การคัดเลือกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทนตัวทำละลายอินทรีย์

Screening of organic solvent-tolerant bacterium capable of organic solvent- tolerant protease production

ธิลาวรรณ อาจนนลา,[1*]นิชชา จำเริญศักดิ์ศรี,[2] รุ่งฤดี ทิวทอง[2]

Thilawan Artnonla,[1*]Nitcha Chamroensaksri,[2] RungruedeeThiwthong[2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียบริสุทธิ์จำนวน 33 ไอโซเลต มาทดสอบการทนตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ Acetone, Benzene, n-Butanol, Chloroform, Diethyl ether, Ethyl acetate, Hexane, Toluene และ Xylene พบแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต ที่สามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบไอโซเลต BSS01 (Xylene), PD24 (Xylene) และ PD29 (Xylene) แบคทีเรียแกรมบวกไอโซเลต PD16 (Chloroform) และ PD22 (Benzene, Chloroform, Diethyl ether และ Ethyl acetate) เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์เข้มข้น 0-5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไอโซเลต PD22 สามารถเจริญ และผลิตเอนไซม์ในอาหารที่มี Benzene เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ได้ โดยมีการเจริญ และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 4.19 log CFU/ml และ 126.07 Unit/mg Protein ตามลำดับ

การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี และการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต BSS01, PD24 และ PD29 มีร้อยละความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA กับ *Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242^T เท่ากับ 99.80, 99.70 และ 99.80 ตามลำดับ และในการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลต PD16 และ PD22 พบว่าโดยมีร้อยละความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA กับ *Bacillus megaterium* IAM 13418^{T}เท่ากับ 99.90 และ 98.90 ตามลำดับ และ *Bacillus aryabhattai* B8W22^T เท่ากับ 99.80 และ 98.80 ตามลำดับ

คำสำคัญ: แบคทีเรีย ความสามารถในการทนตัวทำละลายอินทรีย์ โปรติเอส การคัดเลือก

---

[1]นิสิตปริญญาโท, [2]อาจารย์, สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

[1]Master degree student, [2]Lecturer, Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, MahaSarakham 44150, Thailand.

* *Corresponding author:ThilawanArjnonla, Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, MahaSarakham 44150, Thailand., E-mail address : som_tila@hotmail.com. Tel. 0814494570*

Abstract

Thirty three of pure bacterial isolates were tested for its tolerant ability toward Acetone, Benzene, n-Butanol, Chloroform, Diethyl ether, Ethyl acetate, Hexane, Toluene and Xylene. Five isolates were capable of organic solvent tolerant at 3% v/v concentration. BSS01, PD24 and PD29, a gram negative bacterium were found to be xylene tolerant strains. While a gram positive bacterium, PD16 and PD22 showed tolerant ability toward Chloroform. Among them, only isolate PD22 showed the toleration toward multiple solvents (Benzene, Chloroform, Diethyl ether and Ethyl acetate). Growth and protease production of five isolates was carried out under organic solvent concentration up to 0-5 %v/v. The result showed that isolate PD22 exhibited robust growth and protease production under condition tested. Its growth and caseinolytic activity were 4.19 log CFU/ml and 126.07 unit/mg protein when grown in Trypticase Soy broth (TSB) containing 3% v/v benzene, respectively.

Bacterial identification was conducted using 16S rDNA sequences. The result of 16S rDNA sequence showed that BSS01, PD24 and PD29 were closely related to *Pseudomonas aeruginosa* LMG1242^T with similarity of 99.80%, 99.70% and 99.80%, respectively. In the contrary, the identification of isolate PD16 and PD22 was not clearly identified due to its sequence similarity were closely to both *Bacillus megaterium* IAM 13418^T and *Bacillus aryabhattai* B8W22^T. Their 16S rDNA sequence were 99.90% and 98.90% similar to which of *B.megaterium* IAM 13418^T and were 99.80% และ 98.80% similar to which of *B.aryabhattai* B8W22^T, respectively.

Keywords: Bacteria, Organic solvent tolerant, Protease, Screening

บทนำ

การใช้ประโยชน์จากปฏิกิริยาของเอนไซม์มีมาตั้งแต่สมัยโบราณ แหล่งที่มาของเอนไซม์นั้นอาจจะได้ทั้งจากเซลล์พืช เซลล์สัตว์ และเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรมและมักเป็นเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรีย แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด บางชนิดผลิตแล้วเก็บไว้ภายในเซลล์ ที่เรียกว่า intracellular enzyme และบางชนิดผลิตแล้วจะถูกปล่อยออกนอกเซลล์ ที่เรียกว่า extracellular enzyme สร้างขึ้นเพื่อย่อยสลายสารต่างๆ ที่อยู่ภายนอกเซลล์ไม่ว่าจะเป็นการย่อยสลายเพื่อนำสารอาหารไปใช้ในการเจริญ หรือย่อยสลายเพื่อทำลายสารพิษ หรือสารแปลกปลอมที่เซลล์ไม่ต้องการ ทั้งนี้เซลล์จะมีระบบการควบคุมการสร้างและการทำงานของเอนไซม์ เพื่อเกิดประโยชน์สูงสุดในการสร้างความสมดุลของเมตาบอลิซึม[1] โดยการควบคุมนั้นอาจจะเกิดขึ้นได้จากกระบวนการต่างๆ กันแล้วแต่แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการผลิตเอนไซม์นั้น[2]

