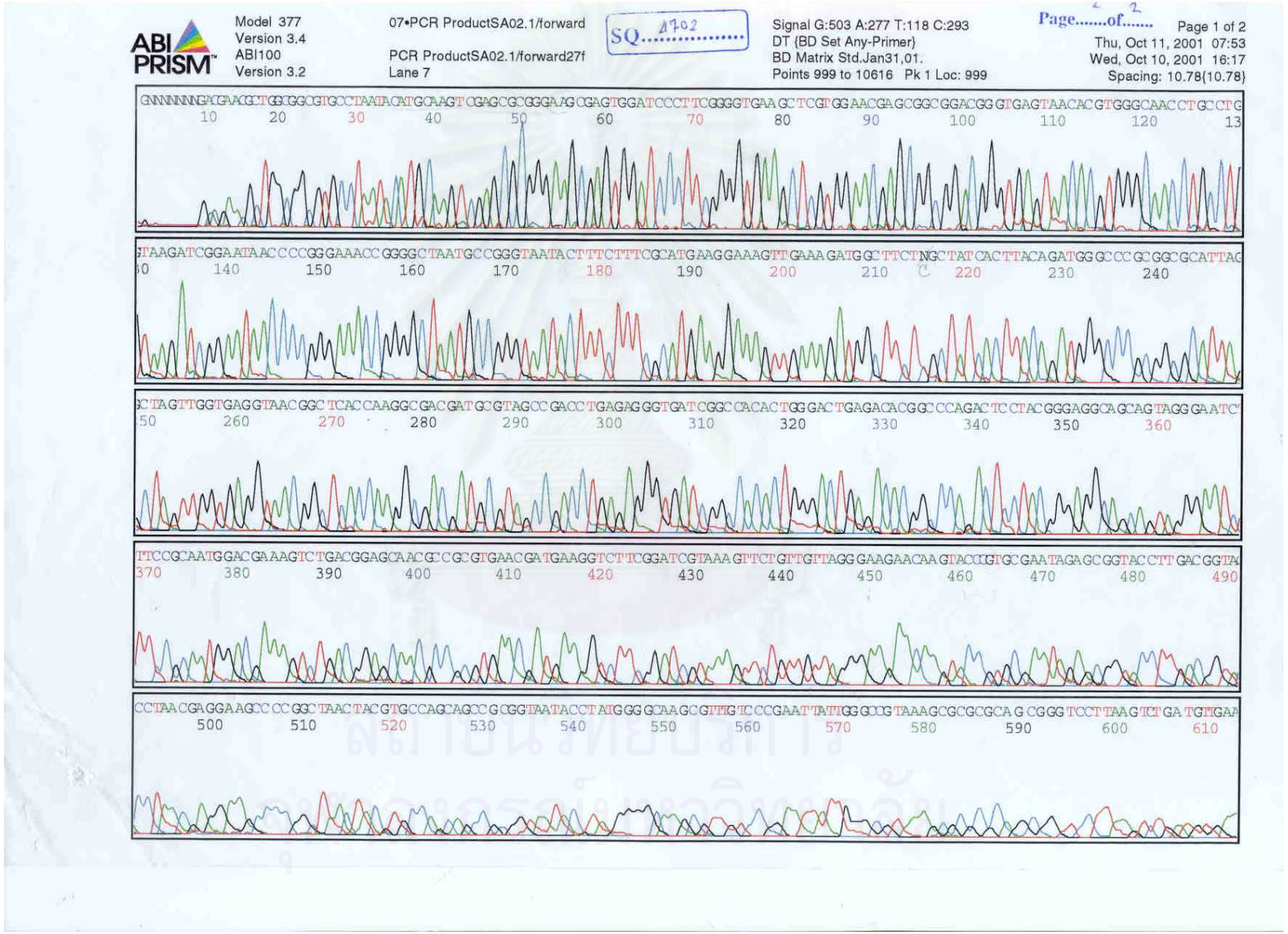


รูปที่ 7 การแยกโครโมโซมัลดีเอ็นเอของไอโซเลต SA.02 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มชิ้นส่วน 16 SrDNA โดยวิธีพีซีอาร์ แถว M ได้แก่ โครโมโซมัลดีเอ็นเอของแลมดาที่ตัดด้วย HindIII ใช้เป็นดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน แถวที่ SA.02 เป็นโครโมโซมัลดีเอ็นเอที่แยกได้จากไอโซเลต SA.02

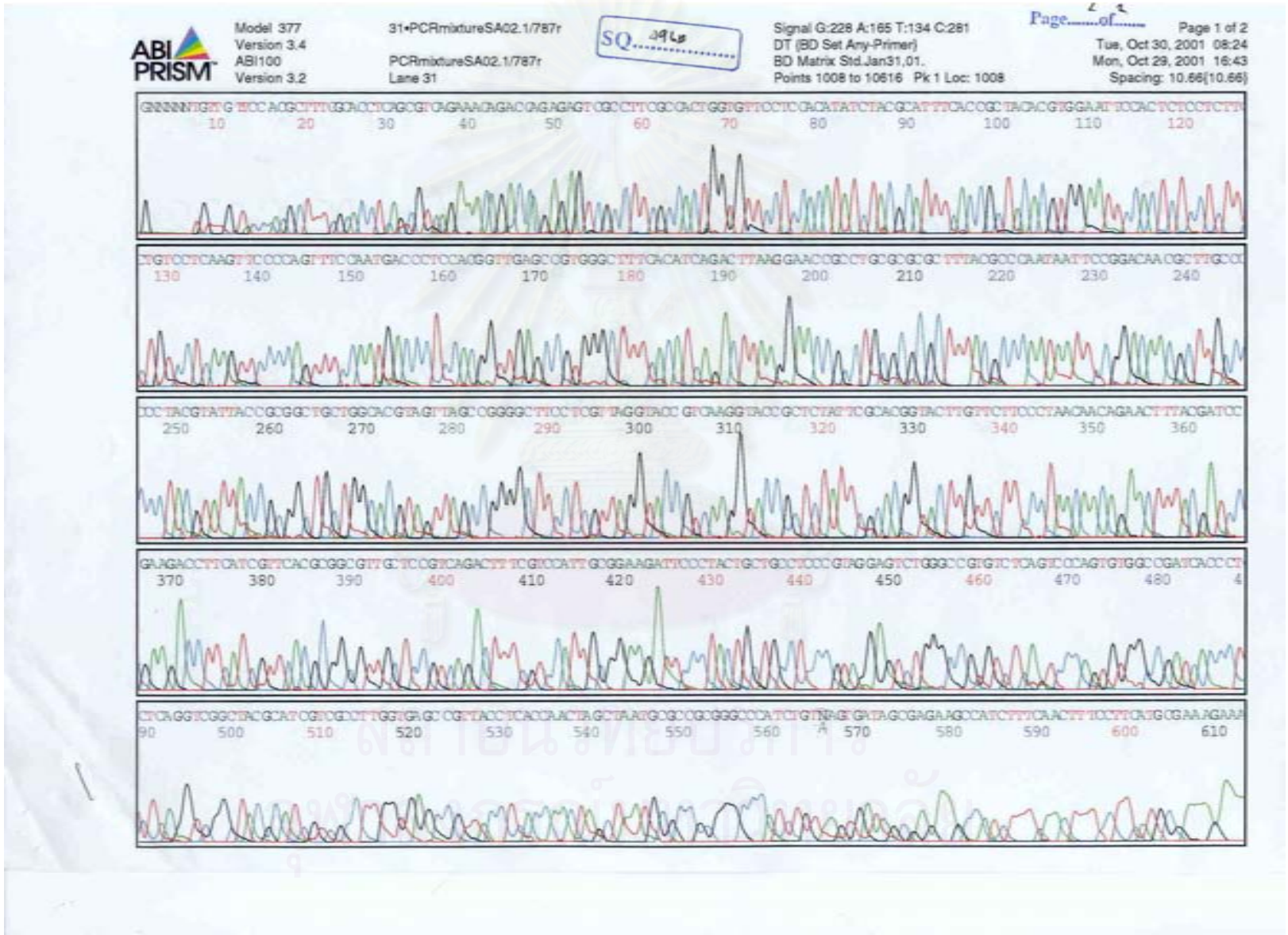
รูปที่ 8 แสดง 16S rDNA ที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนโดยวิธีพีซีอาร์ แถวที่1 เป็น DNA ladder แถวที่ 2 และ 3 เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 16 SrDNA ของ *E.coli*

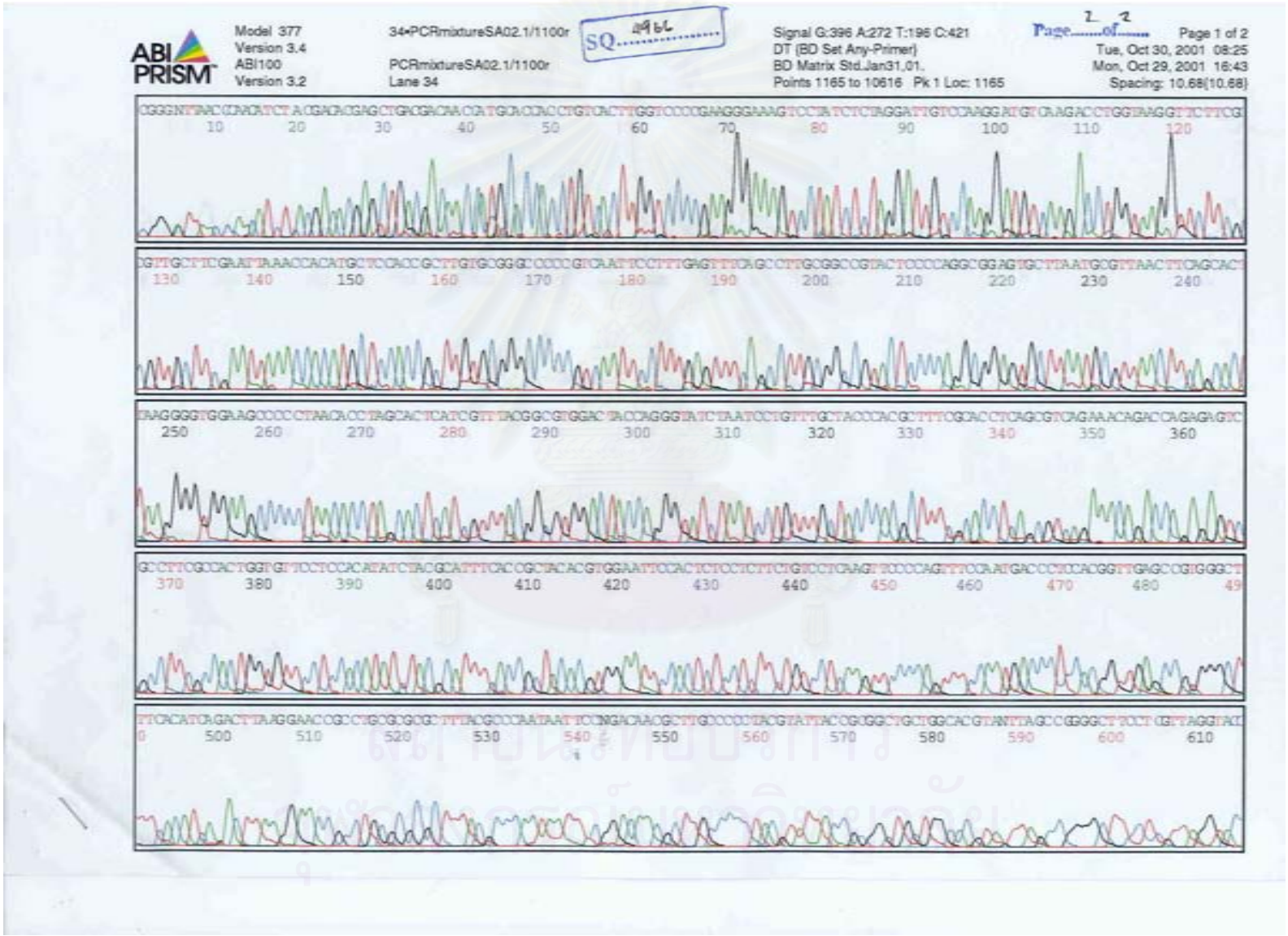
รูปที่ 9 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA ต่างๆ ของไอโซเลต SA.02 ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพร์เมอร์ 27f, 343r, 787r, 1100r, 1241f และ 1492r ผลการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บน sense strand ของ 16S rDNA ของไอโซเลต SA.02 เป็นดังแสดงในรูปที่ 10

