อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 และการนำไปใช้ในสารซักล้าง

พิมล จำนงค์[1]

มหาวิทยาลัยมหิดล ถ.พระรามที่ 6 กรุงเทพฯ 10400

คิน เลย์ คู[2] **และ กนก รัตนะกนกชัย**[3]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

รับเมื่อ 28 สิงหาคม 2546 ตอบรับเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2547

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ 30 ชนิดในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดในสภาวะเป็นด่าง พบว่า alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ซึ่งเป็น Gram-variable เซลล์มีลักษณะเป็นท่อน มีการสร้างสปอร์ ต้องการออกซิเจนในการเจริญและผลิตเอนไซม์คะตะเลส ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุด โปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อ B12 สามารถทนต่อสารซักล้างชนิดผง P1 และ P2 กับชนิดเหลว L1 L2 และ L3 ได้ดี เมื่อแช่ไว้ร่วมกับสารซักล้างที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง *Bacillus* sp. B12 เจริญและผลิตโปรตีเอสได้ดีเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 7.0 ถึง 10.0 เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. B12 ในกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่า 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ผลิตโปรตีเอสได้สูงสุดเท่ากับ 0.44 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งการผลิตโปรตีเอสเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญของเซลล์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของ crude protease อยู่ในช่วง 8.0 ถึง 11.0 และมีเสถียรภาพสูงที่พีเอชในช่วง 6.0 ถึง 11.0 นาน 1 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส และมีเสถียรภาพสูงระหว่างอุณหภูมิ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากการซักผ้าด้ายดิบขาวที่ถูกทำให้เปื้อนด้วยเลือดวัว พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับผ้าสกปรกที่ซักด้วยสารซักล้างอย่างเดียว ผ้าสกปรกที่ซักด้วยสารซักล้าง L2 และ L3 ร่วมกับ crude protease ให้ค่าความขาวสว่างสูงกว่า โดยเพิ่มขึ้นจาก 77.22 และ 71.73 หน่วย เป็น 80.24 และ 75.83 หน่วย ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าผ้าสกปรกที่ซักด้วยสารซักล้างร่วมกับ crude protease ให้ค่าความเป็นสีแดงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับผ้าสกปรกที่ซักด้วยสารซักล้างอย่างเดียว ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่จะนำ crude protease จาก *Bacillus* sp. B12 ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้าง

คำสำคัญ : อัลคาไลน์โปรตีเอส / alkalotolerant *Bacillus* sp. / สารซักล้าง

---

[1] *นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์*

[2] *ผู้เชี่ยวชาญต่างประเทศ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[3] *รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

Alkaline Protease from Alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 and Its Application in Detergent

Pimon Jamnong[1]

Mahidol University, Rama VI Rd., Bangkok 10400

Khin Lay Kyu[2] **and Khanok Ratanakhanokchai**[3]

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangmod, Toongkru, Bangkok 10140

Received 28 August 2003 ; accepted 10 February 2004

Abstract

Thirty types of microorganisms were cultured in an alkaline soybean meal medium. The alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 was able to grow and produce the highest protease level. It is a Gram-variable, rod-shaped, spore-forming and oxygen required bacterium and produced catalase. Protease of the strain B12 was highly stable in commercial detergents such as P1, P2, L1, L2 and L3 when incubated at 50°C for 1 hr. *Bacillus* sp. B12 could grow in the 0.5% soybean meal medium and produced high protease at pH 7.0 to 10.0. The most suitable condition for alkaline protease production (0.44 Unit/ml) was pH 9.0 at 37°C, and shaking at 250 rpm for 24 hr. Alkaline protease produced by this strain was found to increase along with the cell growth. The crude protease had an optimum pH from 8.0 to 11.0 and maintained its stability over a broad range of pH between 6.0 and 11.0 for 1 hr. The optimum temperature for crude protease activity was from 30 to 80°C. The protease was stable between 30 and 60°C for 1 hr. To evaluate the protease action in improving the washing efficiency of the detergents, the pieces of white cotton cloth soiled with cow blood stain were washed with L2 and L3 detergents in the presence of the crude protease from *Bacillus* sp. B12. It showed the increases in bright values from 77.22 and 71.73 to 80.24 and 75.83, respectively and the decreases in red values when compared to the washing only with detergents L2 and L3. Therefore, crude alkaline protease from *Bacillus* sp. 12 was a good candidate to be applied in detergent industry.

Keywords : Alkaline Protease / Alkalotolerant *Bacillus* sp. / Detergent

---

[1] *Scientist, Division of Biotechnology, Faculty of Science.*

[2] *Expert, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[3] *Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

1. บทนำ

อัลคาไลน์โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ หรือกรดอะมิโน พบได้ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีบทบาทมากในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมถ่ายรูป การบำบัดของเสีย และโดยเฉพาะอุตสาหกรรมสารซักล้างมีปริมาณการใช้และคิดเป็นมูลค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอุตสาหกรรมอื่นๆ [1 และ 2] โดยเริ่มมีการนำอัลคาไลน์โปรตีเอสมาเป็นองค์ประกอบในสารซักล้างตั้งแต่คริสตศักราช 1914 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำความสะอาด โดยกำจัดโปรตีนพวกน้ำนม เลือด รอยเปื้อนของอาหาร และคราบสกปรกบนเนื้อผ้า ซึ่งอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ใช้เติมในสารซักล้างที่เป็นที่ยอมรับในทางการค้ามีหลายชนิด เช่น Subtilisin Carlsberg, Subtilisin BPN', Alcalase, Esperase และ Savinase เป็นต้น การทำงานของอัลคาไลน์โปรตีเอสในสารซักล้างขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น พีเอช อุณหภูมิ ส่วนประกอบของสารซักล้าง และเครื่องซักผ้า เป็นต้น ซึ่งสิ่งสำคัญในการใช้อัลคาไลน์โปรตีเอสเป็นส่วนประกอบในสารซักล้างคือเสถียรภาพของเอนไซม์ในสารซักล้าง ดังนั้นจึงได้มีการค้นหาอัลคาไลน์โปรตีเอสชนิดใหม่ที่มีสมบัติที่ดีโดยสามารถทำงานและมีเสถียรภาพในสารซักล้าง ซึ่งการใช้อัลคาไลน์โปรตีเอสเป็นส่วนประกอบในสารซักล้างสามารถลดปริมาณการใช้สารซักล้าง ลดสารเคมีที่ผสมอยู่ในสารซักล้างที่อาจทำให้เกิดมลพิษในน้ำ และสำหรับประเทศไทยหากสามารถผลิตโปรติเอสมาใช้ในสารซักล้างได้ภายในประเทศจะช่วยลดปริมาณการนำเข้าโปรตีเอสได้ โดยในปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเอนไซม์มากกว่า 700 ล้านบาทต่อปี [3] จุลินทรีย์เป็นแหล่งที่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสในปริมาณมากและสกัดได้ง่ายเนื่องจากผลิตแล้วส่งออกภายนอกเซลล์โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Bacillus* มีบทบาทสำคัญในทางอุตสาหกรรม โดยประมาณเกือบครึ่งหนึ่งของการผลิตโปรตีเอสที่ใช้ในทางการค้าได้มาจากสายพันธุ์นี้ [4]

จากการศึกษาที่ผ่านมาของห้องปฏิบัติการเอนไซม์เทคโนโลยี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในสภาวะเป็นด่างจากแหล่งต่างๆ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อคัดเลือกและศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสที่สามารถทำงานและมีเสถียรภาพสูงในสารซักล้าง ซึ่งมีสมบัติที่ดีและเหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมสารซักล้าง งานวิจัยนี้นอกจาก มีความสำคัญต่อความรู้ความเข้าใจในการศึกษาวิทยาศาสตร์พื้นฐานแล้ว ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้างต่อไปในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.1.1 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ระบบบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษบางปะอิน ระบบบ่อบำบัดน้ำเสียของบริษัทเยื่อกระดาษสยาม กากถั่วเน่า และจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง ในสูตรอาหารเหลวกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้วจากบริษัทน้ำมันพืชทิพย์ร้อยละ 2.0 ในน้ำกลั่น โดยเตรียมอาหารเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ

121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วปรับพีเอชเป็น 10.5 ด้วย Na_2CO_3 ร้อยละ 10 บ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาตรวจวัดกิจกรรม ของอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.1.2 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรตีเอสที่มีสมบัติเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในสารซักล้างในสูตร อาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 2.0 ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 9.0 และ 12.0 ด้วย Na_2CO_3 ร้อยละ 10 บ่มใน ตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.2 การตรวจวัดกิจกรรมอัลคาไลน์โปรตีเอส

การตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอสใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Anson [5] โดยเติมเอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร ลงในเคซีนร้อยละ 0.5 ใน 50 มิลลิโมลาร์คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.4 โมลาร์ กรดไตรคลอโรอะซีติก ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ย่อยสลายเคซีนร้อยละ 0.5 ให้ผลิตภัณฑ์ไทโรซีน 1 ไมโครโมล ที่พีเอช 10.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 1 นาที

2.3 ผลของสารซักล้างต่อเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอส

นำ crude enzyme จากจุลินทรีย์ตามหัวข้อ 1.2 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในสารซักล้างความเข้มข้น ร้อยละ 1.0 จำนวน 0.25 มิลลิลิตร 7 ชนิด ได้แก่ ชนิดผง 3 ชนิด คือ P1, P2 และ P3 และชนิดน้ำ 4 ชนิด คือ L1, L2, L3 และ L4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอสที่เหลืออยู่

2.4 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อบาซิลัส

นำเชื้ออายุ 24 และ 48 ชั่วโมง มาย้อมสีแกรม และย้อมสปอร์ ทำการทดสอบ catalase โดยนำเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง มาหยดด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 3.0 จำนวน 1 หยด โดยผลบวกจะเกิดฟองก๊าซขึ้น และทดสอบความสามารถในการใช้ออกซิเจน โดยนำเชื้อแทงลงไปในหลอดอาหารแข็ง nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบผลการทดลอง

2.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.5.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ในน้ำกลั่น โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 และ 12.0 บ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณเชื้อ ปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.5.2 ปริมาณกากถั่วเหลืองที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ปรับพีเอชให้เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากข้อ 5.1 บ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.5.3 การผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ระยะเวลาต่างๆ

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ปรับพีเอชเป็น 9.0 บ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 และ 48 ชั่วโมง ส่วนหนึ่งนำมาตรวจนับปริมาณเชื้อและวัดค่าพีเอชของน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนที่เหลือปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.6.1 ผลของพีเอชต่อการทำงานและเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอส

ตรวจสอบผลของพีเอชต่อการทำงานของ crude enzyme โดยใช้วิธีการเดียวกับการตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส โดยนำเอนไซม์บ่มกับเคซีนร้อยละ 0.5 ใน 50 มิลลิโมลาร์ของสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่พีเอช 6.0-7.0 (sodium phosphate) 7.0-9.0 (Tris-HCl) 9.0-10.0 (sodium carbonate-bicarbonate) และ 10.0-12.0 (Na_2HPO_4/NaOH) ส่วนการตรวจสอบเสถียรภาพของ crude enzyme ทำการทดลองโดยแช่เอนไซม์ร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชระหว่าง 6.0 ถึง 12.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดกิจกรรมของโปรตีเอสที่เหลืออยู่ตามวิธีการข้างต้น

2.6.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอส

ตรวจสอบผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ crude enzyme โดยใช้วิธีการเดียวกับการตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส โดยนำเอนไซม์บ่มกับเคซีนร้อยละ 0.5 ใน 50 มิลลิโมลาร์ ของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 10.0 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ส่วนการตรวจสอบเสถียรภาพของ crude enzyme ทำการทดลองโดยแช่เอนไซม์ร่วมกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 10.0 อุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดกิจกรรมของโปรตีเอสที่เหลืออยู่ตามวิธีการข้างต้น

2.7 ผลของสารยับยั้งต่อการทำงานของ crude enzyme

แช่ crude enzyme ร่วมกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 10.0 ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) เป็น 1 มิลลิโมลาร์ และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) กับ iodoacetamide ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปตรวจวัดกิจกรรมของโปรตีเอสที่เหลือ (PMSF ละลายใน ethanol ร้อยละ 1.0 ที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 10.0)

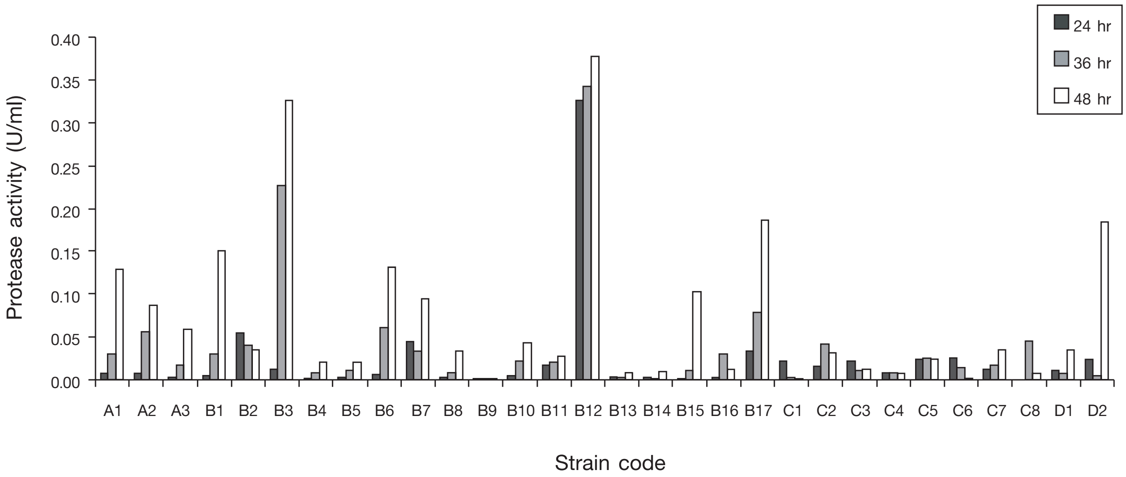
2.8 การทดสอบประสิทธิภาพในการขจัดคราบสกปรกของผ้าด้วย crude protease