เอนไซม์ที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายประเภท ได้แก่ ออกซิโดรีดักเทส ทรานส์เฟอเรส ไลเอส ไอโซเมอร์เลส ไลเกส และไฮโดรเลส ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ใช้กันมากที่สุด ได้แก่เอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งนำมาใช้ในอุตสากรรมนม[3] อุตสาหกรรมสิ่งทอ[4,5] อุตสาหกรรมยา และการสังเคราะห์เปบไทด์[6,7] อุตสาหกรรมอาหาร[8,9] และอุตสาหกรรมทำความสะอาด[10] แบคทีเรียที่ผลิต extracellular enzyme ภายใต้สภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์[11] มีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ พบได้ทั้งในดิน และในน้ำ เช่น *B.pumilus* 115b[12], *B.cereus* BG[13], *B.sphaericus* 205y[14], *B.pallidus*[15] และ *B.licheniformis* S-86[16] และ *P.aeruginosa* (PseA)[17], *P.aeruginossa* PST-01[18] และ *P. aeruginosa* LST-03[19] ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีความสำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพ และ

อุตสาหกรรมค่อนข้างมาก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สามารถหลั่งสารประกอบชนิดต่างๆ ที่สร้างขึ้นออกสู่นอกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทนตัวทำละลายอินทรีย์ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้ได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทนตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อแบคทีเรียที่มีความสามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่คัดเลือกได้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้เอนไซม์โปรติเอสต่อไป

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. แบคทีเรีย

แบคทีเรียบริสุทธิ์ จำนวน 33 ไอโซเลตได้แก่ BS01, BS02, BS03, BS04, BSS01, BSS02, FL01, FL02, FL03, FL04, PD2, PD3, PD5, PD10, PD15, PD16, PD17, PD18, PD19, PD20, PD21, PD22 PD23, PD24, PD25, PD26, PD27, PD28, PD29, PD30, PD34 และ PD36 ซึ่งไอโซเลต BS แยกได้จากตัวอย่างดินโดยวิธี direct plate, BSS แยกได้จากตัวอย่างดินโดยวิธี serial enrichment, FL แยกได้จากดอกไม้ และ PD ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล และน้ำมันเบนซิน[20]

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ในอาหารแข็งโดยวิธี Agar overlay method

แบคทีเรียบริสุทธิ์จำนวน 33 ไอโซเลต กระจายเชื้อบนจานอาหารแข็ง Modified Luria Bertani (MLB) agar (องค์ประกอบ : Tryptone 10.0 กรัม Yeast extract 5.0 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 2.46 กรัม Glucose 1.0 กรัม NaCl 5.0 กรัม และ Agar 18.0 กรัม) ดูดสารละลายอินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ Acetone, Benzene, Chloroform, Diethyl ether, Ethyl ether, Hexane, n-Butanol, Toluene และ Xylene ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบการเจริญ และนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อ

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนตัวทำละลายอินทรีย์ในอาหารเหลว

แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ในอาหารแข็งโดยวิธี Agar overlay method จะถูกนำมาทดสอบความสามารถในการทนและการเจริญ โดยเตรียมกล้าเชื้อทดสอบ โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MLB บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง บนสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 หน่วย O.D ถ่ายกล้าเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ลงอาหารทดสอบ MLB ที่บรรจุในขวดรูปชมพูที่มีฝาเกลียวบุด้วย PTFE เติมตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ Benzene, Chloroform, Diethyl ether, Ethyl acetate, และ Xylene ความเข้มข้นเท่ากับ 0-3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนสภาวะเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยใช้เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ที่ 660 นาโนเมตร และหาค่าการเจริญสัมพัทธ์

4. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสขั้นต้น

แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส โดยการปล่อยออกนอกเซลล์ในอาหาร Nutrient agar (NA) ที่เติมสับเสตรทเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเติมตัวทำละลายอินทรีย์ ที่เชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตสามารถทนได้จากการทดสอบโดยวิธี Agar overlay method นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบการย่อย และวัดค่าดัชนี (index) ของการย่อยโดยคำนวณจากอัตราส่วนของขนาดโคโลนี และขนาดวงใส

5. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสจากการคัดเลือกขั้นต้น นำมาทดสอบความสามารถในการเจริญ และผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptone Soya Broth (TSB) ที่เติมสับเสตรทเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างโดยทุก 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 96 ชั่วโมง โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำมานับปริมาณเซลล์ โดยวิธี Total plate count ส่วนที่สองนำมาปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

6. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสในขั้นต้น นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์เชิงปริมาณ โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB เติมสับเสตรทเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บรรจุในขวดรูปชมพูที่มีฝาเกลียวบุด้วย PTFE และเติมตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ Benzene, Chloroform, Diethyl Ether, ethyl acetate, และ Xylene เข้มข้นเท่ากับ 0, 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนสภาวะเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยชุดควบคุมไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำมานับปริมาณเซลล์ โดยวิธี Total plate count ส่วนที่สองนำมาปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

7. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

วิเคราะห์ภายใต้สภาวะมาตรฐานโดยเติมสารละลายเคซีนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และนำไปบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำเอนไซม์ที่เจือจางด้วย 0.1 M Tris-buffer pH 7.8 ปริมาตร1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายเคซีน บ่มเป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย Trichloroacetic acid ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตรปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้โปรตีนตกตะกอนปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใส ด้วยความเร็ว 3,300 x g เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนใสมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยโปรตีน โดยวัดปริมาณไทโรซีน ที่เกิดขึ้นเทียบกับสารละลายไทโรซีนมาตรฐาน กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ เท่ากับปริมาณของเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถย่อยเคซีนแล้วเกิดไทโรซีน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Lowry *et al*.[21]

9. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA เพิ่มปริมาณยีน 16SrDNA โดยใช้ไพรเมอร์518F (CCAGCAGCCGCGGTAATACG) และ 800R (TACCAGGGTATCTAATCC) ทำโดยนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลของบริษัท MACROGEN Advancing through Genomics ประเทศเกาหลีมาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลGenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (http://www.ncbi.nlm.gov/) เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันแล้วนำมาวิเคราะห์สร้างต้นไม้แห่งวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA 4.1 ด้วยวิธี Neighbour-joinging

ผลการทดลอง

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนตัวทำละลายอินทรีย์ในขั้นต้น

ผลการทดสอบแบคทีเรียบริสุทธิ์จำนวน 33 ไอโซเลต ทดสอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 9 ชนิด ได้แก่ Acetone, Benzene, n-Butanol, Chloroform, Diethyl ether, Ethyl acetate, Hexane, Toluene และ Xylene พบว่าคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 12 ไอโซเลต แบคทีเรียที่มีความสามารถในการทน Chloroform จำนวน 4 ไอโซ

เลต ได้แก่ ไอโซเลต PD5, PD15, PD16 และ PD22 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการทน Diethyl ether จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต BS02, PD22 และ PD25 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการทน Ethyl acetate จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต PD22 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการทน Benzene จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ PD22 และ PD23 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการทน Xylene จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต BSS01, BSS02, BS03, PD24 และ PD29 แบคทีเรีย 33 ไอโซเลต มีความสามารถในการทน Hexane และแบคทีเรีย 33 ไอโซเลตไม่สามารถทน Acetone, n-Butanol และ Toluene ได้

เมื่อนำแบคทีเรีย 12 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการทนตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MLB ที่มีความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน พบว่าแบคทีเรียสามารถทนตัวทำละลายได้ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 3 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลต PD22 สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มี Diethyl ether ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1% v/v ได้ดีที่สุด และมีการเจริญสัมพัทธ์เท่ากับ 50.22 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต (BSS01, PD16, PD22, PD24 และ PD29) สามารถย่อยโปรตีนภายใต้สภาวะที่มีการสัมผัสตัวทำละลายบนอาหารแข็งได้ดี เมื่อพิจารณาจากค่าดัชนีการย่อย (Table 1)

Table 1 Relative growth of organic solvent tolerant bacteria under various organic solvents concentration and its casein solubilizing activity.

Isolate	Organic solvent	Log P	Relative Growth in the presence of organic solvents (%)[1]			Casein Solubilization index (mm)[2]
			1%v/v	2 %v/v	3 %v/v	
BS02	Diethyl ether	0.85	12.97	2.98	0.91	-
BS03	Xylene	3.1	2.32	1.94	1.73	-
BSS01	Xylene	3.1	6.53	6.43	6.43	+ (2.6)
BSS02	Xylene	3.1	12.68	12.30	6.57	-
PD5	Chloroform	2.0	2.96	2.42	2.22	-
PD15	Chloroform	2.0	1.67	1.64	1.39	-
PD16	Chloroform	2.0	2.75	2.63	2.48	+ (4.0)
PD22	Benzene	2.0	4.40	4.16	3.71	+ (3.0)
	Chloroform	2.0	1.60	1.24	1.24	+ (4.0)
	Diethyl ether	0.85	50.22	30.77	18.33	+ (3.0)
	Ethyl acetate	0.68	32.12	1.51	1.40	+ (5.0)
PD23	Benzene	2.0	5.86	5.21	4.93	-
PD24	Xylene	3.0	5.55	4.45	3.27	+ (4.0)
PD25	Diethyl ether	0.85	32.31	25.17	2.92	-
PD29	Xylene	3.1	7.64	7.26	6.34	+ (3.0)

+, positive results; -, negative results; ( ), Solubilization index

[1]Bacterial growth in modified Luria Bertani (MLB) broth containing organic solvent. Relative growth was calculated using equation, $R = (N/ N_0)^*100$, where: N_0, Growth at 0 % organic solvent; N,Growth at served concentration of organic solvent (1, 2 and 3 % v/v).

[2] Bacteria were grown on Nutrient agar containing 1% w/v casein overlay with 2 ml of organic solvent. Solubilizing activity was expressed as casein solubilizing index.