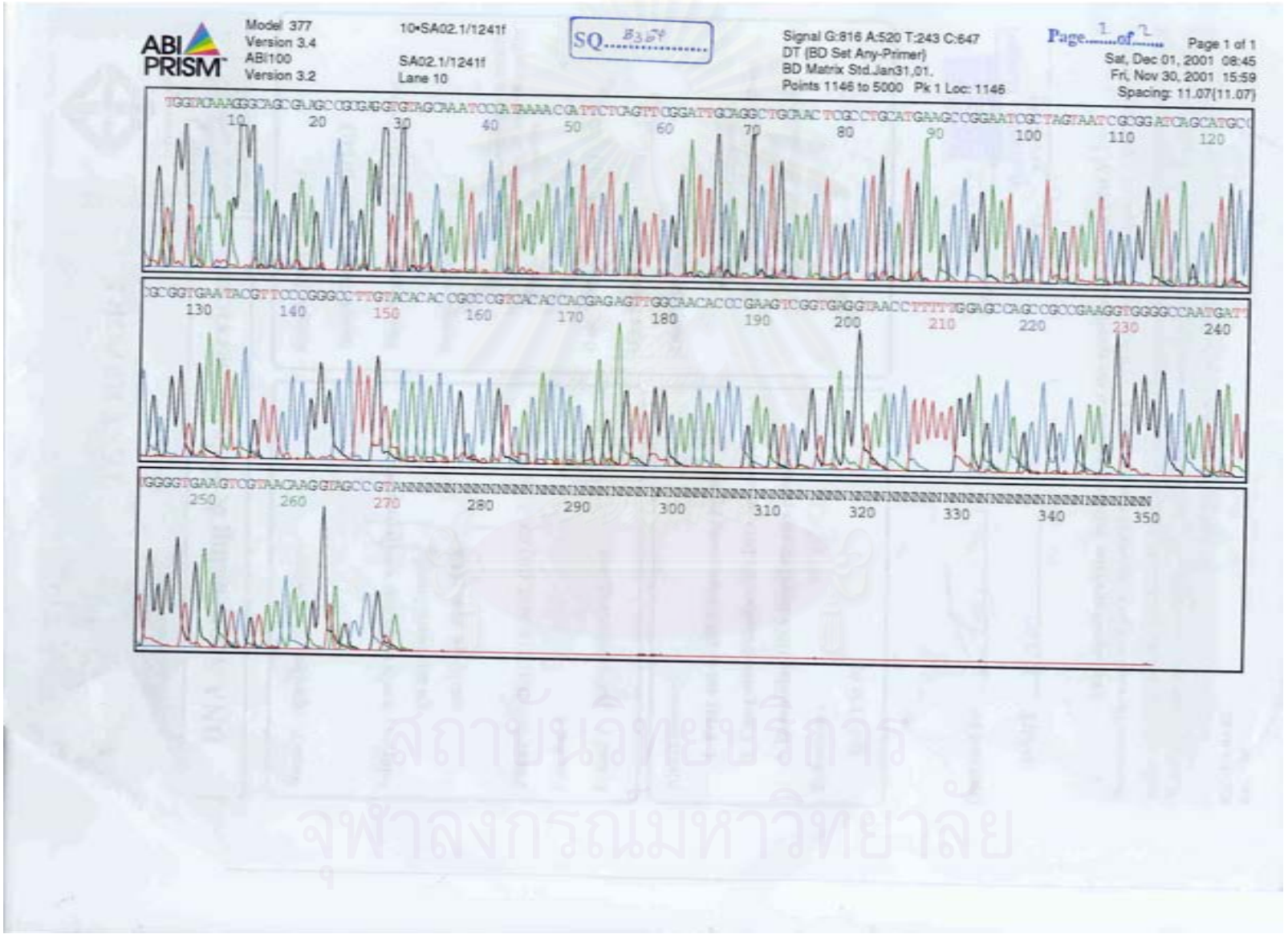
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ABI PRISM
Model 377
Version 3.4
ABI100
Version 3.2
07•PCR ProductSA02.1/forward
PCR ProductSA02.1/forward27f
Lane 7
SQ.....1702
Signal G:503 A:277 T:118 C:293
DT {BD Set Any-Primer}
BD Matrix Std.Jan31,01.
Points 999 to 10616 Pk 1 Loc: 999
Page.....of.....
Page 1 of 2
Thu, Oct 11, 2001 07:53
Wed, Oct 10, 2001 16:17
Spacing: 10.78{10.78}

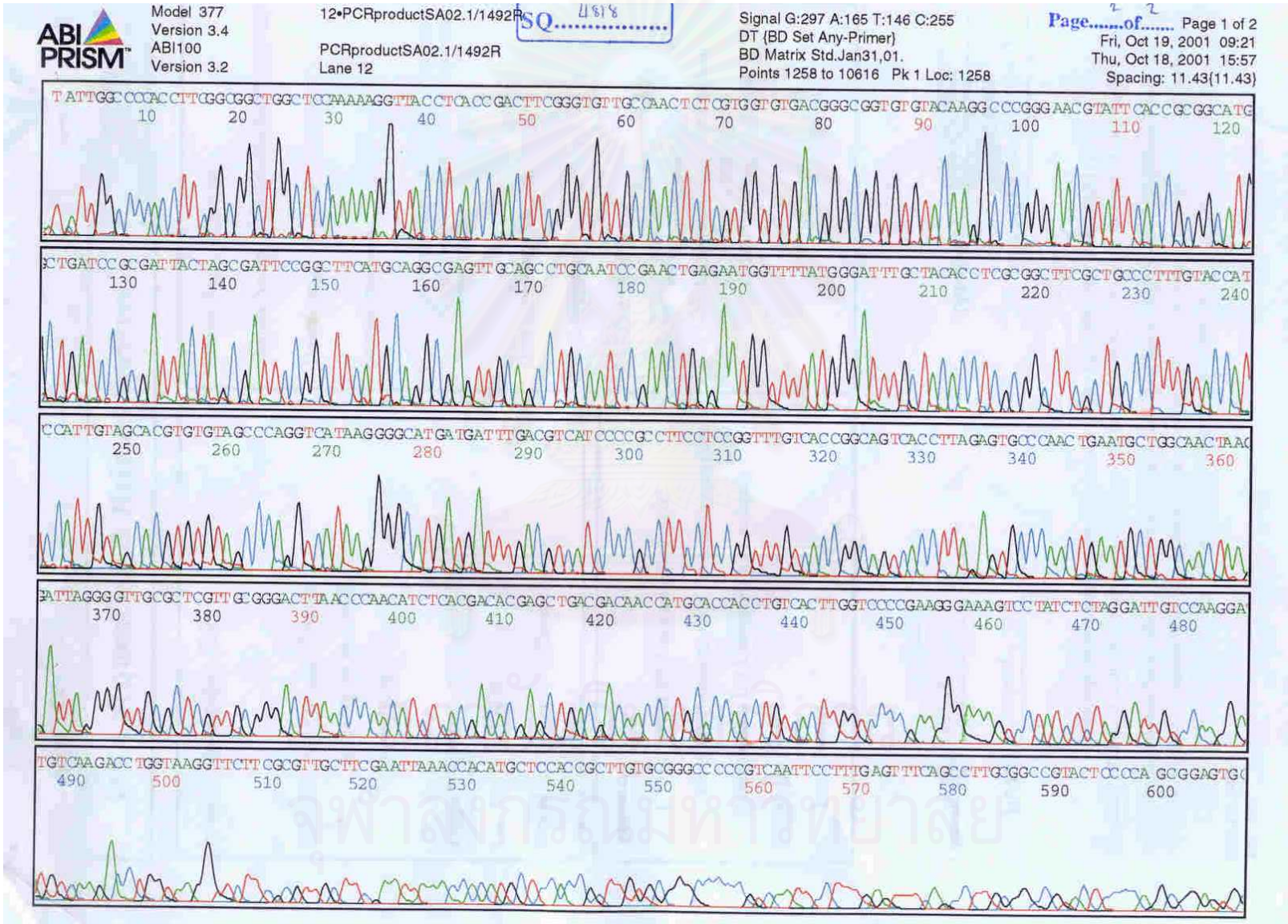
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ABI PRISM
Model 377
Version 3.4
ABI100
Version 3.2
31•PCRmixtureSA02.1/787r
PCRmixtureSA02.1/787r
Lane 31
SQ.....
Signal G:228 A:165 T:134 C:281
DT (BD Set Any-Primer)
BD Matrix Std.Jan31,01.
Points 1008 to 10616 Pk 1 Loc: 1008
Page.....of.....
Page 1 of 2
Tue, Oct 30, 2001 08:24
Mon, Oct 29, 2001 16:43
Spacing: 10.66[10.66]


ABI PRISM
Model 377
Version 3.4
ABI100
Version 3.2
34•PCRmixtureSA02.1/1100r
PCRmixtureSA02.1/1100r
Lane 34
SQ.....
Signal G:396 A:272 T:196 C:421
DT (BD Set Any-Primer)
BD Matrix Std.Jan31.01.
Points 1165 to 10616 Pk 1 Loc: 1165
Page 1 of 2
Tue, Oct 30, 2001 08:25
Mon, Oct 29, 2001 16:43
Spacing: 10.68(10.68)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ABI PRISM
Model 377
Version 3.4
ABI100
Version 3.2
12•PCRproductSA02.1/1492R
PCRproductSA02.1/1492R
Lane 12
SQ.....
Signal G:297 A:165 T:146 C:255
DT {BD Set Any-Primer}
BD Matrix Std.Jan31,01.
Points 1258 to 10616 Pk 1 Loc: 1258
Page.....of.....
Page 1 of 2
Fri, Oct 19, 2001 09:21
Thu, Oct 18, 2001 15:57
Spacing: 11.43{11.43}
TATTGGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCCAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATG
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
GCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAATGGTTTTATGGGATTTGCTACACCTCGCGGCTTCGCTGCCCTTTGTACCAT
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCGCCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAC
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
GATTAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTGGTCCCCGAAGGGAAAGTCCTATCTCTAGGATTGTCCAAGGA
370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
TGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCA GCGGAGTGC
490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

4.5 การจำแนกสายพันธุ์ของไอโซเลต SA.02

จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไอโซเลต SA.02 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ที่มีผู้ฝาก (deposit) ไว้ใน GeneBank ของ NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไอโซเลต SA.02 เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Halobacillus trueperi* จำนวน 1,508 เบสจาก 1,522 เบสเป็นจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เหมือนกัน 14 ตำแหน่ง ซึ่งรวมการเพิ่มช่องว่าง(gap) 4 แห่ง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน 99 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 11 ดังนั้นไอโซเลต SA.02 อาจเป็น *Halobacillus trueperi*

4.6 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของไอโซเลต SA.02 เปรียบเทียบกับผลการทดสอบทางชีวเคมีของ *Halobacillus* spp. ดังแสดงในตารางที่ 3

ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต SA.02 มีผลการทดสอบทางชีวเคมีใกล้เคียงกับ *Halobacillus trueperi* มาก ต่างกันเพียง 2 ลักษณะ คือไอโซเลต SA.02 ย่อยเคซีนและมียูรีเอส ในขณะที่ *Halobacillus trueperi* ไม่ย่อยเคซีนและไม่มียูรีเอส ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ว่า ไอโซเลต SA.02 มีสมบัติทางชีวเคมีแตกต่างจาก *Halobacillus thailandensis* และ *Halobacillus litoralis* มากกว่า ตัวอย่างเช่น *Halobacillus thailandensis* ไม่เพิ่มจำนวนเซลล์ถ้าในอาหารมีเกลือเพียง 0.5 เปอร์เซ็นต์ ย่อยเอสคูลินและแป้ง ไม่ผลิตยูรีเอส แต่ผลิตฟอสฟาเทส ในขณะที่ไอโซเลต SA.02 เพิ่มจำนวนเซลล์แม้ว่าในอาหารมีเกลือเพียง 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต SA.02 ไม่ย่อยเอสคูลินและไม่ย่อยสลายแป้ง ผลิตยูรีเอส แต่ไม่ผลิตฟอสฟาเทส ไอโซเลต SA.02 มีสมบัติทางชีวเคมีต่างจาก *Halobacillus litoralis* หลายลักษณะ เช่น การใช้ ดี-กาแลกโตส แต่ไม่ใช้ ดี-ไซโลส และดี-แมนนิทอล ย่อยสลายเคซีน ผลิตยูรีเอส เป็นต้น ดังนั้นผลการทดสอบทางชีวเคมี เท่าที่ปรากฏในเอกสารอ้างอิง (Spring และคณะ, 1996 และ Chaiyanan และคณะ, 1999) แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต SA.02 มีความใกล้เคียงกับ *Halobacillus trueperi* มากกว่าอีก 2 สายพันธุ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATTATTGGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCT
CCAAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCCAACTCTCGTGGTGTGACGGGCG
GTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGC
GATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAATGGTTTTAT
GGGATTTGCTACACCTCGCGGCTTCGCTGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGT
GTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCGCCTTCCTCCGGTTT
GTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATTAGGGGT
TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGTCTGACGACAACCAT
GCACCACCTGTCACTTGGTCCCCGAAGGGAAAGTCCTATCTCTAGGATTGTCCAAGG
ATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCG
CTTGTGCGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGG
CGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAGGGGTGGAAGCCCCCTAACACCTAG
CACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTTGTTGTTCCACGC
TTTCGCACCTCAGCGTCAGAAACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCT
CCACATATCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGTCCTCA
AGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTT
AAGGAACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCCCCTA
CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCCTCGTTAGGTACCGTC
AAGGTACCGCTCTATTCGCACGGTACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAACTTTACGATCC
GAAGACCTTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAG
ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCC
GATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAA
CTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCTGTAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTCAACTT
TCCTTCATGCGAAAGAAAGTATTACCCGGCATTAGCCCCGGTTTCCCGGGGTTATTCC
GATCTTACAGGCAGGTTGCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTCGTTCCACGAG
CTTCACCCCGAAGGGATCCACTCGCTTCCCGCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACG
CCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATAAACTCA

รูปที่ 10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA ไอโซเลต SA.02 เมื่อผ่านโปรแกรม BioEdit

รูปที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์ไอโซเลต SA.02 โดยใช้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA เครื่องหมาย * แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เหมือนกัน จำนวน 14 แห่ง ซึ่งรวมช่องว่างที่เติมเข้าไปจำนวน 4 แห่ง

Query= gi|sa02| (1530 letters)

Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E Value
gi|13508750|emb|AJ310149.1|HTR310149	Halobacillus trueperi ...	2884	0.0
gi|1181223|emb|X94558.1|HL16SRRN1	H.litoralis 16S rRNA gene	2819	0.0
gi|452433|emb|X62174.1|SHNCIMBT	S.halophila 16S rRNA	2535	0.0
gi|15425521|emb|AJ291752.1|HSP291752	Halobacillus sp. K3-1 ...	2460	0.0
gi|15425523|emb|AJ291754.1|HSP291754	Halobacillus sp. I7 pa...	2337	0.0

Alignments

>gi|13508750|emb|AJ310149.1|HTR310149 Halobacillus trueperi 16S rRNA gene, strain DSM 10404T

