บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

การทดลองนี้เป็นการทดลองต่อเนื่อง ในลักษณะที่มีการนำผลการทดลองจากการทดลองหนึ่งไปใช้ในการทดลองต่อไป ตัวอย่างเช่นในการทดลองแยกแบคทีเรียชอบเค็มจากของเหลวในถังหมักปลา มีการแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเคซิเนสและเจลลาทินเนสบนอาหารวุ้นมีเดียม 73 ที่มีเคซีอีนหรือเจลลาทิน เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่สร้างทั้งเคซิเนสและเจลลาทินเนสบนอาหารวุ้นได้แล้ว จึงนำแบคทีเรียที่แยกได้ไปทดลองเลี้ยงเพื่อดูการเจริญและการสร้างเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนสในอาหารเหลวมีเดียม 73 เพื่อเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโปรติเอสแอคติวิตีสูง แล้วนำแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดเลือกนั้นไปทดลองปรับสภาวะการเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และแอคติวิตีของโปรติเอสต่อไป

1. <u>การแยกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูง</u>

ในการแยกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูงจากของเหลวในถังหมักปลา หลังการหมักประมาณ 1-2 เดือนซึ่งเป็นช่วงที่พบว่าเริ่มมีการเพิ่มจำนวนของกลุ่มแบคทีเรียที่คาดว่ามีบทบาทในการย่อยสลายเนื้อปลา (Santinanalerts,1979; สาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์, 2531) ได้แบคทีเรียชอบเค็มสูงทั้งหมด 13 ไอโซเลท

2. <u>การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์เจลลาทินเนสบนอาหารวุ้น</u> (ตารางที่ 1,2)

ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์เจลลาทินเนสบนอาหารวุ้นที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์จะไม่พบบริเวณใสจากเชื้อใดแต่ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) พบว่าเชื้อหมายเลข 1, 4, 8, 11, 13, และ 14 ให้ผล positive คือ เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี เชื้อหมายเลข 8 ผลิตเจลลาทินเนสบนอาหารวุ้นได้เร็วกว่าเชื้ออื่น ทั้งนี้เพราะสังเกตเห็นบริเวณใสรอบโคโลนี ตั้งแต่วันที่ 4 หลังการจุด (spot)เชื้อ เชื้อหมายเลข 1 สังเกตเห็นบริเวณใสในวันที่ 5 ส่วนเชื้อหมายเลข 4, 11, 13, และ 14 สังเกตเห็นบริเวณใสพร้อมกันคือในวันที่ 7 เชื้อหมายเลข 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, ให้ผล negative ในระยะเวลา 10 วัน ส่วนที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) พบว่าเชื้อที่ให้บริเวณใส

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบการผลิตเจลลาทินเนสในระยะเวลาต่าง ๆของเชื้อที่แยกได้บนอาหารวุ้น มีเดียม 73 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ หมายเลข	เวลา (วัน)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
14	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ หมายถึง เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

- หมายถึง ไม่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบการผลิตเจลลาทินเนสในระยะเวลาต่าง ๆของเชื้อที่แยกได้บนอาหารวุ้น มีเดียม 73 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์

เชื้อหมายเลข	เวลา (วัน)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
11	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
14	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
18	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
19	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+ หมายถึง เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

- หมายถึง ไม่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

รอบโคโลนีได้แก่เชื้อหมายเลข 1, 4, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18 และ 19 เชื้อหมายเลข 12, 15 และ 16 ให้ผล negative เชื้อหมายเลข 1, 8, และ 14 ผลิตเจลลาทินเนสบนอาหารวุ้นเร็วกว่าเชื้ออื่น คือสังเกตเห็นบริเวณใสรอบโคโลนี ตั้งแต่วันที่ 2 หลังจากการจุดเชื้อ เชื้อหมายเลข 13 สังเกตเห็นบริเวณใสในวันที่ 3 ส่วนเชื้อหมายเลข 4, 10, 11, 15, 18, และ 19 สังเกตเห็นบริเวณใสพร้อมกันใน วันที่ 5 สำหรับเชื้อหมายเลข 17 สังเกตเห็นบริเวณใสช้ากว่าเชื้ออื่น ๆ คือปรากฏใน วันที่ 6 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างกันความสามารถในการผลิตเอนไซม์เจลลาทินเนสก็ต่างกันด้วย เชื้อหมายเลข 1, 4, 8, 11, 13 และ 14 ผลิตเอนไซม์เจลลาทินเนส ทั้งที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ และ 25 เปอร์เซ็นต์ แต่เชื้อหมายเลข 10, 15, 17, 18 และ 19 ผลิตเอนไซม์เจลลาทินเนสเฉพาะที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นไม่ผลิตเอนไซม์เมื่อเลี้ยงในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเชื้อที่ผลิตเจลลาทินเนสบนอาหารวุ้นที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ มีมากกว่าที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้แบคทีเรียชอบเค็มที่แยกได้ ยังผลิตเจลลาทินเนสได้เร็วขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างเช่น เชื้อหมายเลข 1 ที่ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เกลือสร้างเอนไซม์ ในวันที่ 5 ในขณะที่ 25 เปอร์เซ็นต์ เกลือจะสร้างเอนไซม์ ในวันที่ 2 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะหลายสาเหตุ เช่น Bayley และ Kushner (1964) อธิบายว่าความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสม จะทำให้ไรโบโซมของแบคทีเรียชอบเค็มสูงอยู่ในรูปที่ทำงานได้ (active form) เช่น Halobacterium cutirubrum ต้องการโปแตสเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3.0-4.0 และ 0.1 โมลาร์ ตามลำดับ เพื่อทำให้ไรโบโซมสามารถทำงานได้ ถ้าความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมคลอไรด์ลดลงเหลือ 2.0 โมลาร์ และ 0.01 โมลาร์ตามลำดับ จะทำให้ไรโบโซมแยกตัวออกเป็นโปรตีนและกรดนิวคลีอิก (nucleic acids) ซึ่งเป็นรูปที่ทำงานไม่ได้ (inactive form)

3. ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์เคซิเนสบนอาหารวุ้น (ตารางที่ 3,4)

ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์เคซิเนสบนอาหารวุ้น พบว่าที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีเชื้อใดให้บริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่าไม่มีเชื้อใดผลิตเคซิเนส ส่วนที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) เชื้อที่ให้บริเวณใสรอบโคโลนี ได้แก่ เชื้อหมายเลข 1, 8, 13, 14 และ 19 โดยที่เชื้อหมายเลข 8 เกิดบริเวณใสเร็วที่สุด คือสังเกตเห็นในวันที่ 2 หลังจากการจุดเชื้อ เชื้อหมายเลข 1 เกิดบริเวณใสในวันที่ 7 ส่วนเชื้อหมายเลข 13,14 และ 19

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบการผลิตเคซิเนสในระยะเวลาต่าง ๆ ของเชื้อที่แยกได้บนอาหารวุ้นมีเดียม 73 ซึ่งมี 1% เคซิอีนแทนเจลลาทิน ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ หมายเลข	เวลา (วัน)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ หมายถึง เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

- หมายถึง ไม่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบการผลิตเคซิเนสในระยะเวลาต่าง ๆ ของเชื้อที่แยกได้บนอาหารวุ้นมีเดียม 73 ซึ่งมี 1% เคซีอีนแทนเจลลาทิน ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ หมายเลข	เวลา (วัน)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
14	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

+ หมายถึง เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

- หมายถึง ไม่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

ตารางที่ 5 สรุปผลการทดสอบเจลลาทินเนสและเคซิเนสของแบคทีเรียชอบเค็มที่แยกได้บนอาหารวุ้นมีเดียม 73 ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 15,20 และ 25 เปอร์เซ็นต์

เชื้อหมายเลข	เจลลาทินเนส			เคซิเนส		
	ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์(เปอร์เซ็นต์)			ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์(เปอร์เซ็นต์)		
	15	20*	25*	15	20*	25*
1	–	+(5)	+(2)	-	+(7)	+(4)
4	-	+(7)	+(5)	-	-	-
8	-	+(4)	+(2)	-	+(2)	+(2)
10	-	-	+(5)	-	-	-
11	-	+(7)	+(5)	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	+(7)	+(3)	-	+(10)	+(7)
14	-	+(7)	+(2)	-	+(10)	+(7)
15	-	-	+(5)	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	+(6)	-	-	-
18	-	-	+(5)	-	-	-
19	-	-	+(5)	-	+(10)	+(4)

\+ หมายถึงมีการผลิตเอ็นไซม์

\- หมายถึงไม่มีการผลิตเอ็นไซม์

* ตัวเลขในวงเล็บหมายถึงจำนวนวันหลังการเลี้ยงเชื้อที่ตรวจพบเอ็นไซม์

พบในวันที่ 10 สำหรับที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) พบว่าเชื้อที่ให้บริเวณใสเป็นเชื้อเดียวกันกับที่ให้ผล positive ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เชื้อหมายเลข 8 เกิดบริเวณใสเร็วกว่าเชื้ออื่น ๆ เช่นเดิม คือพบในวันที่ 2 เชื้อหมายเลข 1 และ 19 พบบริเวณใสรอบโคโลนีในวันที่ 4 ส่วนเชื้อหมายเลข 13 และ 14 สังเกตเห็นบริเวณใสรอบโคโลนีในวันที่ 7 จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน ความสามารถในการสร้างเอนไซม์เคซิเนสก็ต่างกันด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องจากเอนไซม์นี้ต้องการความเข้มข้นของเกลือสูงในการทำงาน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของกฎษดา (2529) และ Gibbons (1957) ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาทางชีวเคมี เช่น การย่อยสลายโปรตีน, การผลิตอินโดล และการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์จะเปลี่ยนแปลงไป เมื่อความเข้มข้นของเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไป ดังนั้นการรายงานผลของปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรียชอบเค็มนี้ควรจะระบุความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ทำการทดลองด้วย และควรจะทำการทดลองที่ความเข้มข้นของเกลือหลาย ๆ ความเข้มข้นก่อนที่จะรายงานผล

จากผลการทดลองคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิต ทั้งเจลลาทินเนส และเคซิเนส พบว่าเชื้อบางเชื้อผลิตทั้งเจลลาทินเนสและเคซิเนส (ตารางที่ 5) แต่บางเชื้อผลิตเฉพาะเจลลาทินเนส ทั้งนี้แสดงว่า เอนไซม์ทั้งสองเป็นคนละชนิด มีความจำเพาะกับซับสเตรทต่างกัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อที่ผลิตเคซิเนสจะผลิต เจลลาทินเนสด้วย

4. <u>ผลการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายเจลลาทินและเคซิอีน ของแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดเลือกไว้</u> (ตารางที่ 6)

ผลการวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง (ϕ) ของโคโลนีและบริเวณใสรอบโคโลนี ในการทดสอบการย่อยสลายเจลลาทินและเคซิอีนโดยแบคทีเรียชอบเค็ม ที่คัดเลือกไว้มีดังแสดงในตารางที่ 6

ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 สามารถย่อยสลายเจลลาทินและเคซิอีนได้ดีกว่าแบคทีเรียไอโซเลทอื่น ทั้งนี้เพราะอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนีและเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีมีค่าสูงมากกว่าอัตราส่วนที่คำนวณได้สำหรับแบคทีเรียชอบเค็มอีกสี่ไอโซเลทที่ใช้ในการทดลอง แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 14 มีความสามารถเท่ากันในการย่อยสลายเจลลาทินและเคซิอีนบนอาหารวุ้นดังจะเห็นได้จากอัตราส่วนที่มีค่าเท่ากัน (1.0) ส่วนแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 1,8,13 และ 19 ย่อยสลายเจลลาทินได้มากกว่าเคซิอีน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเจลลาทินเป็นคอลลาเจน (collagen) ที่ถูก denature แล้วในขบวนการผลิต (Difco manual,1984) จึงถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าเคซิอีนซึ่งมีโมเลกุลใหญ่ เพราะเป็นโปรตีนหลักของน้ำนม สิ่งที่น่าสนใจสำหรับผลการทดลองที่ได้คือ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียชอบเค็มที่ย่อยสลาย

เจลลาทินได้ดี จะย่อยสลายเคซีอีนได้ดีด้วยโดยที่ไอโซเลทหมายเลข 8 ย่อยเจลลาทินและเคซีอีนได้ดีกว่าไอโซเลทอื่น ดังนั้นในการทดสอบหาแอคติวิตีของโปรติเอสที่ผลิตโดย

ตารางที่ 6 ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายเจลลาทินและเคซีอีน

เชื้อหมายเลข	การย่อยสลายเจลลาทิน			การย่อยสลายเคซีอีน		
	ø ของบริเวณใส (มม.)	ø ของโคโลนี (มม.)	ø ของบริเวณใส / ø ของโคโลนี	ø ของบริเวณใส (มม.)	ø ของโคโลนี (มม.)	ø ของบริเวณใส / ø ของโคโลนี
1	20.0	1.0	20.0	2.0	1.0	2.0
8	30.0	0.5	60.0	1.5	0.5	3.0
13	14.0	1.0	14.0	1.5	1.0	1.5
14	0.2	0.2	1.0	0.2	0.2	1.0
19	10.0	1.0	10.0	1.5	1.0	1.5

แบคทีเรียชอบเค็มในอาหารเหลว จะใช้เคซีอีนเป็นซับสเตรทในการหาแอคติวิตี ทั้งนี้เพราะความสามารถในการย่อยเจลลาทินของแบคทีเรียชอบเค็มนี้มีความสัมพันธ์กับการย่อยเคซีอีน และการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของโปรติเอสโดยใช้เคซีอีนเป็นซับสเตรทนี้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ให้ผลรวดเร็วและใช้กันทั่วไป ส่วนการหาโปรติเอสแอคติวิตีโดยใช้เจลลาทินเป็นซับสเตรทนั้นยากกว่ามาก ต้องเตรียมเจลลาทินจากหางหนูหรือหนังลูกวัวโดยผ่านกรรมวิธีหลายขั้นตอน จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้หาแอคติวิตีของโปรติเอสในการทดลองนี้

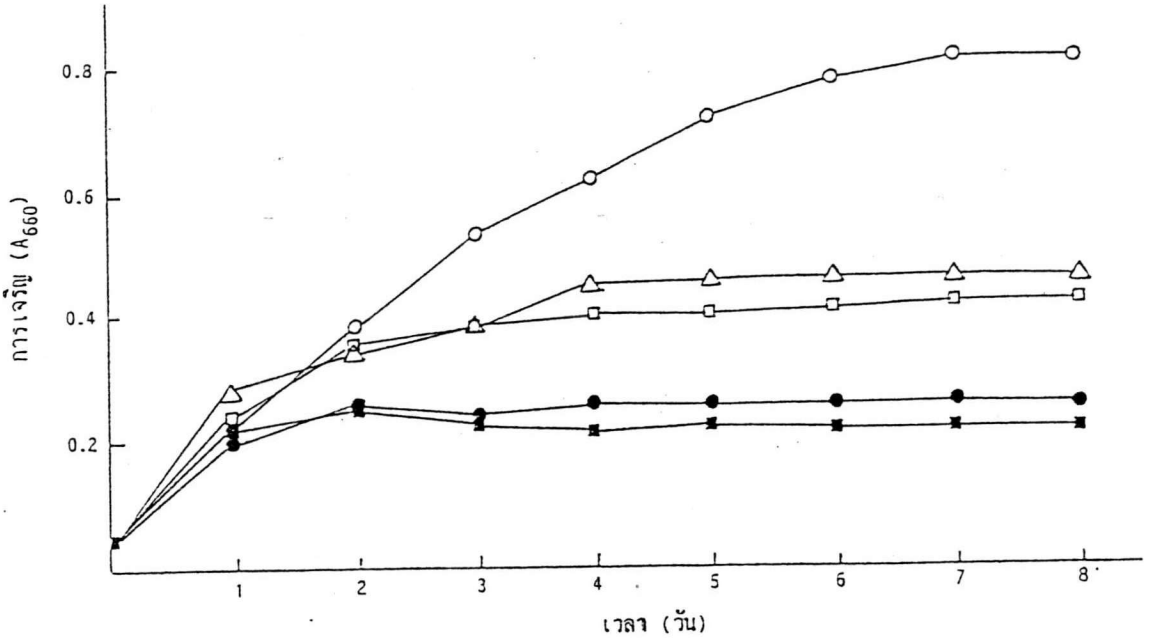
5. <u>ผลการทดลองการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนสในอาหารเหลว</u> (รูปที่ 1 2 และตารางที่ 7)

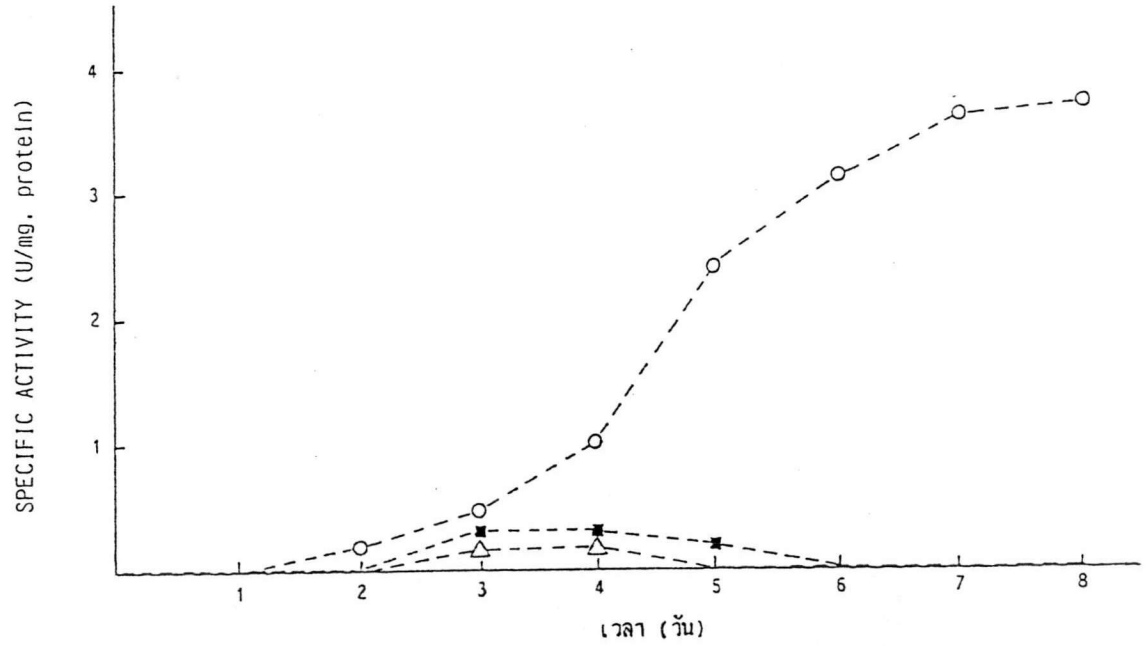
จากผลการวัดความขุ่น (รูปที่ 1) พบว่าแบคทีเรียหมายเลข 8 มีการเจริญเติบโตดีกว่าเชื้อหมายเลขอื่น ๆ คือ วัดความขุ่นที่ mid log phase ได้ 0.39 เชื้อหมายเลข 1 เจริญได้ดีรองลงมา วัดความขุ่นได้ 0.28 ซึ่งสูงกว่าเชื้อหมายเลข 13 เพียงเล็กน้อย คือ 0.25 ส่วนเชื้อหมายเลข 14 และ 19 เจริญได้น้อย วัดความขุ่นได้ 0.20 และ 0.09 ตามลำดับ

จากผลการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (รูปที่ 2) พบว่าเชื้อหมายเลข 8 ผลิตเอนไซม์โปรติเอสมากกว่าเชื้ออื่น ๆ คือ เชื้อหมายเลข 1,13,14,19 ซึ่งพบว่าผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 7)

ผลการทดลองวัดการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีเดียม73 นอกจากนี้ยังผลิตโปรติเอสที่มีแอคติวิตีสูงหลังจากเลี้ยงเชื้อแล้ว 4 วัน โดยจะได้แอคติวิตีสูงสุด (3.64 U/mg protein) หลังจากเลี้ยงเชื้อแล้ว 7 วัน ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นอีกว่า แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 จะผลิตโปรติเอสได้แอคติวิตีสูงในระยะ late exponential และ early stationary phase (รูปที่ 1,2)

ในการทดลองนี้เลือกใช้เคซีอีนเป็นซับสเตรทในการหาโปรติเอสแอคติวิตี ทั้งนี้เพราะจากการตรวจเอกสาร (บทที่ 2) พบว่า โปรตีนซับสเตรทสำหรับการหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสได้แก่ เคซีอีน ฮีโมโกลบิน ซับสเตรทที่สังเคราะห์ขึ้น หรือใช้เปปไทด์ ไม่พบการใช้เจลลาทิน





รูปที่ 1 และ 2 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียชอบเค็ม 5 ไอโซเลท ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	แบคทีเรียหมายเลข
△—△	△- - -△	1
○—○	○- - -○	8
□—□	□- - -□	13
●—●	●- - -●	14
■—■	■- - -■	19