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาการเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ได้แก่ BSS01, PD16, PD22, PD24 และ PD29 ในสภาวะที่ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่ามีการเจริญค่อนข้างคงที่ และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 547.1, 642.3, 370.7, 206.0 และ 244.3 unit/mg protein ตามลำดับ (Figure 1)

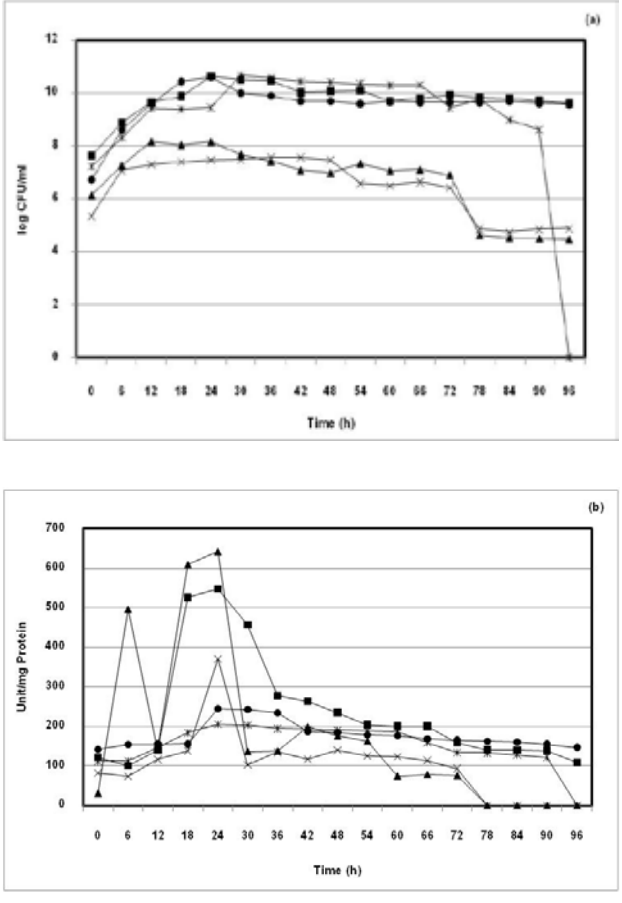

Figure 1 Growth (a) and protease activity (b) of bacteria in the absence and presence of organic solvent on tested bacteria at 0 to 96 hour. BSS01 (■), PD16 (▲), PD22 (x), PD24 (*) and PD29 (●)

การทดสอบความสามารถในการเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์

ความสามารถในการเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต มีความสามารถในการเจริญ (Table 2) และผลิตเอนไซม์ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ความเข้มข้นแตกต่างกัน และแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกันตามชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ (Table 3) โดยแบคทีเรียไอโซเลต PD22 สามารถเจริญ และผลิตเอนไซม์ในอาหารที่มี Benzene เข้มข้น 3 %v/v ได้ โดยมีการเจริญ และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 4.19 log CFU/ml และ 126.07 Unit/mg Protein ตามลำดับ

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16SrRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต BSS01, PD24 และ PD29 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* LMG1242^{T} โดยมีร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99.80, 99.70 และ 99.80 ตามลำดับ (Figure 2 และในการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลต PD16 และ PD22 พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียแกรมบวก *B. megaterium* IAM13418^{T} โดยมีร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99.90 และ 98.90 ตามลำดับ และมีความใกล้เคียงกับ *B. aryabhattai* B8W22^{T} มีร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99.80 และ 98.80 ตามลำดับ (Figure 3) โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต BSS01, PD16, PD22, PD24 และ PD29 ได้ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูลโดยมี Accession Number หมายเลข LC092935, LC092936, LC092937, LC092938 และ LC092939 ตามลำดับ

Table 2 Growth of organic solvent tolerant bacteria cultivated in Trypticase Soy broth containing 1% w/v casein with and without organic solvent under shake flask condition.

Isolate	Organic solvent	Organic solvent concentration							
		0 %v/v		1 %v/v		3 %v/v		5 %v/v	
		15 (min)	24 (h)	15 (min)	24 (h)	15 (min)	24 (h)	15 (min)	24 (h)
BSS01	Xylene	8.21±2.19	11.12±2.83	7.29±2.85	8.36±038	3.96±0.00	7.45±1.39	3.82±0.19	6.75±0.19
PD16	Chloroform	5.13±2.50	6.00±1.17	4.11±2.08	4.17±2.33	4.17±2.14	4.12±1.39	3.94±0.77	3.97±0.51
PD22	Benzene	5.94±0.51	6.70±2.14	4.91±0.38	4.23±1.00	4.17±1.26	4.19±3.76	4.16±1.58	4.15±2.40
	Chloroform	5.95±0.69	6.46±1.92	4.22±1.02	4.17±0.88	4.16±0.00	4.16±0.00	4.03±2.91	4.14±1.20
	Diethyl ether	5.94±0.51	7.46±1.92	5.20±0.19	5.12±0.00	4.23±2.91	5.05±0.33	4.13±1.35	4.72±0.00
	Ethyl acetate	9.10±1.00	7.25±0.19	5.15±0.00	6.67±0.19	4.12±0.00	4.99±0.00	4.05±0.00	4.98±0.19
PD24	Xylene	7.86±0.58	11.26±1.71	8.00±0.38	6.97±3.47	7.06±1.00	5.03±6.11	5.01±0.77	4.95±0.58
PD29	Xylene	7.94±4.04	11.29±1.50	8.07±4.53	7.09±0.19	7.11±1.02	5.05±1.02	4.99±1.84	4.95±1.02

Growth was conducted using PTFE lined screw cap flask to prevent solvent evaporation at ambient temperature for 24 h. Initial bacteria concentration was approximately 1 x 10^6 CFU/ml or 6.0 log CFU/ml. Each experimentwas done in triplicates.