Length = 1536

Score = 2884 bits (1455), Expect = 0.0
Identities = 1508/1522 (99%), Gaps = 4/1522 (0%)
Strand = Plus / Minus

```
                                                                *
SA.02:        1    tacggctaccttgttacgacttcaccccaattattggccccaccttcggcggctggctcc 60
                   ||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:1519 tacggctaccttgttacgacttcaccccaatcattggccccaccttcggcggctggctcc 1460


SA.02:       61    aaaaaggttacctcaccgacttcgggtgttgccaactctcgtggtgtgacgggcggtgtg 120
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:1459 aaaaaggttacctcaccgacttcgggtgttgccaactctcgtggtgtgacgggcggtgtg 1400


SA.02:      121    tacaaggcccgggaacgtattcaccgcggcatgctgatccgcgattactagcgattccgg 180
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:1399 tacaaggcccgggaacgtattcaccgcggcatgctgatccgcgattactagcgattccgg 1340


SA.02:      181    cttcatgcaggcgagttgcagcctgcaatccgaactgagaatggttttatgggatttgct 240
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:1339 cttcatgcaggcgagttgcagcctgcaatccgaactgagaatggttttatgggatttgct 1280


SA.02:      241    acacctcgcggcttcgctgccctttgtaccatccattgtagcacgtgtgtagcccaggtc 300
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:1279 acacctcgcggcttcgctgccctttgtaccatccattgtagcacgtgtgtagcccaggtc 1220


SA.02:      301    ataaggggcatgatgatttgacgtcatccccgccttcctccggtttgtcaccggcagtca 360
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:1219 ataaggggcatgatgatttgacgtcatccccgccttcctccggtttgtcaccggcagtca 1160


SA.02:      361    ccttagagtgcccaactgaatgctggcaactaagattaggggttgcgctcgttgcgggac 420
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:1159 ccttagagtgcccaactgaatgctggcaactaagattaggggttgcgctcgttgcgggac 1100

                                                                *
```

```
SA.02:       421  ttaacccaacatctcacgacacgagtctgacgacaaccatgcaccacctgtcacttggtc 480
                  ||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:1099 ttaacccaacatctcacgacacgag-ctgacgacaaccatgcaccacctgtcacttggtc 1041


                                *           **
SA.02:       481  cccgaagggaaagtcctatctctaggattgtccaaggatgtcaagacctggtaaggttct 540
                  |||||||||||||| ||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:1040 cccgaagggaaagccctatctctagggatgtccaaggatgtcaagacctggtaaggttct 981

                                                                *
SA.02:       541  tcgcgttgcttcgaattaaaccacatgctccaccgcttgtgcgg-cccccgtcaattcct 599
                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
H.trueperi:980 tcgcgttgcttcgaattaaaccacatgctccaccgcttgtgcgggcccccgtcaattcct 921


SA.02:       600 ttgagtttcagccttgcggccgtactccccaggcggagtgcttaatgcgttaacttcagc 659
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:920 ttgagtttcagccttgcggccgtactccccaggcggagtgcttaatgcgttaacttcagc 861


SA.02:       660 actaaggggtggaagccccctaacacctagcactcatcgtttacggcgtggactaccagg 719
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:860 actaaggggtggaagccccctaacacctagcactcatcgtttacggcgtggactaccagg 801


                                  **  ****
SA.02:       720 gtatctaatcctgttttgttgttccacgctttcgcacctcagcgtcagaaacagaccaga 779
                  ||||||||||||||||  |    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:800 gtatctaatcctgtttgctac--ccacgctttcgcacctcagcgtcagaaacagaccaga 743


SA.02:       780 gagtcgccttcgccactggtgttcctccacatatctacgcatttcaccgctacacgtgga 839
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:742 gagtcgccttcgccactggtgttcctccacatatctacgcatttcaccgctacacgtgga 683


SA.02:       840 attccactctcctcttctgtcctcaagttccccagtttccaatgaccctccacggttgag 899
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:682 attccactctcctcttctgtcctcaagttccccagtttccaatgaccctccacggttgag 623


SA.02:       900 ccgtgggctttcacatcagacttaaggaaccgcctgcgcgcgctttacgcccaataattc 959
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:622 ccgtgggctttcacatcagacttaaggaaccgcctgcgcgcgctttacgcccaataattc 563


SA.02:       960 cggacaacgcttgccccctacgtattaccgcggctgctggcacgtagttagccggggctt 1019
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:562 cggacaacgcttgccccctacgtattaccgcggctgctggcacgtagttagccggggctt 503


SA.02:      1020 cctcgttaggtaccgtcaaggtaccgctctattcgcacggtacttgttcttccctaacaa 1079
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:502 cctcgttaggtaccgtcaaggtaccgctctattcgcacggtacttgttcttccctaacaa 443


SA.02:      1080 cagaactttacgatccgaagaccttcatcgttcacgcggcgttgctccgtcagactttcg 1139
```

```
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:442 cagaactttacgatccgaagaccttcatcgttcacgcggcgttgctccgtcagactttcg 383


SA.02:     1140 tccattgcggaagattccctactgctgcctcccgtaggagtctgggccgtgtctcagtcc 1199
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:382 tccattgcggaagattccctactgctgcctcccgtaggagtctgggccgtgtctcagtcc 323


SA.02:     1200 cagtgtggccgatcaccctctcaggtcggctacgcatcgtcgccttggtgagccgttacc 1259
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:322 cagtgtggccgatcaccctctcaggtcggctacgcatcgtcgccttggtgagccgttacc 263

                                                                *
SA.02:     1260 tcaccaactagctaatgcgccgcgggcccatctgtaagtgatagcgagaagccatctttc 1319
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
H.trueperi:262 tcaccaactagctaatgcgccgcgggcccatctgtaagtgatagctagaagccatctttc 203


SA.02:     1320 aactttccttcatgcgaaagaaagtattacccggcattagccccggtttcccggggttat 1379
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:202 aactttccttcatgcgaaagaaagtattacccggcattagccccggtttcccggggttat 143


SA.02:     1380 tccgatcttacaggcaggttgcccacgtgttactcacccgtccgccgctcgttccacgag 1439
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi:142 tccgatcttacaggcaggttgcccacgtgttactcacccgtccgccgctcgttccacgag 83

                      *
SA.02:     1440 cttcaccccgaagggatccactcgcttcccgcgctcgacttgcatgtattaggcacgccg 1499
                ||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
H.trueperi: 82 cttcaccccgaagggagccactcgcttcccgcgctcgacttgcatgtattaggcacgccg 23


SA.02:     1500 ccagcgttcgtcctgagccagg 1521
                |||||||||||||||||||||||
H.trueperi: 22 ccagcgttcgtcctgagccagg 1
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบทางจุลชีววิทยาและชีวเคมีของ ไอโซเลตSA.02 เพื่อเปรียบเทียบกับ *Halobacillus* spp. ที่มีผู้รายงาน(Spring และคณะ, 1996; Chaiyanan และคณะ, 1999)

ลักษณะ	*Halobacillus litoralis*	*Halobacillus thailandensis*	*Halobacillus trueperi*	Isolate SA.02
รูปร่างเซลล์	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง
สปอร์	+	+	+	+
การเคลื่อนที่	+	+	+	+
รงควัตถุ	สีส้ม	สีส้ม	สีส้ม	สีส้ม
การเจริญในสภาวะปราศจากอากาศ	-	-	-	-
การเจริญที่เกลือ 0.5%	+	-	+	+
แคตาเลส	+	+	+	+
ออกซิเดส	+	+	+	+
การใช้วีพี	-	-	-	-
การรีดิวซ์ไนเตรท	-	-	-	-
การผลิตกรดจาก :				
ดี- ฟรุกโตส	+	+	+	+
ดี-กาแลคโตส	-	+	+	+
มอลโตส	+	+	+	+
ซูโครส	+	+	+	+
ดี- ไซโลส	+	-	-	-
ดี- กลูโคส	+	+	+	+
ดี-แมนนิทอล	+	-	-	-
ดี-ทีฮาโลส	+	+	+	+
การย่อยสลาย :				
เอสคูลิน	-	+	-	-
เคซีน	-	+	-	+
เจลาติน	+	+	+	+
แป้ง	-	+	-	-
ทวีน 80	-	-	-	-
การผลิตเอนไซม์:				
ยูรีเอส	-	-	-	+
ฟอสฟาเทส	-	+	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 ผลการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอส

ผลการทดลองนำแบคทีเรียไอโซเลต SA.02 มาเลี้ยงในอาหารเหลวมีเดียม 73 ที่แปรค่าพีเอชตั้งแต่ 6.0 – 9.0 ปรับปรุงสูตรอาหาร โดยแปรปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต 5 -15 กรัมต่อลิตร โปตัสเซียมคลอไรด์ 2.5 - 7.5 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 - 0.3 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 0.5-1.5 กรัมต่อลิตร เจลาติน 5-15 กรัมต่อลิตร และ 0-20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ วัดการเพิ่มจำนวนโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของโปรติเอสโดยวิธี Keay & Wildi 1970 ผลการทดลองพบว่าไอโซเลต SA02.1 ผลิตโปรติเอสสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารมีเดียม73 ที่พีเอช 7.0 ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์โดยเพิ่มสารสกัดจากยีสต์จากสูตรเดิมไปเป็น 1.5 กรัมต่อลิตร พบว่ามีโปรติเอสแอคติวิตีเท่ากับ 164 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในตารางที่ 4

4.8 ผลการทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์

4.8.1 การหาช่วงที่โปรติเอสตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ผลการทดลองการหาช่วงที่โปรติเอสจากไอโซเลต SA.02 เกิดตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0–100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าช่วงที่โปรติเอสตกตะกอนคือ 0–50 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 12

รูปที่ 12 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรติเอสที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวช่วง 0-100 เปอร์เซ็นต์

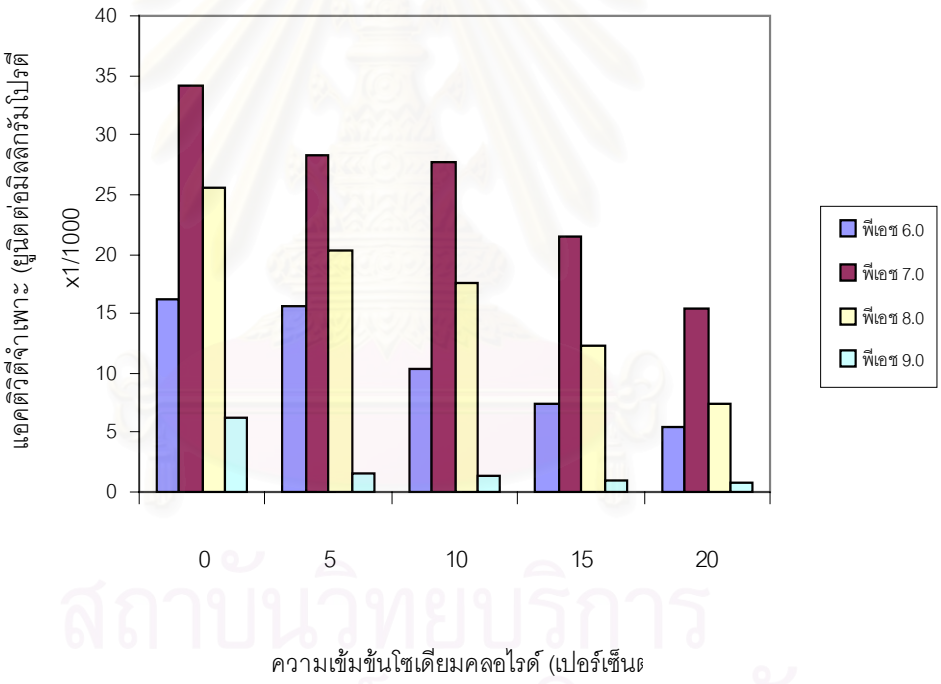
ตารางที่ 4 ผลโปรติเอสแอคติวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)ในการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสแอคติวิตีสูงโดยการปรับปรุงสูตรอาหารเหลวมีเดียม 73 แถวกลาง ของสารอาหารแต่ละชนิดเป็นปริมาณเดิมของสารอาหารในสูตร มีเดียม 73 ซึ่งประกอบด้วย 10 g.l^{-1} $MgSO_4$, 5 g.l^{-1} KCl , 0.2 g.l^{-1} $CaCl_2$, 10 g.l^{-1} gelatin, 1.0 g.l^{-1} Yeast extract

pH		6					7					8					9				
NaCl %		0	5	10	15	20	0	5	10	15	20	0	5	10	15	20	0	5	10	15	20
$MgSO_4$ (g.l^{-1})	5	0.6	0.8	0.4	0.24	0.2	16.1	26.1	20.3	9.7	2.6	5.4	24.4	19.2	13.3	4.1	7.6	2.2	2.2	1.8	0.8
	10	2.1	3.4	1.28	1.04	1.8	12.8	32.5	24.8	11.7	4	16.1	19.8	23.4	6.6	3.8	2.1	1.3	1.3	0.9	0.2
	15	1.0	1.3	0.4	0.3	0.2	9.4	22.0	8.7	1.9	1.4	2.4	35.4	21.3	1.5	1.5	0.6	0.5	0.4	0.1	0.2
KCl (g.l^{-1})	2.5	10.4	11.7	4.8	0.7	0.3	12.0	19.3	19.8	6.2	3.8	8.9	14.6	14.5	12.1	11.2	4.4	4.4	2.9	1.7	1.5
	5.0	2.1	3.4	1.28	1.04	1.8	12.8	32.5	24.8	11.7	4	16.1	19.8	23.4	6.6	3.8	2.1	1.3	1.3	0.9	0.2
	7.5	1.7	2.1	0.3	0	0	19.0	21.6	30.8	6.7	1.3	17.9	22.9	9.8	2.5	0.3	1.0	0.9	0.7	0.2	0.1
$CaCl_2$ (g.l^{-1})	0.1	0.9	3.6	6.1	1.1	1.8	15.0	24.2	22.2	5.0	1.2	7.8	4.9	12.7	21.1	1.1	1.9	1.9	0.6	0.9	0.6
	0.2	2.1	3.4	1.28	1.04	1.8	12.8	32.5	24.8	11.7	4	16.1	19.8	23.4	6.6	3.8	2.1	1.3	1.3	0.9	0.2
	0.3	2.6	4.2	1.4	0.5	1.8	10.4	25.2	19.2	6.6	3.1	7.4	17.3	8.7	4.8	2.5	1.5	1.3	0.9	0.9	1.0
gelatin (g.l^{-1})	5	0.5	3.0	1.1	1.0	1.8	4.8	11.4	8.3	6.6	2.2	4.2	5.9	16.3	4.4	1.0	4.2	3.2	3.0	3.2	2.2