หมายเหตุ แบคทีเรียหมายเลข 13,14 ไม่พบโปรติเอส แอคติวิตี

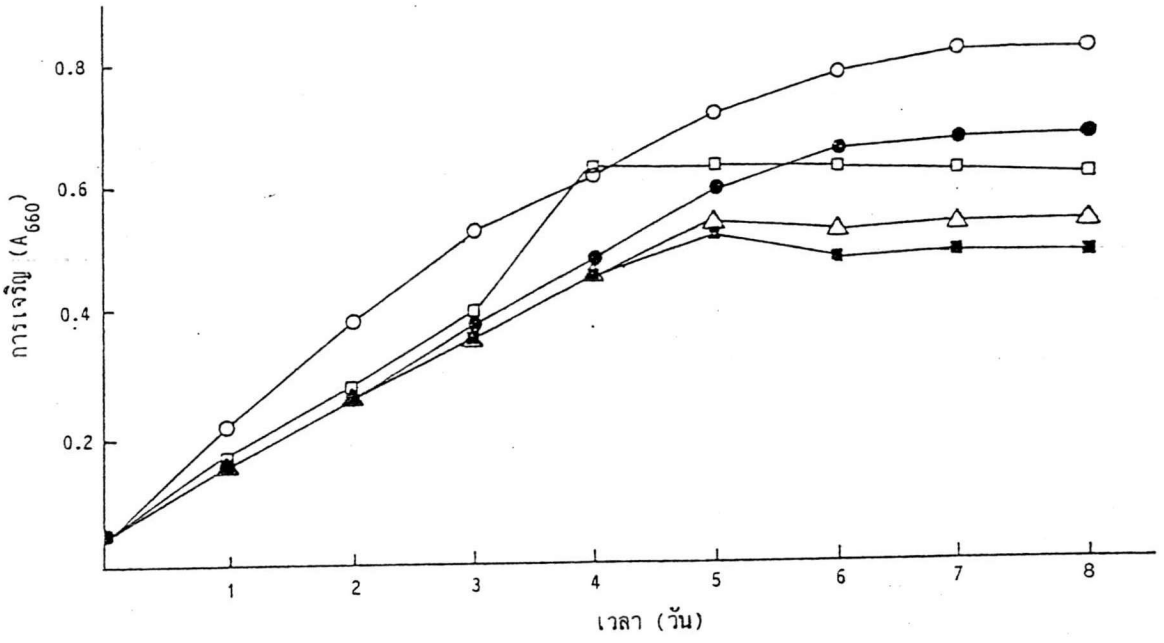
ตารางที่ 7 สรุปผลการคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตโปรติเอส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

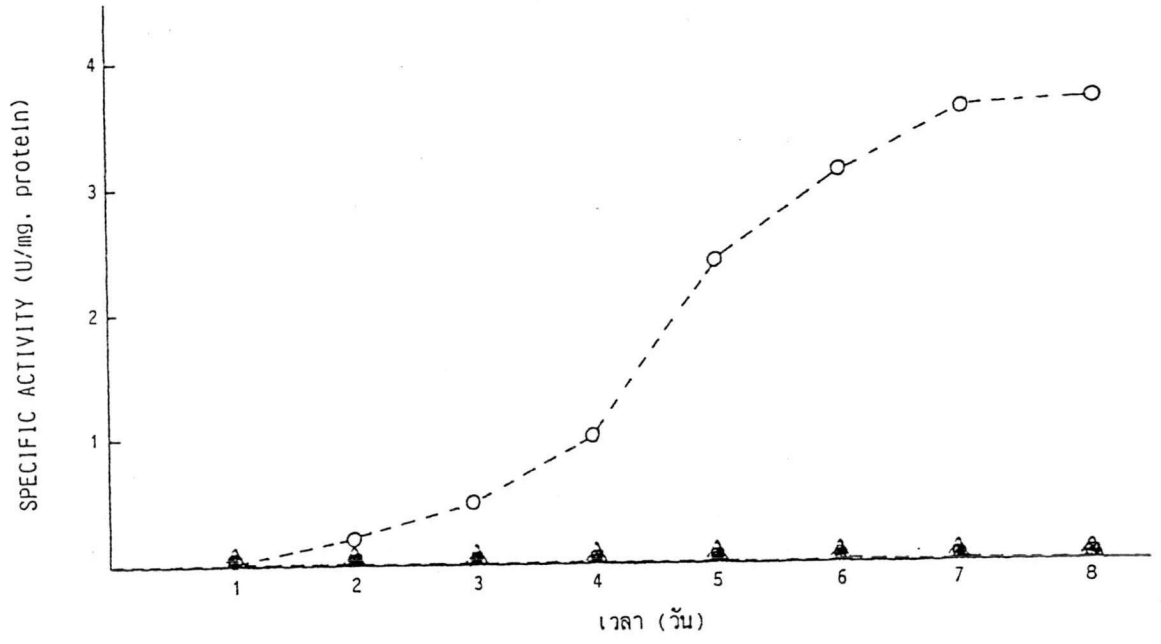
แบคทีเรียหมายเลข	การเจริญที่ Mid log phase		Specific Activity (U/mg protein)	
	A_{660}	จำนวนวันหลังการหมัก	Maximum	จำนวนวันหลังการหมัก
1	0.28	1	0.24	3
8	0.39	2	3.64	7
13	0.25	1	0.28	3
14	0.20	1	0.00	-
19	0.09	12 ชม.	0.30	3

6. ผลการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสม (รูปที่ 3,4 และตารางที่ 8)

อาจแบ่งอาหารเหลว 5 ชนิดที่เลือกมาใช้ในการทดลองได้เป็น 2 ประเภท คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารประกอบคาร์บอนและไนโตรเจนมาก ได้แก่ มีเดียม 73 และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารประกอบไนโตรเจนมาก ได้แก่ Complex medium of Sehgal, Complex medium of Dundas, Halobacterium medium broth และ Tryptone-yeast extract-salt medium

จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 5 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่สุด (รูปที่ 3) และผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากที่สุด (รูปที่ 4) ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้ออื่น ๆ คือ Complex medium of Sehgal and Gibbons, Tryptone-yeast extract-salt medium, Halobacterium medium broth และ Complex medium of Dundas เชื้อสามารถเจริญได้ดีตามลำดับ แต่ไม่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 (ตารางที่ 8)





รูปที่ 3 และ 4 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 5 ชนิด

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ชนิดของอาหารเลี้ยงเหลว
○—○	○- - -○	Medium 73
□—□	□- - -□	Tryptone-yeast extract-salt Medium
△—△	△- - -△	Halobacterium medium broth
●—●	●- - -●	Complex medium of Sehgal and Gibbons
■—■	■- - -■	Complex medium of Dundas

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 สรุปผลการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อใช้เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญที่ mid log phase		Specific Activity (U/mg protein)	
	A_{660}	จำนวนวันหลังการหมัก	Maximum	จำนวนวันหลังการหมัก
Medium 73	0.39	2	3.64	7
TYSM*	0.28	2	0.00	-
CSG*	0.27	2	0.00	-
CD*	0.26	2	0.00	-
HMB*	0.26	2	0.00	-

TYSM = Tryptone-yeast extract-salt Medium

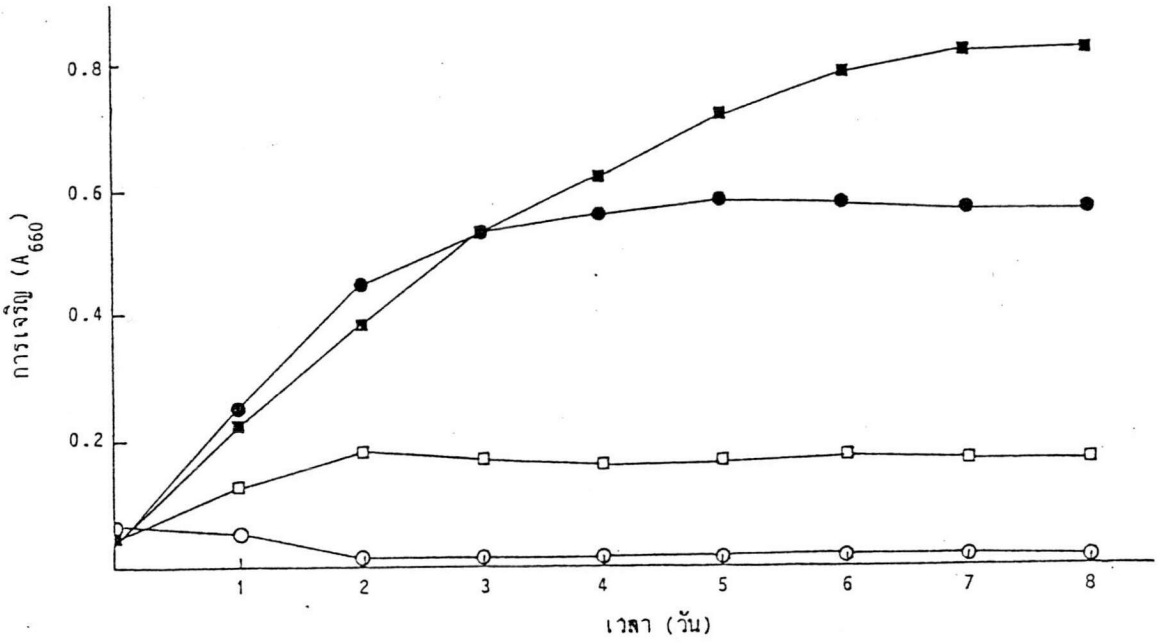
CSG = Complex medium of Sehgal and Gibbons

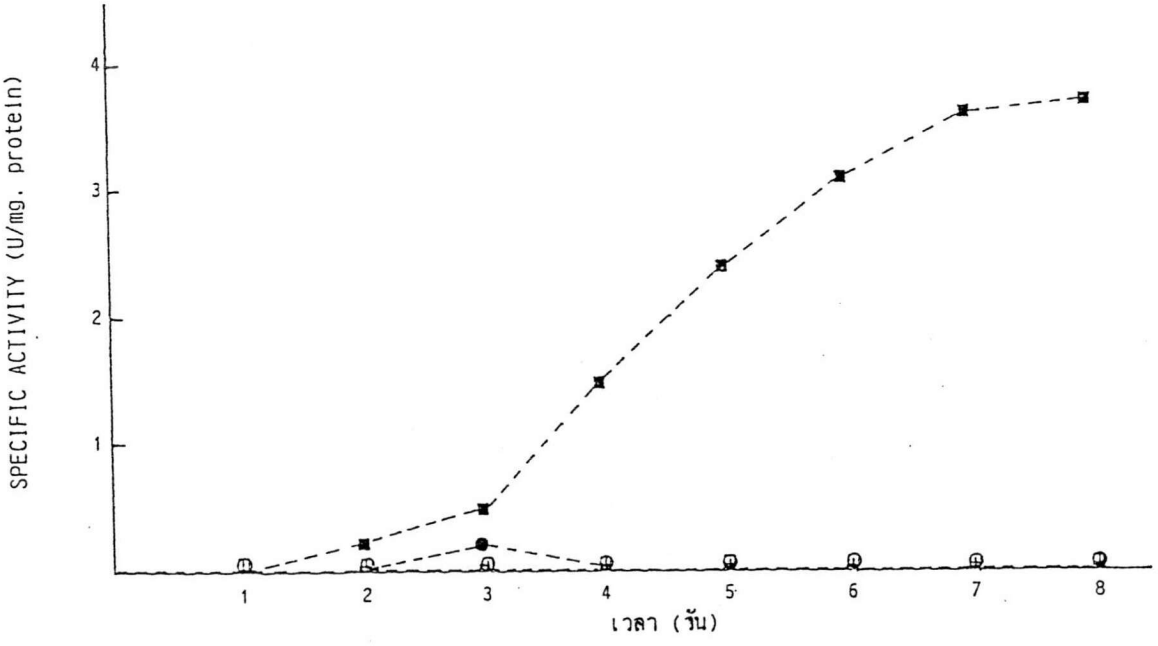
CD = Complex medium of Dundas

HMB = Halobacterium medium broth

7. ผลการปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (รูปที่ 5,6 และตารางที่ 9)

ผลการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์เชื้อเจริญได้น้อย และไม่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส ส่วนที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์เชื้อเจริญได้ดีขึ้นแต่ก็ไม่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสเช่นกัน สำหรับที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์เชื้อเจริญได้ดีที่สุด และผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มาก (รูปที่ 5,6 และตารางที่ 9) เนื่อง





รูปที่ 5 และ 6 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่แปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์
○—○	○--○	10 เปอร์เซ็นต์
□—□	□--□	15 เปอร์เซ็นต์
●—●	●--●	20 เปอร์เซ็นต์
■—■	■--■	25 เปอร์เซ็นต์

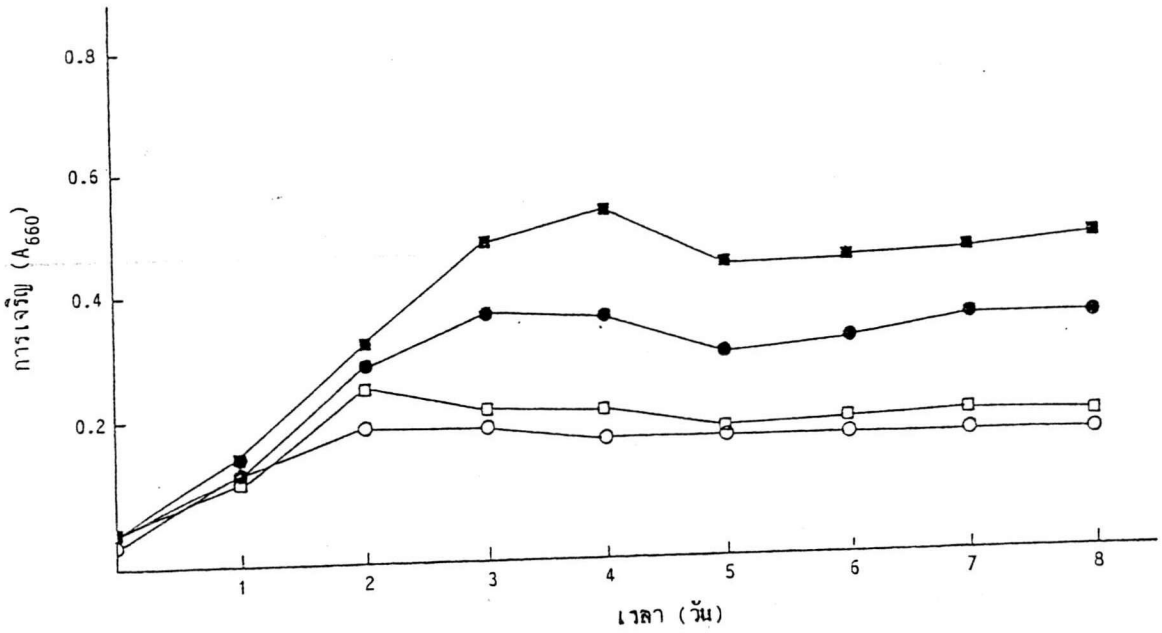
จากเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียชอบเค็มสูง จึงเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือสูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งพบว่าได้ผลสอดคล้องกับการทดลองของกฤษดา (2529)

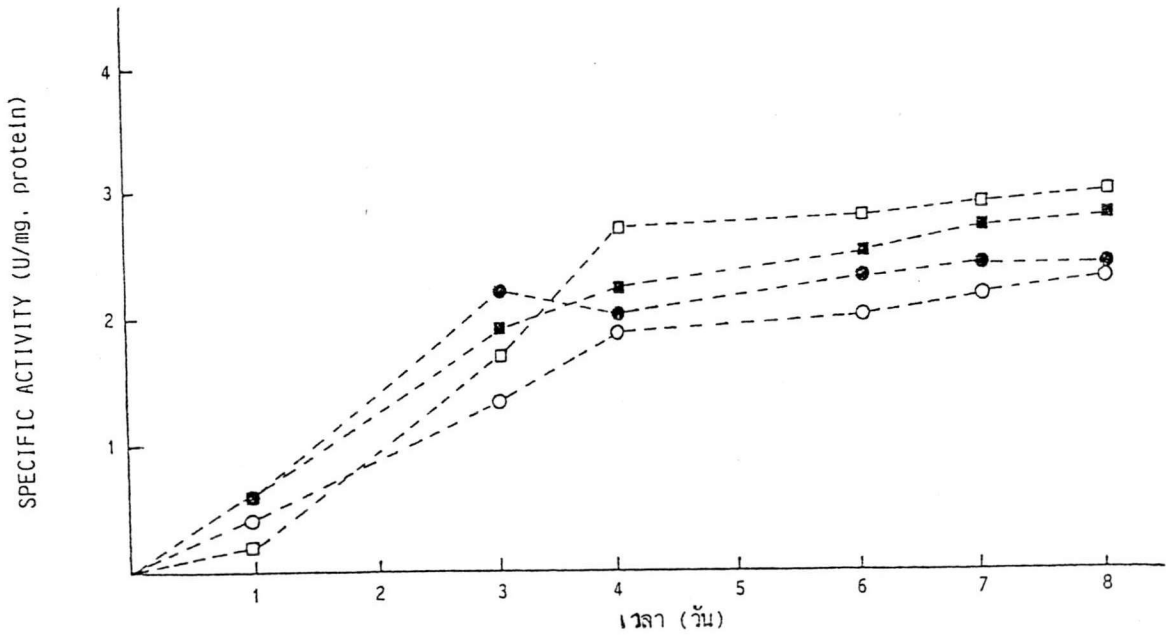
ตารางที่ 9 สรุปผลการคัดเลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (เปอร์เซ็นต์)	การเจริญที่ mid log phase		Specific Activity	
	A_{660}	จำนวนวันหลังการหมัก	Maximum	จำนวนวันหลังการหมัก
10	ไม่มีการเจริญ	-	0.00	–
15	0.12	1	0.00	–
20	0.26	1	0.18	3
25	0.39	2	3.64	7

8. ผลการแปรความเข้มข้นของเจลลาทินซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

ในการแปรแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ได้แปรแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนพร้อมกัน ทั้งนี้เพราะเจลลาทินเป็นสารที่เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (Bidochka and Khachatourians,1988) ผลการแปรความเข้มข้นของเจลลาทินแสดงใน รูปที่ 7,8 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีเดียม 73 ที่ไม่มีผงสกัดจากยีสต์ แต่แปรความเข้มข้นของเจลลาทิน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าผงสกัดจากยีสต์เสริมการเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ทั้งนี้เพราะปริมาณการเจริญและแอคติวิตีของโปรติเอสลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะคอนโทรล (Control) คือการเลี้ยงเชื้อในมีเดียม 73 ผงสกัดจากยีสต์ในมีเดียม 73 เป็นทั้งแหล่งไนโตรเจนและแหล่งวิตามินบีรวม (B-Complex Vitamins) ซึ่งกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียเป็นอย่างดี (Difco Manual, 10^{th} edition) ในกรณีที่ไม่มีการเติมผงสกัดจากยีสต์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเจลลาทินจาก0.5เปอร์เซ็นต์ เป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรีย จะเจริญได้ดีขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเจลลาทินเพิ่มขึ้น การเลี้ยง





รูปที่ 7 และ 8 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่ไม่มีผงสกัดจากยีสต์ และแปรความเข้มข้นของเจลลาทิน

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของเจลลาทิน
○—○	○- -○	0.25 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.5 เปอร์เซ็นต์
●—●	●- -●	1.0 เปอร์เซ็นต์
■—■	■- -■	1.5 เปอร์เซ็นต์

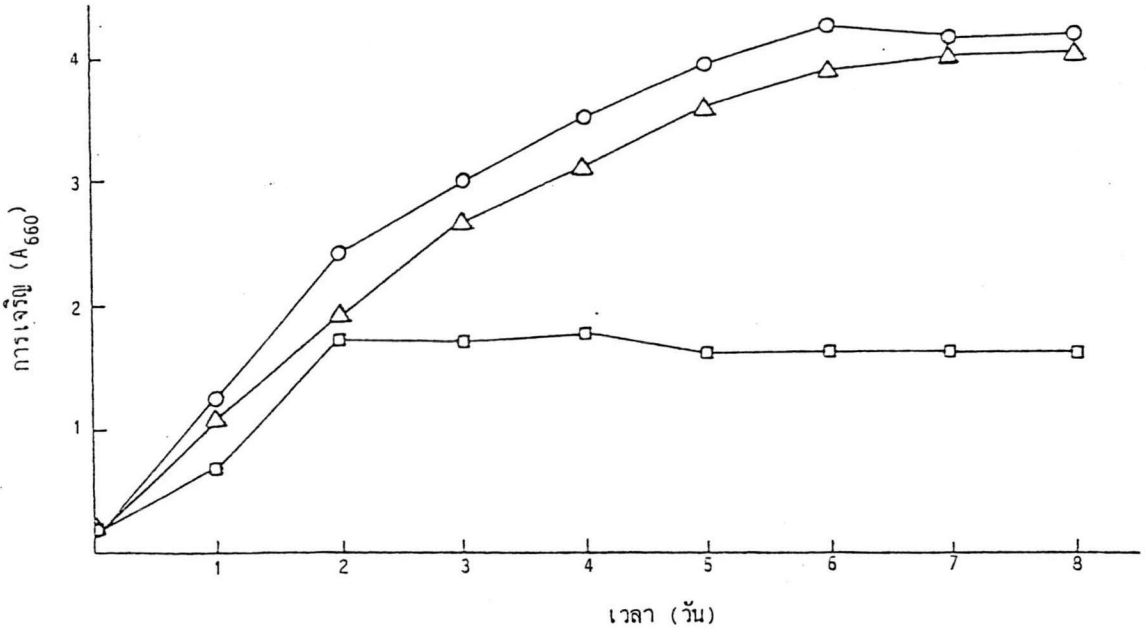
แบคทีเรียหมายเลข 8 ในเจลลาทินที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ได้ค่าโปรติเอสแอคติวิตีใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากวัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์นี้เพื่อหาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณเซลล์และแอคติวิตีของโปรติเอสสูงในระยะเวลาสั้น และประหยัดค่าใช้จ่าย ผู้ทดลองจึงเลือกศึกษาการแปรปริมาณธาตุอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีความเข้มข้นของเจลลาทินที่ 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังทดลองใช้ความเข้มข้นของเจลลาทินเท่ากับ 0.25 เปอร์เซ็นต์เพื่อตรวจสอบว่า ถ้าลดปริมาณเจลลาทินในอาหารเลี้ยงเชื้อลงเหลือ 0.25 เปอร์เซ็นต์ จะได้ปริมาณเซลล์และโปรติเอสแอคติวิตีสูงขึ้นหรือไม่