Table 3 Protease activity of organic solvent tolerant bacteria cultivated in Trypticase Soy broth containing 1% w/v casein with and without organic solvent under shake flask condition.

Isolate	Organic solvent	Organic solvent concentration							
		0 %v/v		1 %v/v		3 %v/v		5 %v/v	
		15 (min)	24 (h)	15 (min)	24 (h)	15 (min)	24 (h)	15 (min)	24 (h)
BSS01	Xylene	95.95±0.05	86.71±0.01	60.81±0.01	68.55±0.03	78.56±0.00	70.04±0.04	69.77±0.00	69.39±0.01
PD16	Chloroform	73.13±0.04	104.33±0.01	76.72±0.05	85.24±0.04	78.75±0.03	98.13±0.00	65.82±0.03	82.08±0.02
PD22	Benzene	141.35±0.05	133.94±0.05	133.28±0.04	113.59±0.06	116.59±0.06	126.07±0.03	113.97±0.04	122.34±0.04
	Chloroform	125.70±0.08	114.98±0.06	139.25±0.06	124.90±0.05	130.71±0.00	113.26±0.07	118.48±0.04	113.67±0.00
	Diethyl ether	64.90±0.00	60.74±0.02	60.37±0.03	55.75±0.03	58.74±0.02	57.79±0.01	58.40±0.01	58.28±0.04
	Ethyl acetate	105.24±0.08	81.16±0.01	78.84±0.03	70.37±0.01	67.57±0.01	73.54±0.01	66.54±0.03	80.16±0.00
PD24	Xylene	66.16±0.03	70.56±0.05	57.75±0.03	74.25±0.04	58.66±0.04	55.80±0.04	60.69±0.05	61.85±0.00
PD29	Xylene	72.35±0.02	62.85±0.04	74.20±0.06	68.20±0.03	63.52±0.04	71.37±0.05	61.11±0.01	84.22±0.01)

Protease activity was performed under standard condition. Each experiment was done in triplicates.

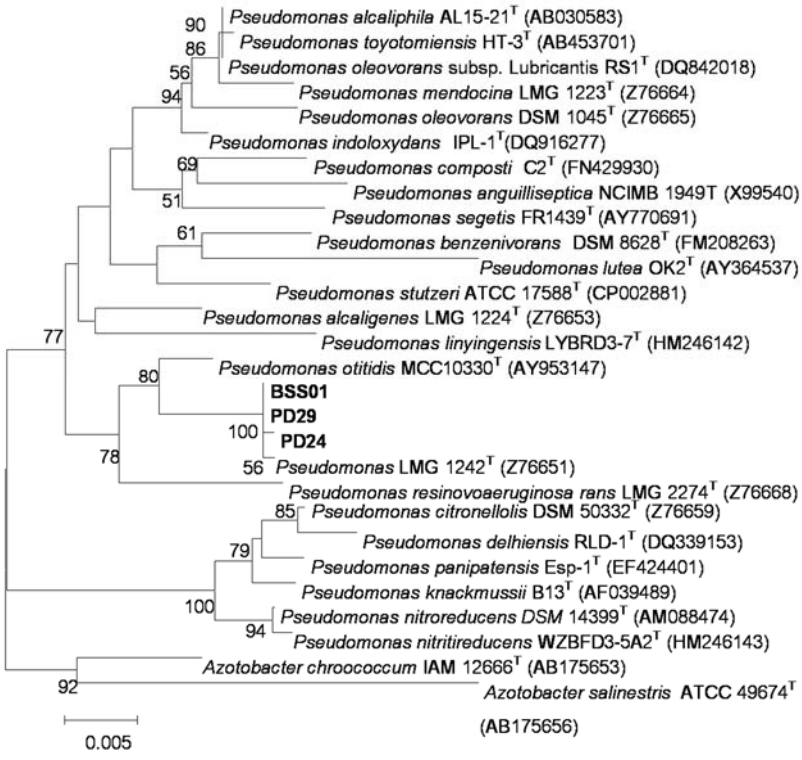

Figure2 Rooted phylogenetic tree of isolate BSS01, PD24 and PD29 to other *Pseudomonas* species. Each number on a branch indicates the bootstrap confidence values (100 replicates). The scale bar indicates 0.005 substitutions per nucleotide position.

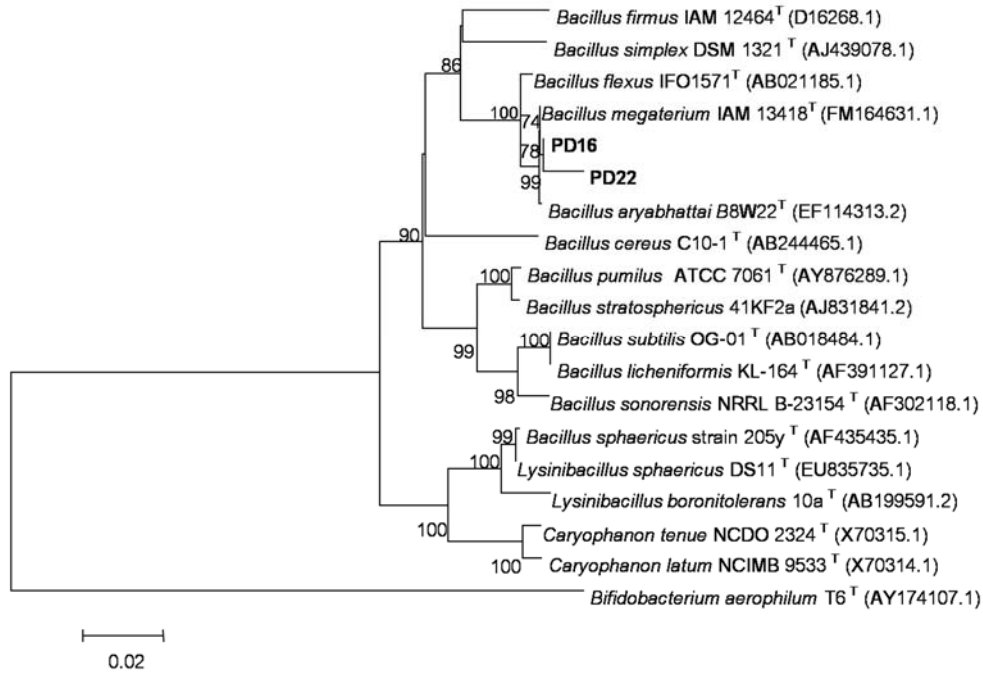

Figure 3 Rooted phylogenetic tree of isolate PD16 and PD22 to other *Bacillus* species. Each number on a branch indicates the bootstrap confidence values (100 replicates). The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position.

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียบริสุทธิ์จำนวน 33 ไอโซเลต โดยทดสอบการทนตัวทำละลาย 9 ชนิด ได้แก่ Acetone, Benzene, n-Butanol, Chloroform, Diethyl ether, Ethyl acetate, Hexane, Toluene และ Xylene คัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติทนตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 12 ไอโซเลต ได้แก่ BSS01, BSS02, BS02, BS03, PD5, PD15, PD16, PD22, PD23, PD24, PD25 และ PD29 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการทนตัวทำละลายอินทรีย์ได้ต่างชนิดกัน เช่น แบคทีเรียไอโซเลต PD22 สามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากชนิดที่สุด โดยทนตัวทำละลายได้ 4 ชนิด ได้แก่ Benzene, Chloroform, Diethyl ether และ Ethyl acetate สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Aono *et al.*[22] ได้ทำการศึกษาแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ST-001 และ *P. putida* IH-2000 โดยวิธี Agar overlay method โดยการขีดเชื้อบนจานอาหาร แล้วเททับผิวหน้าอาหารด้วยตัวทำละลายอินทรีย์หนา 2 มิลลิเมตร ทดสอบตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิด ได้แก่ n-Hexane, Cyclohexane, p-Xylene, Toluene, n-Heptanol และ Benzene พบว่าแบคทีเรียสามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ได้โดยเจริญบนจานอาหารที่มีตัวทำละลายอินทรีย์เกือบทุกชนิด ยกเว้นจานอาหารที่มี Benzene บ่งชี้ว่าแบคทีเรียสามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P มากกว่าหรือเท่ากับ 2.4 และจากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสขั้นต้น พบว่าแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต (BSS01, PD16, PD22, PD24 และ PD29) สามารถย่อยโปรตีนเคซีนภายใต้สภาวะที่มีการสัมผัสตัวทำละลายบนอาหารแข็งได้ดี เมื่อพิจารณาจากค่าดัชนีการย่อย (Table 1)

จากศึกษาการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ (BSS01,PD16, PD22, PD24 และ PD29) ในอาหาร TSB ที่เติมสับเสตรทเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและเติมตัวทำละลายอินทรีย์ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตสามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ได้แตกต่างชนิดกัน โดย BSS01, PD24 และ PD29 สามารถทนตัวทำละลายชนิด Xylene ได้ ในขณะที่ PD16 สามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ชนิด Chloroform และ PD22 สามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ชนิด Benzene, Chloroform, Diethyl ether, Ethyl acetate สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Sardessai *et al.*[23] ซึ่งศึกษาเปรียบการทนตัวทำละลายของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ พบว่าแบคทีเรียแกรมลบมีความสามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากชนิดกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนมากกว่าของแบคทีเรียแกรมบวก คือแบคทีเรียแกรมลบมีสารพวกลิโพพอลิแซกคาไรด์ อยู่ชั้นนอกสุดของผนังเซลล์ทำหน้าที่กั้นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญของผนังเซลล์ไม่ให้ออกจากช่องว่างและยังกั้นสารเคมีและเอนไซม์จากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ ดังนั้นผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจึงถูกทำลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้ง่ายกว่าของแบคทีเรียแกรมลบ แต่มีรายงานว่าแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Bacillus, Rhodococcu sopacus*[24] และ *Arthrobacter* มีความสามารถในการทนเบนซินได้ดี

Sardessai *et al.*[25] ได้ทำการศึกษาตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดมีค่า log P แตกต่างกัน ซึ่งค่า log P แสดงค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำ และชั้นออกทานอล แสดงให้เห็นว่าค่า log P มีความสัมพันธ์กับความเป็นพิษของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อเซลล์แบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่า log P ระหว่าง 2-4 มีความเป็นพิษสูงต่อจุลินทรีย์ การสะสมของตัวทำละลายอินทรีย์มีผลต่อการทำลายความคงตัวของชั้นไขมัน และโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นเหตุให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียการทำงาน และการผ่านเข้าออกของสารอาหาร เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเปลี่ยนแปลง เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P ต่ำกว่า 2 เป็นพวกชอบน้ำสามารถรวมตัวกับชั้นของน้ำตัวทำละลายอินทรีย์จึงเข้าไปในเยื่อหุ้มนิวเคลียสทำให้การทำงานผิดปกติจึงทำให้เป็นพิษกับเซลล์ส่งผลให้เซลล์ตาย มากกว่าตัวทำละลายที่มีค่า log P มากกว่า 4[26]

การผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ พบว่าแบคทีเรียแสดงกิจกรรมเอนไซม์แตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีตัวทำละลายแต่ละชนิดที่

ความเข้มข้นต่างกัน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์เท่ากับ 1% สอดคล้องกับการศึกษาของ Fang *et.al*.[27] ซึ่งทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่เติมตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดที่มีค่า log P แตกต่างกันตั้งแต่ 1.8-3.5 พบว่าเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P มากกว่าหรือเท่ากับ 4 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะเพิ่มขึ้น ดังนั้นความสามารถในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของตัวทำละลาย รวมทั้งค่า log P ของตัวทำละลายอินทรีย์นั้นๆ

การกระจายตัวของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ขึ้นอยู่กับความไม่ชอบน้ำของตัวทำละลายอินทรีย์นั้น ตัวทำละลายอินทรีย์มีความสำคัญต่อกิจกรรมเอนไซม์และมีส่วนสำคัญในการคงอยู่ของปริมาณน้ำรอบๆเอนไซม์ ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไฮโดรฟิลิคสามารถรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกับน้ำตัวทำละลายอินทรีย์กลุ่มนี้ชอบที่จะดึงน้ำรอๆ โมเลกุลเอนไซม์ส่งผลให้โครงสร้างโปรตีนเปลี่ยนบริเวณเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนทำให้เอนไซม์เกิดการคลี่ออกเป็นสายยาวมีผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์ต่ำส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไฮโดรโฟบิคเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกับน้ำตัวทำละลายอินทรีย์กลุ่มนี้ไม่แย่งดึงน้ำออกจากเอนไซม์ทำให้มีกิจกรรมเอนไซม์เช่นเดิม ดังนั้นกิจกรรมเอนไซม์ในการเร่งในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไฮโดรโฟบิคจึงสูงกว่าชนิดไฮโดรฟิลิค[28]

การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต BSS01, PD24 และ PD29 มีร้อยละความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA กับ *P. aeruginosa* LMG1242^T เท่ากับ 99.80, 99.70 และ 99.80 ตามลำดับ และในการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลต PD16 และ PD22 พบว่าโดยมีร้อยละความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA กับ *B.megaterium* IAM13418^T เท่ากับ 99.90 และ 98.90 ตามลำดับ และ *B.aryabhattai* B8W22^T เท่ากับ 99.80 และ 98.80 ตามลำดับ มีรายงานของนักวิจัยที่ได้ศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนตัวทำละลายอินทรีย์มีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ Tang *et al*.[9] ได้คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันโดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Modified Luria-Bertani ที่เติมตัวทำละลายอินทรีย์แตกต่างกัน พบว่าเป็นแบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ Priya *et.al*.[29] ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทนตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งแยกได้จากของเสียโรงงานอุตสาหกรรนม พบว่าเป็นแบคทีเรีย *B. megaterium* AU02

ความสามารถในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์เข้มข้น 0-5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไอโซเลต PD22 สามารถเจริญ และผลิตเอนไซม์ในอาหารที่มี Benzene เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ได้ โดยมีการเจริญ และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส เท่ากับ 4.19 log CFU/ml และ 126.07 Unit/mg Protein ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่คัดเลือกได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ เช่น การสังเคราะห์เอสพาร์เทม (Aspartame)[29] การสังเคราะห์เปบไทด์ (peptide synthesis)[30] และอุตสาหกรรมทำความสะอาด[31]

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Heipieper HJ, Neumann G, Cornelissen S, Meinhardt F. Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. Appl. Microbiol. Biotechnol 2007; 74(5): 961-73.
2. Sardessai Y, Bhosle, S. Tolerance of bacteria to organic solvents. Res.Microbiol 2002; 153(5): 263-8.
3. Ogino H, Nakagawa S, Shinya K, Muto T,

Fujimura N, Yasuda M, Ishikawa H. Purification and Characterization of Organic Solvent-Stable Lipase from Organic Solvent-Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. J Biosci Bioeng 2000; 89(5): 451-457.