	10	2.1	3.4	1.28	1.04	1.8	12.8	32.5	24.8	11.7	4	16.1	19.8	23.4	6.6	3.8	2.1	1.3	1.3	0.9	0.2
	15	0.7	0.9	1.4	1.1	0.6	7.4	10.5	18.1	6.6	6.7	6.2	4.4	10.2	4.8	0.6	1.0	1.0	1.2	0.2	0.2
Yeast Extract (g.l^{-1})	0.5	1.0	3.8	1.8	1.1	0.7	9.8	23	19.2	10.6	1.6	12.3	9.0	3.2	1.8	1.2	1.8	0.6	0.3	3.4	3.0
	1.0	2.1	3.4	1.28	1.04	1.8	12.8	32.5	24.8	11.7	4	16.1	19.8	23.4	6.6	3.8	2.1	1.3	1.3	0.9	0.2
	1.5	2.1	4.0	3.8	2.5	3.0	32.4	65.6	39.4	15.9	7.8	7.7	16.5	14.1	16.6	1.1	1.0	2.6	2.2	1.9	0.2

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 ชี้ให้เห็นว่าสูตรอาหารที่ทำให้ไอโซเลต SA.02 ขับโปรติเอสแอคติวิตีสูงสุดออกนอกเซลล์ ได้แก่ สูตรอาหารทีประกอบด้วย 10 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต, 5 กรัมต่อลิตร โปตัสเซียมคลอไรด์, 0.2 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์, 10 กรัมต่อลิตร เจลาติน, 1.5 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์, 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ที่พีเอช 7.0

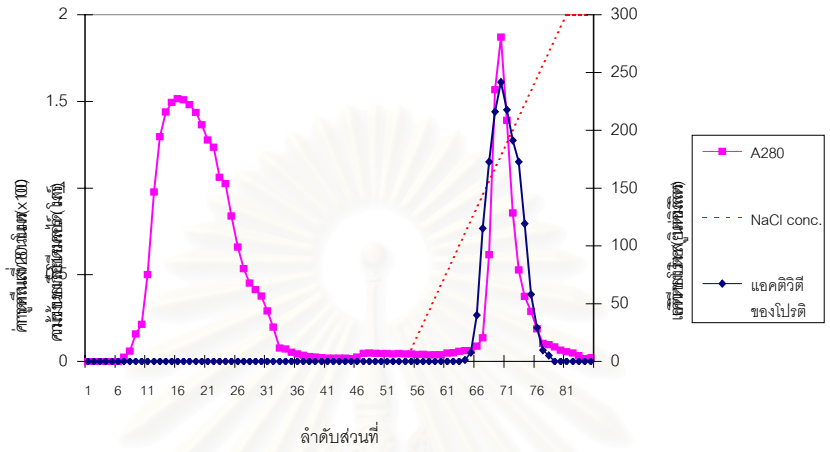
4.8.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอส

ผลการทดลอง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โปรติเอสแอคติวิตีคือ พีเอช 7.0 และไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ดังแสดงในรูปที่ 13



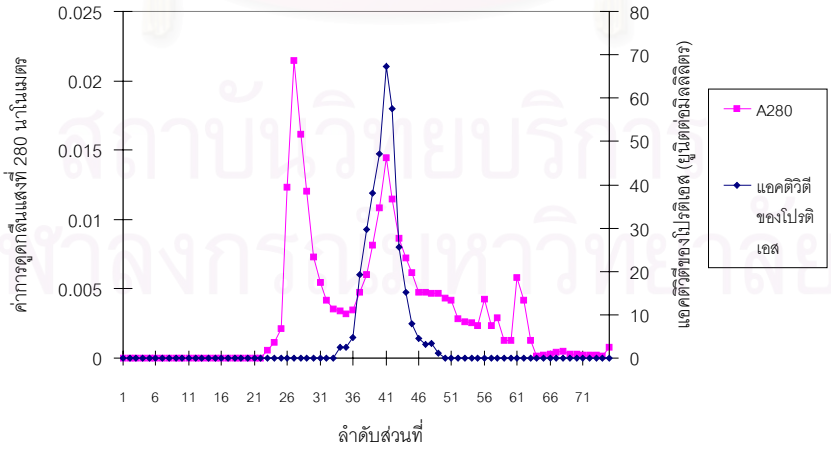
รูปที่ 13 แสดงแอคติวิตีจำเพาะของโปรติเอส ที่พีเอช และที่เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ต่างๆ

4.8.3 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยการทำดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ โดยใช้ดีอีเออีเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ ที่พีเอช 7.0 และ linear gradient ที่ 0–2 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ พบว่าโปรติเอสที่ได้จากไอโซเลต SA.02 เป็นประจุลบเพราะเกาะกับดีอีเออี และโดยชะออกมาที่ 1.2 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ ชะออกมาลำดับส่วนที่ 66-76 ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ บัฟเฟอร์ที่ใช้ชะได้แก่ 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด พีเอช 7.0 และ linear gradient ชะด้วย 0-2 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์

4.8.4 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยการทำเซฟาเดกซ์ จี-50 เจลฟิลเตรชันคอลัมน์ ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกโปรติเอสออกจากโปรตีนอื่น โดยชะออกมาลำดับส่วนที่ 36 ถึง 46 ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15 การทำโปติเอสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 บัฟเฟอร์ที่ใช้ชะได้แก่ 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด พีเอช 7.0

สรุปการทำให้บริสุทธิ์ของโปรติเอสที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-50 เปอร์เซ็นต์, ผ่านลงคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอเจล-เอ ผ่านลงคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-50 พบว่าโปรติเอสมีความบริสุทธิ์ขึ้น 1.0 เท่า และมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 0.08 เปอร์เซ็นต์ เมื่อไม่มี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ในบัฟเฟอร์ดังตารางที่ 5 และพบว่าโปรติเอสมีความบริสุทธิ์ขึ้น 1.5 เท่า และมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ในบัฟเฟอร์ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 5 แสดงการทำให้บริสุทธิ์ของโปรติเอสโดยผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่างๆ เมื่อไม่มี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ใน 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0

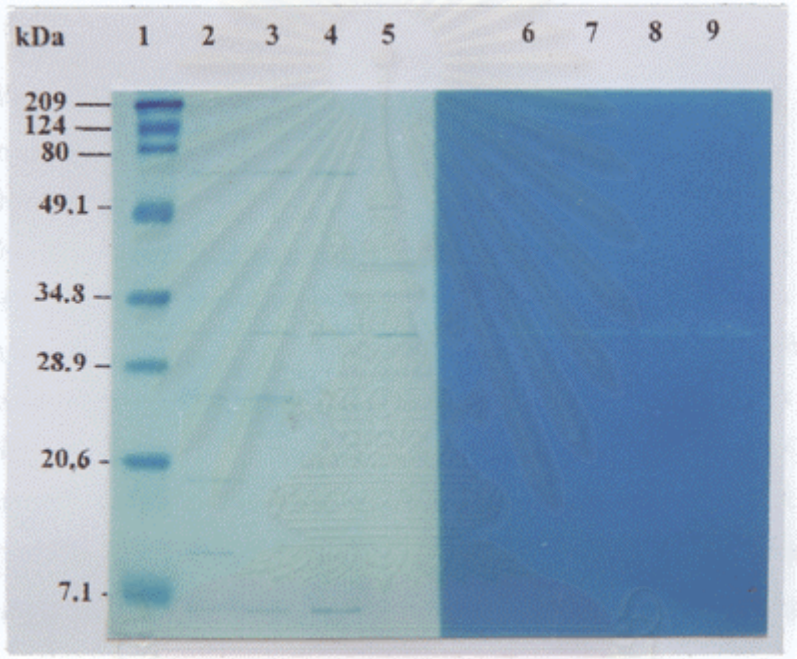
ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก.โปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ร้อยละของโปรติเอสแอคติวิตีที่ตรวจพบ
สารสกัดเอนไซม์	1520	89984	11.8	7626	1	100
ตกตะกอนด้วย 0-50 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต	9.5	59347	2.01	29526	3.9	66
ดีอีเออี ไบโอเจล เอ	5.9	859	0.11	7809	1.0	1.0
เซฟาเด็กซ์ จี 50	0.8	69	0.01	6900	0.9	0.08

ตารางที่ 6 แสดงการทำให้บริสุทธิ์ของโปรติเอสโดยผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่างๆ เมื่อมี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ใน 0.1 โมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0

ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก.โปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ร้อยละของโปรติเอสแอคติวิตีที่ตรวจพบ
สารสกัดเอนไซม์	1520	91930	12.2	7535	1	100
ตกตะกอนด้วย 0-50 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต	11.5	62634	1.84	34040	4.5	68.1
ดีอีเออี ไบโอเจล เอ	1.5	1373	0.13	10562	1.4	1.5
เซฟาเด็กซ์ จี 50	0.17	225.6	0.02	11280	1.5	0.25

4.9 ผลการตรวจความบริสุทธิ์และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอส

จากการนำตัวอย่างโปรติเอสแต่ละขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ มาทำ SDS-PAGE และ Activity staining นำมาหาน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 16 พบว่าโปรติเอสให้แถบชัดเพียงแถบเดียวและมีโปรติเอสแอคติวิตี และจากการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนบน SDS-PAGE แสดงดังรูปที่ 17 แถบโปรติเอสมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 31 กิโลดาลตัน และคาดว่าโปรติเอสไม่มีหน่วยย่อย เนื่องจากมีแอคติวิตีบน SDS-PAGE และสามารถทำการ renature ให้มีแอคติวิตีได้

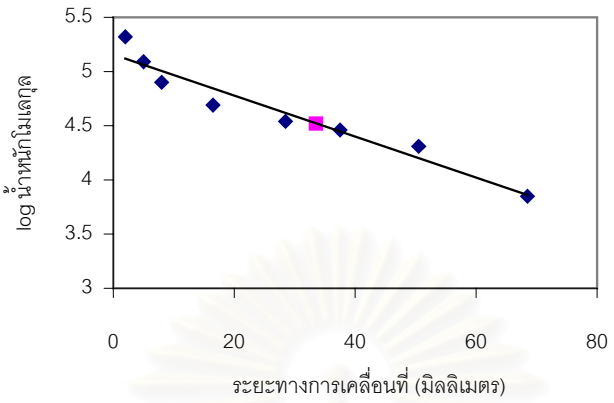


รูปที่16 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอส โดยการทำ SDS-PAGE และ Activity staining

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน
แถวที่ 2 crude enzyme
แถวที่ 3 โปรติเอสที่ผ่านขั้นตอนตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0-50 %
แถวที่ 4 โปรติเอสที่ผ่านขั้นตอนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ
แถวที่ 5 โปรติเอสที่ผ่านขั้นตอนเซฟา เดกซ์ จี-50
} SDS-PAGE

แถวที่ 6 crude enzyme
แถวที่ 7 โปรติเอสที่ผ่านขั้นตอนตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0-50 %
แถวที่ 8 โปรติเอสที่ผ่านขั้นตอนดีอีเออี ไบโอ-เจลเอ
แถวที่ 9 โปรติเอสที่ผ่านขั้นตอนเซฟาเดกซ์ จี-50
} Activity Staining

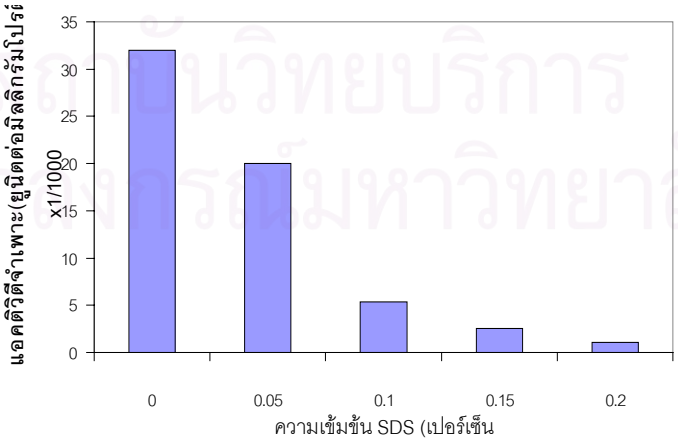
รูปที่ 17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บน SDS-PAGE



1. ไมโอซิน(Myosin) น้ำหนักโมเลกุล 209 กิโลดาลตัน
2. บีตา-กาแลกโตซิเดส (β -galactosidase) น้ำหนักโมเลกุล 124 กิโลดาลตัน
3. อัลบูมินจากโบ ไวน์ (Bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุล 80 กิโลดาลตัน
4. อัลบูมินจากไข่ (Ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 49.1 กิโลดาลตัน
5. คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase) น้ำหนักโมเลกุล 34.8 กิโลดาลตัน
6. สารยับยั้ง ซอยบีน ทริปซิน (Soybean trypsin inhibitor) น้ำหนักโมเลกุล 28.9 กิโลดาลตัน
7. ไลโซไซม์ (Lysozyme) น้ำหนักโมเลกุล 20.6 กิโลดาลตัน
8. อะโพตินิน (Aprotinin) น้ำหนักโมเลกุล 7.1 กิโลดาลตัน

P โปรติเอสจากไอโซเลต SA.02 น้ำหนักโมเลกุล 31 กิโลดาลตัน

การหาผลของ SDS ต่อการเร่งปฏิกิริยาของ SDS พบว่า SDS ทำให้โปรติเอสมีแอคติวิตีลดลงทุกความเข้มข้นและลดลงเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้น SDS เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18 ผลของความเข้มข้นของ SDS ต่อการเร่งปฏิกิริยาของโปรติเอสแอคติวิตี

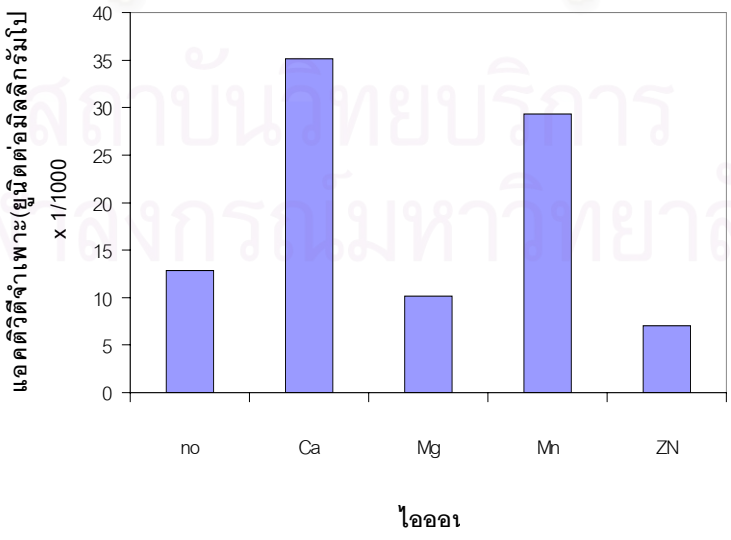
4.10 ผลการศึกษาสมบัติโปรติเอสจากไอโซเลต SA.02

4.10.1 ผลของ EDTA และ PMSF ต่อการทำงานของโปรติเอส พบว่า EDTA มีผลยับยั้งการทำงานของโปรติเอสเพราะแอคติวิตีลดลง ส่วน PMSF ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของโปรติเอส ดังแสดงในตารางที่ 7 แสดงว่าโปรติเอสของ *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis* เป็น metalloprotease

ตารางที่ 7 แสดงผลของ EDTA และ PMSF ต่อการทำงานของโปรติเอส

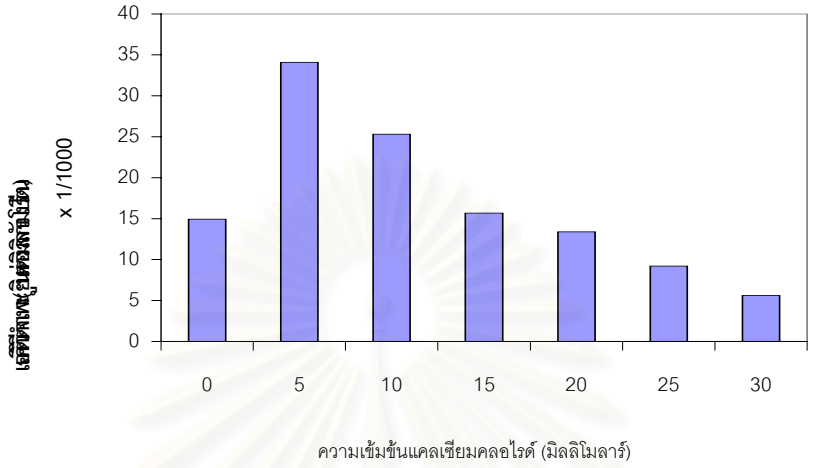
สารยับยั้ง	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	Relative activity (เปอร์เซ็นต์)
None	-	100
EDTA	1	0.65
	5	0.07
PMSF	5	97
	10	100

4.10.2 ผลของไอออนโลหะความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ต่อการทำงานของของโปรติเอส พบว่าไอออนของแคลเซียมคลอไรด์ ทำให้โปรติเอสมีแอคติวิตีสูงขึ้นเมื่อเทียบกับไอออนโลหะชนิดอื่นๆ โดยมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 35 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 19



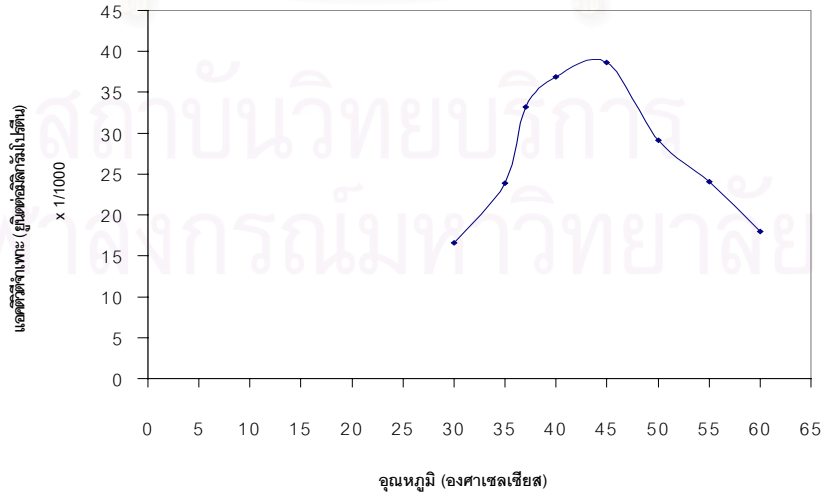
รูปที่ 19 ผลของไอออนต่อการทำงานของโปรติเอส

4.10.3 ผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแคลเซียมคลอไรด์ต่อโปรติเอสแอคติวิตี พบว่าความเข้มข้นของไอออนแคลเซียมคลอไรด์ ที่ทำให้โปรติเอสมีแอคติวิตีสูงขึ้น คือ 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 20 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0-30 มิลลิโมลาร์ ต่อการเร่งปฏิกิริยาของโปรติเอส

4.10.4 ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอส คือ 45 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมินี้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดี ดังแสดงในรูปที่ 21



รูปที่ 21 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอส

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ไอโซเลต SA.02 อาจเป็น *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis*

ผลการคัดเลือกและจำแนกชนิดแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโปรติเอส ในอาหารสูตรมีเดียม 73 ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ พีเอช 5.5 ได้ผลเป็นที่น่าพอใจเพราะสามารถคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มไอโซเลต SA.02 ซึ่งสุดาวดี ลีโทชวลิต (2540) แยกจากเกลือสมุทรที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊วระดับห้องปฏิบัติการ ผลการจำแนกชนิดไอโซเลต SA.02 พบว่า งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่พบ *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis* จากเกลือสมุทร ก่อนหน้านี้ Spring และคณะ เสนอให้มีจีนัสใหม่คือ *Halobacillus* ในปีค.ศ. 1996 โดยรายงานการค้นพบ *Halobacillus trueperi* และ *Halobacillus litoralis* จากดินตะกอนทางทิศใต้ของ Salt Lake มลรัฐยูทาห์ สหรัฐอเมริกา นอกจากนี้ Chaiyanan และคณะ(1999) รายงานการค้นพบ *Halobacillus thailandensis* จากน้ำปลาระหว่างการหมัก แต่ยังไม่มีรายงาน การฝากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Halobacillus thailandensis* ในฐานข้อมูล Genbank ผลการตรวจเอกสารพบว่า ในปัจจุบันมีรายงานชนิดของ *Halobacillus* ที่มีรูปร่างกลม 1 ชนิด ได้แก่ *Halobacillus halophilus* และที่มีรูปร่างเป็นแท่ง เพียง 3 ชนิดได้แก่ *Halobacillus litoralis*, *Halobacillus trueperi* และ *Halobacillus thailandensis* (Spring และคณะ, 1996, Chaiyanan และคณะ, 1999) ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และผลการทดสอบทางชีวเคมีดังแสดงในตารางที่ 3 ชี้ว่า ไอโซเลต SA.02 อาจเป็น subspecies ของ *Halobacillus trueperi* มากกว่าเป็น subspecies ของ *Halobacillus litoralis* หรือ *Halobacillus thailandensis*