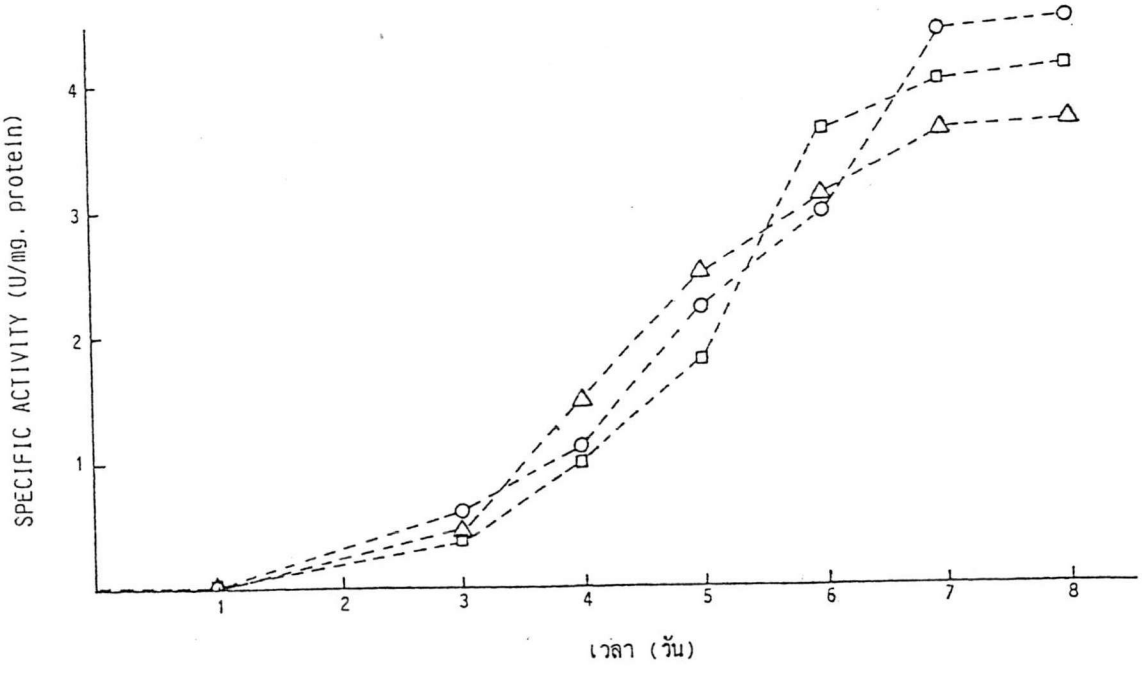
9. ผลการทดลองเมื่อใส่เจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ในมีเดียม 73

9.1 ผลการแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน (รูปที่ 9,10)

ในการทดลองนี้ต้องการทดสอบว่าจะใช้แหล่งไนโตรเจนอื่นแทนผงสกัดจากยีสต์ได้หรือไม่ จึงเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 แล้วใช้กรดแคสอะมิโน ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์(organic nitrogen) และแอมโมเนียมคลอไรด์ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) เปรียบเทียบกับผงสกัดจากยีสต์ ผลการทดลอง (รูปที่ 9,10) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 เจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีกรดแคสอะมิโนหรือผงสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไม่ทำให้แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 เจริญได้ดีแต่ทำให้มีโปรติเอสแอคติวิตีใกล้เคียงกับเมื่อใช้ผงสกัดจากยีสต์หรือกรดแคสอะมิโนในความเข้มข้นเดียวกัน การที่แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1เปอร์เซ็นต์ไม่ทำให้แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 เจริญได้ดี แต่ทำให้แบคทีเรียนี้ผลิตโปรติเอสที่มีแอคติวิตีสูงใกล้เคียงกับเมื่อใช้ผงสกัดจากยีสต์หรือกรดแคสที่ความเข้มข้นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียมอิออนอาจเหนี่ยวนำ (induce) ให้มีการผลิตโปรติเอสในปริมาณสูง ในปี ค.ศ. 1988 Kole, Draper and Gerson รายงานว่าในการผลิตโปรติเอสโดย Bacillus subtilis แอมโมเนียมอิออนทำให้การผลิตโปรติเอสเพิ่มขึ้น 5 เท่า ในปี ค.ศ. 1972 Cazzulo and Videl รายงานว่าแอมโมเนียมอิออนช่วย (support) การทำงานของมาลิคเอนไซม์ (malic enzyme)ในแบคทีเรียชอบเค็มสูง Halobacterium cutirubrum

การที่กรดแคสอะมิโนและผงสกัดจากยีสต์ ทำให้แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 เจริญเติบโตได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในแอมโมเนียมคลอไรด์อาจเป็นเพราะกรดอะมิโน มีโปรลีน (proline) เป็นองค์ประกอบอยู่ 8.76 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10) และผงสกัดจากยีสต์มีโปรลีนอยู่เพียง 2.29 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) จากรายงานของ Le Rudulier et al ในปี ค.ศ. 1984 กล่าวว่า โปรลีนเป็น osmoprotectant ที่พบมากในพวกสิ่งมีชีวิต





รูปที่ 9 และ 10 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาติน 1 เปอร์เซ็นต์ และแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	แหล่งไนโตรเจน	
○—○	○- -○	กรดแคสอะมิโน	0.1 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	แอมโมเนียมคลอไรด์	0.1 เปอร์เซ็นต์
△—△	△- -△	ผงสกัดจากยีสต์	0.1 เปอร์เซ็นต์

ชอบเค็ม ช่วยให้สิ่งมีชีวิตเหล่านี้เจริญได้ดีในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติคสูง

9.2 ผลการหาความเข้มข้นที่ของผงสกัดจากยีสต์ในมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 11,12)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์เป็น 0.1,0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญใกล้เคียงกัน แต่โปรติเอสแอคติวิตีลดลงเมื่อปริมาณผงสกัดจากยีสต์เพิ่มขึ้น แสดงว่าปริมาณผงสกัดจากยีสต์ที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของโปรติเอสในรูปของเคชิเนส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมคือ 0.1 เปอร์เซ็นต์

9.3 ผลการแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ (รูปที่ 13,14) ในมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์

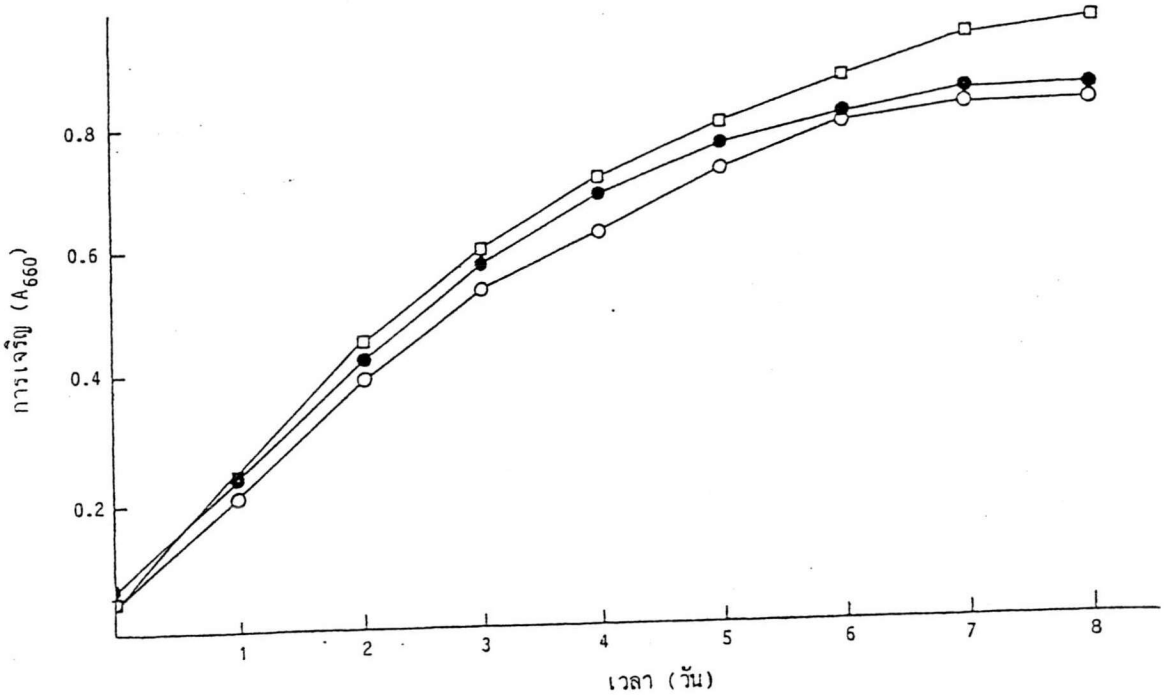
เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีความเข้มข้นของเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เป็น 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ไม่ทำให้การเจริญเพิ่มขึ้นทัดเทียมกับเมื่อใช้ผงสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นคอนโทรล ถึงแม้ว่าที่แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์จะมีโปรติเอสแอคติวิตีสูงเท่าเทียมกัน

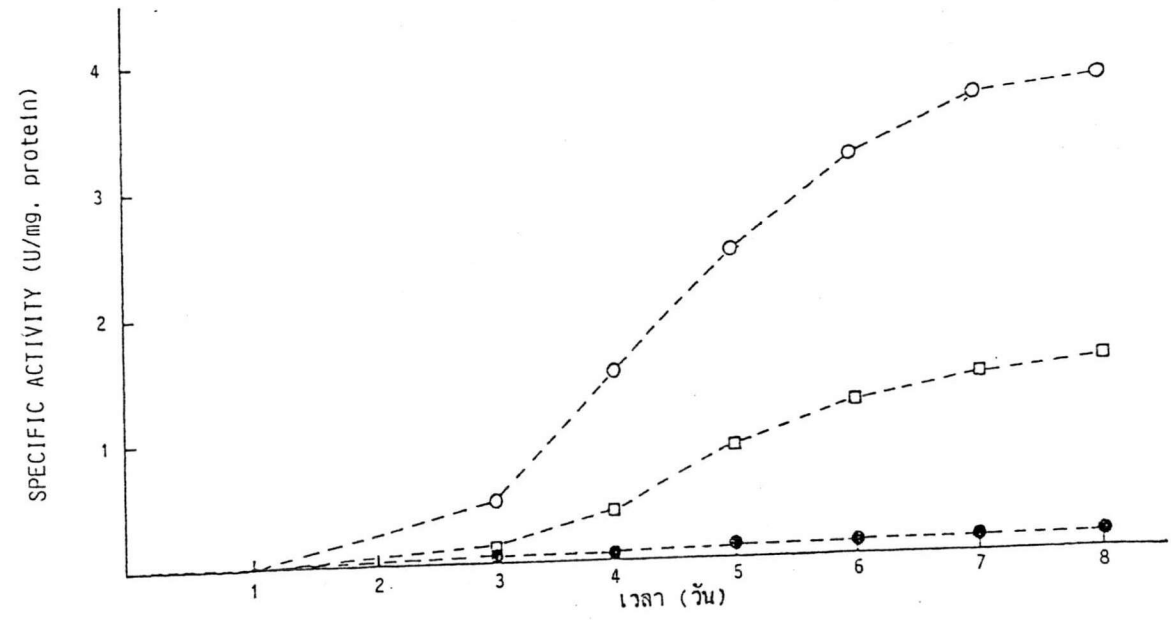
9.4 ผลการแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโนในมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 15,16)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 และแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโนเป็น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโนการเจริญใกล้เคียงกัน แต่โปรติเอสแอคติวิตีลดลง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรดแคสอะมิโนที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ให้โปรติเอสแอคติวิตีสูงสุด

9.5 ผลการแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ เมื่อใส่ผงสกัดจากยีสต์หรือกรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 17, 18)

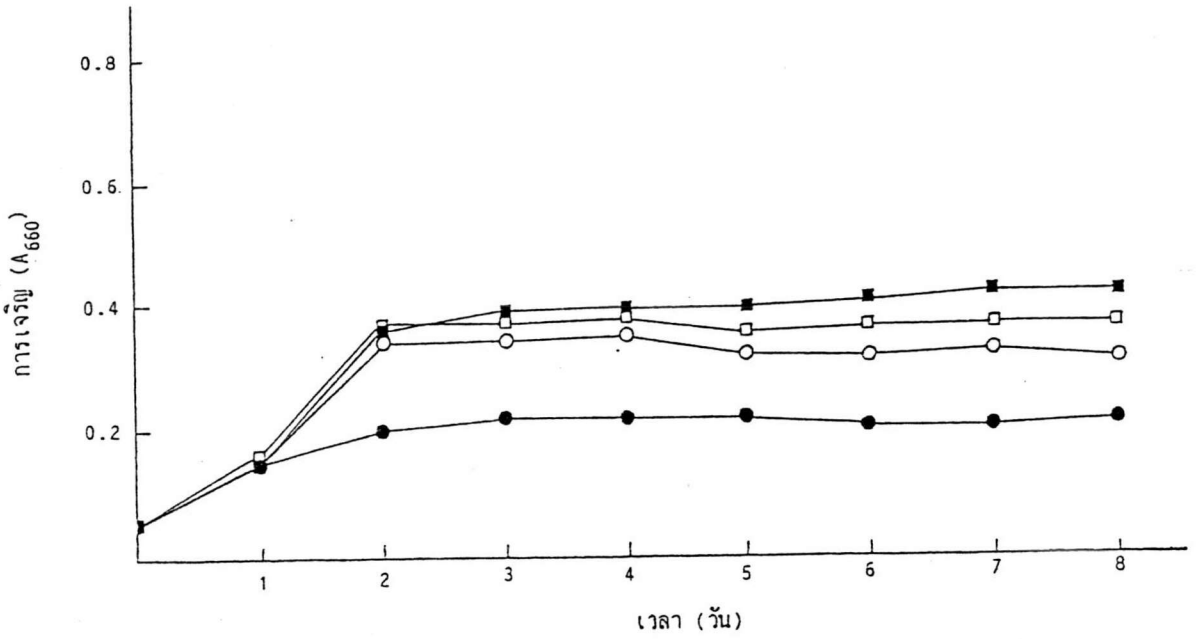
เนื่องจากวัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ที่มีโปรติเอสแอคติวิตีสูง และในขณะเดียวกันก็พยายามลดต้นทุนการผลิต จึงทำการทดลองใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ผสมกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เพื่อลดปริมาณการใช้แหล่งไนโตรเจน

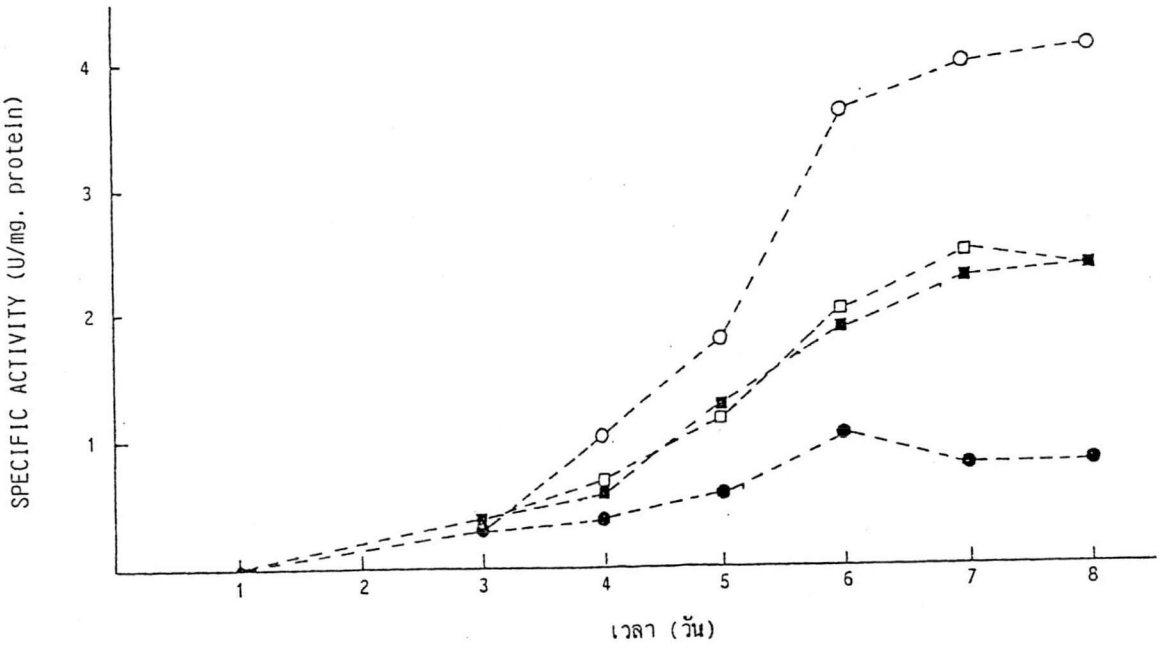




รูปที่ 11 และ 12 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 1 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์

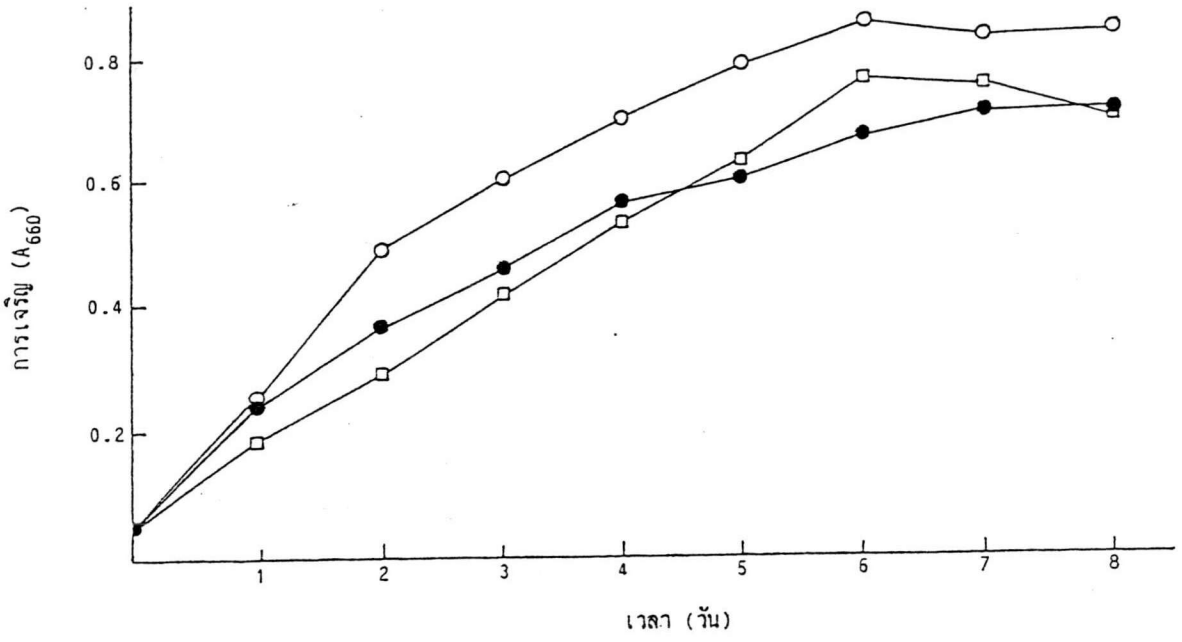
การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์
○—○	○—○	0.1 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.5 เปอร์เซ็นต์
●—●	●- -●	1.0 เปอร์เซ็นต์

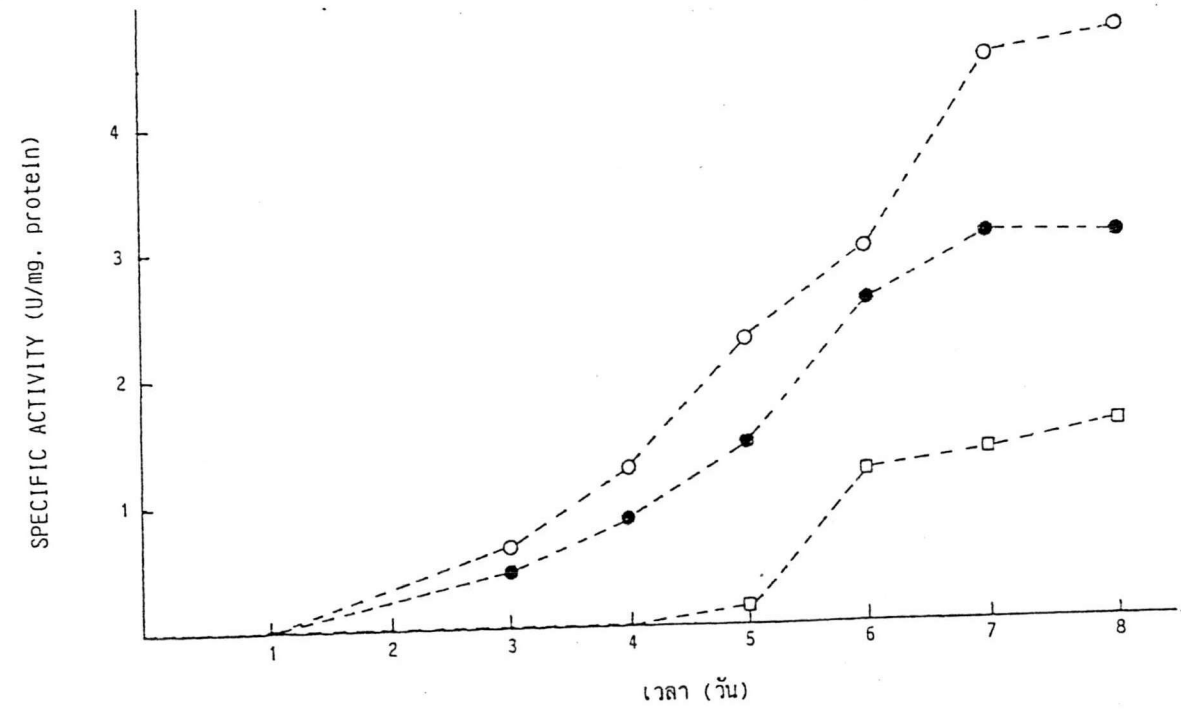




รูปที่ 13 และ 14 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 1 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

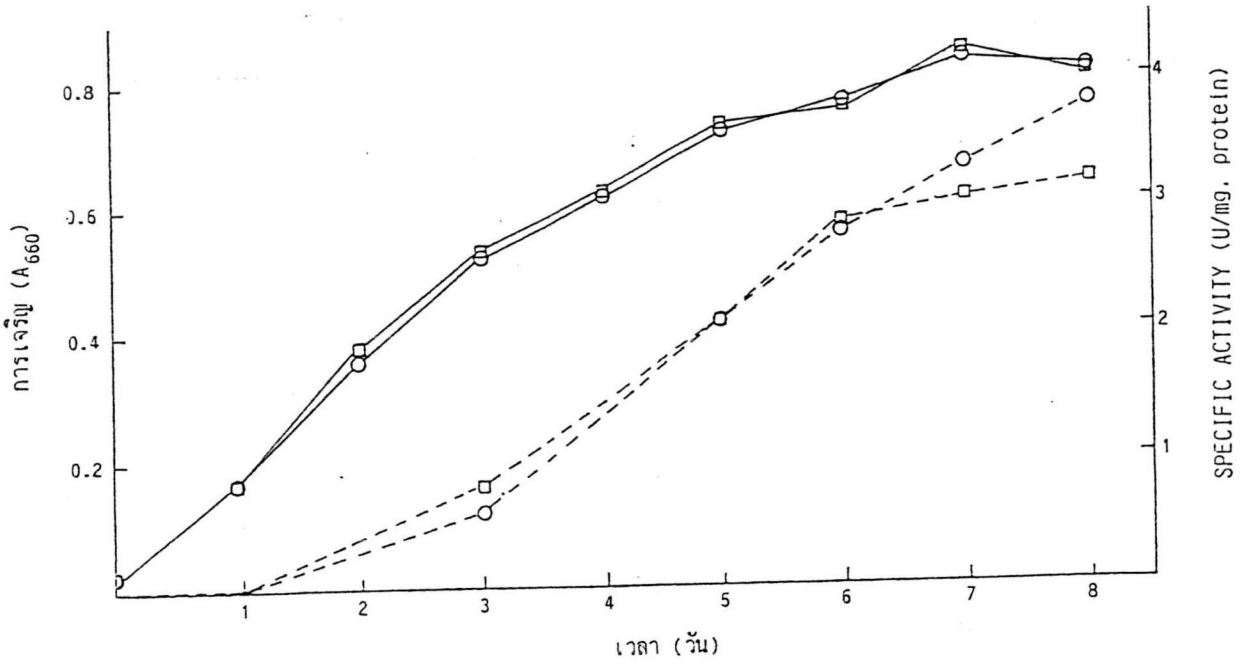
การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์
○—○	○—○	0.1 เปอร์เซ็นต์
□—□	□—□	0.5 เปอร์เซ็นต์
●—●	●—●	1.0 เปอร์เซ็นต์
■—■	■—■	1.5 เปอร์เซ็นต์





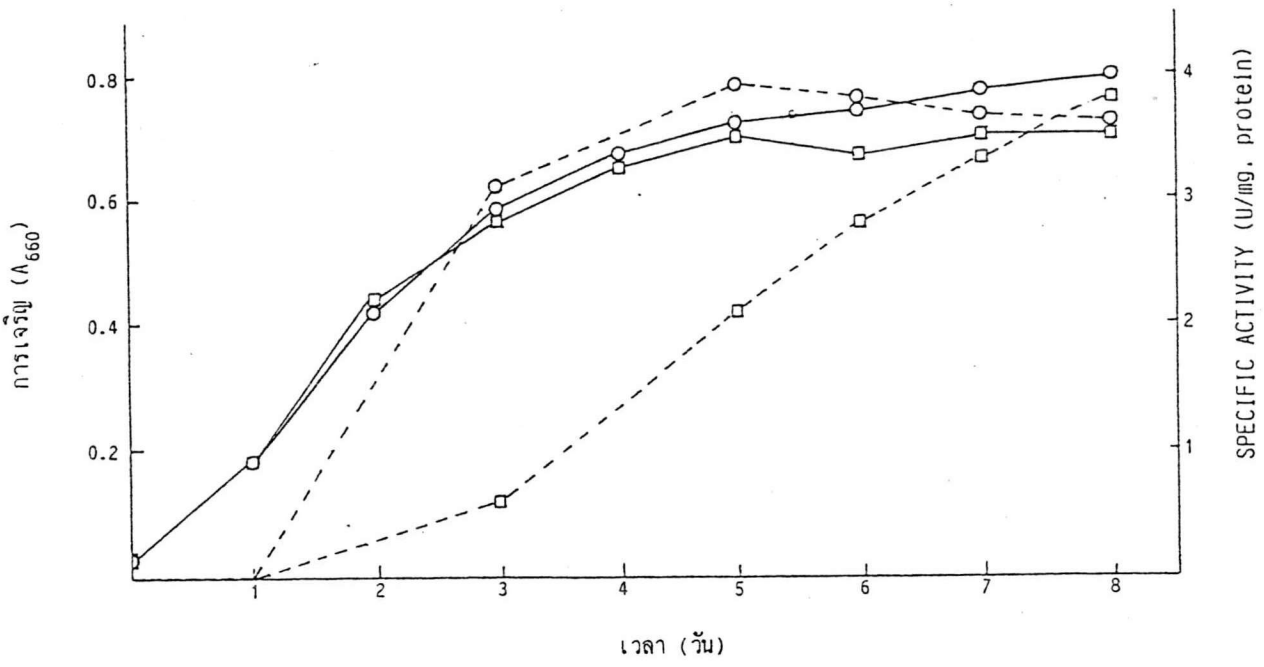
รูปที่ 15 และ 16 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 1 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโน

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโน
○—○	○- -○	0.1 เปอร์เซ็นต์
●—●	●- -●	0.5 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	1.0 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 17 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 1 เปอร์เซ็นต์ ผงสกัดจากยีสต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์
○—○	○- -○	0.05 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.1 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 18 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 1 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์
○—○	○- -○	0.05 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.10 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 10 ปริมาณกรดอะมิโนในกรดแคสอะมิโน

AMINO ACID	CONCN.	AMINO ACID	CONCN.
Cystine	*	Isoleucine	3.09
Methionine	2.08	Leucine	6.45
Aspartic	4.56	Tyrosine	0.33
Threonine	2.89	Phenylalanine	2.68
Serine	3.69	Lysine	5.53
Glutamic	12.78	Ammonia	0.44
Glycine	1.40	Histidine	1.80
Alanine	2.67	Tryptophan	-
Valine	4.05	Arginine	2.51
Proline (440)	8.76		

หมายเหตุ หน่วยเป็น กรัม กรดอะมิโน /100 กรัมของตัวอย่าง
รายงานการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer Hitachi 835-50
จากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
* ปริมาณน้อยมากจนวิเคราะห์ไม่ได้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ปริมาณกรดอะมิโนในผงสกัดจากยีสต์

AMINO ACID	CONCN.	AMINO ACID	CONCN.
Cystine	0.55	Isoleucine	3.09
Methionine	1.02	Leucine	4.26
Aspartic	5.80	Tyrosine	1.00
Threonine	2.61	Phenylalanine	2.52
Serine	2.66	Lysine	4.41
Glutamic	10.21	Ammonia	1.16
Glycine	2.63	Histidine	1.02
Alanine	4.53	Tryptophan	-
Valine	3.68	Arginine	2.20
Proline (440)	2.29		

หมายเหตุ หน่วยเป็น กรัม กรดอะมิโน /100 กรัมของตัวอย่าง

รายงานการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer Hitachi 835-50 จากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อินทรีย์ซึ่งมีราคาสูง นอกจากนี้การเพิ่มแอมโมเนียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นผลดี เพราะแอมโมเนียมคลอไรด์อาจเหนี่ยวนำการสร้างโปรติเอสในรูปของเคซิเนส เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ และผงสกัดจากยีสต์หรือ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์แล้ว แปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เป็น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญใกล้เคียงกัน แต่ที่กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ให้โปรติเอสแอคติวิตีสูงกว่าและ เร็วกว่าคอนโทรล (ตารางที่ 12)

10. ผลการทดลองเมื่อใส่เจลลาทิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ในมีเดียม 73

10.1 ผลการแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์(รูปที่ 19,20)

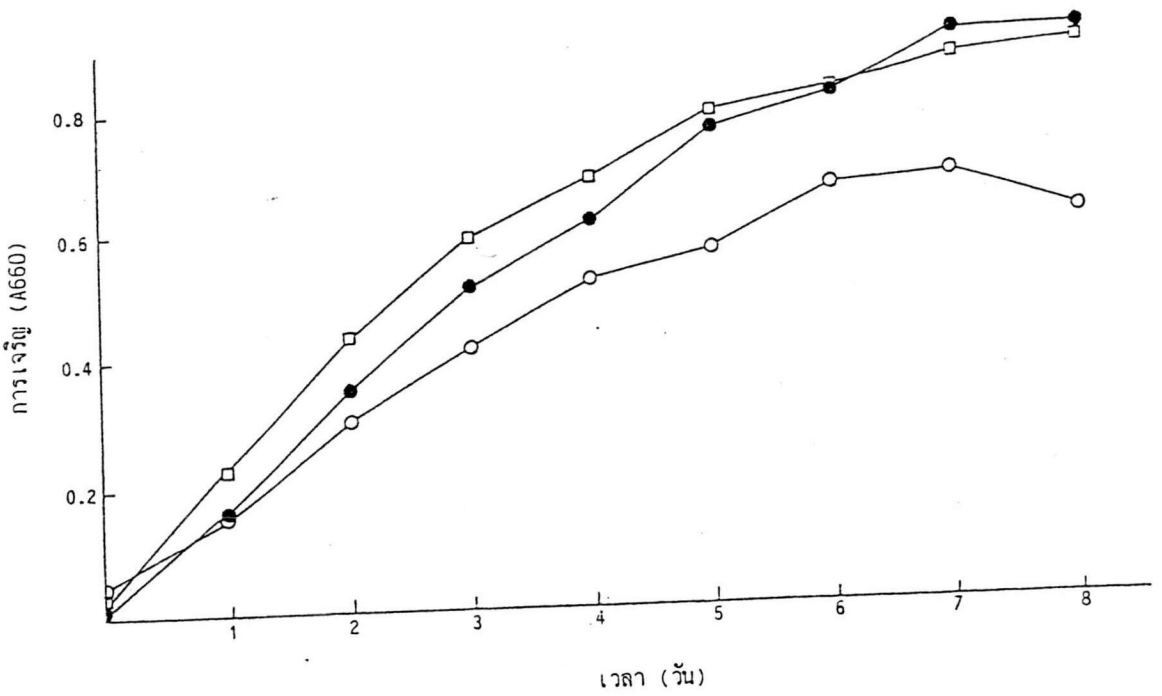
เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในมีเดียม 73 โดยลดเจลลาทินลง 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์เป็น 0.1, 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าต้องใช้ผงสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ จึงจะทำให้การเจริญมากกว่าคอนโทรลเล็กน้อย แต่แอคติวิตีน้อยกว่า และเมื่อใช้ผงสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซนต์ จะได้การเจริญน้อยกว่าคอนโทรลและได้แอคติวิตีสูงสุดช้ากว่าคอนโทรลอีกด้วย (ตารางที่ 12) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อลดความเข้มข้นของเจลลาทินลง 0.5 เปอร์เซนต์ จะต้องใช้ผงสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นพอเหมาะ (0.2%) จึงจะได้การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีสูง

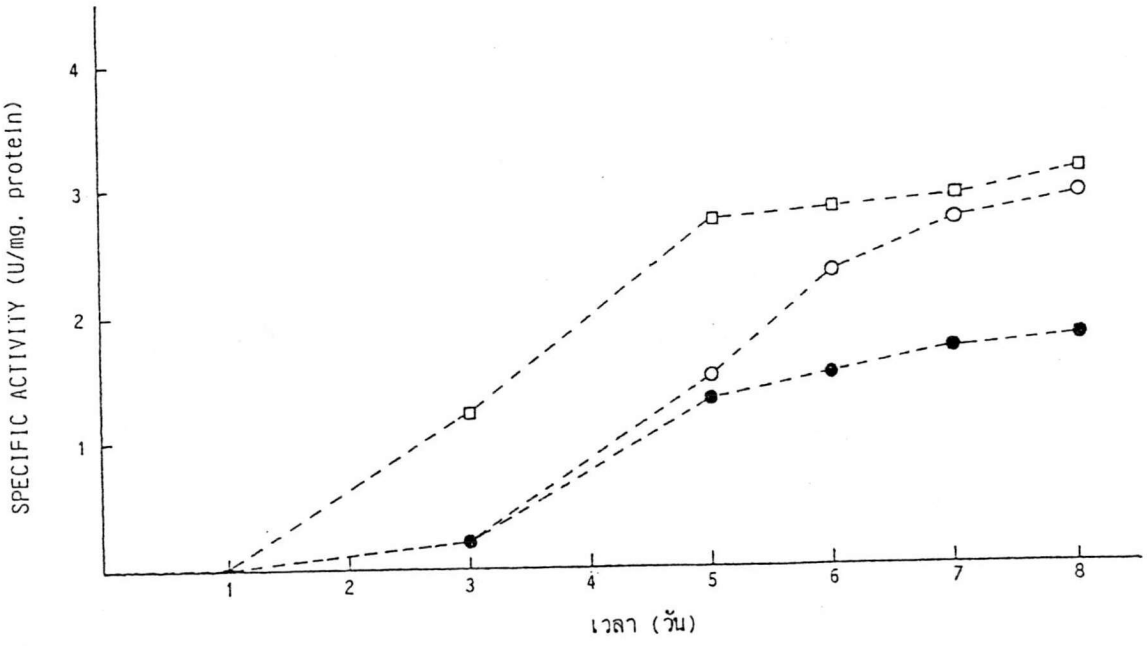
10.2 ผลการแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโนในมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 21,22)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในมีเดียม 73 ที่ลดความเข้มข้นเจลลาทินเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโนเป็น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญใกล้เคียงกัน แต่ที่ 0.05 เปอร์เซ็นต์ให้โปรติเอสแอคติวิตีสูงกว่าคอนโทรล (ตารางที่ 12)

10.3 ผลการแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ เมื่อใส่ผงสกัดจากยีสต์หรือกรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 23,24)

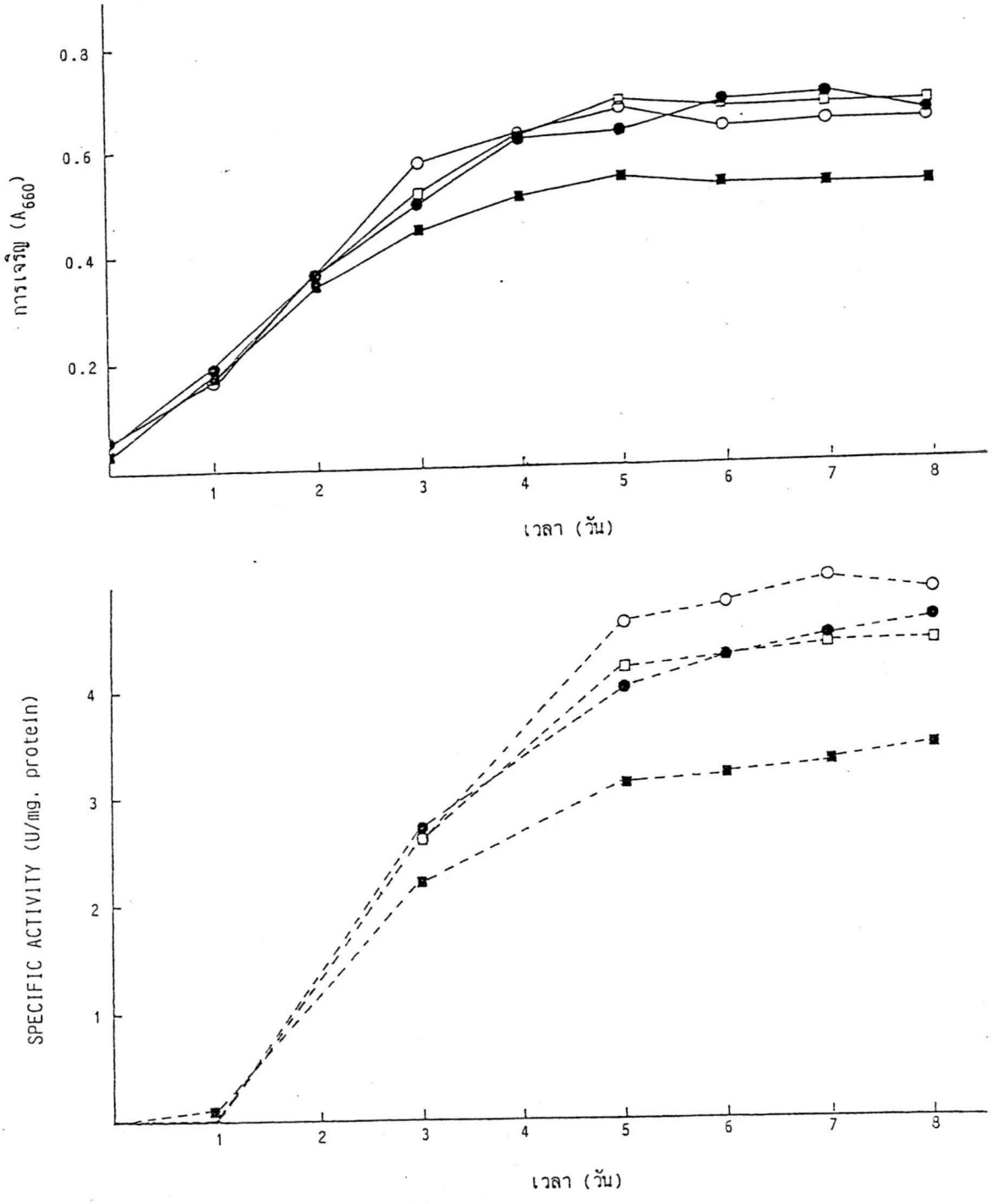
เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูง หมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่ลดความเข้มข้นของเจลลาทินเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และใส่กรดแคสอะมิโนหรือผงสกัดจากยีสต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ ผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มแอมโมเนียมคลอไรด์ลงในกรดแคสอะมิโนสามารถเพิ่มการเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีได้มากกว่าเมื่อเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ลงในผงสกัดจากยีสต์ดังนั้น สูตรอาหารที่น่าสนใจคือ มีเดียม 73 ที่ดัดแปลงให้มีเจลลาทิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ กรดแคส





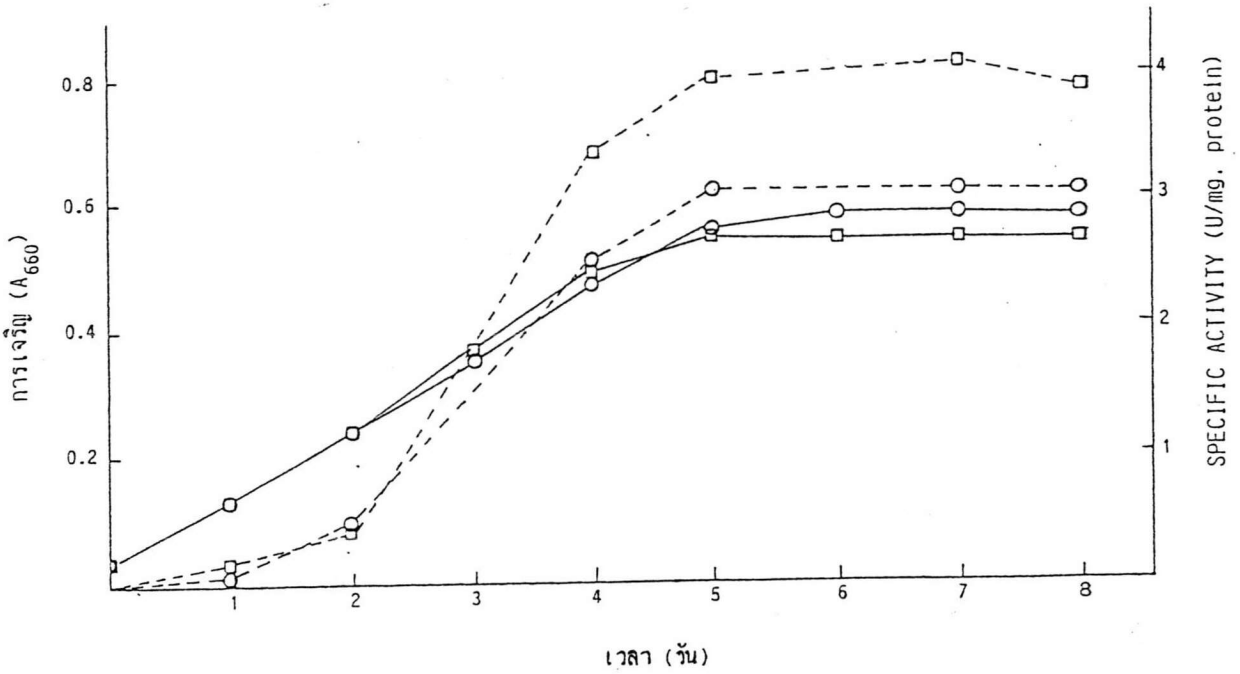
รูปที่ 19 และ 20 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์
○—○	○- -○	0.1 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.2 เปอร์เซ็นต์
●—●	●- -●	0.5 เปอร์เซ็นต์



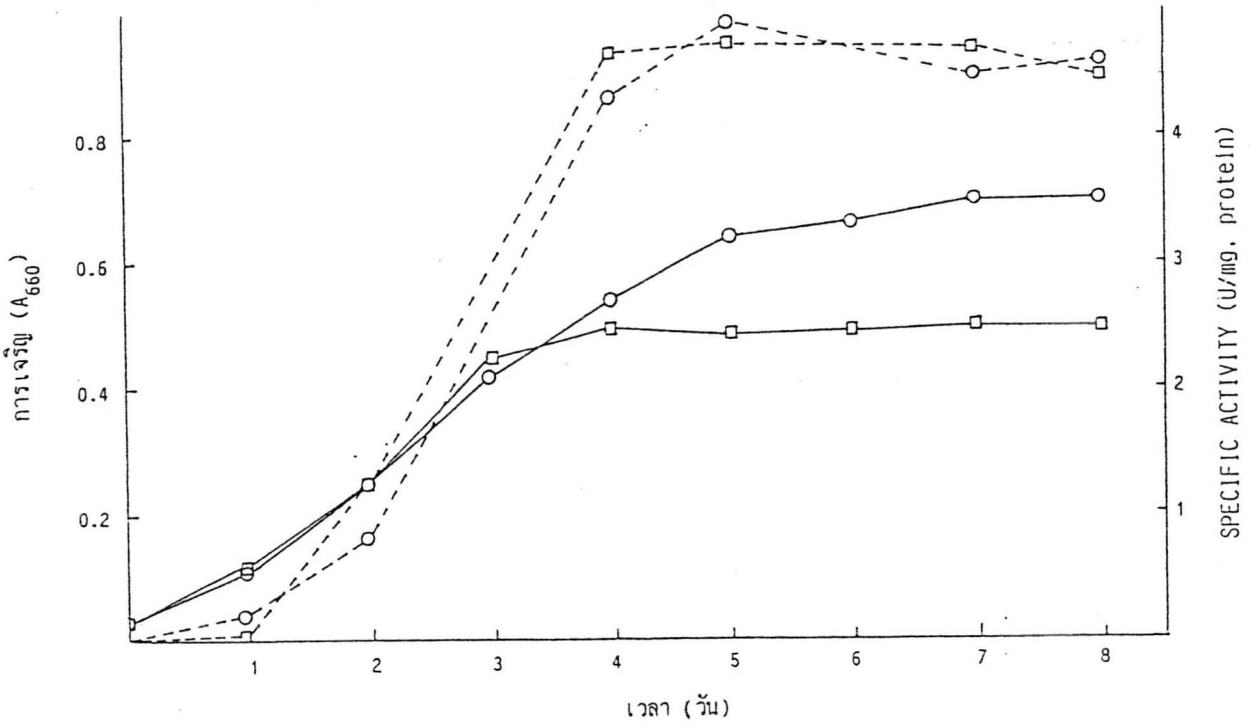
รูปที่ 21 และ 22 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโน

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโน
○—○	○--○	0.05 เปอร์เซ็นต์
●—●	●--●	0.1 เปอร์เซ็นต์
□—□	□--□	0.2 เปอร์เซ็นต์
■—■	■--■	0.5 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 23 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผงสกัดจากยีสต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์
○—○	○- -○	0.05 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.10 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 24 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์
○—○	○- -○	0.05 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.10 เปอร์เซ็นต์

อะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเทียบผลการทดลองนี้กับผลการทดลองข้อ 9.5 พบว่า การเจริญน้อยกว่า แต่แอคติวิตีสูงกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเซลล์ต้องเร่งผลิตโปรติเอส เพื่อไปย่อยสลายเจลลาทิน ให้เป็นสารอาหารในการเติบโต (ตารางที่ 12)

11. ผลการทดลองเมื่อใส่เจลลาทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ในมีเดียม 73

11.1 ผลการแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์ (รูปที่ 25,26)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในมีเดียม 73 ที่มีความเข้มข้นของเจลลาทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์เป็น 0.1, 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองพบว่าถ้าลดความเข้มข้นของเจลลาทินลง ต้องใช้ผงสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ จึงจะมีการเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีใกล้เคียงกับคอนโทรล (ตารางที่ 12)

11.2 ผลการแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโนในมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 27,28)

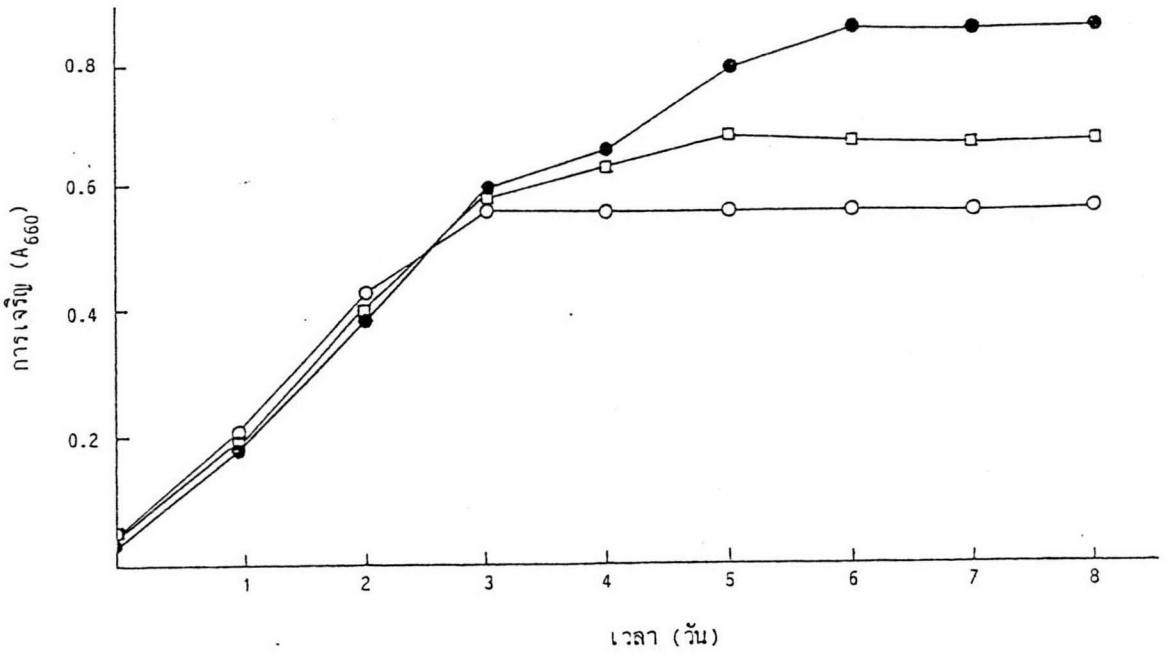
เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโนเป็น 0.1, 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจะได้โปรติเอสแอคติวิตีสูงและเร็ว แต่การเจริญไม่ดีเท่าคอนโทรล (ตารางที่ 12)

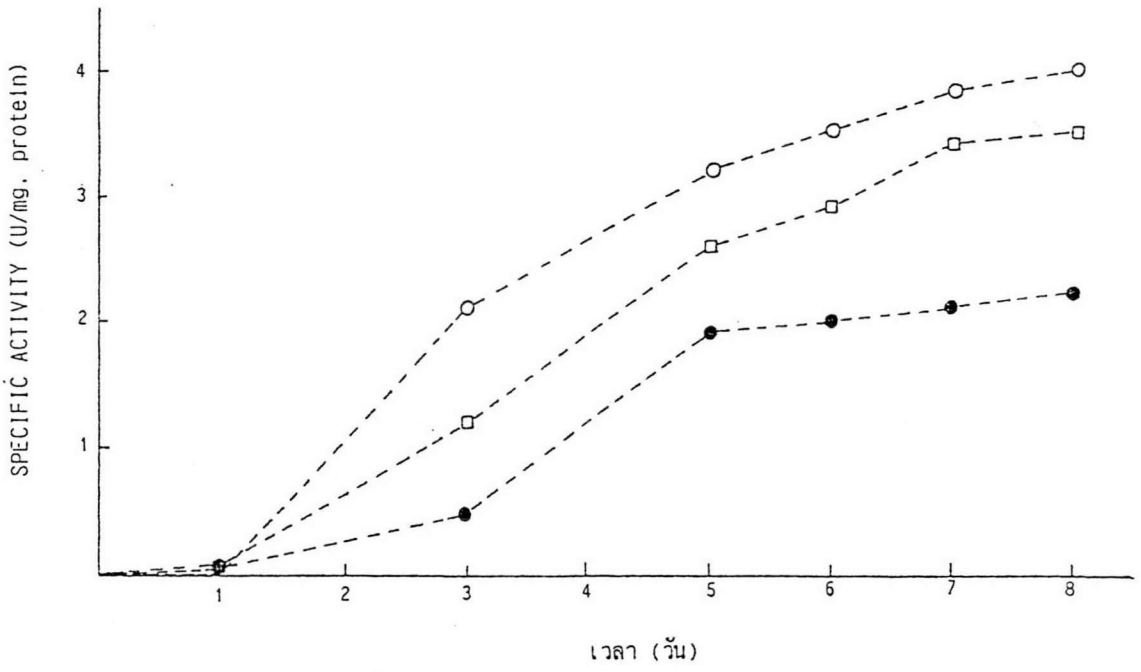
11.3 ผลการแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ เมื่อใส่ผงสกัดจากยีสต์หรือกรดแคสอะมิโน 0.2 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 29,30)

เมื่อเพิ่มแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่ลดเจลลาทินเป็น 0.25 เปอร์เซ็นต์ และใส่ผงสกัดจากยีสต์หรือกรดแคสอะมิโน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองเหมือนเดิมคือการเพิ่มแอมโมเนียมคลอไรด์ ไม่สามารถทำให้การเจริญและแอคติวิตีของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับคอนโทรล (ตารางที่ 12) ดังนั้นความเข้มข้นของเจลลาทินในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะปรับปรุงควรจะมีค่าสูงกว่า 0.25 เปอร์เซ็นต์

12. ผลการใช้กลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนในมีเดียม 73 แล้วแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน (รูปที่ 31,32)

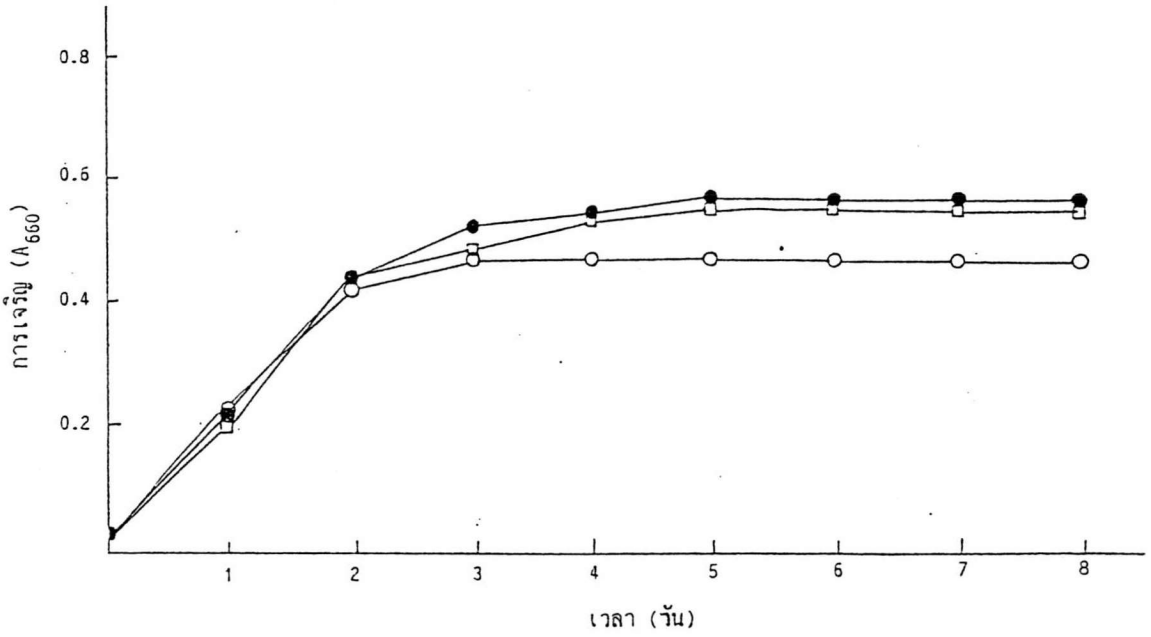
เจลลาทิน กรดแคสอะมิโน ผงสกัดจากยีสต์และ/หรือแอมโมเนียมคลอไรด์อาจมีตัวเหนี่ยวนำ (inducer) ให้เกิดการผลิตโปรติเอสจึงทดลองเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม

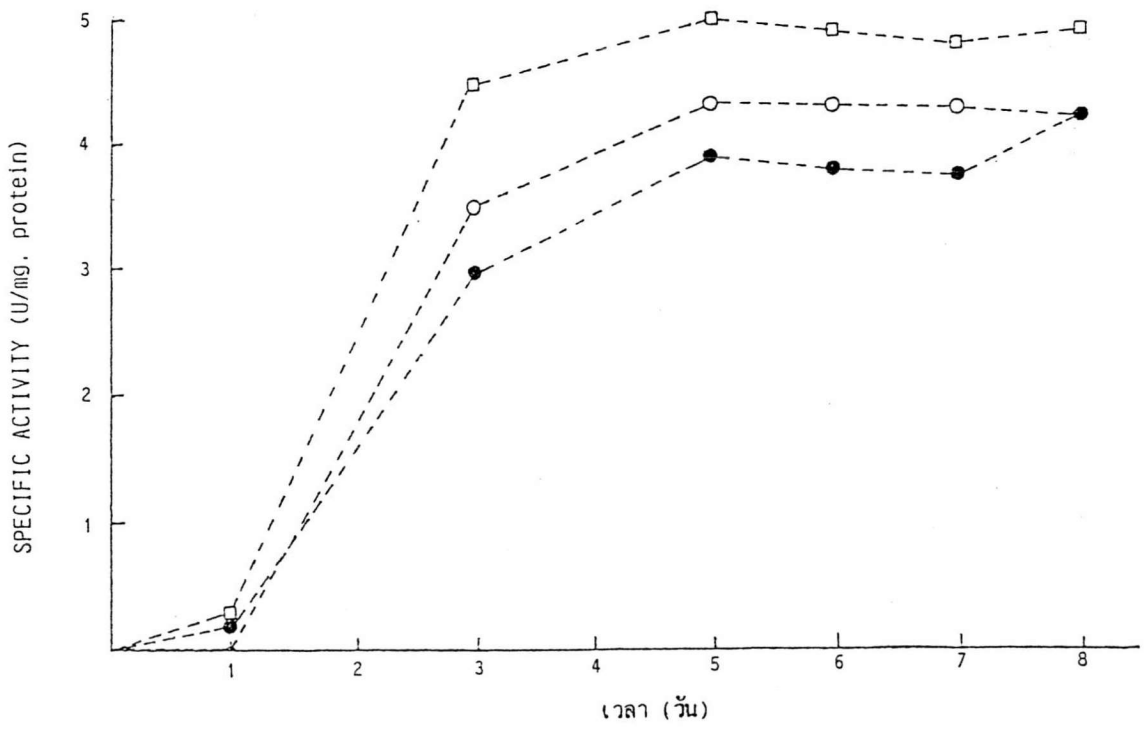




รูปที่ 25 และ 26 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์

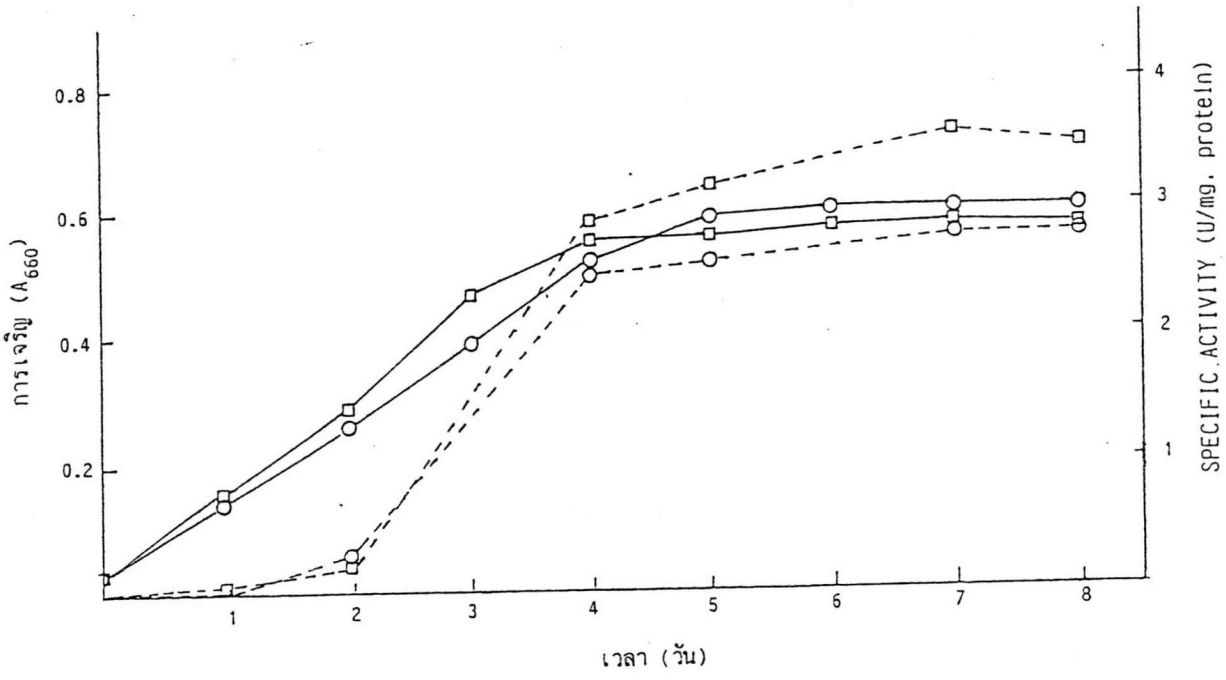
การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์
○—○	○- -○	0.1 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.2 เปอร์เซ็นต์
●—●	●- -●	0.5 เปอร์เซ็นต์





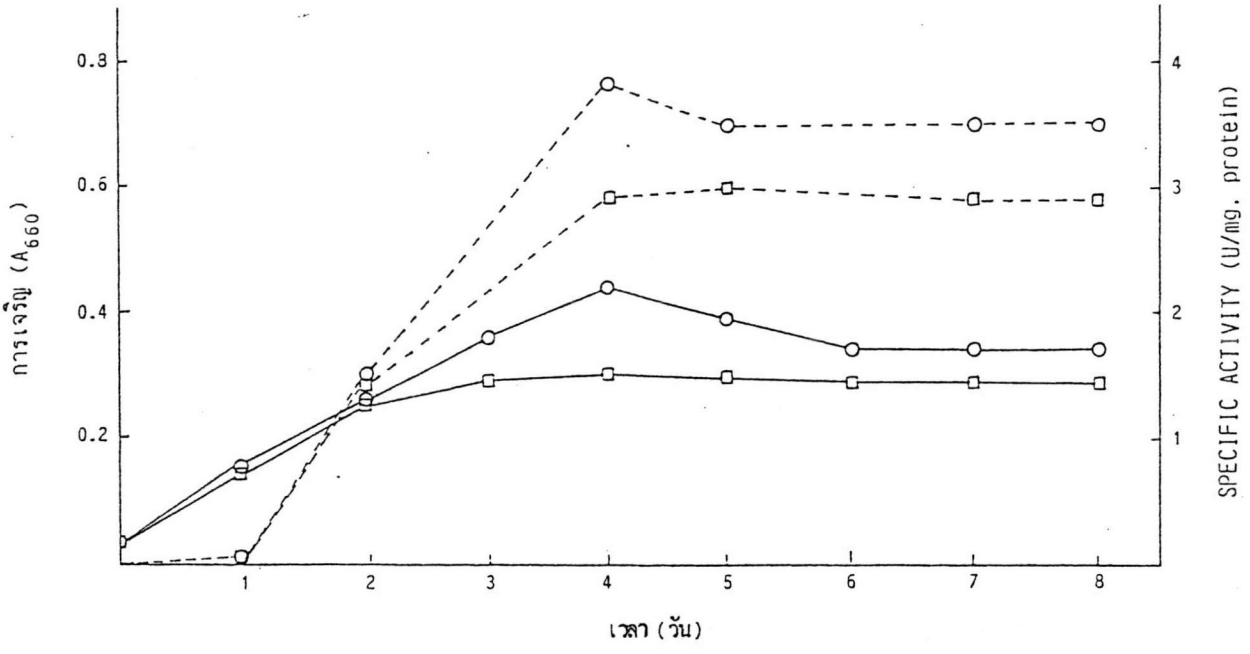
รูปที่ 27 และ 28 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโน

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของกรดแคสอะมิโน
○—○	○- -○	0.1 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.2 เปอร์เซ็นต์
●—●	●- -●	0.5 เปอร์เซ็นต์



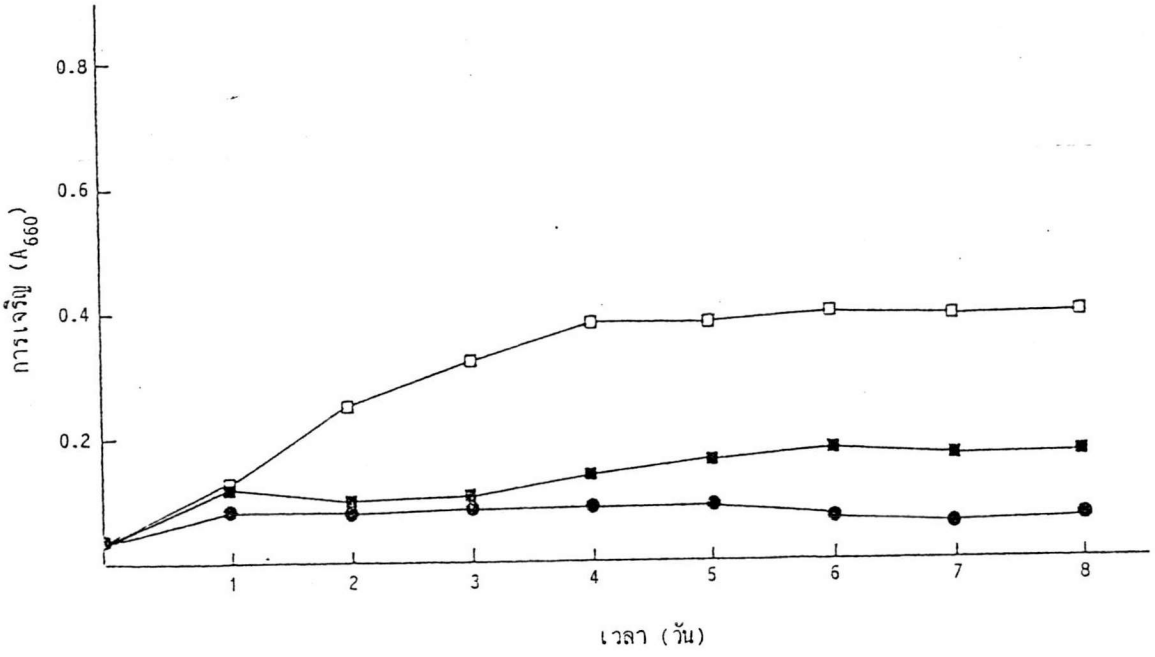
รูปที่ 29 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ ผงสกัดจากยีสต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

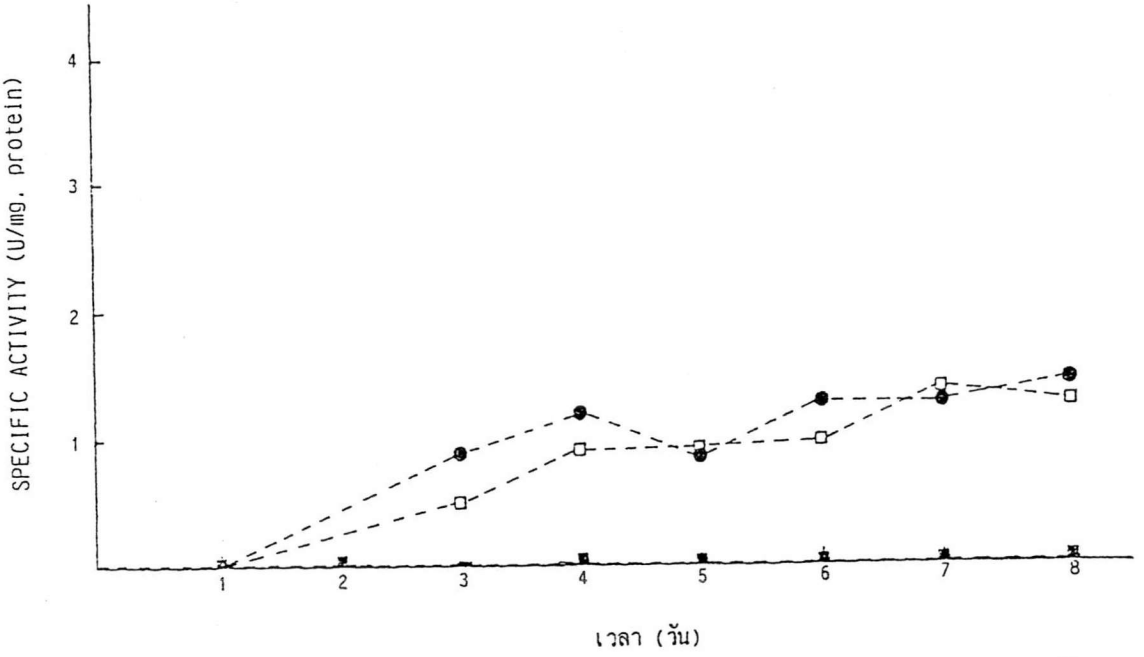
การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์
○—○	○- -○	0.05 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.10 เปอร์เซ็นต์



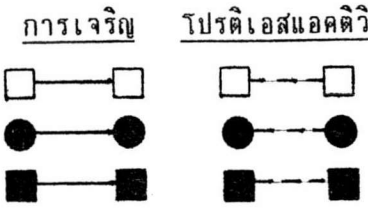
รูปที่ 30 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีเจลลาทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์
○—○	○- -○	0.05 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.10 เปอร์เซ็นต์





รูปที่ 31 และ 32 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่มีกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์แทนเจลลาทินและแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน



ตารางที่ 12 สรุปผลการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	การเจริญที่ mid log phase		Specific Activity (U/mg protein)	
	A_{660}	จำนวนวันหลังการหมัก	Maximum	จำนวนวันหลังการหมัก
เจลลาทิน 0.25%	0.17	1	1.85	4
เจลลาทิน 0.5%	0.13	1	2.70	4
เจลลาทิน 1.0%	0.14	1	2.02	3
เจลลาทิน 1.5%	0.16	1	2.22	4
เจลลาทิน 1.0% + กรดแคสอะมิโน 0.1%	0.48	2	4.37	7
เจลลาทิน 1.0% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1%	0.15	1	4.02	7
เจลลาทิน 1.0% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.1%	0.39	2	3.64	7
เจลลาทิน 1.0% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.1%	0.39	2	3.64	7*
เจลลาทิน 1.0% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.5%	0.45	2	1.43	7
เจลลาทิน 1.0% + ผงสกัดจากยีสต์ 1.0%	0.43	2	0.13	5
เจลลาทิน 1.0% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1%	0.15	1	4.02	7
เจลลาทิน 1.0% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5%	0.16	1	2.50	7
เจลลาทิน 1.0% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 1.0%	0.14	1	0.84	6
เจลลาทิน 1.0% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 1.5%	0.15	1	2.32	7
เจลลาทิน 1.0% + กรดแคสอะมิโน 0.1%	0.48	2	4.37	7
เจลลาทิน 1.0% + กรดแคสอะมิโน 0.5%	0.37	2	3.02	7
เจลลาทิน 1.0% + กรดแคสอะมิโน 1.0%	0.40	3	1.49	8

* = คอนโทรล

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	การเจริญที่ mid log phase		Specific Activity (U/mg protein)	
	A_{660}	จำนวนวันหลังการหมัก	Maximum	จำนวนวันหลังการหมัก
เจลลาทิน 1.0% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.05% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05%	0.51	3	2.49	8
เจลลาทิน 1.0% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.05% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1%	0.53	3	2.35	6
เจลลาทิน 1.0% + กรดแคสอะมิโน 0.05% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05%	0.42	3	3.94	5
เจลลาทิน 1.0% + กรดแคสอะมิโน 0.05% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1%	0.44	3	3.78	8
เจลลาทิน 0.5% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.1%	0.41	3	2.67	7
เจลลาทิน 0.5% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.2%	0.59	3	2.72	5
เจลลาทิน 0.5% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.5%	0.51	3	1.30	5
เจลลาทิน 0.5% + กรดแคสอะมิโน 0.05%	0.36	2	4.61	5
เจลลาทิน 0.5% + กรดแคสอะมิโน 0.1%	0.37	2	3.95	5
เจลลาทิน 0.5% + กรดแคสอะมิโน 0.2%	0.36	2	4.18	5
เจลลาทิน 0.5% + กรดแคสอะมิโน 0.5%	0.34	2	3.07	5
เจลลาทิน 0.5% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.05% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05%	0.24	2	3.08	5
เจลลาทิน 0.5% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.05% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1%	0.24	2	3.95	5

ตารางที่ 12 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	การเจริญที่ mid log phase		Specific Activity (U/mg protein)	
	A_{660}	จำนวนวันหลังการหมัก	Maximum	จำนวนวันหลังการหมัก
เจลลาทิน 0.5% + กรดแคสอะมิโน 0.05% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05%	0.25	2	4.87	5
เจลลาทิน 0.5% + กรดแคสอะมิโน 0.05% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1%	0.25	2	4.65	4
เจลลาทิน 0.25% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.1%	0.43	2	3.86	7
เจลลาทิน 0.25% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.2%	0.40	2	3.42	7
เจลลาทิน 0.25% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.5%	0.40	2	1.88	5
เจลลาทิน 0.25% + กรดแคสอะมิโน 0.1%	0.23	1	4.34	5
เจลลาทิน 0.25% + กรดแคสอะมิโน 0.2%	0.20	1	4.99	5
เจลลาทิน 0.25% + กรดแคสอะมิโน 0.5%	0.22	1	3.89	5
เจลลาทิน 0.25% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.2% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05%	0.26	2	2.46	4
เจลลาทิน 0.25% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.2%% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1%	0.29	2	2.85	4
เจลลาทิน 0.25% + กรดแคสอะมิโน 0.2% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05%	0.26	2	3.75	4
เจลลาทิน 0.25% + กรดแคสอะมิโน 0.2% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1%	0.14	2	2.94	4

ตารางที่ 12 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	การเจริญที่ mid log phase		Specific Activity (U/mg protein)	
	A_{660}	จำนวนวันหลังการหมัก	Maximum	จำนวนวันหลังการหมัก
กลูโคส 1% + กรดแคสอะมิโน 1.0%	0.25	2	0.85	4
กลูโคส 1% + แอมโมเนียมคลอไรด์ 1.0%	0.08	1	1.23	4
กลูโคส 1% + ผงสกัดจากยีสต์ 0.1%	0.12	1	0.00	-

73 แต่ใช้กลูโคสแทนเจลลาทิน แล้วแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ กรดแคสอะมิโน แอมโมเนียมคลอไรด์และผงสกัดจากยีสต์ ปรากฏว่าแบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดแคสอะมิโน และเจริญได้น้อยที่สุดหรือแทบจะไม่เจริญเลยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในสูตรอาหารมีองค์ประกอบไนโตรเจนและ/หรือคาร์บอนน้อย ส่วนโปรติเอสแอคติวิตีพบเฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดแคสอะมิโน และที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เท่านั้นโดยแบคทีเรียสร้างโปรติเอสซึ่งมีแอคติวิตีใกล้เคียงกัน ค่าโปรติเอสที่ตรวจได้น้อยกว่าคอนโทรลมาก (ตารางที่ 10) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อมีการเจริญน้อยมากเมื่อเทียบกับคอนโทรล การที่สูตรอาหารมีเดียม 73 ที่มีกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์และผงสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตรวจไม่พบค่าแอคติวิตีของโปรติเอส อาจเป็นเพราะเชื้อเจริญได้น้อยมากในสูตรอาหารนี้ (ตารางที่ 12) การที่สูตรอาหารมีเดียม 73 ที่มีกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ และกรดแคสอะมิโนหรือแอมโมเนียมคลอไรด์ทำให้เชื้อเจริญได้น้อย แต่ยังมีแอคติวิตีของโปรติเอส โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 1.0 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์มีผลทำให้เชื้อเจริญได้น้อยมากเมื่อเทียบกับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโนแต่ในขณะเดียวกันสูตรอาหารที่มี 1.0 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์กลับมีค่าแอคติวิตีของโปรติเอสสูงกว่าเมื่อใช้ 1.0 เปอร์เซ็นต์กรดแคสอะมิโน (ตารางที่ 12) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในสูตรอาหารที่มีกรดแคสอะมิโนและโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแอมโมเนียมคลอไรด์อาจมีตัวเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียหมายเลข 8 สร้างและขับโปรติเอสในรูปของเคซิเนสออกนอกเซลล์

13. <u>ผลการแปรความเข้มข้นของเกลือแร่ต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

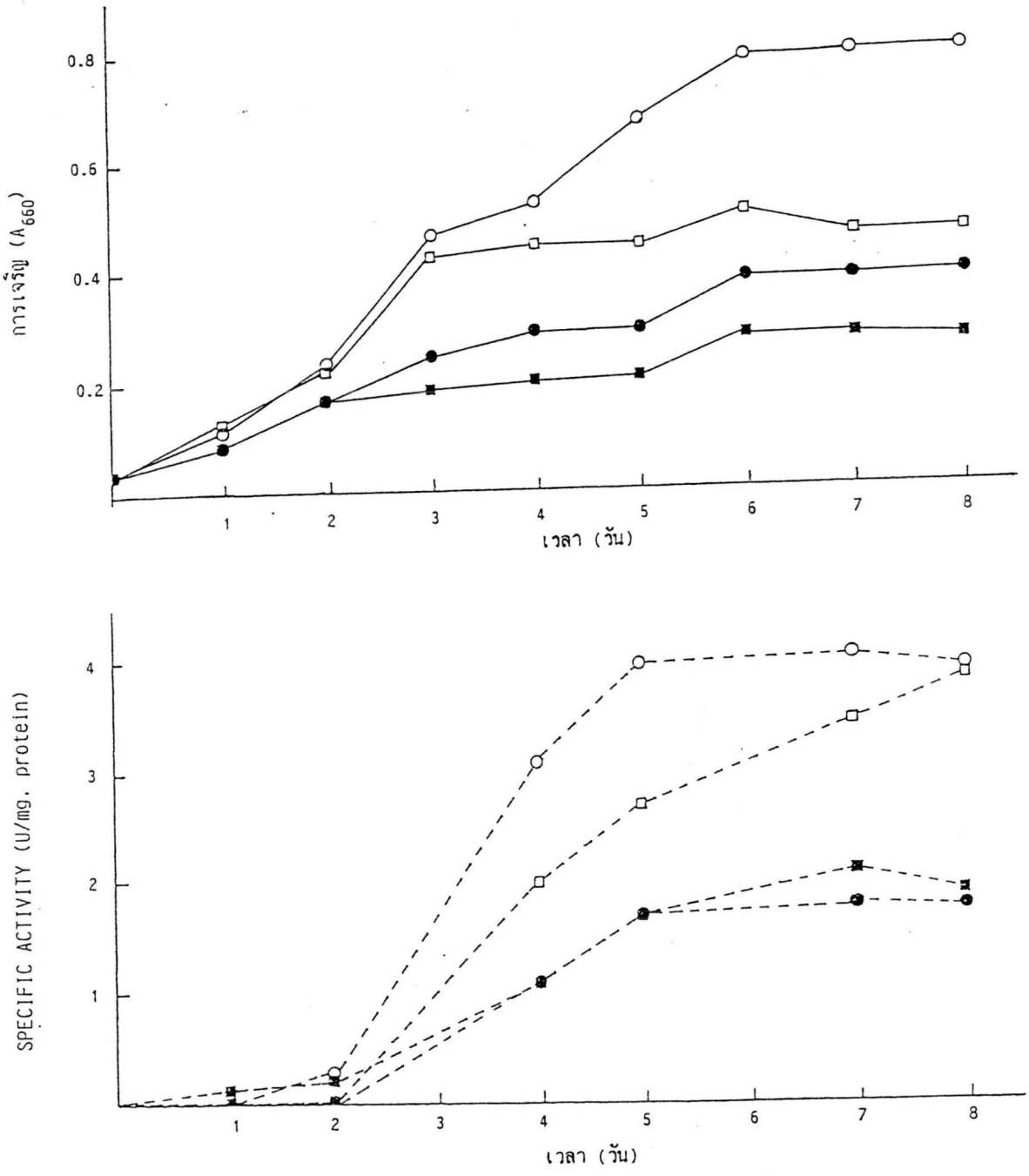
13.1 ผลการแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตและโปแตสเซียมคลอไรด์โดยคงความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ที่ 0.02 เปอร์เซ็นต์

13.1.1 ผลการแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต โดยไม่เติมโปแตสเซียมคลอไรด์ (รูปที่ 33,34)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสูตรแล้วแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 0.0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 มีการเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีมากที่สุดและมากกว่าคอนโทรล (ตารางที่ 13) เมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเพิ่มขึ้น การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด แสดงว่าแมกนีเซียมซัลเฟตอาจยับยั้งการเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8

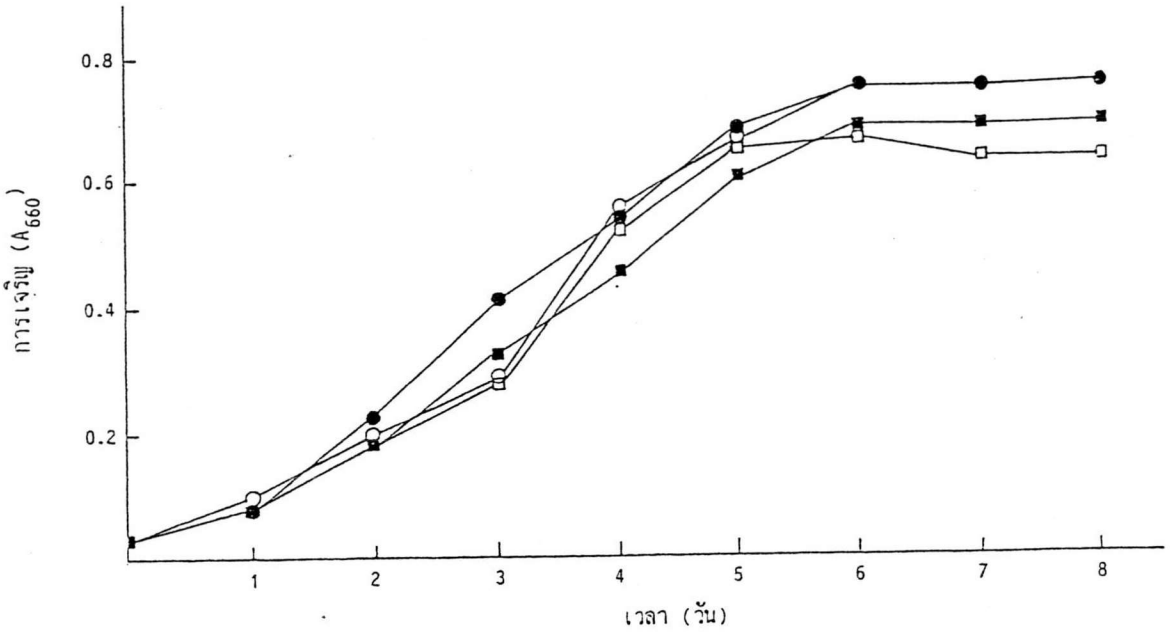
13.1.2 ผลการแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเมื่อเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 35,36)

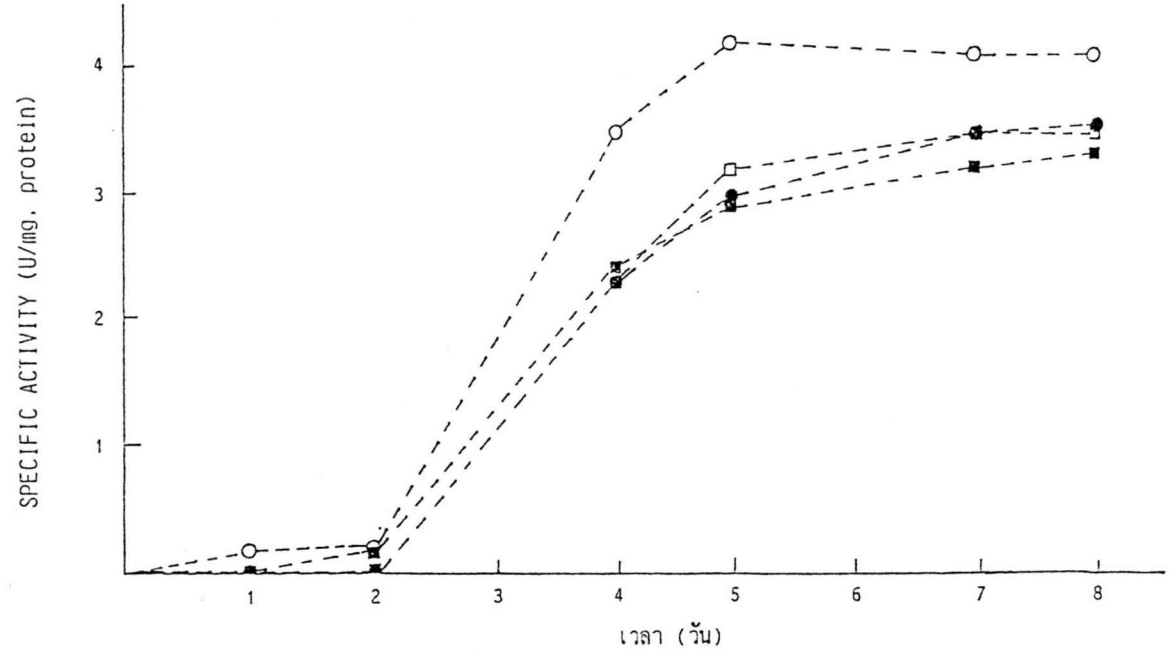
เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ใน



รูปที่ 33 และ 34 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแล้ว โดยไม่เติมโปแตสเซียมคลอไรด์

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต
○—○	○- -○	0.0 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.5 เปอร์เซ็นต์
●—●	●- -●	1.0 เปอร์เซ็นต์
■—■	■- -■	1.5 เปอร์เซ็นต์





รูปที่ 35 และ 36 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแล้ว โดยเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.25 เปอร์เซ็นต์

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต
○—○	○- -○	0.0 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.5 เปอร์เซ็นต์
●—●	●- -●	1.0 เปอร์เซ็นต์
■—■	■- -■	1.5 เปอร์เซ็นต์

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสูตรซึ่งเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.25 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 0.0, 0.5, 1.0 และ1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรียเจริญได้ใกล้เคียงกัน ส่วนโปรติเอสแอคติวิตีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตมีค่าสูงสุดและสูงกว่าคอนโทรล (ตารางที่ 13) ส่วนที่ความเข้มข้นอื่น ๆ มีแอคติวิตีใกล้เคียงกัน

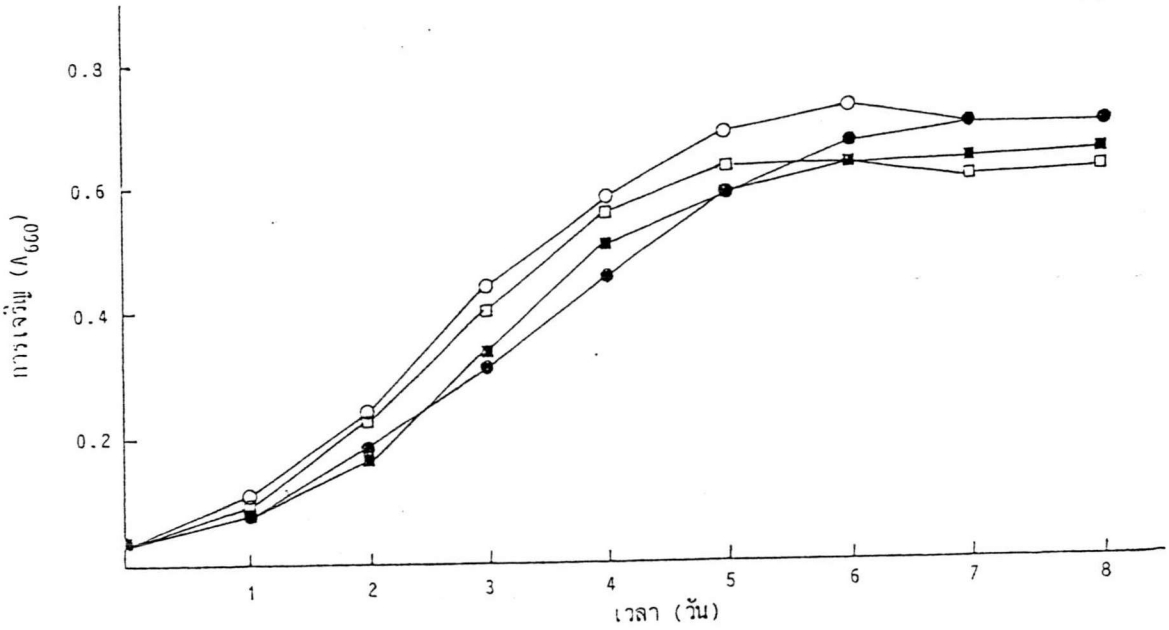
13.1.3 ผลการแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต เมื่อเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 37,38)

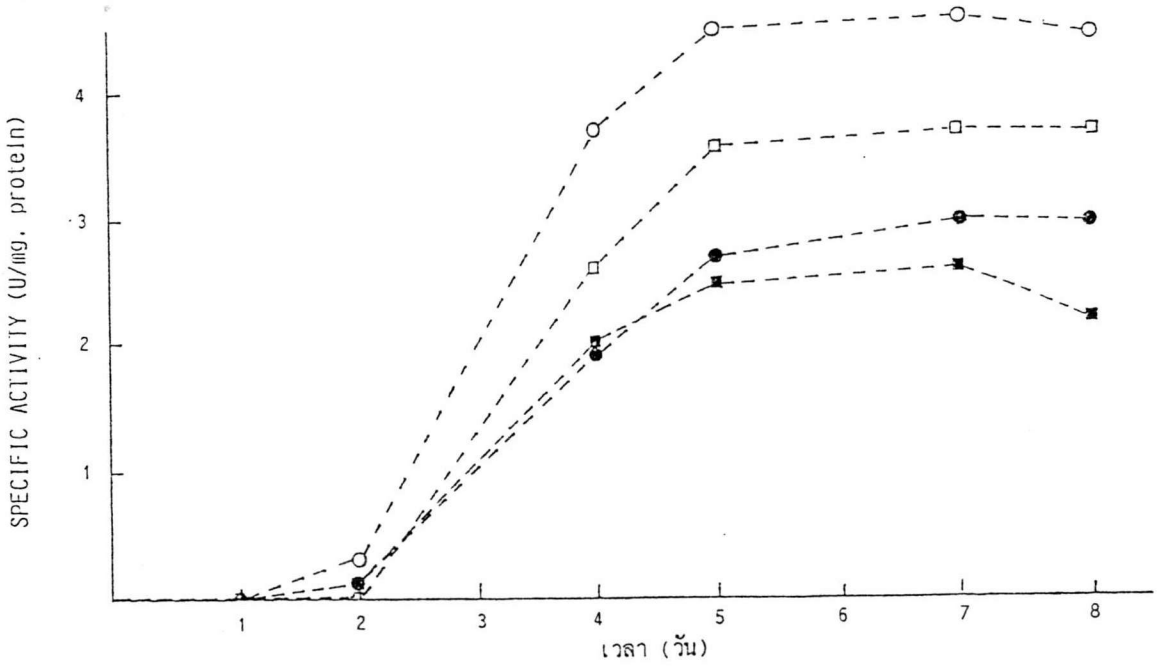
เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสูตร ซึ่งเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 0.0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญใกล้เคียงกัน แต่โปรติเอสแอคติวิตีลดลงเมื่อปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเพิ่มขึ้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตให้แอคติวิตีสูงกว่าคอนโทรล (ตารางที่ 13) และสูงกว่าผลการทดลองที่ 13.1.2

13.1.4 ผลการแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต เมื่อเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.75 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 39,40)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสูตร ซึ่งเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.75 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 0.0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญใกล้เคียงกัน ส่วนแอคติวิตีผลการทดลองที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตให้ค่าใกล้เคียงกับคอนโทรล (ตารางที่ 13) แต่เร็วกว่า เมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเพิ่มขึ้นแอคติวิตีลดลง สรุปผลการแปรความเข้มข้นโปแตสเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสูตรแล้วปรากฏว่า มีแนวโน้มเช่นเดียวกัน คือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีลดลงอย่างเห็นได้ชัดในเกือบทุกความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์ แสดงว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) ที่มากเกินพอจะยับยั้งการเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตและโปแตสเซียมคลอไรด์ที่คัดเลือกไว้คือ 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เนื่องจากให้การเจริญและแอคติวิตีมากที่สุดและมากกว่าคอนโทรล (ตารางที่ 13)

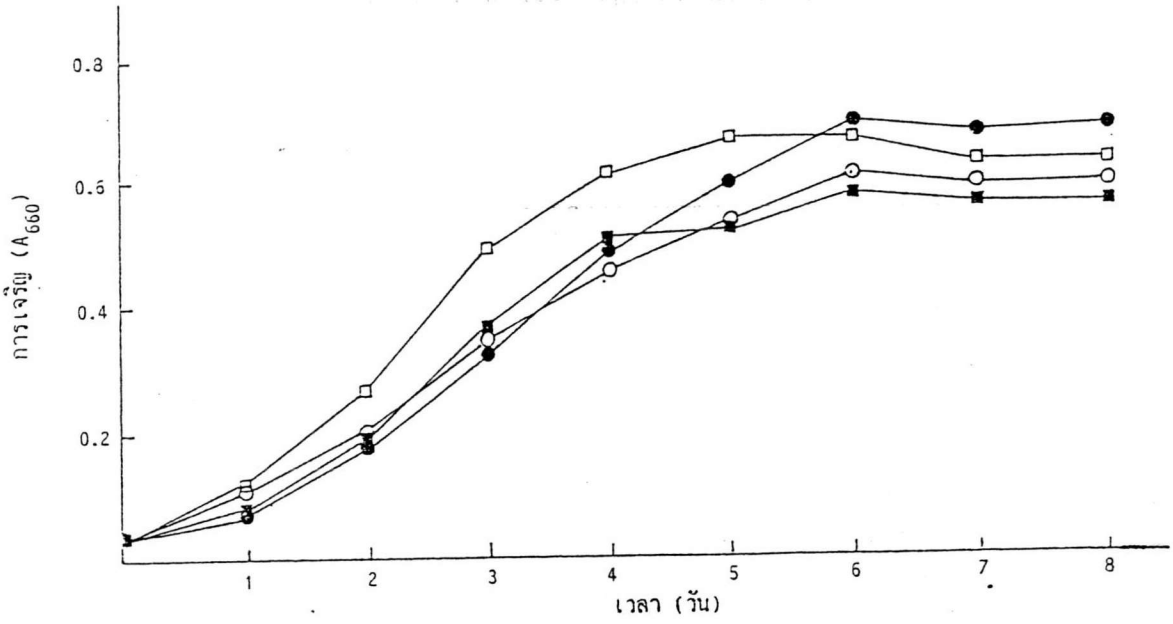
การศึกษาเอนไซม์ของแบคทีเรียชอบเค็มสูงโดย Baxter and Gibbons (1957), Holmes et al. (1965), Hochstein และ Dalton (1968) พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียเหล่านี้ทำงานได้ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง และส่วนใหญ่จะไม่ทำงานเมื่อไม่มีเกลือ โปแตสเซียมอิออนมักเป็น effective activator มากกว่าโซเดียมอิออน

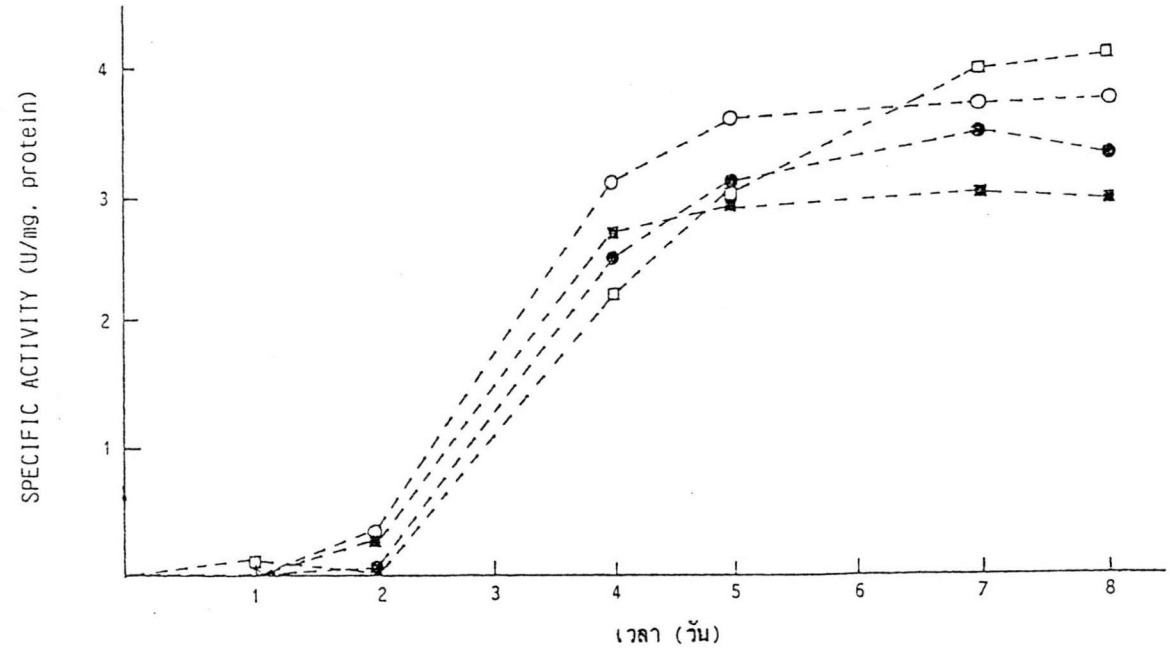




รูปที่ 37 และ 38 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแล้ว โดยเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต
○—○	○- -○	0.0 เปอร์เซ็นต์
□—□	□- -□	0.5 เปอร์เซ็นต์
●—●	●- -●	1.0 เปอร์เซ็นต์
■—■	■- -■	1.5 เปอร์เซ็นต์





รูปที่ 39 และ 40 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแล้ว โดยเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.75 เปอร์เซ็นต์

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต
○—○	○—○	0.0 เปอร์เซ็นต์
□—□	□—□	0.5 เปอร์เซ็นต์
●—●	●—●	1.0 เปอร์เซ็นต์
■—■	■—■	1.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 13 สรุปผลการแปรความเข้มข้นเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตและโปแตสเซียมคลอไรด์ในมีเดียม 73 ที่ปรับสูตรอาหารแล้ว

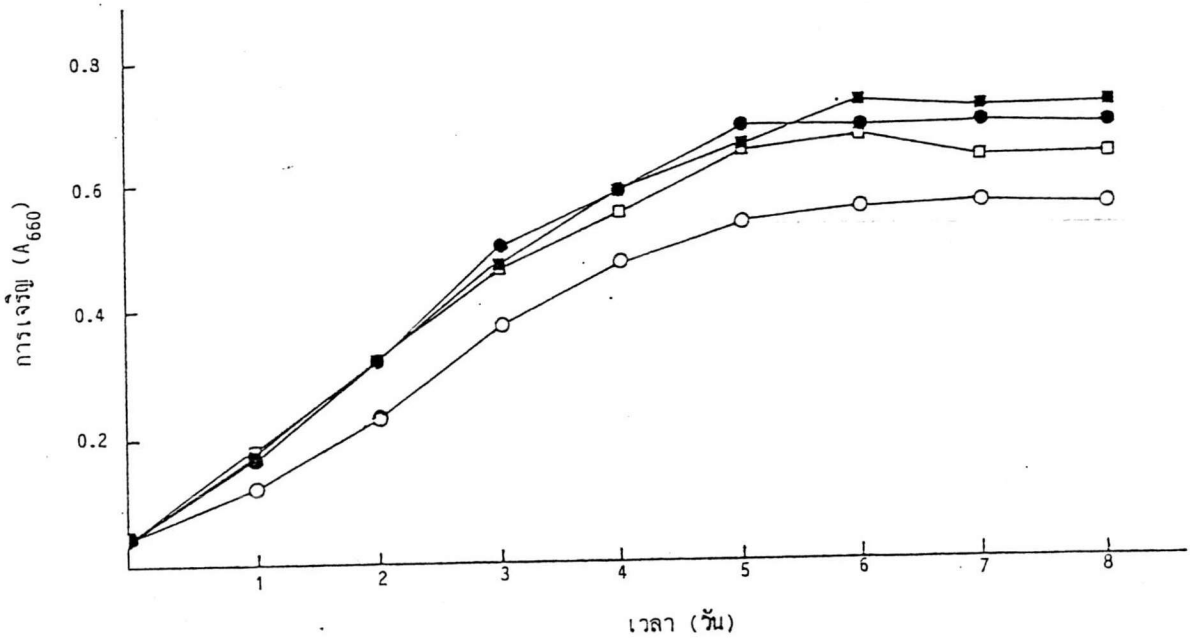
ความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์ (เปอร์เซ็นต์)	ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์)	การเจริญที่ mid log phase		Specific Activity (U/mg protein)	
		A_{660}	จำนวนวันหลังการหมัก	Maximum	จำนวนวันหลังการหมัก
0.0	0.0	0.46	3	4.02	5
	0.5	0.22	2	3.86	8
	1.0	0.16	2	1.72	5
	1.5	0.16	2	1.71	5
0.25	0.0	0.39	3	4.18	5
	0.5	0.38	3	3.20	5
	1.0	0.41	3	2.99	5
	1.5	0.32	3	2.93	5
0.5	0.0	0.44	3	4.50	5
	0.5	0.40	2	3.56	5
	1.0	0.31	3	2.67	5
	1.5	0.33	3	2.48	2
0.75	0.0	0.34	3	3.58	5
	0.5	0.27	2	2.99	7
	1.0	0.32	3	3.12	7
	1.5	0.36	3	2.95	4
คอนโทรล*		0.39	2	3.64	7

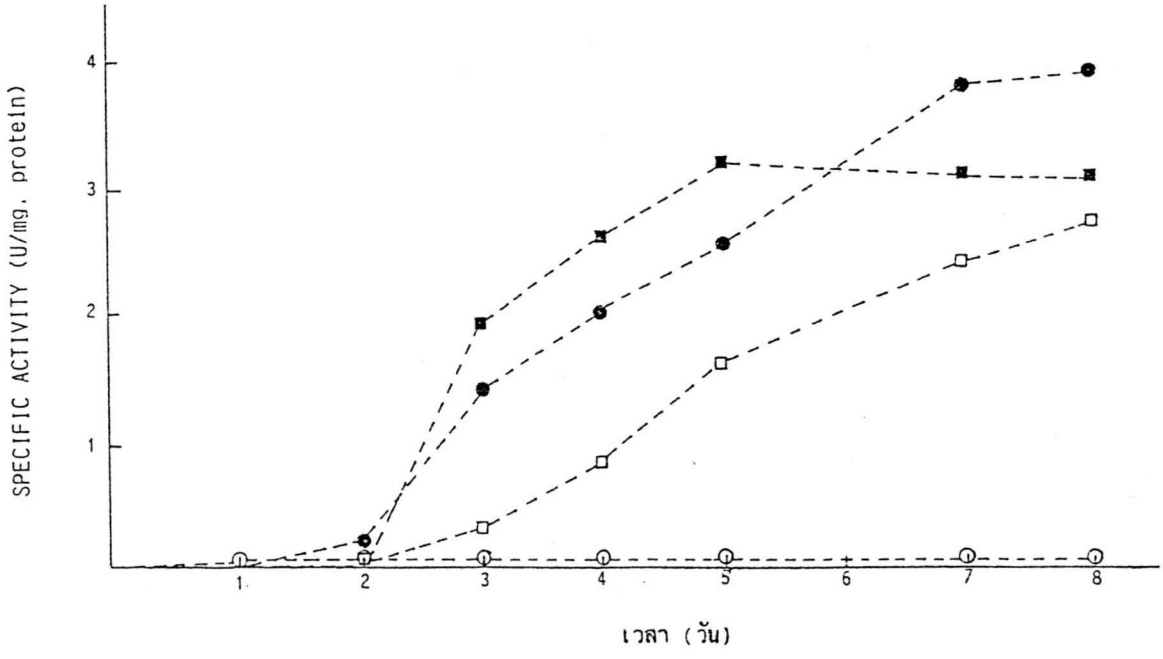
*อาหารเลี้ยงเชื้อของคอนโทรล ประกอบด้วย เจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ ผงสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 1.0 เปอร์เซ็นต์ โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์

13.2 ผลการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (รูปที่ 41,42)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสูตรซึ่งเติมโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วแปรความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เป็น 0.0, 0.01, 0.02 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญของแบคทีเรียใกล้เคียงกัน แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์ แบคทีเรียเจริญได้น้อยและไม่มีโปรติเอสแอคติวิตี ส่วนที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์มีแอคติวิตีสูงสุดและสูงกว่าคอนโทรล (ตารางที่ 14) ผลการทดลองแสดงถึงความสำคัญของเกลือแคลเซียมในการเจริญและในการผลิตโปรติเอสที่มีแอคติวิตีสูง นอกจากนี้ปริมาณแคลเซียมอิออนที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเป็นต้องใส่ปริมาณมาก เนื่องจากในเจลลาตินมีแคลเซียมอิออนอยู่ด้วย (Bronke and Hammel,1987) แคลเซียมอิออนมีความสำคัญในการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส การแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน ได้ผลเช่นเดียวกับที่ Longo et al (1988) พบว่าใน Bacillus subtilis DB 104 ที่ทำให้กลายพันธุ์ (mutant) จนไม่สามารถสังเคราะห์ทั้งนิวทรัลและอัลคาไลน์โปรติเอสได้ แต่พบว่ายังมีโปรติเอสที่หลงเหลืออยู่ (residual protease) ซึ่งโปรติเอสเหล่านี้จะไม่ทำงาน (inactive) เมื่อไม่มีแคลเซียมอิออน

ผลการทดลองที่ความเข้มข้นโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.0 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 13 เมื่อนำมาทำการทดลองแปรความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (ตารางที่ 14) พบว่าแอคติวิตีของโปรติเอสลดลงจากแอคติวิตีสูงสุด 4.50 u/mg protein ภายใน 5 วัน เป็นแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 3.81 u/mg protein ภายใน 7 วัน ทั้งนี้เนื่องจากเก็บเชื้อโดยวิธีสับคัลเจอร์ (subculture) เชื้อทุก 15 วัน อาจทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ลดลง การเก็บเชื้อที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมควรเก็บด้วยวิธีที่รักษาคุณสมบัติทางพันธุศาสตร์ของจุลินทรีย์เช่น วิธีไลโอฟิไลเซชัน (Lyophilization)





รูปที่ 41 และ 42 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อแปรความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแล้ว

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์
○—○	○—○	0.0 เปอร์เซ็นต์
□—□	□—□	0.01 เปอร์เซ็นต์
●—●	●—●	0.02 เปอร์เซ็นต์
■—■	■—■	0.04 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 14 สรุปผลการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในมีเดียม 73 ที่ปรับสูตรอาหารแล้ว

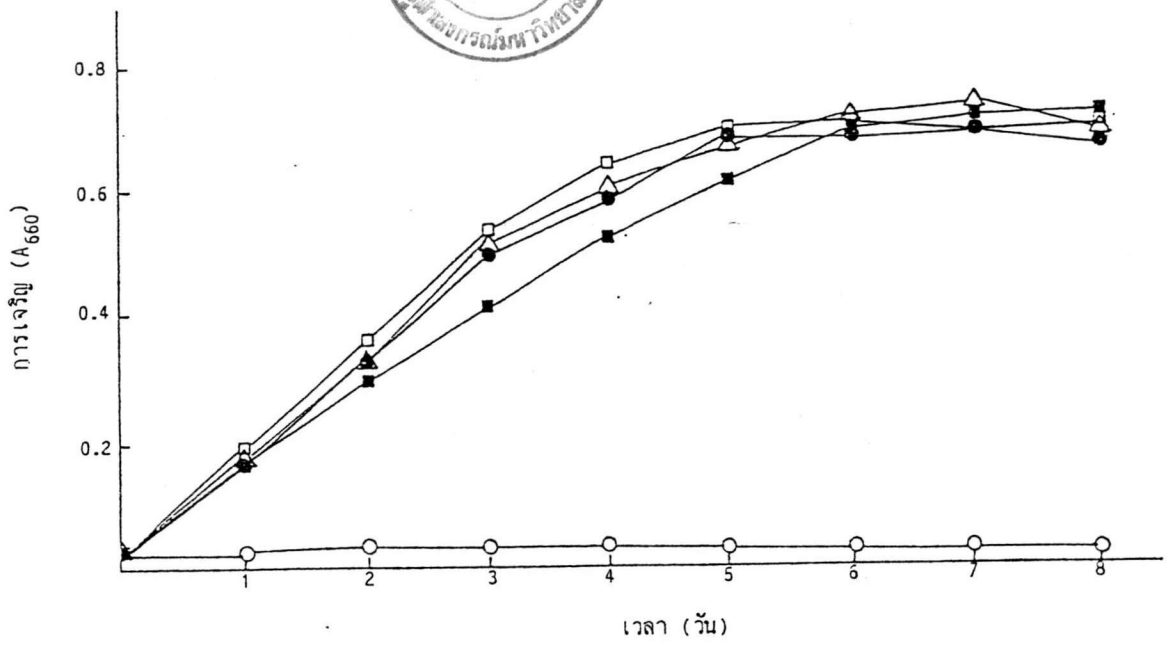
ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (เปอร์เซ็นต์)	การเจริญที่ Mid log phase		Specific Activity (U/mg protein)	
	A_{660}	จำนวนวันหลังการหมัก	Maximum	จำนวนวันหลังการหมัก
0.00	0.37	3	0.00	-
0.01	0.46	3	2.75	8
0.02	0.50	3	3.81	7
0.04	0.45	3	3.16	5
คอนโทรล*	0.39	2	3.64	7

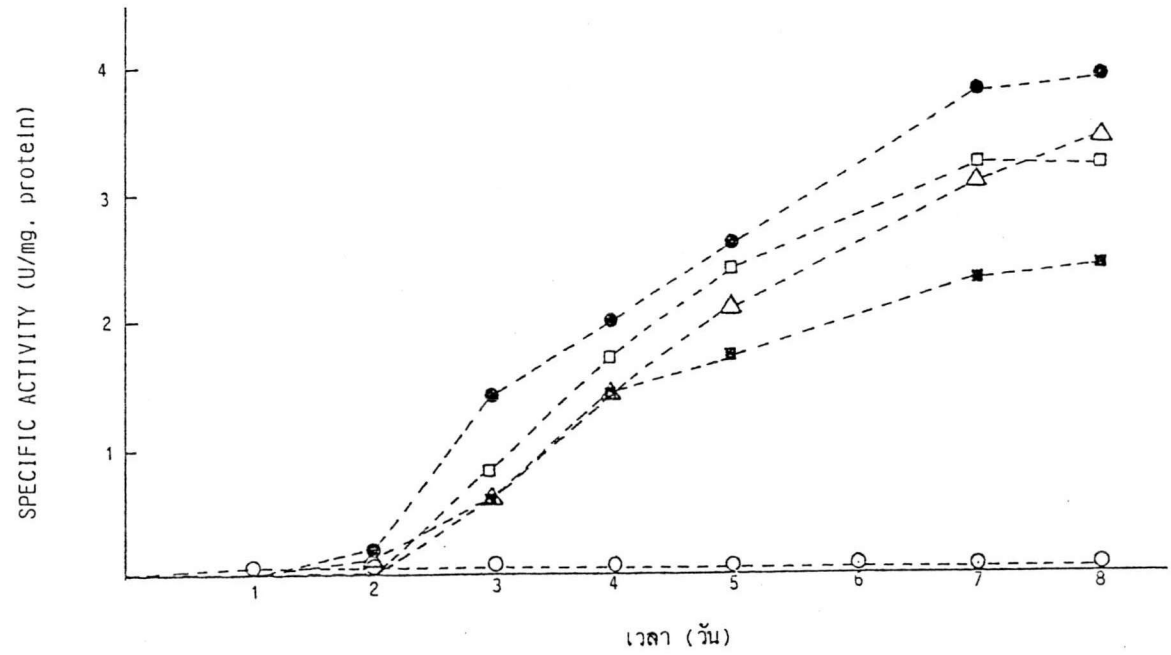
*อาหารเลี้ยงเชื้อของคอนโทรล ประกอบด้วย เจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ ผงสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 1.0 เปอร์เซ็นต์ โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์

14. ผลการปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่ปรับสูตรอาหารแล้ว (รูปที่ 43,44)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสูตรแล้ว ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 พบว่าที่ pH 4.0 แบคทีเรียไม่เจริญและไม่มีโปรติเอสแอคติวิตี ที่ pH อื่น ๆ การเจริญใกล้เคียงกัน ส่วนโปรติเอสแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 7.0 ที่ pH 5.0 และ 6.0 แอคติวิตีใกล้เคียงกัน ที่ pH 8.0 แอคติวิตีต่ำสุด (ตารางที่ 15) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า pH 6.0 $\pm$ 1.0 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีมีค่าใกล้เคียงกัน ถ้าค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่สูงหรือต่ำกว่าช่วง (range) ของ pH 6.0 $\pm$ 1.0 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีจะต่ำลงหรือจะไม่มี (ตัวอย่างเช่นในกรณีของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 4.0 และ 8.0) ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะเมื่อเลี้ยงเซลล์ในช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 $\pm$ 1.0 เซลล์มีความสามารถในการปรับระดับความเป็นกรดเป็นด่างภายในเซลล์ (intracellular pHs) ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะแก่การเจริญและการผลิตเอ็นไซม์โปรติเอส แต่เมื่อความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่นอกช่วง pH

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 43 และ 44 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อแปรความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสูตรแล้ว

การเจริญ	โปรติเอสแอคติวิตี	ความเป็นกรดด่าง
○—○	○- -○	4.0
□—□	□- -□	5.0
△—△	△- -△	6.0
●—●	●- -●	7.0
■—■	■- -■	8.0

เท่ากับ 6.0±1.0 เซลล์อาจจะไม่สามารถปรับความเป็นกรดเป็นด่างภายในเซลล์ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะแก่การเจริญและการผลิตโปรติเอส Kushner และ Bayley (1963) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูง Halobacterium cutirubrum ในอาหารเลี้ยงเชื้อของ Sehgal และ Gibbons ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน แล้วนำเซลล์มาตรึงส่วนประกอบภายใน (fix) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NaCl (4.5M) ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำเซลล์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลการทดลองพบว่า ที่ pH 4.0 เซลล์ซึ่งเดิมมีรูปร่างเป็นแท่ง จะแยกออก (pinch off) เป็นชิ้นส่วนที่มีรูปร่างกลม ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ไม่เจริญและไม่มีโปรติเอสแอคติวิตี ที่ pH 4.0 อาจเป็นเพราะเซลล์เปลี่ยนรูปร่างไป ทำให้ไม่มีการเจริญและการผลิตเอ็นไซม์ อย่างไรก็ตามตารางที่ 16 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ปรากฏว่าไม่ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่าไรค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนแปลงไปในทางเดียวกันสำหรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่อยู่ในระหว่าง 8.0 ± 1.0 คือ จะมีค่าเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในวันที่ 8 ค่า pH จะมีค่าประมาณ 8.2 เท่ากัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะขณะที่แบคทีเรียเจริญจะย่อยกรดอะมิโนให้กลายเป็นแอมโมเนีย ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น Anderson ในปี ค.ศ. 1954 พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มสีแดงมีความสามารถย่อยเจลลาทินและเคซีอีนได้ และมีบทบาทสำคัญในการสร้างกลิ่น, อินโดล และแอมโมเนีย ทำให้ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้น ส่วนที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 ไม่ตรวจพบการเจริญของเชื้อดังนั้นค่าความเป็นกรดด่างที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (4.4) อาจเนื่องมาจากการนึ่งฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เกิดการแตกตัวของไฮดรอกซิลไอออน (OH^-) ที่มีอยู่ในองค์ประกอบของอาหารเช่น ผงสกัดยีสต์ เจลลาทิน เป็นต้น สิ่งที่น่าสนใจคือเมื่อความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 มีการลดค่าความเป็นกรดด่างลงหลังจากเชื้อเจริญขึ้นจนในวันที่ 8 หลังการหมักค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.2 (ตารางที่ 16) ผลการทดลองนี้ อาจแสดงถึงการที่แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 ปรับสภาพแวดล้อมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH =8.0 ให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสำหรับการเจริญและการผลิตเอ็นไซม์โปรติเอส โดยในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อ (วันที่ 1-3) มีการขับสารที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นด่างน้อยลง และในระยะหลังของการเลี้ยงเชื้อ (วันที่ 4-8) ไม่มีการขับสารดังกล่าวออกนอกเซลล์เป็นต้น ผู้ที่สนใจเกี่ยวกับผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียชอบเค็มสูงอาจทำการทดลองต่อไปเพื่อหาหลักฐานมาสนับสนุนหรือ คัดค้านการอภิปรายผลดังกล่าวทั้งหมดข้างต้น

ตารางที่ 15 สรุปผลการแปรความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่ปรับสูตรอาหารแล้ว

ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น	การเจริญที่ Mid log phase		Specific Activity (U/mg protein)	
	A_{660}	จำนวนวันหลังการหมัก	Maximum	จำนวนวันหลังการหมัก
4.0	0.03	3	0.00	-
5.0	0.53	3	3.16	7
6.0	0.51	3	3.42	8
7.0*	0.50	3	3.81	7
8.0	0.41	3	2.25	7

* = คอนโทรล

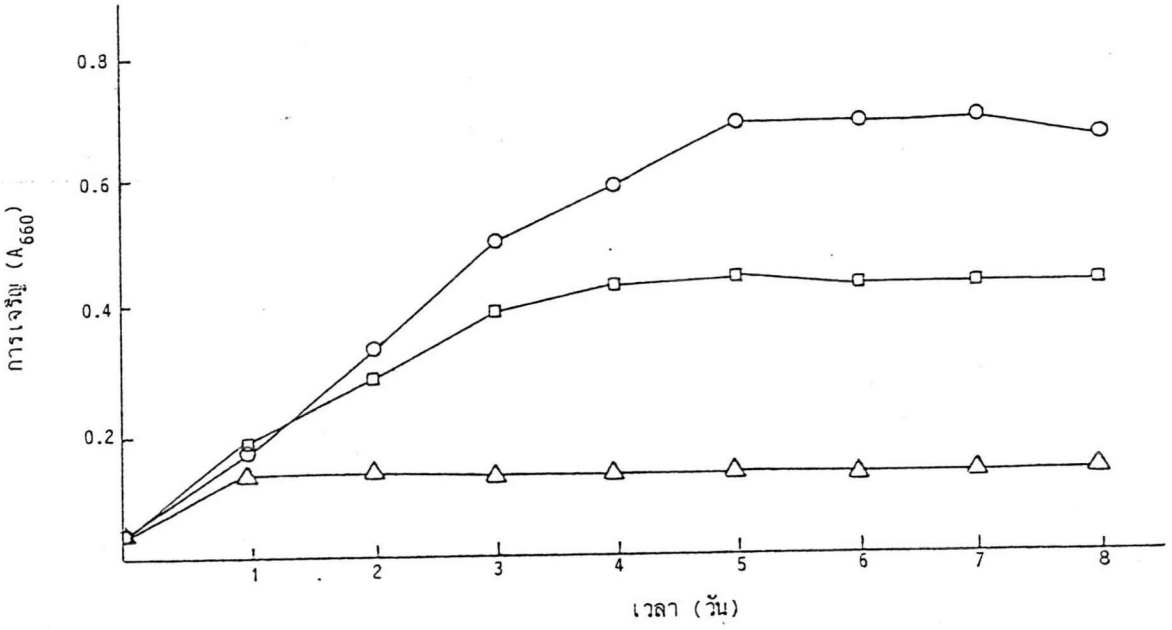
ตารางที่ 16 สรุปผลการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเดียม 73 ที่ปรับสูตรอาหารแล้ว

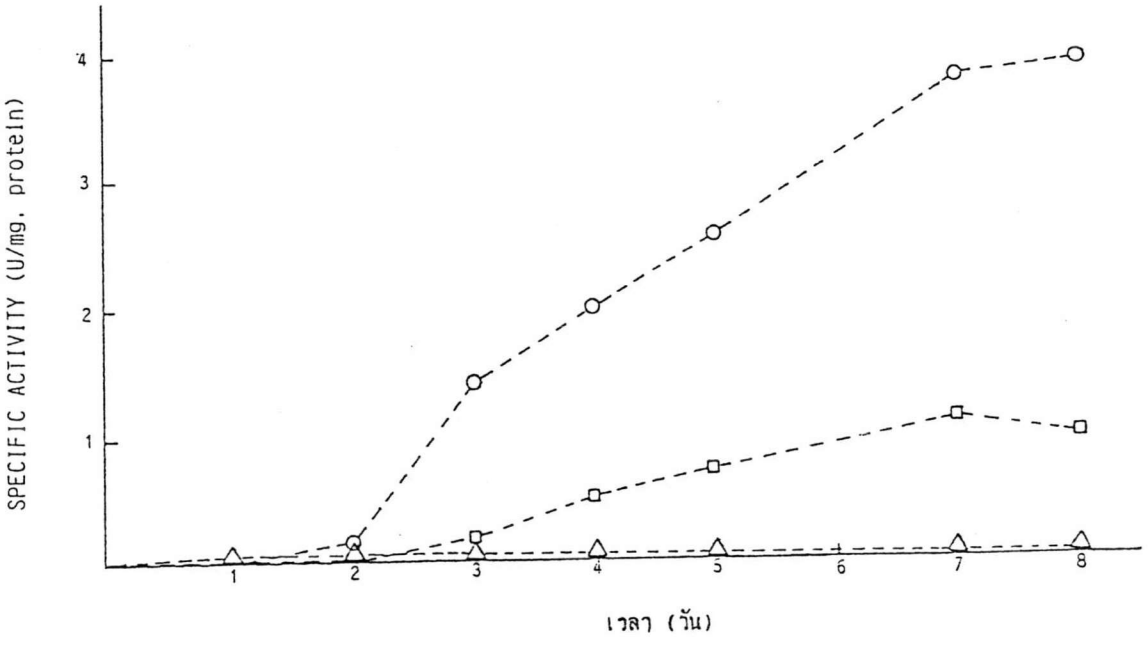
ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (วัน)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
4.0	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4*
5.0	6.6	7.1	7.4	7.7	7.8	7.9	8.1	8.1
6.0	6.8	7.3	7.4	7.8	8.0	8.1	8.1	8.2
7.0	7.1	7.4	7.5	7.8	7.9	8.0	8.1	8.2
8.0	7.3	7.5	7.6	7.8	7.9	7.9	8.1	8.2

* เชื้อไม่เจริญ

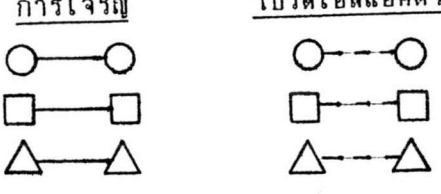
15. ผลการปรับอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 45,46)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสูตรแล้ว แปรอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเป็น 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียเจริญและมีแอคติวิตีดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นแบคทีเรียเจริญและมีแอคติวิตีลดลง โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่า แบคทีเรียไม่มีแอคติวิตีเลย (ตารางที่ 17)





รูปที่ 45 และ 46 การเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียหมายเลข 8 เมื่อแปรอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ



ตารางที่ 17 สรุปผลการแปรอุณหภูมิในขณะเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 ในมีเดียม 73 ที่ปรับสูตรอาหารแล้ว

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	การเจริญที่ Mid log phase		Specific Activity (U/mg protein)	
	A_{660}	จำนวนวันหลังการหมัก	Maximum	จำนวนวันหลังการหมัก
37*	0.50	3	3.81	7
45	0.29	2	1.12	7
50	0.14	1	0.00	-

* = คอนโทรล

16. ผลการปรับความเป็นกรดด่างในสารละลายที่ใช้ในการตรวจหาโปรติเอสแอคติวิตี (assay medium)

เมื่อแปรความเป็นกรดด่างใน assay medium เป็น 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 แล้ววิเคราะห์หาแอคติวิตีพบว่า เอนไซม์โปรติเอสในรูปของเคซิเนสมีแอคติวิตีสูงที่สุดที่ pH 8.0 (ตารางที่ 18) รองลงมาคือ pH 9.0 ส่วนที่ pH 6.0 และ 7.0 มีแอคติวิตีเพียงเล็กน้อยแสดงว่า เอนไซม์โปรติเอสที่มีเคซิเนสแอคติวิตีของแบคทีเรียชอบเค็มนี้ เป็นอัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) ชนิดหนึ่ง

ตารางที่ 18 สรุปผลการแปรความเป็นกรดด่างใน assay medium

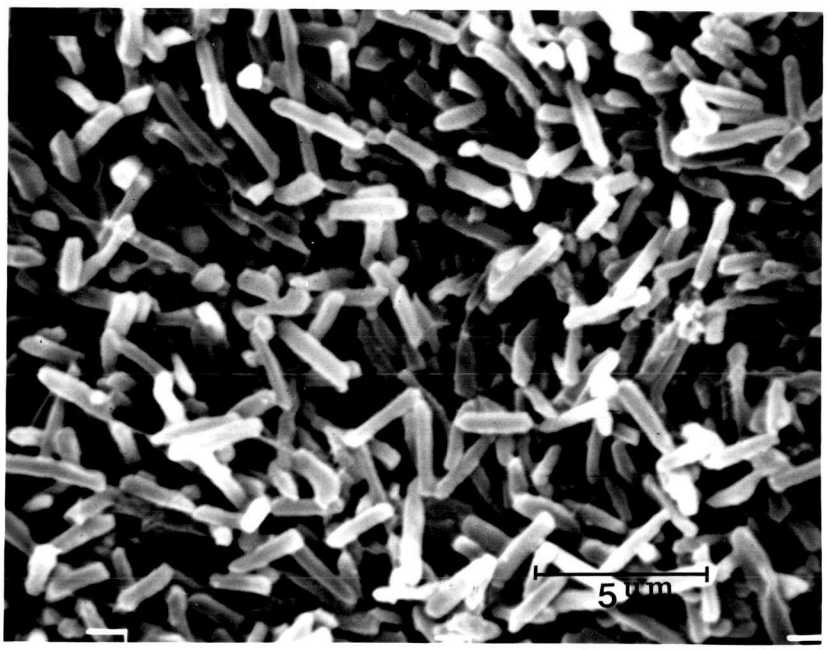
pH ใน assay medium	Protease activity (U)
6.0	15
7.0	20
8.0	150
9.0	145

17. การศึกษาโครงสร้างภายในและภายนอกของแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน

พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารวุ้นมีเดียม 73 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียชอบเค็มนี้มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาดกว้าง 0.4-0.6 ไมโครเมตร ยาว 2.4-2.8 ไมโครเมตร (รูปที่ 47) โครงสร้างภายในส่วนใหญ่จะเป็นนิวคลีโอพลาสึม (nucleoplasm) อยู่ตรงกลางเซลล์ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (รูปที่ 48 ก) บริเวณริมเซลล์ (periphery) ประกอบด้วยไซโตพลาสึม (cytoplasm) และอนุภาคทึบอิเล็คตรอน (electron-dense particles) นอกจากนี้ในไซโตพลาสึมยังมีออร์กาแนล (organelle) ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นทึบอิเล็คตรอนสานกันเป็นตาข่ายหรือเป็นแถบ (รูปที่ 48 ข,ค) ส่วนนอกของเซลล์ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ 2 ชั้น และผนังเซลล์ซึ่งมีลักษณะเป็นหยัก (รูปที่ 48 ง) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 มีโครงสร้างอย่างละเอียดภายในเซลล์เช่นเดียวกับ Halobacterium halobium ซึ่งรายงานโดย Cho et al (1967)

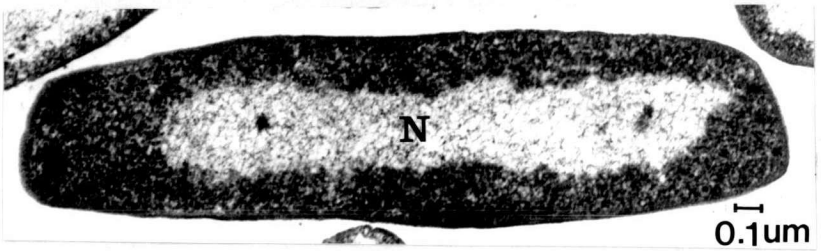
18. ผลการจัดชนิด (identify) แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8

ผลการศึกษารูปร่างภายนอกของแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 ด้วย SEM (รูปที่ 47) และการวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียตามวิธีมาตรฐาน พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 นี้มีรูปร่างเป็นแท่ง, ติดสีแกรมลบ ในการเจริญต้องการออกซิเจนและเกลือโซเดียมคลอไรด์อย่างต่ำ 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นมีเดียม 73 ที่มีเจลลาติน

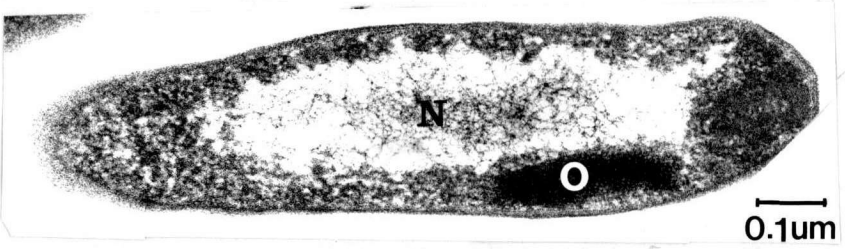


รูปที่ 47 โครงสร้างภายนอกแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบสแกนนิง

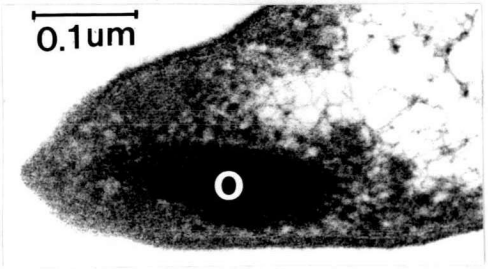
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



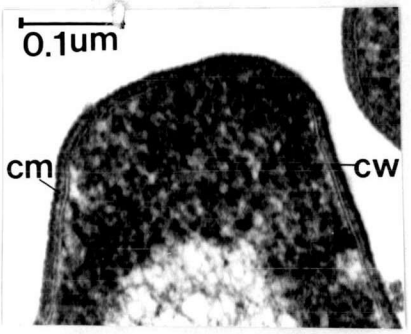
ก



ข



ค



ง

รูปที่ 48 โครงสร้างภายในของแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบทรานสมิชชัน

N = nucleoplasm

O = electron-dense organelle

CW = cell wall

CM = cell membrane

ตารางที่ 19 คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของ Halobacterium salinarium และแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8

คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ	Halobacterium salinarium*	แบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8
ต้องการโซเดียมคลอไรด์อย่างน้อย 12-15 เปอร์เซ็นต์สำหรับการเจริญ	+	+
คาตาเลส	+	+
ออกซิเดส	+	+
การย่อยเจลลาติน	+	+
การย่อยเคซิอีน	-	+
การย่อยไขมัน	N.B.	-
เปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์	-	+
การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์	+	-
การผลิตอินโดล	+	-
ยูรีเอส	N.B.	-
การใช้ซิเตรท	N.B.	-
การใช้น้ำตาลกลูโคส	-	-
กาแลคโตส	-	-
แมนโนส	-	-
ฟรุคโตส	-	-
ไรโบส	-	-
มอลโตส	-	-
แลคโตส	-	-
ซูโครส	-	-

หมายเหตุ * ที่มา Larsen, 1984

+ หมายถึง ให้ผล positive

- หมายถึง ให้ผล negative

N.B. หมายถึง ไม่มีข้อมูล

1.0 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ค่อนข้างโปร่งแสง มีสีชมพู เคลื่อนที่ได้ คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการเทียบกับ Halobacterium salinarium มีดังแสดงใน ตารางที่ 19

ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 นี้พบว่ามีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ แบคทีเรียในกลุ่ม Halobacterium จึงเรียกแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 นี้ว่า Halobacterium sp. สายพันธุ์ MC1 (MC = Micro. Chula)