4. Arpigny JL, Gaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem. J 1999; 343: 177–183.
5. Hasan F, Ali Shah A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme Microb. Technol 2006; 39: 235–251.
6. Kumar D, Bhalla TC. Microbial proteases in peptide synthesis : approaches and applications. Appl. Microbiol. Biotechnol 2005; 68: 726–736.
7. Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol 2002; 59: 15–32.
8. Sardessai YN, Bhosle S. Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. Biotechnol. Progr 2004; 20: 655–660.
9. Tang XY, Pan Y, Li S, He BF. Screening and isolation of an organic solvent-tolerant bacterium for high-yield production of organic solvent-stable protease. Bioresour. Technol 2008; 99(15): 7388-92.
10. Sarethy, IP, Saxena Y, Kapoor A, SharmaM, Sharma SK, Gupta V, Gupta S. Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. J. Ind. Microbiol. Biotechnol 2011; 38(7): 769-90.
11. Geok LP, Razak, CNA, Rahman RNZA, Basri M, Salleh AB. Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. Biochem. Eng. J 2003; 13: 73–77.
12. Rahman RNZRA, Mahamad S, Salleh AB, BasriM. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. J. Ind. Microbiol. Biotechnol 2007; 34: 509–517.
13. Ghorbel B, Sellami-Kamoun A, Nasri M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. Enzyme Microb. Technol 2003; 32: 513–518.
14. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. Biochem. Eng. J 2003; 147–151.
15. Bustard MT, Whiting S, Cowan DA, Wright PC. Biodegradation of high concentration isopropanol by a solvent-tolerant thermophile, *Bacillus pallidus*. Extrem J 2002; 6: 319–323.
16. Torres S,Martnez MA, Pandey A ,Castro GR. An organic-solvent-tolerant esterase from thermophilic *Bacillus licheniformis* S-86. Bioresour. Technol 2009; 100: 896–902.
17. Gupta A, KhareSK. A protease stable in organic solvents from solvent tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Bioresour. Technol 2006; 97: 1788–1793.
18. Ogino H, Watanabe F, Yamada M, Nakagawa S, Hirose T, Noguchi A, Yasuda M, Ishikawa H. Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginossa* PST-01. J. Biosci. Bioeng.1999; 87: 61–68.
19. Ogino H, MiyamotoK, IshikawaH. Organic solvent-tolerant bacterium which secretes organic solvent-stable lipolytic enzyme. Appl. Environ. Microbiol 1994; 60: 3884–3886.
20. มาลินี เรืองคง.การคัดเลือกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล และน้ำมันเครื่อง, โครงงานชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม; 2550

21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL,Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem 1951; 193: 265-275.
22. Aono R, Ito M, Inoue A, Horikoshi K. Isolation of Novel Toluene-Tolerant Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Biosci. Biotechnol. Biochem 1992; 56(1): 145-146.
23. Sardessai Y, BhosleS. Tolerance of bacteria to organic solvents. Res. Microbiol 2002; 153: 263–268.
24. Na KS, Kuroda A,Takiguchi N, Ikeda T,IkedaT, Ohtake H, Kato J. Isolation and Characterization of Benzene-Tolerant Rhodococcu sopacus Strains. J. Biosci. Bioeng 2009; 4: 378–382.
25. Sardessai YN, Bhosle S. Industrial Potential of Organic Solvent Tolerant Bacteria. Biotechnol. Progr 2004; 20: 655-660.
26. Zahir Z, Seed KD, Dennis JJ. Isolation and characterization of novel organic solvent-tolerant bacteria. Extrem. J 2006; 10:129–138.
27. Fang Y, Liu S, Wang S, Mingsheng Lv. Isolation and screening of a novel extracellular organic solvent-stable protease producer. Biochem. Eng. J 2009; 43: 212 – 215.
28. Kieboom J, Bont JA .Mechanisms of organic solvent tolerance in bacteria. In: Storz G, Hengee-Aronis R (eds) Bacterial stress responses. ASM Press Washington DC 2000; 393–402.
29. Priya JDA, Divakar K, Prabha MS, Selvam GP, Gautam P. Isolation, Purification and Characterisation of an Organic Solvent-Tolerant Ca^{2+} Dependent Protease from *Bacillus megaterium* AU02. Appl. Biochem. Biotechnol 2014 ; 172: 910–932.
30. Tang XY, Wu B, Ying HJ, He BF. Biochemical Properties and Potential Applications of a Solvent-Stable Protease from the High-Yield Protease Producer *Pseudomonas aeruginosa* PT121. Appl Biochem Biotechnol 2009; DOI 10.1007/s12010-009-8665-1.
31. Gupta A, Khare SK. Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. Enz Microbial Technol 2007; 42: 11-16.