5.2 *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis* มีรูปร่างกลมและรูปร่างแท่ง

รูปที่ 4 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นว่า *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis* มีรูปร่างกลมและรูปร่างเป็นท่อน เป็นการค้นพบที่น่าสนใจมาก ซึ่งผู้วิจัยกำลังทำการวิจัยเพื่อยืนยันการค้นพบดังกล่าว จากผลการทดลองในเบื้องต้น เนื่องจากแบคทีเรียมีรูปร่างเซลล์แบบกลมและรูปแท่ง ไม่พบสปอร์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว TSA เมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่เป็น positive control ซึ่งลักษณะเซลล์แบบนี้จัดอยู่ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ใน Section 15:Irregular, nonsporing Gram-positive rod จึงสรุปในเบื้องต้นว่าน่าจะเป็น *Arthrobacter* sp.(ตารางที่ 2) เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว EYGA

และนำมาย้อมสีแกรม ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp. และ *Corynebacterium* sp. เปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ได้เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 3 วัน โดยมีรูปแท่งสั้น รูปแท่งยาว และ รูปกลม ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 6 ส่วนไอโซเลต SA.02 จะมีรูปแท่ง ทุกช่วงเวลา เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ดังนั้นหากมีการศึกษาเพื่อยืนยันการมีรูปร่างกลมและรูปร่างแท่งของ *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis* ก็จะเป็นการค้นพบใหม่ว่า แบคทีเรียชนิดนี้มีรูปร่างกลมและแท่ง คล้ายกับที่พบในแบคทีเรีย Section 15 ดังกล่าวข้างต้น แต่เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์

5.3 การทำโปรติเอสจาก *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis* ให้บริสุทธิ์

ผลการปรับปรุงสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis* ให้ขับโปรติเอสแอคติวิตีสูงออกนอกเซลล์ พบว่าการเพิ่มสารสกัดจากยีสต์จากเดิม 1.0 กรัมต่อลิตร เป็น 1.5 กรัมต่อลิตร ทำให้โปรติเอสแอคติวิตีเพิ่มขึ้นจากการใช้สูตรเดิมเกือบ 2 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 4 สารสกัดจากยีสต์มีไวตามินบี คอมเพล็กซ์ ที่จำเป็นในกิจกรรมของเซลล์ (Difco Manual, 1984) ผลการทดลองยืนยันว่าสูตรอาหารที่ Norberg และ Hofsten (1969) คิดค้นขึ้นสำหรับใช้ศึกษาโปรติเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียชอบเค็ม เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มให้ขับโปรติเอสแอคติวิตีสูงออกนอกเซลล์

ผลการทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6 พบว่า โปรติเอสแอคติวิตีลดต่ำลงอย่างรวดเร็วมาก จากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมายังขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ แม้ว่าจะใช้ 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ในบัฟเฟอร์ ก็ไม่สามารถเพิ่มโปรติเอสแอคติวิตีได้ อาจเป็นเพราะการย่อยสลายตนเอง เพราะแอคติวิตีของโปรติเอสในช่วงขั้นตอนคอลัมน์ดีอีเออีโครมาโตกราฟี และเจลฟิวเตรชั่น ลดลงอย่างมากเช่นเดียวกัน นอกจากนี้สันนิษฐานว่าในการทำ ion exchange chromatography ไอออนซึ่งเป็นส่วนสำคัญของ metalloprotease ชนิดนี้อาจสูญเสียไป ทำให้สูญเสียแอคติวิตี ดังนั้นจึงอาจทำโปรติเอสชนิดนี้ให้บริสุทธิ์ โดยทำเจลฟิวเตรชันก่อนการทำ ion exchange chromatography หรืออาจใช้ hydrophobic column chromatography (Pharmacia, 1993)

สรุปผลการทดลอง

1. ผลการทดลองได้คัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโปรติเอสในอาหารสูตรมีเดียม 73 ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ พีเอช 5.5 ผลการจำแนกชนิดโดยวิธีทางจุลชีววิทยา วิธีทางชีว

เคมี รวมถึงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มที่แยกได้อาจเป็น *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis*

2. ผลการทำโปรติเอสของ *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis* ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ไดอะไลซีส ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ โครมาโตรกราฟี เซฟาเดกซ์ จี-50 เจลฟิวเตรชัน SDS-PAGE คู่กับ Casein-PAGE พบว่าสูญเสียโปรติเอสแอคติวีตีในช่วงต่อระหว่างการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการทำ ion exchange chromatography ผลการใช้สาร EDTA พบว่ายับยั้งการทำงานของโปรติเอส จึงจัดว่าเป็น metalloprotease ซึ่งอาจสูญเสียไอออนที่น่าจะเป็น ประจุลบของบริเวณเร่ง ในช่วงการทำ ion exchange chromatography ทำให้สามารถทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์ได้เพียง 1.5 เท่า โดยตรวจพบแอคติวิตีเหลือเพียง 0.25 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโมเลกุล 31 กิโลดาลตัน
3. โปรติเอสมีแอคติวิตีที่อุณหภูมิเหมาะสมคือ 45 องศาเซลเซียส จัดว่าเป็นเอนไซม์ชอบร้อนพอสมควร ซึ่งอาจทดลองใช้ผงโปรติเอสดังกล่าวในการผลิตซีอิ๊วโปรตีนสูง ในระยะโมโรมิซึ่งอยู่กลางแจ้งได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สุดาวดี ลีโทชวลิต, 2540. ผลของการเติมโปรติเอสจากแบคทีเรียที่แยกจากการหมักซีอิ๊วต่อปริมาณโปรตีนในซีอิ๊ว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาคจุลชีววิทยา.คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุตสาหกรรมกระทรวง มอก. 252-2521 มาตรฐานอุตสาหกรรมทำซีอิ๊ว 15 หน้า

ภาษาอังกฤษ

Aderibigbe, E.Y., and Odunfa, S.A. 1988. Purification and characterization of extracellular proteinases excreted by a strain of *Bacillus subtilis* BS2, isolated from fermented African locust bean' iru'. J. Appl. Bacteriol. 65: 361-369.

Aoki, K., Miyamoto, K., Murakami, S., and Shinke, R. 1995. Anaerobic synthesis of extracellular proteases by the soil bacterium *Bacillus* sp. AM-23: Purification and characterization of the enzymes. Soil. Biol.Biochem. 27(11): 1377-1382.

Aunstrup, K. 1979. Proteinases. Appl. Biochem. Bioeng. 2: 49-114.

Barrett, A. 1990. The classes of proteolytic enzymes. In Dalling, M.J. Plant Proteolytic Enzymes. Baca Ratoh, Florida: CRC Press. 1: 1-16.

Blackall, L.L. 1999. Workshop on Molecular Biology Techniques. September. 22-24 and 26-28, 1999, Thaksin University, Songkla, Thailand: p.23, j1- j9.

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

Bremer, E., Kramer, R. 2000. Coping with osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In Storz, G., and Hengge-Aronis, R.(eds). Bacterial Stress Responses. Washington DC: American Society of Microbiology. p.79-97

Chaiyanan, S., Chaiyanan, S., Maugel, T., Huq, A., Robb, F.T., and Cowell, R.R. 1999. Polyphasic taxonomy of a novel *Halobacillus*, *Halobacillus thailandensis* sp.nov. isolated from fish sauce. Syst. Appl. Microbiol.22: 360-365.

Chansa-ngavej, K., Mahattanathavee, K. 1993. Role of halophilic bacteria in the improvement of soy sauce protein contents. Proceedings of the Third Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology. p.85-91.

Chansa-ngavej, K., Singhaboonpong, T. 1994. Strategy for the production of high-protein-low-salt soy sauce as part of the integrated research on agricultural biotechnology in the northeastern part of Thailand. Proceedings of the National Seminar on Science and Technology for the Development of the Northeastern Part of Thailand. p.61-74.

Cowan, S.T., and Steel, K.J. 1974. Manual for the Identification of Medical Bacteria. 2nd. London:Cambridge University Press. p.134-180.

Cure, G.L., Keddie, R.M. 1973. Methods for the Morphological Examination of Aerobic Coryneform Bacteria. In Bord and Lovelock (eds). Sampling Microbiological Monitoring of Environment. Academic Press. p.123-135.

Dorsch, M., Stackebrandt, E. 1992. Some modifications in the procedure of direct sequencing of PCR amplified 16SrDNA. J. Microbiol. Meth. 16: 271-279.

Drapeau, G.R., Boily, Y., and Houmard, J. 1972. Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 247(20): 6720-6726.

Durham, D.R., Stewart, D.B., and Stellwag, E.J. 1987. Novel alkaline- and heat stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX6638. J. Bacteriol. 169(6):2762-2768.

Eeles, R.A., Stamps, A.C. 1993. Polymerase Chain Reaction(PCR): The Technique and Its Applications. Chapter 4: The PCR Environment. Austin: R.G Landes Co. p.27-32.

Fujio, Y., and Kume, S. 1991. Characteristics of a highly thermostable neutral protease produced from *Bacillus stearothermophilus*. World. J. Microbiol. Biotech. 7: 12-16.

Fukuda, K., Hasuda, K., Oda, T., Yoshimura,H., and Muramatsumi, T. 1997. Novel extracellular alkaline metalloendopeptidases from *Vibrio* sp. NUF-BPP1: Purification and characterization. Biosci. Biotech. Biochem. 61(1): 96-101.

Garcia-Carreno, F.L., Dimes, L.E., and Haard, N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Anal. Biochem. 214: 65-69.

Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R., and Phillips, G.B. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. Washington, D.C. : American Society for Microbilogy. p.409-443.

Horikoshi, T. 1971. Production of alkaline enzyme by alkaophilic microorganisms Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No.221. Agri. Biol. Chem. 35(9): 1407-1414.

Novo Nordisk Biotech, Inc. Enzyme solutions[Online]. 2000. Available from: http://www.enzymes.novo.dk/enzymes/Industries-food.htm [2000,August 19]

Hall, T. 2001. BioEdit. Biological sequence alingment editor for windows 95/98/NT[Online]. 2001. Available from: http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html.[2001,June18]

Hummel, K.M., Penheiter, A.R., Gathman, A.C., Lilly, W.W. 1996. Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin-containing SDS-PAGE. Anal. Biochem. 218: 325-329.

Izotova, L.S., Strongin, A.Y., Chekulaeva, L.N., Sterkin, V.E., Ostoslarskaya, V.T., Lyublinskaya, L.A., Timokhina, E., and Stepanov, V.M. 1983. Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. 155(2): 826-830.

Jones, D., Collins, M.D. 1984. Section 15: Irregular, nonsporing Gram-positive rods. In Krieg, N.R., Holt, J.G. (eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins.p.1261-1263.

Kakudo, S., Kikuchi, N., Kitadokoro, K., Fujiwara, T., Nakamura, E., Okamoto, H., Shi, M., Teraoka, H., Tsuzuki, H., and Yoshida, N. 1992. Purification, characterization, cloning and expression of a glutamic acid specific protease from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. J. Biol. Chem. 267: 23782-23788.

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