ตรวจสอบประสิทธิภาพในการขจัดคราบสกปรกของผ้าด้วย crude protease จาก *Bacillus* sp. B12 โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Banerjee และคณะ [6] โดยนำผ้าด้ายดิบขาว (cotton white cloth) ไปย้อมด้วยเลือดวัวแล้วตากให้แห้ง หลังจากนั้นตัดเป็นชิ้นขนาดกว้าง 4 เซนติเมตร และยาว 4 เซนติเมตร แล้วนำไปทดลองดังนี้ คือ นำผ้าชิ้นที่ 1 ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่เติมน้ำประปา 59 มิลลิลิตร ผ้าชิ้นที่ 2 ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่เติมน้ำประปา 56 มิลลิลิตร และสารซักล้างชนิดเหลวร้อยละ 1.0 (L2 และ L3 ทำการทดลองแยกกัน) 3 มิลลิลิตร และผ้าชิ้นที่ 3 ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่เติมน้ำประปา 50 มิลลิลิตร สารซักล้างชนิดเหลวร้อยละ 1.0 3 มิลลิลิตร และ crude enzyme (0.42 หน่วยต่อมิลลิลิตร) 6 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำ flask ทั้งหมดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที เขย่าด้วยมือเป็นครั้งคราว ล้างด้วยน้ำประปา แล้วตากให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าความขาวสว่างและการเป็นสีแดงด้วยเครื่อง Chroma meter (Minolta, Model CR-300) ซึ่งการทำงานของเครื่องเป็นแบบอัตโนมัติ และมีการเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่นระหว่าง 400-1100 นาโนเมตร

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

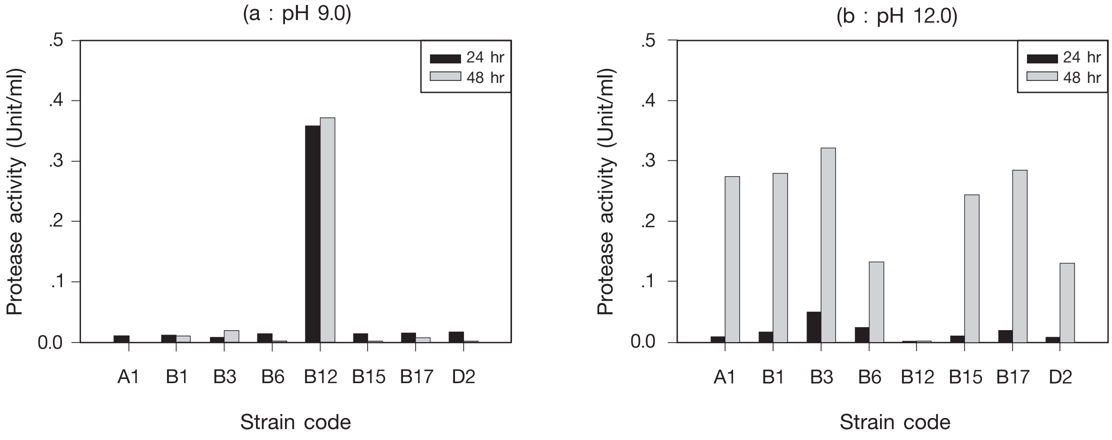
3.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรตีเอส

ภายหลังการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ 30 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 2 พีเอช 10.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 2 วัน นำน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งแยกเซลล์ออกโดยการปั่นด้วยแรงเหวี่ยงมาตรวจหากิจกรรมของโปรตีเอสที่สภาวะเป็นด่าง (พีเอช 10.0) พบว่ามีจุลินทรีย์เพียง 8 สายพันธุ์เท่านั้น ที่ผลิตโปรตีเอสได้สูงกว่า 0.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อรหัส B12 ให้กิจกรรมโปรตีเอสสูงสุด (มากกว่า 0.33 หน่วยต่อมิลลิลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงไว้นานระหว่าง 24 ถึง 48 ชั่วโมง ส่วนเชื้อรหัส A1, B1, B3, B6, B15, B17 และ D2 ให้กิจกรรมโปรตีเอส ระหว่าง 0.10 ถึง 0.32 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงไว้นาน 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 1 ดังนั้นจึงคัดเลือกโปรตีเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ 8 ชนิดที่ผลิตโปรตีเอสสูงเพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการขจัดคราบสกปรกของผ้า



รูปที่ 1 การผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบด ที่ปรับพีเอชเป็น 10.5 นาน 24 36 และ 48 ชั่วโมง

เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ให้กิจกรรมของโปรตีเอสสูงทั้ง 8 สายพันธุ์ ที่พีเอช 9.0 นาน 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อรหัส B12 ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุด (0.35 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ส่วนเชื้อรหัส A1, B1, B3, B6, B15, B17 และ D2 ให้กิจกรรมน้อยกว่า 0.02 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 2 (a)

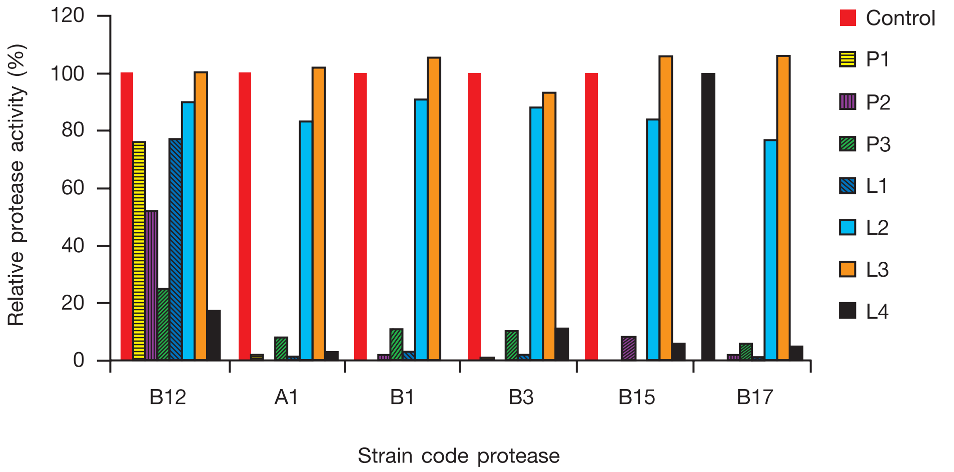


รูปที่ 2 การผลิตโปรตีเอสเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกากถั่วเหลืองบดที่ปรับพีเอชเป็น (a) 9.0 และ (b) 12.0 นาน 24 และ 48 ชั่วโมง

ขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่พีเอช 12.0 นาน 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อรหัส A1, B1, B3, B6, B15, B17 และ D2 ให้กิจกรรมมากกว่า 0.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนที่เวลา 24 ชั่วโมง ให้กิจกรรมน้อยกว่า 0.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 2 (b)) ส่วนเชื้อรหัส B12 ไม่สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ในสภาวะความเป็นด่างสูง ซึ่งจากการตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับเมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ (ระหว่าง 4.5 และ 5.0 x 10^6 CFU/ml)

3.2 ผลของสารซักล้างต่อการทำงานและเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอส

เมื่อนำโปรตีเอสจากเชื้อ 6 ชนิดเก็บร่วมกับสารซักล้าง 7 ชนิด ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง มาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าโปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อรหัส B12 ยังคงสามารถทำงานได้ในสารซักล้างทั้งหมด โดยเมื่อเติมลงในสารซักล้างชนิดผงได้แก่ P1 และ P2 และชนิดน้ำได้แก่ L1, L2 และ L3 โปรตีเอสเหลือกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 50 ซึ่งมากกว่าเมื่อเติมลงในสารซักล้างชนิดผง P3 และชนิดน้ำ L4 ที่เหลือกิจกรรมน้อยกว่าร้อยละ 25 ในขณะที่โปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อรหัส A1, B1, B3, B15 และ B17 เมื่อเติมลงในสารซักล้างชนิด P1, P2, P3, L1 และ L4 เหลือกิจกรรมน้อยกว่าร้อยละ 10 ซึ่งคาดว่าสาร anionic surfactant ที่เป็นส่วนประกอบในสารซักล้างน่าจะยับยั้งการทำงานของโปรตีเอส โดยในสารซักล้างชนิด P1 และ L4 มี anionic surfactant เป็น linear alkyl benzene sulfonate สารซักล้างชนิด P2 และ P3 มี alkyl benzene sulfonate และชนิด L1 มี sodium dodecyl benzene sulfonate เป็นส่วนประกอบ และพบว่าโปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อทั้งหมดเมื่อเติมลงในสารซักล้างชนิดน้ำ L2 และ L3 ยังคงสามารถทำงานได้ดีโดยเหลือกิจกรรม มากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าส่วนประกอบในสารซักล้างทั้งสองชนิดไม่ค่อยมีผลรบกวนต่อการทำงานและเสถียรภาพของโปรตีเอส หรือในสารซักล้างทั้งสองชนิดนี้มีส่วนประกอบของสารบางอย่างที่ช่วยทำให้โปรตีเอสทำงานได้ดี ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 กิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอสที่เหลือจากเชื้อ 6 ชนิด หลังจากแช่ร่วมกับสารซักล้างที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง โดยที่สารซักล้างชนิดผงมี 3 ชนิด คือ P1 P2 และ P3 และชนิดเหลว 4 ชนิด คือ L1 L2 L3 และ L4 (control หมายถึงไม่เติมสารซักล้าง)

เชื้อรหัส B12 สามารถเจริญในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบด ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันพืช เจริญรวดเร็ว และใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น และสามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อชนิดอื่น โปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อชนิดนี้สามารถทนต่อสารซักล้างต่างๆได้ดี ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อชนิดนี้ไปผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม สารซักล้าง ดังนั้นเชื้อรหัส B12 จึงเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการนำมาผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้

3.3 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อรหัส B12 ซึ่งคัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษสยาม จำกัด จังหวัดกาญจนบุรี [7] พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาย้อมสีแกรมติดสีแดง แต่เมื่อเพาะเลี้ยงไว้นาน 48 ชั่วโมงย้อมสีแกรม ติดสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อชนิดนี้เป็น Gram-variable และเมื่อย้อมสปอร์พบว่าติดสีเขียว แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างสปอร์ได้ และพบว่าเป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ เมื่อทดสอบด้วย catalase พบว่าสามารถเกิดฟองก๊าซได้ ซึ่งจากการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ตามวิธีของ Bergy [8] พบว่า เชื้อรหัส B12 เป็น *Bacillus* sp. ที่มีรูปร่างแบบแท่ง Gram-variable สามารถสร้างสปอร์ได้ เป็น *Bacillus* sp. ที่ต้องการอากาศในการเจริญ และสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อรหัส B12

Characteristic	Test result
Gram stain	Gram-variable
Form	Rod-shape
O_2- requirement	Aerobic
Endospore-forming	+
Catalase	+

3.4 ผลของสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีเอส

3.4.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. B12 ในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 12.0 โดยใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 4.5 X 10^6 CFU/ml เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 7.0 ถึง 10.0 และผลิตโปรตีเอสได้สูง โดยมีกิจกรรมมากกว่า 0.40 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยที่พีเอช 9.0 มีกิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะสูงสุด 0.44 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 6.34 x 10^{-12} Unit/CFU ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นสูงกว่า 11.0 เชื้อไม่สามารถเจริญและผลิตโปรตีเอสในการทดลองต่อไปจึงเลือกปรับค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 9.0 ซึ่ง Johnvesly และ Naik [9] ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีเอสของ alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 พบว่าสามารถเจริญและผลิต

โปรตีเอสได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชระหว่าง 8.0 ถึง 11.0 และจากการที่เชื้อ *Bacillus* sp. B12 ไม่สามารถเจริญและผลิตโปรตีเอสที่สภาวะเป็นด่างสูง แต่เจริญและผลิตโปรตีเอสได้ในด่างอ่อนเป็นการยืนยันให้เห็นว่าเชื้อชนิดนี้เป็นพวก alkalotolerant ดังแสดงในตารางที่ 2

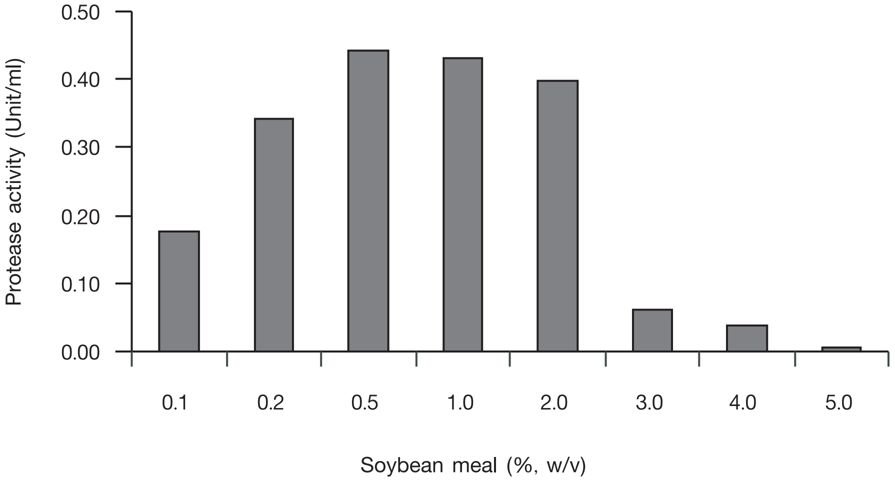
ตารางที่ 2 ผลของพีเอชต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสและการเจริญของ *Bacillus* sp. B12

pH	Protease activity (Unit/ml)	Cell number (CFU/ml)	Specific activity (Unit/CFU)
7.0	0.40	6.80×10^{10}	5.81×10^{-12}
8.0	0.43	7.10×10^{10}	6.09×10^{-12}
9.0	0.44	7.00×10^{10}	6.34×10^{-12}
10.0	0.44	8.00×10^{10}	5.50×10^{-12}
11.0	0.00	5.00×10^{6}	0.00
12.0	0.00	4.50×10^{6}	0.00

หมายเหตุ : เป็นกิจกรรมและจำนวนเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง

3.4.2 ปริมาณกากถั่วเหลืองที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีเอส

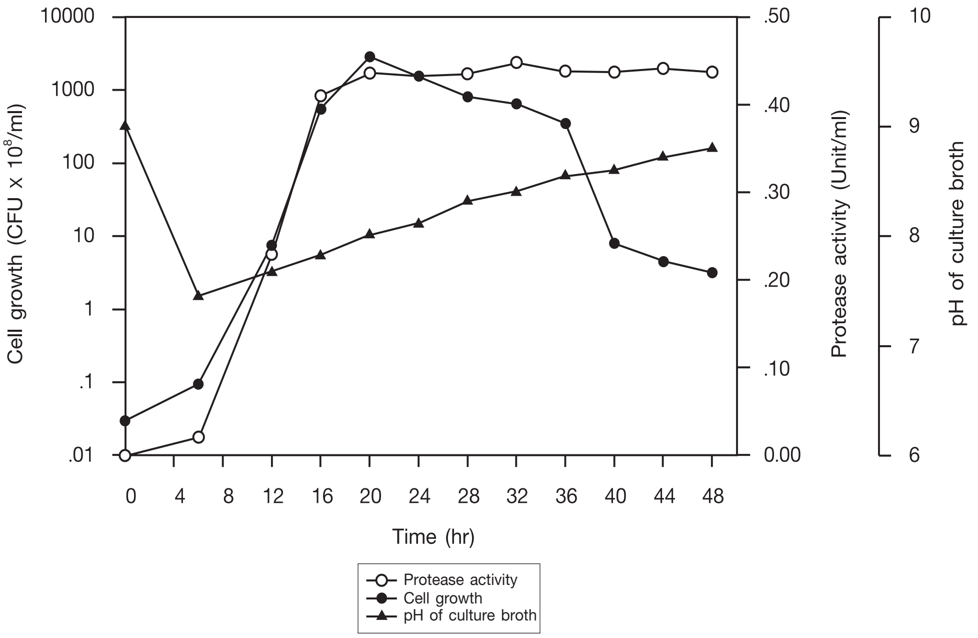
จากรูปที่ 4 เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. B12 ในอาหารเหลวพีเอช 9.0 ที่มีกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากถั่วเหลืองขึ้นจากร้อยละ 0.1 ถึง 0.5 เชื้อสามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงขึ้นตามลำดับ อาจเนื่องจาก *Bacillus* sp. B12 เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ ซึ่งปริมาณกากถั่วเหลืองบดในช่วงความเข้มข้นนี้มีพื้นที่ผิวสัมผัสกับบาซิลัส และออกซิเจนที่เหมาะสมต่อย่อยสลายเพื่อนำไปใช้ในการเจริญได้ง่ายจึงกระตุ้นการผลิตโปรตีเอสได้ดี และที่ความเข้มข้นของกากถั่วเหลืองร้อยละ 0.5 เชื้อสามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงสุดเท่ากับ 0.44 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ถึง 2.0 การผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อลดลงเล็กน้อย ขณะที่ความเข้มข้นของกากถั่วเหลืองมากกว่าร้อยละ 3.0 การผลิตอัลคาไลด์โปรติเอสน้อยมาก ซึ่งอาจมีสาเหตุจากกากถั่วเหลืองบดในปริมาณมากทำให้การละลายของออกซิเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อลดลง เชื้อเจริญได้น้อยจึงผลิตโปรตีเอสได้น้อย ซึ่งจากการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของเชื้อ (ตารางที่ 1) พบว่าเชื้อเจริญได้ในที่มีอากาศ แต่ไม่สามารถเจริญในที่ไม่มีอากาศ อีกเหตุผลหนึ่งอาจเป็นเพราะว่าที่ความเข้มข้นของกากถั่วเหลืองสูงมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระปนอยู่ในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดมากเกินไปจึงไปกดดัน (repress) ไม่ให้มีการสร้างโปรตีเอสเกิดขึ้นในปรากฏการณ์ที่เรียกว่า end product inhibition [10 และ 11] ซึ่งจากการศึกษาของกฤษณา โพธิสารัตนะ [12] พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. B-2 ในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.1 กลูโคสร้อยละ 3.0 และกากถั่วเหลืองร้อยละ 3.0 เชื้อสามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงสุด นอกจากนี้ Joo และคณะ [13] รายงานว่า *Bacillus* horikoshii เจริญและผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกากถั่วเหลืองร้อยละ 1.5 ที่ผสมด้วยเคซีนร้อยละ 1.0 และโปตัสเซียมฟอสเฟตร้อยละ 0.1 ที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4 ผลของปริมาณกากถั่วเหลืองต่อการผลิตโปรตีเอสของ *Bacillus* sp. B12

3.4.3 การผลิตโปรตีเอสที่ระยะเวลาต่างๆ

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. B12 ในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่พีเอช 9.0 และเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ พบว่าการเจริญและอัตราการผลิตโปรตีเอสของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างชั่วโมงที่ 6 ถึง 16 ขณะที่การผลิตโปรตีเอสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยระหว่างชั่วโมงที่ 16 ถึง 48 และการที่เชื้อสามารถเจริญและผลิตโปรตีเอสควบคู่กันไปตั้งแต่ช่วง lag phase จนสิ้นสุดช่วง log phase อาจสรุปได้ว่าการผลิตโปรตีเอสของเชื้อชนิดนี้น่าจะเป็นแบบ growth-associated enzyme และพบว่าเชื้อสามารถเจริญได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 20 และการเจริญลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้นการเจริญลดลงเร็วมากระหว่างชั่วโมงที่ 36 ถึง 40 และลดลงเล็กน้อยระหว่างชั่วโมงที่ 40 ถึง 48 เชื้อสามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 จนถึงชั่วโมงที่ 48 ซึ่งจาก รายงานของ Keay และ Wildi [14] พบว่านิวทรัลโปรตีเอสและอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่ ถูกสร้างในช่วงท้ายของการเจริญ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการสร้างสปอร์ และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพีเอช กับเวลาพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชลดลงมากที่สุดในช่วง 6 ชั่วโมงแรก โดยเปลี่ยนจาก 9.0 เป็น 7.5 ดังแสดงในรูปที่ 5 ซึ่งการที่ค่าพีเอชลดลงอาจเกิดจากในระหว่างการเจริญ เชื้อใช้สารคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบในกากถั่วเหลืองถึงร้อยละ 31 [15] ในระหว่างการเจริญและแบ่งเซลล์ สารคาร์โบไฮเดรทจะถูกย่อยสลายไปเป็นน้ำตาล เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งเชื้อบาซิลัสจะผลิตสารบางอย่างที่มีความเป็นกรดขึ้น เช่น citric acid, α-ketoglutaric acid, succinic acid, fumaric acid, malic acid และ oxaloacetic acid เป็นต้น [16] ซึ่งในช่วงเวลาเดียวกันนี้แม้ว่าจะมีการผลิตสารที่มีสมบัติเป็นด่างจากการสังเคราะห์สารอื่นเกิดขึ้นด้วย แต่การสลายน้ำตาลกลูโคส เพื่อให้เกิดเป็นแหล่งพลังงานและเป็นกรดมีมากกว่า จึงมีผลทำให้ค่าพีเอชลดลง แต่หลังจากชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป ค่าพีเอชค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้น อาจเนื่องจากกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อสังเคราะห์สิ่งจำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของเชื้อบาซิลัสมากขึ้น เช่น กรดอะมิโน กรดไขมัน กรดนิวคลีอิก เป็นต้น ทำให้มีการขับสารที่มีสมบัติเป็นด่าง เช่น แอมโมเนีย ออกมามากขึ้น หรือเกิดจากการผลิตกรดจากการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสลดลงเนื่องจากสารคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลกลูโคสในกากถั่วเหลืองถูกใช้เกือบหมดแล้ว ดังนั้นสารที่มีสมบัติเป็นด่างที่ผลิตขึ้นจึงมีผลทำให้ค่าพีเอชสูงขึ้น



รูปที่ 5 Time courses ของการเจริญ การผลิตโปรตีเอส และพีเอชของ *Bacillus* sp. B12 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 พีเอช 9.0

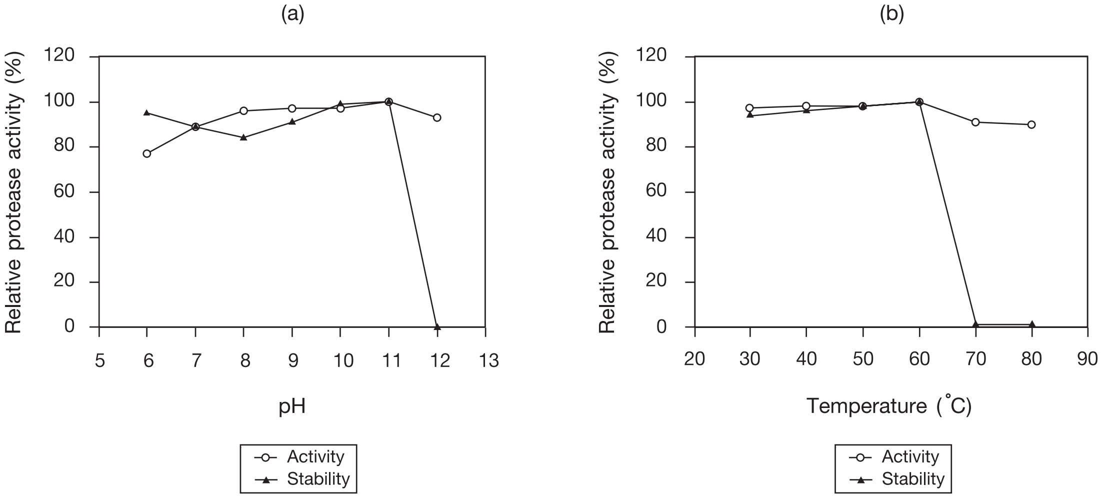
3.5 ผลของสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของอัลคาไลน์โปรตีเอส

3.5.1 ผลของพีเอชต่อการทำงานและเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอส

crude enzyme สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6.0 ถึง 12.0 โดยในช่วงพีเอช 8.0 ถึง 11.0 มีกิจกรรมเหลือมากกว่าร้อยละ 95 ขณะที่มีเสถียรภาพต่อพีเอชในช่วง 6.0 ถึง 11.0 โดยเหลือกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 85 ส่วนที่พีเอช 12.0 โปรตีเอสเหลือกิจกรรมน้อยมาก ดังแสดงในรูปที่ 6 (a) ซึ่งจากรายงานของ Kumar และ Takagi [2] พบว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 9.0 ถึง 11.0

3.5.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอส

crude enzyme สามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส โดยเหลือกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 90 ขณะที่เอนไซม์มีเสถียรภาพสูงที่อุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส โดยเหลือกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 95 ขณะที่โปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อชนิดนี้ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า 70 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 6 (b) สำหรับสาเหตุที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส ขณะที่เสถียรภาพที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสต่ำมากน่าจะมีสาเหตุจากในการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์อยู่ร่วมกับสับสเตรท ซึ่งสับสเตรทจะช่วยเพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์ [17] ส่วนในกรณีของการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ เอนไซม์อยู่ร่วมกับบัฟเฟอร์เท่านั้น จึงทำให้ทนต่ออุณหภูมิได้น้อยกว่า นอกจากนี้การตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ใช้เวลาเพียง 10 นาที เท่านั้น ส่วนการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ใช้เวลา 60 นาที โดยทั่วไปเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์จะทำงานได้ดีขึ้น เนื่องจากเมื่อพลังงานภายในโมเลกุลของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นจะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้น แต่ในขณะเดียวกันที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพ ดังนั้นที่อุณหภูมิหนึ่งๆ กิจกรรมที่วัดได้จะเป็นค่ารวมของกิจกรรมที่เพิ่มขึ้นจากการมีพลังงานเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ กับการลดลงของกิจกรรมเนื่องจากการเสียสภาพ [18]



รูปที่ 6 ผลของ (a) พีเอช และ (b) อุณหภูมิ ต่อการทำงานและเสถียรภาพของ crude enzyme ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. B12 หลังจากเก็บเอนไซน์ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ นาน 1 ชั่วโมง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า crude enzyme ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. B12 สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง และมีเสถียรภาพดีในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส สามารถทำงานและมีเสถียรภาพดีในช่วงพีเอชกว้าง Kumar และ Takagi [2] รายงานว่า *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานในช่วง 50 ถึง 70 องศาเซลเซียส และพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 9.0 ถึง 11.0 การที่อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. B12 สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิสูง ทำให้มีแนวโน้ม ที่น่าจะนำโปรตีเอสชนิดนี้มาใช้เป็นส่วนผสมของสารซักล้าง ซึ่งมักต้องทำงานในสภาวะเป็นด่างประมาณ 8.0 ถึง 12.0 และอุณหภูมิน้อยกว่า 40 องศาเซลเซียส ภายในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

3.6 ผลของสารยับยั้งต่อการทำงานของ crude enzyme

ผลการศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้งต่อการทำงานของ crude enzyme จาก *Bacillus* sp. B12 แสดงในตารางที่ 3 พบว่า PMSF ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสได้ร้อยละ 92 ส่วน EDTA ที่มี ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 6 ในขณะที่สาร iodoacetamide ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งการที่ crude enzyme ถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสาร PMSF และ EDTA แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. B12 น่าจะผลิต crude enzyme ที่ประกอบด้วยทั้งอัลคาไลน์เซรีนโปรตีเอสและนิวทรัลโปรตีเอส และการที่สาร EDTA ไม่ค่อยมีผลลดการทำงานของโปรตีเอสถือว่าเป็นข้อดีของเอนไซม์ ที่จะนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในสารซักล้าง เนื่องจากส่วนใหญ่ในสารซักล้างมักมีปริมาณของ chelating agent อยู่สูง

ตารางที่ 3 ผลของสารยับยั้งต่อการทำงานของ crude enzyme

Inhibitor	Relative protease activity (%)
Control	100
PMSF (1 mM)	8
EDTA (10 mM)	94
Iodoacetamide (10 mM)	108

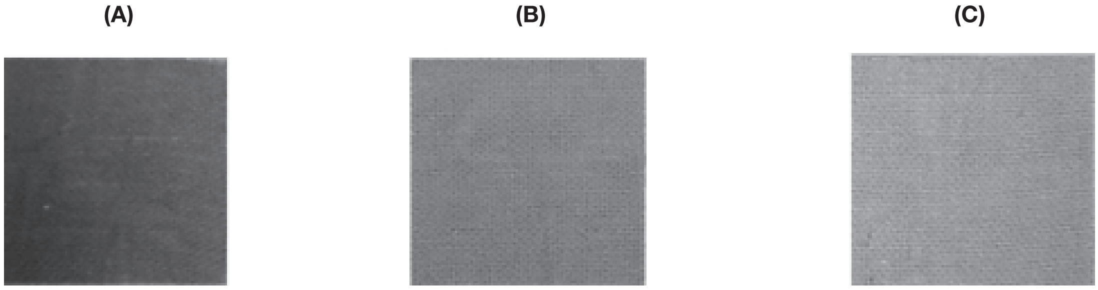
3.7 การทดสอบประสิทธิภาพในการขจัดคราบสกปรกของผ้าขาวด้วย crude enzyme จาก *Bacillus* sp. B12

จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 2 พบว่า crude protease จาก *Bacillus* sp. B12 ทนและทำงานได้ดีในสารซักล้างหลายชนิดทั้งชนิดผงและเหลว โดยทำงานได้ดีที่สุดในสารซักล้างชนิดเหลว L2 และ L3 เมื่อนำ crude protease จาก *Bacillus* sp. B12 (0.42 หน่วยต่อมิลลิกรัม) เติมลงในสารซักล้างชนิดเหลว L2 และ L3 เพื่อขจัดคราบสกปรกของผ้าด้ายดิบขาวเป็นเวลานาน 30 นาที พบว่าเอนไซม์ที่เติมลงในผ้าที่มีสารซักล้างชนิด L2 ทำให้ผ้ามีความขาวสว่าง 80.24 หน่วย ส่วนการใช้เฉพาะสารซักล้างอย่างเดียวให้ค่าความขาวสว่าง 77.22 หน่วย ขณะที่ไม่ได้ใช้ทั้งสารซักล้างและเอนไซม์ให้ค่าความขาวสว่าง 72.79 หน่วย และเอนไซม์ที่เติมลงในผ้าที่มีสารซักล้างชนิด L3 ทำให้ผ้ามีค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 75.83 หน่วย เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เฉพาะสารซักล้างอย่างเดียวและไม่ได้ใช้ทั้งสารซักล้างและเอนไซม์ ซึ่งให้ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 71.73 และ 70.14 หน่วยตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าผ้าสกปรกที่ซักด้วยสารซักล้าง L2 และ L3 ร่วมกับ crude protease ให้ค่าความเป็นสีแดงลดลงจาก 5.37 และ 6.84 หน่วย เป็น 2.98 และ 4.75 หน่วย ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผ้าสกปรกที่ซักด้วยสารซักล้างเพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่เติมลงในสารซักล้างมีผลให้สารซักล้างทั้งสองชนิดกำจัดคราบเลือดออกจากผ้าขาวได้ดีขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 7 และ 8

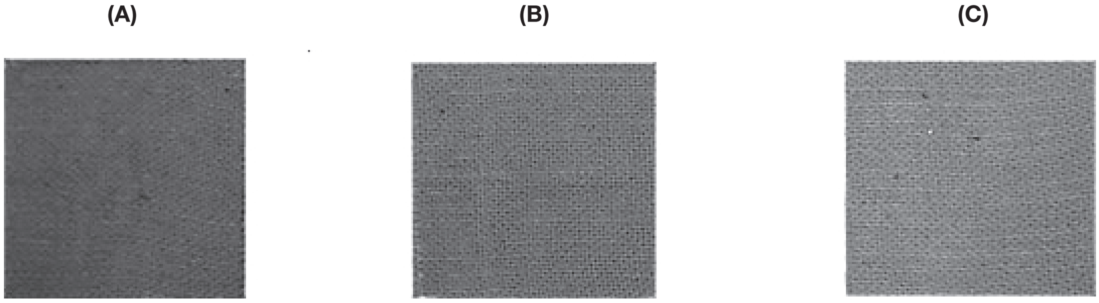
ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพในการขจัดคราบสกปรกของผ้าด้วย crude enzyme จาก *Bacillus* sp. B12

Detergent	Condition	Brightness	Red value
L2	Control	72.79	6.30
	Detergent	77.22	5.37
	Detergent + enzyme	80.24	2.98
L3	Control	70.14	8.15
	Detergent	71.73	6.84
	Detergent + enzyme	75.83	4.75

Control หมายถึงผ้าที่ไม่ได้เติมทั้งสารซักล้างและเอนไซม์



รูปที่ 7 การขจัดคราบสกปรกของผ้าด้ายดิบขาวด้วย crude enzyme จาก *Bacillus* sp. B12
(A) ผ้าเปื้อนเลือด
(B) ผ้าเปื้อนเลือดล้างด้วยสารซักล้างชนิด L2
(C) ผ้าเปื้อนเลือดล้างด้วยสารซักล้างชนิด L2 ร่วมกับอัลคาไลน์โปรตีเอส



รูปที่ 8 การขจัดคราบสกปรกของผ้าด้ายดิบขาวด้วย crude enzyme จาก *Bacillus* sp. B12
(A) ผ้าเปื้อนเลือด
(B) ผ้าเปื้อนเลือดล้างด้วยสารซักล้างชนิด L3
(C) ผ้าเปื้อนเลือดล้างด้วยสารซักล้างชนิด L3 ร่วมกับอัลคาไลน์โปรตีเอส

4. สรุปผลการวิจัย

alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ซึ่งคัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเยื่อและกระดาษ สามารถเจริญและผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 พีเอช 9.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยการผลิตเอนไซม์สัมพันธ์กับการเจริญ ซึ่งจัดเป็น growth-associated enzyme เชื้อชนิดนี้สามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงและค่อนข้างคงที่ในช่วง stationary phase เอนไซม์จากสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 8.0 ถึง 11.0 และทนต่อพีเอชในช่วง 6.0 ถึง 11.0 อุณหภูมิที่สามารถทำงานและมีเสถียรภาพสูงอยู่ในช่วง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส สาร PMSF 1 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งการทำงานของ crude enzyme จาก *Bacillus* sp. B12 ได้สูงสุด และ EDTA 10 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสได้น้อยมาก crude enzyme จาก *Bacillus* sp. B12 สามารถทนต่อสารซักล้างได้หลายชนิด และเมื่อเติม crude enzyme ลงในสารซักล้างชนิดเหลว L2 และ L3 สามารถขจัดคราบเลือดจากผ้าด้ายดิบขาวได้ดีกว่าเมื่อใช้สารซักล้างเพียงอย่างเดียว ดังนั้นอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากสายพันธุ์ B12 จึงมีสมบัติที่ดีที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้าง

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน หมวดเงินอุดหนุนการวิจัย ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ประจำปีงบประมาณ 2548

6. เอกสารอ้างอิง

1. Helle, O., and Boyce, C. O., 1990, "Microbial proteinase and biotechnology," *Microbial Enzyme and Biotechnology,* 2nd ed., Elsevier Applied Science, New York, USA, pp. 240-241.

2. Kumar, C. G., and Takagi, H., 1999, "Microbial alkaline proteases : From a Bioindustrial Viewpoint," *Biotechnology Advances,* Vol. 17, pp. 561-594.

3. Thai Customs Department, Import and Export Statistics [Online], Available: http://www.customs.go.th/Statistic/StatisticIndex.jsp (HS-code : 3507900009) [2003, June 17].

4. Beg, Q. K., and Gupta, R., 2002, "Purification and Characterization of an Oxidation-stable, Thiol-dependent Serine Alkaline Protease from *Bacillus mojavensis,*" *Enzyme and Microbial Technology,* Vol. 6231, pp. 1-11.

5. Anson, M. L., 1938, "Estimation of Pepsin, Papain and Cathepsin with Hemoglobin," *Journal of General Physic,* Vol. 22, pp. 79- 89.

6. Banerjee, U. C., Sani, R. K., Azmi, W., and Soni, R., 1999, "Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus brevis* and its Characterization as a Laundry Detergent Additive," *Process Biochemistry,* Vol. 35, pp. 213-219.

7. จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ, 2542, "การศึกษาไซลาเนสจากจุลินทรีย์ทนด่างและอุณหภูมิสูงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ," วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

8. Sneath, P. H. A., 1986, "Endospore-forming Gram-positive Rod and Cocci," In : Sneath, P.H.A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.), *Bergy's Manual of Systematic Bacteriology,* Vol. 2, Section 13, Williams and Wilkins, Baltimore, MD., pp. 1104-1139.

9. Johnvesly, B., and Naik, G. R., 2001, "Studies on Production of Thermostable Alkaline Protease from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a Chemically Defined Medium," *Process Biochemistry*, Vol. 37, pp. 139-144.

10. Ward, O. P., 1985, “Proteolytic Enzymes”, In : Moo-Yong M (ed), *Comprehensive Biotechnology, the Practice of Biotechnology : Current Commodity Products,* Pergamon Press, Oxford, Vol. 3, pp. 789-818.

11. Doi, R. H., 1972, “Role of Proteases in Sporulation,” *Current Topic in Cellular Regulation,* Vol. 6, pp. 1-20.

12. กฤษณา โพธิสารัตนะ, 2535, “การศึกษาสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. ชนิดทนต่อสภาวะด่าง,” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. Joo, H. S., Kumar, C. G., Park, G. C., Kim, K. T., Paik, S. R., and Chang, C. S., 2002, “Optimization of the Production of an Extracellular Alkaline Protease from *Bacillus horikoshi,*” *Process Biochemistry,* Vol. 38, pp. 155-159.

14. Keay, L. and Wildi, B. S., 1970, “Protease of the Genus *Bacillus.* I. Neutral Proteases,” *Biotechnology and Bioengineering,* Vol. 12, pp. 179-212.

15. จิตธนา แจ่มเมฆ, สายสนม ประดิษฐดวง, ทะนง ภัครัชพันธุ์, ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์, เนื้อทอง วนานุวัธ, มาลัยวรรณ อารยะสกุล, ศิวาพร ศิวเวชช, สมจิตร สุรพัฒน์, นภาศรี ไวศยะนันท์, สุคนธ์ชื่น ศรีงาม, อรอนงค์ นัยวิกุล, วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, โชคชัย ธีรกุลเกียรติ, อนุกูล วัฒนสุข, ธนะบูลย์ สัจจาอนันตกุล, วราภา มหากาญจนกุล, สิรี ชัยเสรี และปริศนา สุวรรณาภรณ์, 2540, วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร, คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, หน้า 327.

16. Voet, D., Voet, J. G and Pratt, C. W., 1999 “Citric acid cycle,” *Fundamentals of Biochemistry.* Chapter 16, John Willey & Sons, Inc. New York, pp. 466-491.

17. Ratanakhanokchai, K., Kaneko J., Kamio Y., and Izaki K., 1992, “Purification and Properties of a Maltotetrose - and Maltotriose - Producing Amylase from *Chloroflexus aurantiacus,” Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, pp. 2490-2494.

18. Drauz, K. and Waldmann, H., 1995, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Weinheim*, New York, Vol. 1, pp. 25-29.