Kim, S-H., and Choi, N-S. 2000. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang. Biosci. Biotech. Biochem. 64(8): 1722-1725.

Kleiner, D.E., and Stetler-Stevenson, W.G. 1994. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. 1994. Anal. Biochem. 218: 325-329.

Kobayashi, T., Hakamada, Y., Adachi, S., Hitomi, J., Yoshimatsu, T., Koike, K., Kawai, S., Ito, S. 1995. Purification and properties of an alkaline protease from *Bacillus* sp. KSM-K16. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 473-481.

Kobayashi, T., Hakamada, Y., Hitomi, J., Koike, K., Ito, S. 1996. Purification of alkaline proteases from *Bacillus* strain and their possible interrelationship. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 63-71.

Kohlmann, K.L., Nielsen, S.S., and Ladisch, M.R. 1991. Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M316. J. Dairy Sci. 74: 74125-4136.

Kumar, C.G., Tiwari, M.P., and Jany, K.D. 1999. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp.: Purification and some properties. Process. Biochem. 34: 441-449.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Lee, G-D., Chun, S.-S., Kho, Y.-H., and Chun, H.-K. 1998. Purification and properties of an extracellular leucine aminopeptidase from *Bacillus* sp. N2. J. Appl. Microbiol. 84: 561-566.

Lewin, B. 1997. Genes VI. Oxford university Press. p.153.

Matta, H., and Punj, V. 1998. Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17. Int. J. food microbiol. 42:139-145.

McConn, J.D., Tsuru, D., and Yasunobu, K.T. 1964. *Bacillus subtilis* neutral proteinase. J. Biol. Chem. 239(11): 3706-3715.

Morihara, K. 1974. Comparative specificity of microbial proteinases. Adv. Enzymol. 41: 179-243.

Morihara, K., Tsuzuki, H., and Oka, T. 1968. Comparison of the specificities of various neutral proteinases from microorganisms. Arch. Biochem. Biophys. 123: 572-588.

Moriyama, R., Sugimoto, K., Zhang, H., Inoue, T., and Makino, S. 1998. A cysteine-dependent serine protease associated with the dormant spores of *Bacillus cereus*: Purification of the protein and cloning of the corresponding gene. Biosci. Biotech. Biochem. 62(2): 268-274.

Norberg, P., and Hofsten, B.V. 1969. Proteolytic enzyme from extremely halophilic bacteria. J. Gen Microbiol. 55: 251-256.

Ohta, Y. 1967. Thermostable protease from thermophilic bacteria. J. Biol. Chem. 242(3): 509-515.

Ohta, H., Katoh, T., and Fujio, Y. 1995. Purification and some properties of a thermostable protease, BSP2, produced from *Bacillus stearothermophilus* No.2. 1995. J. Fac. Agri. Kyushu University.1-2: 9-17.

Okamoto, H., Fujiwara, T., Nakamura,E., Katoh, T., Iwamoto, H., Tsuzuki, H. 1997. Purification and characterization of a glutamic-acid-specific endopeptidase from *Bacillus subtilis* ATCC B051; application to the recovery of bioactive peptidases from fusion proteins by sequence-specific digestion. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 27-33.

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

Pharmacia. 1993. Hydrophobic Interaction Chromatography: Principles and Methods. p.103

Phooyuthin, V., KongKaew, T., Leethochawalit, S., Chansa-ngavej, K. 2000. Selection of protease of use in the *moromi* stage of high-protein soy sauce production. Abstract Book. BioThailand 2001: From Research to Market. November 7-10, 2001. Bangkok, Thailand. p. 397.

Poutanen, K. 1977. Enzymes: An important tool in the improvement of the qualify of cereal foods. Trends. Food Sci. Technol. 8: 300-306.

Qua, V.D., Simidu, U., and Taga, N.1981. Purification and some properties of halophilic protease produced by a moderately halophilic marine *Pseudomonas* sp. Can. J. Microbiol. 27: 505-510.

Rahman, R.N.Z.A., Razak, C.N., Ampon, K., Basri, M., Yunus, W.Md.Z.W., and Salleh, A.B. 1994. Purification and characterization of heat-stable alkaline protease from *Bacillus sterothermophilus* F1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 822-827.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev.62(3): 597-635.

Roitsch, C.A., and Hageman, J.M.1983. Bacillopeptidase F: Two forms of a glycoprotein serine protease from *Bacillus subtilis* 168. J. Bacteriol. 155(1): 145-152.

Rufo, G.A., Sullivan, J.R. B.J., Sloma, A., and Pero, J. 1990. Isolation and characterization of a novel extracellular metalloprotease from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 172(2): 1019-1023.

Secades, P., and Guijarro, J.A. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. Appl. Environ. Microbiol. 65(9): 3969-3975.

Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition. NewYork : Cold Spring Harbor Laboratory Press: 6.6-6.19.

Shimogaki, H., Takeuchi, K., Nishino, T., Ohdera, M., Kudo, T., Ohba,K., Iwama, M., and Irie, M. 1991. Purification and properties of a novel surface-active agent- and alkaline-resistant protease from *Bacillus* sp.Y. Agri. Biol. Chem. 55(9):2251-2258.

Sidler, W., and Zuber, H. 1980. Isolation procedures for thermostable neutral proteinases produced by *Bacillus stearothermophilus*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech. 10: 197-209.

Sloma, A., Rufo, G.A., Rudolph, JR.C.F., Sullivan, B.J., Theriault, K.A., and Pero, J. 1990. Bacillopeptidase F of *Bacillus subtilis*: Purification of the protein and clonig of the gene. J. Bacteriol. 172(3): 1470-1477.

Smacchi, E., Fox, P.F., and Gobbetti, M. 1999. Purification and characterization of two extracellular proteinases from *Arthrobacter nicotianae* 9458. FEMS. Microbiol. Lett. 170: 327-333.

Spring, S., Ludwig, W., Marquez, M.C., Ventosa, A., and Schleifer, K-H. 1996. *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov., and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb.nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 46(2): 492-496.

Strongin, A.Y.A., Izotova, L.S., Abramov, Z.t., Gorodetsky, D.I., Ermakova, L.M., Baratova, L.A., Belyanova, L.P., and Stepanov, V.M.1978. Intracellualar serine protease of *Bacillus subtilis* : sequence homology with extracellular subtilisins. J. Bacteriol. 133(3): 1401-1411.

Takii, Y., Urata, Y., and Ueno,N. 1998. Thermostable neutral protease resembling thermolysin derived from *Bacillus brevis* MIB001. Biosci. Biotech. Biochem. 62(5): 1028-1030.

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

Toma, C., Ichinose, Y., and Iwanaga, M. 1999. Purification and characterization of an *Aeromonas caviae* metalloprotease that is related to the *Vibrio cholerae* heamagglutinin/protease. FEMS. Microbiol. Lett. 170: 237-242.

Van den burg, B., Enequist, H.G., Van der haar, M.E., Eijsink, V.G.H., Stulp, B.K., and Venema, G. 1991. A highly thermostable neutral protease from *Bacillus caldolyticus*: cloning and expression of gene in *Bacillus subtilis* and characterization of gene product. J. Bacteriol. 173(13): 4107-4115.

Wang, H.L., Vespa, J.B., and Hesseltine, C.W. 1974. Acid protease production by fungi used in soybean food fermentation. Appl. Microbiol. 27: 906-911.

Wu, L.C., and Hang, Y.D. 1998. Purification and characterization of acid proteinase from *Neosartorya fischeri* var. *spinosa* IBT 4872. Lett. Appl. Microbiol. 27: 71-75.

Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. 1993. Purification and specificity of a cell-wall associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. J. Biochem. 1414: 740-745.

Yang, J-K., Ferrai, E., Henner, D.J. 1984. Cloning of the neutral protease gene of *Bacillus subtilis* and the use of the cloned gene to create an in vitro-derived deletion mutation. J. Bacteriol. 160(1): 15-21.

Yang, J-K., Shih, I-L., Tzeng, Y-M., and Wang, S-L. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme. Microbiol. Technol. 26: 406-413.

Yasunobu, K.T., and McConn, J.D. 1970. *Bacillus subtilis* neutral proteinase. Methods. Enzymol. 19: 569-575.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลวมีเดียม 73 (M73 medium) **ต่อ 1 ลิตร** Norberg **และ** Hofsten (1969)

แมกนีเซียมซัลเฟต	10	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์	5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1	กรัม
เจลาติน	10	กรัม

ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที

อาหารเหลว TSB (Tryptic Soy Broth) **ต่อ 1 ลิตร**

แบคโต ทริปโทน	15	กรัม
แบคโต ซอยโทน	15	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

อาหารแข็ง TSA (Tryptic Soy Agar) **ต่อ 1 ลิตร**

อาหารเหลวทริปติก ซอย	1	ลิตร
วุ้น	15	กรัม

ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

อาหารแข็งซีวอเตอร์ (Seawater agar) **ต่อ 1 ลิตร** Spring **และคณะ** (1996)

โซเดียมคลอไรด์	50	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์	10.99	กรัม
โซเดียมซัลเฟต	4.06	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	1.51	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โปตัสเซียมคลอไรด์	0.69	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	0.2	กรัม
โปตัสเซียมโบรไมด์	0.1	กรัม
เฟอร์รัสฟอสเฟต	0.1	กรัม
เซอร์รีเนียมคลอไรด์	0.042	กรัม
กรดบอริก	0.027	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์	0.01	กรัม
โซเดียมซิลิเคต	0.005	กรัม
โซเดียมฟลูออไรด์	0.003	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	0.002	กรัม
เคซีนเปปโทน	5	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1	กรัม
วุ้น	15	กรัม

ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

อาหารแข็ง EYGA ต่อ 1 ลิตร (Cure และ Keddie, 1973)

ส่วนประกอบ		
มิเนอรัล เบส อี (Mineral Base E)	1000	มิลลิลิตร
วิตามิน B 12	200	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
วุ้น	12.0	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม

การเตรียม มิเนอรัล เบส อี มีดังนี้

สารละลายสต๊อก (ใน 400 มิลลิลิตร น้ำกลั่น) ประกอบด้วย

สารละลาย 1: ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	80	กรัม
สารละลาย 2: โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	62.4	กรัม
สารละลาย 3: แคลเซียมคลอไรด์	2.0	กรัม
สารละลาย 4: แมกนีเซียมซัลเฟต	8.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	4.0	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลาย 5: แอมโมเนียมซัลเฟต 20.0 กรัม

การเตรียมอาหารสูตร EYGA มีดังนี้ เติมสารสกัดจากยีสต์ และวุ้นลงใน มิเนอรัลเบส อี (1 ลิตร) และต้มจนวุ้นละลาย ละลายกลูโคสและเติม วิตามิน B 12 1 มิลลิลิตร (อาจเตรียมสารละลายวิตามิน B 12 โดยเติม วิตามิน B 250 ไมโครกรัม ในน้ำกลั่น 24 มิลลิลิตร) ปรับพีเอชเท่ากับ 6.5 (ถ้าจำเป็น) นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที

อาหารเหลวไนเตรต (Nitrate Broth) **ต่อ 1 ลิตร**

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
แบคโตเปปโทน	15	กรัม
โปตัสเซียมไนเตรต	1	กรัม

ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส 20 นาที

อาหารแข็งสกิมมิลค์ (Skim milk agar) **ต่อ 1 ลิตร**

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
แบคโตเปปโทน	5	กรัม
สกิมมิลค์	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม

ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส 15 นาที

อาหารนิวเทรียนต์ (Nutrient Agar) **ต่อ 1 ลิตร**

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
แบคโตเปปโทน	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม

ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส 20 นาที

อาหารแข็งทวิน80 (Tween80 medium) **ต่อ 1 ลิตร**

แบคโต เปปโทน	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทวิน80	10	มิลลิลิตร
แคลเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
วุ้น	20	กรัม

ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส 20 นาที

อาหารทดสอบการผลิตยูเรีย ต่อ 1 ลิตร

แบคโต เปปโทน	1.0	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
สีฟีนอลเรด	0.012	กรัม
วุ้น	20	กรัม

ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.9 ด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมี (Cowan และ Steel, 1974)

<u>สารละลายคริสตัลไวโอเลต</u>

สารละลาย ก ประกอบด้วย

คริสตัลไวโอเลต	10	กรัม
95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล	100	มิลลิลิตร

สารละลาย ข ประกอบด้วย

แอมโมเนียมออกซาเลต(Ammonium oxalate)	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก 20 มิลลิลิตรและสารละลาย ข 80 มิลลิลิตร

<u>สารละลายสีมาลาไคต์กรีน</u>

สีมาลาไคต์กรีน (Malachite green)	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

<u>สารละลายสีซาฟรานิน</u>

สีซาฟรานิน (safranin)	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

<u>สารละลายทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส</u>

สารละลาย ก ประกอบด้วย

เตตระเมธิลพาราเฟนิลีนไดเอมีน ไดไฮโดรคลอไรด์ (tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride)	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เก็บในขวดสีชา ที่ 4 องศาเซลเซียส

สารละลาย ข ประกอบด้วย

แอลฟาแนฟธอล	1	กรัม
95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล	100	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลาย ค ประกอบด้วย

พารา-อะมิโนเมธิลลาอะนิไลน์ ออกซาเลต (p-aminodimethylaniline oxalate)	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

<u>สารละลายทดสอบไนไตร์</u>

สารละลาย ก ประกอบด้วย

ซัลฟานิลิก แอซิด	0.8	กรัม
5 นอร์มอล อะซิติก แอซิด	100	มิลลิลิตร

สารละลาย ข ประกอบด้วย

แนปธิลเอมีน	0.5	กรัม
5 นอร์มอล อะซิติก แอซิด	100	มิลลิลิตร

<u>สารละลายไอโอดีน</u>

ไอโอดีน	5	กรัม
โพแทสเซียม ไอโอดีน	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

<u>Tris EDTA Saline , TES buffer</u>

โซเดียมคลอไรด์	0.9	กรัม
อีดีทีเอ	0.29	กรัม
0.1 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0	100	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

<u>Saline EDTA</u>

โซเดียมคลอไรด์	0.9	กรัม
อีดีทีเอ	0.29	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>สารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์สำหรับย้อมสีดีเอ็นเอ</u>

นำสารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในน้ำกลั่น นำมาผสมกับ TES บัฟเฟอร์จนมีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน

<u>สารละลายแบรดฟอร์ด</u>

สีคลูแมสซี บริลเลียนท์ จี250	100	มิลลิกรัม
95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล	50	มิลลิลิตร
85 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอสฟอริก	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	850	มิลลิลิตร

กรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เก็บในขวดสีชา

สารเคมีที่ใช้ในการหาแอคติวิตีของโปริเอส

<u>สารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0</u>

ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	6.15	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.85	กรัม

ละลายน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยปรับพีเอชเท่ากับ 6.0 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

<u>สารละลายทริสบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0</u>

ทรีสมาร์ เบส	121.1	กรัม

ละลายน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

<u>สารละลายทริสบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0 และ 9.0</u> เตรียมวิธีเดียวกับ พีเอช 7.0 แต่ปรับพีเอชให้ได้ 8.0 และ 9.0 โดยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

<u>สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 0.4 โมลาร์</u>

กรดไตรคลอโรอะซิติก	16.34	กรัม
น้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร

<u>สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.4 โมลาร์</u>

โซเดียมคาร์บอเนต	21.2	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

<u>สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์เจือจาง</u>

โฟลินฟีนอลรีเอเจนต์	1	ส่วน
น้ำกลั่น	3	ส่วน

สารเคมีที่ใช้ในการหาทำอิเลคโทรโฟริซีสบนโซเดียมโดเดซิลพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

<u>สารละลายทริสไกลซีนอิเลคโทรดบัฟเฟอร์</u> (เข้นข้น 5เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	3.0	กรัม

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.3 เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 600 มิลลิลิตร

<u>สาละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต</u> (SDS stock) 10 <u>เปอร์เซ็นต์</u>

โซเดียมโดดิซิลซัลเฟต	1.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร

<u>สารละลายทริส บัฟเฟอร์ ความเข้นข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8</u>

ทริส	6.0	กรัม

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.8 เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 600 มิลลิลิตร

<u>สารละลายทริส บัฟเฟอร์ ความเข้นข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8</u>

ทริส	18.15	กรัม

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.8 เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 600 มิลลิลิตร

<u>สารละลายอะคริไมด์</u> (30% T, 2.67% C)

อะคริไมด์	14.60	กรัม

BIS(N,N,-Methylene bis acrylamide)	0.40	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร		

<u>บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์</u> (Sample buffer) **เข้มข้น 1 เท่า**

น้ำกลั่น	3.8	มิลลิลิตร
สารละลายทริส บัฟเฟอร์ ความเข้นข้น	1.0	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8		
กลีเซอรอล	0.8	มิลลิลิตร
10 เปอร์เซ็นต์ SDS	1.6	มิลลิลิตร
2-เมอร์แคปโตเอธานอล	0.4	มิลลิลิตร
สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์บรอมฟีนอลบลู	0.4	มิลลิลิตร

<u>สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์</u>

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร		

<u>สารละลายผสมของ seperating gel 15 เปอร์เซ็นต์เจล</u>

น้ำกลั่น	3.52	มิลลิลิตร
สารละลายทริส บัฟเฟอร์ ความเข้นข้น	3.75	มิลลิลิตร
1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8		
สารละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	150	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	7.5	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียม	75	ไมโครลิตร
เปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์		
TEMED	7.5	ไมโครลิตร

<u>สารละลายผสมของ stacking gel 4 เปอร์เซ็นต์เจล</u>

น้ำกลั่น	6.10	มิลลิลิตร
สารละลายทริส บัฟเฟอร์ ความเข้นข้น	2.50	มิลลิลิตร
1.5 โมลาร์ พีเอช 6.8		
สารละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต10 เปอร์เซ็นต์	100.0	ไมโครลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	มิลลิลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร

สารละลายผสมของ seperating gel 15 เปอร์เซ็นต์เจลที่มีเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์

น้ำกลั่น	2.02	มิลลิลิตร
สารละลายทริส บัฟเฟอร์ ความเข้นข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8	3.75	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต10 เปอร์เซ็นต์	150	ไมโครลิตรสาร
ละลายอะคริลาไมด์	7.5	มิลลิลิตร
สารละลายเคซีน 10 เปอร์เซ็นต์	1.5	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	75	ไมโครลิตร
TEMED	7.5	ไมโครลิตร

สารละลายไตรตรอนเอ็กซ์-100 (TritonX-100) ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์

ไตรตรอนเอ็กซ์-100	25	มิลลิลิตร
สารละลายทริส บัฟเฟอร์ ความเข้นข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ที่มี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์	975	มิลลิลิตร

สารละลายสำหรับย้อมสี (staining solution)

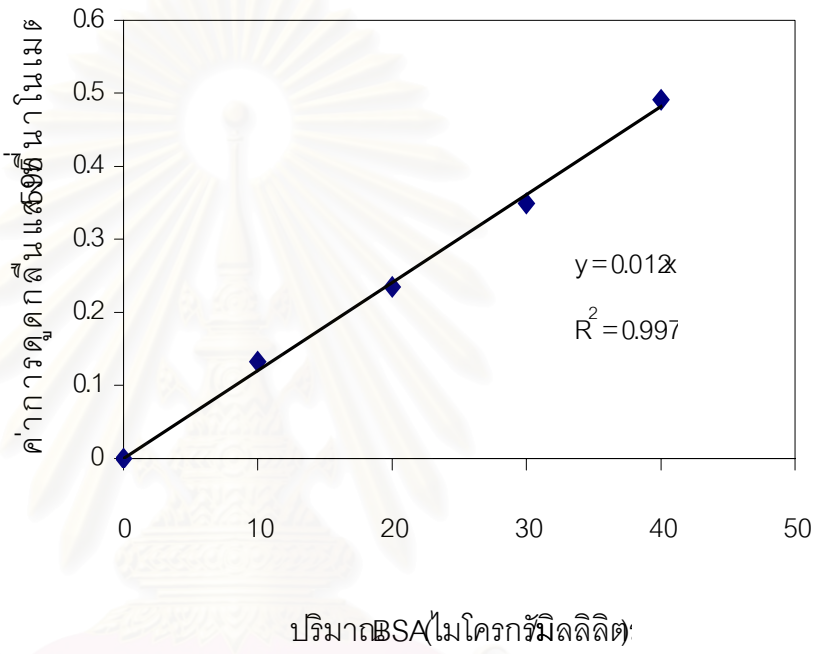
สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250	0.1	เปอร์เซ็นต์
เมธานอล	40	เปอร์เซ็นต์
กรดอะซิติก	10	เปอร์เซ็นต์

สารละลายสำหรับล้างสี (destaing solution)

เมธานอล	40	เปอร์เซ็นต์
กรดอะซิติก	10	เปอร์เซ็นต์

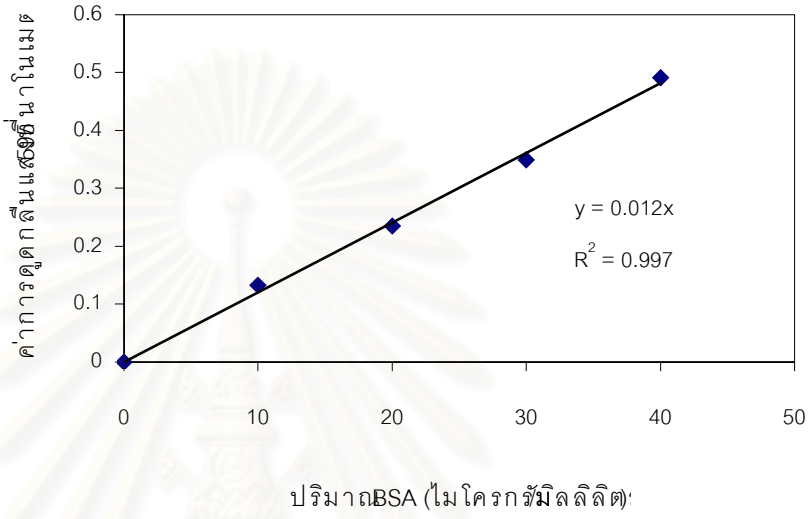
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟมาตรฐาน BSA (โดยวิธีแบรดฟอร์ด)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟมาตรฐาน BSA (โดยวิธีแบรดฟอร์ด)



ปริมาณ BSA (ไมโครกรัมมิลลิลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววทัญญุตา ภู่โยธิน เกิดเมื่อวันที่ 27 มกราคม พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2542 ที่อยู่ปัจจุบัน 39 ซอย 6 หมู่บ้านวัฒนานิเวศน์ ถนนสุทธิสาร เขตห้วยขวาง แขวงสามเสนนอก กรุงเทพ 10320

ประวัติการเสนอผลงานการแสดงโปสเตอร์

1. วทัญญุตา ภู่โยธิน และ กาญจนา ชาญสง่าเวช. 2543.การคัดเลือกแบคทีเรียจากกระบวนการหมักซีอิ๊วที่ผลิตโปรติเอสในภาวะกรดและความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูง.หนังสือรวมบทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. ครั้งที่ 25:หน้า 728-729

2. วทัญญุตา ภู่โยธิน และ กาญจนา ชาญสง่าเวช. 2544. การจำแนกชนิด *Corynebacterium* sp. ชอบเค็มและการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเพื่อผลิตโปรติเอสแอคติวิตีสูง.หนังสือรวมบทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. ครั้งที่ 26:หน้า 399

3. Phooyothin, V., Kongkaeow, T., Leethochawalit, S., Chansa-ngavej, K. 2001. Selection of protease for use in the *moromi* stage of high-protein soy sauce production. Abstract Book, BioThailand 2001: From Research to Market. November 7-10 2001. Bangkok, Thailand. p.397.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย