

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Protease (EC 3.4.X.X) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ หรือกรดอะมิโนอิสระ เป็นเอนไซม์ที่มีการซื้อขายกันมากที่สุดประมาณ 60 % ของเอนไซม์ทั้งหมด (Rao *et al.*, และคณะ, 1998) protease ที่ผลิตขายทางการค้าส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เช่น Novozyme 243 (Denmark), Maxacal (Netherlands), Protosol (India), Biopraxe SP (Japan), และ Wuxi (China) เป็นต้น (Bhunja *et al.*, 2012) ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ อาทิ เช่น อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ซักล้าง อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเวชภัณฑ์และการบำบัดของเสีย นอกจากนี้ยังมีการใช้ protease เพื่อสังเคราะห์เปปไทด์ และสารประกอบเอสเทอร์ เป็นต้น (Olajuyigbe and Falade, 2014) อย่างไรก็ตามการนำ protease ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมมักจะมีปัญหาเรื่องการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity) โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นสูง ปัญหานี้อาจแก้ไขได้ด้วยการค้นหา คัดแยกจุลินทรีย์ผลิต protease ซึ่งมีความเสถียร สามารถคงกิจกรรมเอนไซม์ได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ สำหรับการสังเคราะห์สารอินทรีย์ การใช้ protease ในตัวทำละลายอินทรีย์มีข้อดี คือ ตัวทำละลายอินทรีย์จะช่วยเพิ่มการละลายของสารตั้งต้น (substrate) และผลิตภัณฑ์ที่ละลายในน้ำได้น้อย (แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์) สามารถควบคุมปฏิกิริยาให้เป็นไปในทิศทางที่ต้องการได้ และช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์เมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูง ดังนั้นผลได้ (yield) ของการสังเคราะห์ด้วย protease จะสูงกว่าการใช้วิธีสังเคราะห์ทางเคมี ผู้วิจัยจึงสนใจคัดแยกจุลินทรีย์ผลิต protease ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาและมีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์โดยมีเป้าหมายที่จะนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการสังเคราะห์น้ำตาลเอสเทอร์ และสารอินทรีย์ที่มีมูลค่าสูงต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. คัดแยกแบคทีเรียผลิต protease ซึ่งเร่งปฏิกิริยาได้ดีและความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์
2. แยกบริสุทธิ์ protease ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ และศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของ protease ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้ว
3. ศึกษาความเป็นไปได้ของการนำ protease ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์น้ำตาลเอสเทอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Protease

Protease (EC 3.4.x.x) เป็นตัวเร่งชีวภาพที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรไลติกเอนไซม์ (hydrolytic enzyme) มีความสามารถในการตัดพันธะเปปไทด์ของสายโพลีเปปไทด์ หรือโปรตีนโดยกระบวนการที่มีน้ำเข้าร่วมในปฏิกิริยา

เมื่อพิจารณามูลค่าการซื้อขายเอนไซม์ในตลาดโลก ซึ่งคิดเป็นจำนวนเงินประมาณ 1 พันล้านเหรียญสหรัฐในปี 2010 และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในอัตราการเติบโต 6.6% ต่อปี (CAGR) หรือประมาณ 1.5 พันล้านเหรียญสหรัฐ ในปี 2015 พบว่า protease เป็นเอนไซม์กลุ่มสำคัญที่มีการซื้อขายกันมากที่สุดประมาณ 60% ของเอนไซม์ทั้งหมด protease ที่ผลิตเพื่อจำหน่ายทางการค้าส่วนใหญ่จะผลิตจาก *Bacillus spp.* ดังแสดงในตารางที่ 1 (Li *et al*, 2012)

ตารางที่ 1 Protease ที่จำหน่ายระดับอุตสาหกรรมและจุลินทรีย์ที่ผลิต

บริษัทผู้ผลิต	ชื่อทางการค้า	แหล่งจุลินทรีย์	การประยุกต์ใช้
Novo Nordisk, Denmark	Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	ผงซักฟอก ลอกกาวเส้นไหมดิบ
	Savinase		
	Esperase	<i>Bacillus sp.</i>	ผงซักฟอก
	Durazym	<i>Bacillus licheniformis</i>	ผงซักฟอก
	Novozyme 243	<i>Bacillus licheniformis</i>	ลอกกาวเส้นไหมดิบ สิ่งทอ ผงซักฟอก
Nagase Biochemicals, Japan	Biopraxe concentrate	<i>Bacillus subtilis</i>	เครื่องสำอาง และยา การวิจัย
	Cryst.protease	<i>Bacillus subtilis</i> (K2)	การวิจัย
		<i>Bacillus subtilis</i>	การวิจัย
	Biopraxe SP	<i>Bacillus subtilis</i>	อุตสาหกรรมทำความสะอาด
Genencor D International, USA	Purafact	<i>Bacillus lentus</i>	ผงซักฟอก
	Primatan	Bacterial source	ฟอกหนัง
Gist-Brocades, Netherlands	Subtilisin	<i>Bacillus alcalophilus</i>	ผงซักฟอก
	Maxacal	<i>Bacillus sp.</i>	ผงซักฟอก
	Maxatase	<i>Bacillus sp.</i>	ผงซักฟอก
Godo Shusei, Japan	Godo-Bap	<i>Bacillus licheniformis</i>	อุตสาหกรรมผงซักฟอกและอาหาร
Rohm, Germany	Corolase7089	<i>Bacillus subtilis</i>	อุตสาหกรรมอาหาร
Wuxi Synder Bioproducts, China	Wuxi	<i>Bacillus sp.</i>	ผงซักฟอก
Advance Biochemicals, India	Protosol	<i>Bacillus sp</i>	ผงซักฟอก
Solvay Enzymes, Germany	Opticlean	<i>Bacillus alcalophilus</i>	ผงซักฟอก
	Optimase	<i>Bacillus licheniformis</i>	ผงซักฟอก

ที่มา: Bhunia *et al*, 2012

นอกจาก *Bacillus spp.* แล้วยังพบจุลินทรีย์อื่นๆ ที่สามารถผลิต protease ได้ เช่น *Aspergillus terreus* (Martinez et al, 2011) *Aspergillus oryzae* (Chutmanop et al, 2008) *Rhizopus oligosporus* (Devi et al, 2011) *Pseudomonas aeruginosa* (Gupta et al, 2005) *Lactobacillus helveticus* (Valasaki et al, 2008) *Streptomyces microflavus* (Rifaat et al, 2006) เป็นต้น

Protease ในตัวทำละลายอินทรีย์

Protease ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลากหลายๆ ประเภท เช่น การผลิตผงซักฟอก การผลิตน้ำยาทำความสะอาด อุตสาหกรรมฟอกย้อม การผลิตเครื่องหนัง เครื่องสำอาง เกษษกรรมหรือเคมีภัณฑ์ ซึ่งในอุตสาหกรรมที่กล่าวมาล้วนแต่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อเป็นตัวทำละลายทั้งสิ้น โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ acetonitrile, Dimethyl formamide (DMF), Dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, toluene และ ethanol การใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาในตัวกลางที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์มีข้อดีอยู่หลายประการ คือ ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของสารตั้งต้น หรือผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลของปฏิกิริยาไปในทิศทางที่พึงประสงค์ แต่ความเข้มข้นของตัวทำละลายที่สูงเกินไปอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพ หรืออาจเป็นตัวยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ ทำให้นักวิจัยจำนวนมากสนใจศึกษาหาวิธีการต่างๆ เพื่อปรับปรุงพัฒนาความเสถียรของเอนไซม์ โดยการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และทางกายภาพเอนไซม์ รวมถึงการใช้พันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยปรับปรุงคุณสมบัติเอนไซม์ ซึ่งวิธีการเหล่านี้ยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง จึงเริ่มสนใจค้นหาและคัดแยกจุลินทรีย์ผลิต protease ที่มีความคงตัวในตัวทำละลายอินทรีย์ (Ogino et al, 2001) ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณสมบัติและความคงตัวในตัวทำละลายอินทรีย์ของ protease จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดแยกได้

แหล่งที่มา	Crude / Purified	Mass (kDa)	Optimum Temp/pH	Type	ความเข้มข้นและชนิดของ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ Protease คงตัว (% ความเข้มข้น)	การเสถียรภาพของ Protease ใน ตัวทำละลายอินทรีย์ (% ความเข้มข้น)	ข้อสังเกต	อ้างอิง
<i>Bacillus cereus</i> strain BG1	Crude	N/A	N/A	N/A	25% (v/v) DMSO, methanol, ethanol และ 2-propanol	25% (v/v) acetonitrile	Protease คงตัวได้ใน n-hexane	Ghorbel <i>et al</i> , 2003
<i>Bacillus pumilus</i> strain 115b	Crude	N/A	45°C	N/A	25% (v/v) n-hexane, 1-decanol, isooctane, n-tetradecane	25% (v/v) ethyl acetate, n-heptane และ toluene	Protease คงตัวได้ใน toluene, benzene, p-xylene และ ethyl benzene	Rahman <i>et al</i> , 2007
<i>Bacillus</i> sp. strain APR-4	Purified	N/A	65-70°C /7	serine protease	50% (v/v) methanol, ethanol, 2-propanol, benzene และ 1-butanol	50% (v/v) acetone	เอนไซม์สามารถย่อย trehalose-oleate ได้	Kumar <i>et al</i> , 2002
<i>Lumbricus rubellus</i> (Earthworm)	Purified	27	60°C /9-11	N/A	25% (v/v) 2-propanol, acetone และ toluene	N/A	N/A	Nakajima <i>et al</i> , 2000

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แหล่งที่มา	Crude / Purified	Mass (kDa)	Optimum Temp/pH	Type	ความเข้มข้นและชนิด ของตัวทำละลายอินทรีย์ ที่ Protease คงตัว (% ความเข้มข้น)	การเสถียรภาพของ Protease ใน ตัวทำละลายอินทรีย์ (% ความเข้มข้น)	ข้อสังเกต	อ้างอิง
<i>Fasciola hepatica</i> (the liver fluke proteinase)	Purified	30	37°C / 7	cysteine proteinase	10–90% (v/v) DMF และ 10–30% (v/v) methanol	10–90% (v/v) acetone และ tetrahydrofuran	<i>Fasciola hepatica</i> เป็นปรสิตพยาธิที่ทน อุณหภูมิสูง เป็นสาเหตุ โรค พยาธิใบไม้ในตับ	Dowd <i>et al</i> , 2000
<i>Natrialba magadii</i>	Crude	N/A	N/A	N/A	15% หรือ 30% (v/v) glycerol, DMSO, polypylenglycol	15% (v/v) acetone, acetonitrile, ethanol, และ 2-propanol	มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ใน organic solvents ต่ำ เพราะเป็นจุลินทรีย์ที่คัด แยกได้จากสภาพแวดล้อม ที่เป็นด่างและเกลือสูง	Ruiz <i>et al</i> , 2007
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> strain san-ai	Purified	18	60°C /9	N/A	25% (v/v) DMF	25% (v/v) 2-propanol, n-hexane, chloroform, benzene และ acetone	จุลินทรีย์สายพันธุ์ san-ai คัดแยกได้จาก น้ำมันแระในกระบวนการ ผลิตปิโตรเลียม	Karadzic <i>et al</i> , 2004

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แหล่งที่มา	Crude / Purified	Mass (kDa)	Optimum Temp/pH	Type	ความเข้มข้นและชนิดของ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ Proteaseคงตัว (%) ความเข้มข้น)	การเสถียรภาพของ Proteaseใน ตัวทำละลายอินทรีย์ (% ความเข้มข้น)	ข้อสังเกต	อ้างอิง
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PST-01	Purified	35	60°C /8	metallo protease	25% (v/v) ethylene glycol, 1,4-butanediol, 1,5-pentanediol, methanol, ethanol, 1-hexanol, DMSO, 2-propanol, triethylene glycol, tert-butanol, toluene 1-heptanol และ DMF,	25% (v/v) benzene n-heptane, p-xylene, n-hexane, n-decane และ cyclohexane แสดงค่า Half- life ในตัวทำละลายเท่ากับ 2.3 ชั่วโมง	ให้ high reaction rates และ high yields นำมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ peptide ได้ผลดี	Ogino <i>et al</i> , 2007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PT121	Crude	N/A	N/A	N/A	50% (v/v) n-decane, n-octane, heptane, n-hexane, cyclohexane, toluene, chloroform และ DMSO	50% (v/v) 1-butanol chloroform, acetone, ethanol, 2-propanol และ DMF	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 50% (v/v) DMSO ใน การเร่งปฏิกิริยาสูง ใช้สังเคราะห์สารตั้งต้น สำหรับการสังเคราะห์ aspartame	Tang <i>et al</i> , 2008

N/A (Not Applicable)

จากการรวบรวมรายงานการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า protease สามารถการเร่งปฏิกิริยาได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ ทำให้มีการค้นคว้าและวิจัยเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้น โดยเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ในตัวกลางที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่เอนไซม์ในกลุ่ม Oxidoreductases, Hydrolases และ Isomerases (Karigar and Rao, 2011) ทำให้มีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่นอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง เกษษกรรม หรือเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในทางการแพทย์ สำหรับข้อดีและข้อเสียของการใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์สรุปไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อดี และข้อเสียของการใช้เอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์

ข้อดี	- ตัวทำละลายอินทรีย์ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำ - ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลปฏิกิริยาไปในทิศทาง การสังเคราะห์ (synthesis) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) - ในสภาวะที่เอนไซม์อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ การยับยั้งปฏิกิริยาโดยสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์จะลดลงเนื่องจากเอนไซม์ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ - ตัวทำละลายอินทรีย์ช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ - เอนไซม์ที่ได้มีศักยภาพสำหรับที่จะนำมาใช้ได้โดยตรงในกระบวนการทางเคมี
ข้อเสีย	- ตัวทำละลายอินทรีย์อาจทำให้เอนไซม์เกิดการแปรสภาพธรรมชาติ - ตัวทำละลายอินทรีย์อาจยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ถูกจำกัดการแพร่และที่บริเวณเร่งของเอนไซม์อาจถูกปิดกั้น - โครงรูปที่เหมาะสมของโมเลกุลเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไปอาจลดลักษณะที่ยึดหยุ่นและเคลื่อนไหวได้ของโมเลกุลเอนไซม์

ที่มา: Doukyu and Ogino, 2010

รูปแบบการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในตัวทำละลายอินทรีย์

รูปแบบการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในตัวทำละลายอินทรีย์มี 3 วิธีดังนี้

1. การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่รวมกับน้ำลงไปในการละลายที่เป็นน้ำที่มีเอนไซม์ละลายอยู่ (Water + water-miscible organic solvent system) สารตั้งต้นจะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ตัวทำละลายอินทรีย์ยังช่วยลดปริมาณน้ำ และเปลี่ยนสมดุลของปฏิกิริยาได้
2. การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมกับน้ำลงไปในการละลายที่เป็นน้ำที่มีเอนไซม์ละลายอยู่ (Water + water-immiscible organic solvent system) วิธีนี้จะทำให้เกิดระบบสองวัฏภาค (biphasic system) โดยสารตั้งต้นส่วนใหญ่จะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์และมีสารตั้งต้นปริมาณน้อยที่ละลายในส่วนที่เป็นน้ำ ซึ่งเป็นที่ที่สารตั้งต้นเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ การใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย (non-polar solvents) เช่น เฮกเซนและไอโซออกเทน จะทำให้โครงสร้างเอนไซม์ถูกทำลายได้น้อยกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว (polar solvents) ข้อดีของระบบนี้คือเตรียมได้ง่าย สามารถแยกเอนไซม์และผลิตภัณฑ์ออกได้อย่างสะดวก และยังช่วยลดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ (product inhibitor) แต่ค่ากิจกรรมเอนไซม์จะขึ้นกับพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ (interface) และเอนไซม์ส่วนมากไวต่อการแปรสภาพจากสภาพธรรมชาติ (denaturation) โดยแรงระหว่างชั้นของเหลว (interfacial forces)
3. การเติมเอนไซม์ลงไปโดยตรงในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมกับน้ำ เนื่องจากเอนไซม์ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เอนไซม์จึงอยู่ในสถานะแขวนลอย (suspended solids) อยู่ในส่วนของน้ำ และมีปริมาณน้ำเพียงเล็กน้อยที่อยู่บนโมเลกุลเอนไซม์ (nearly anhydrous organic solvent system) แต่ก็มากพอที่จะทำให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ วิธีนี้อาจทำให้การแพร่ของเอนไซม์เป็นไปได้ยากเนื่องจากโมเลกุลเอนไซม์เกิดการดึงดูดกันด้วยแรงไอออนิกที่แข็งแรงกว่าแรงดึงดูดในตัวทำละลายอินทรีย์

ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เมื่ออยู่ในตัวกลางที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ดังนี้ (Ogino and Ishikawa, 2001)

1. น้ำ จำเป็นสำหรับกิจกรรมเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาและมีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ การควบคุมปริมาณน้ำให้พอเหมาะเป็นสิ่งสำคัญ เพราะถ้ามีปริมาณมากเกินไปจะทำให้สมดุลของปฏิกิริยาเปลี่ยนไปในทิศทางที่เกิดปฏิกิริยาการสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) แต่ถ้ามีน้ำน้อยเกินไปจะทำให้เอนไซม์สูญเสียประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา น้ำที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือ น้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลเอนไซม์ (bound water) และน้ำที่ไม่ได้เกาะอยู่กับโมเลกุลของเอนไซม์ (bulk water หรือ free water)

น้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลเอนไซม์ (bound water) น้ำส่วนนี้มีความสำคัญต่อการรักษาโครงสร้างของเอนไซม์ น้ำเหล่านี้มีส่วนทั้งทางตรงและทางอ้อมเกี่ยวกับพันธะไฮโดรเจน แรงไฮโดรโฟบิก และแรงแวนเดอร์วาลส์ ที่อยู่ในเอนไซม์ โดยที่แรงเหล่านี้จะช่วยให้เอนไซม์คงรูปตามธรรมชาติและช่วยในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ถ้าน้ำส่วนนี้ถูกดึงออกไปจะทำให้เอนไซม์มีโครงสร้างที่ผิดไป เอนไซม์จึงสูญเสียประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์จะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ถ้าปราศจากน้ำที่จะรักษาโครงสร้างเอนไซม์ ปริมาณน้ำที่พอเหมาะ

สำหรับแต่ละปฏิกิริยาแตกต่างกันไป ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของเอนไซม์ พาหะตรึง ตัวทำละลาย อินทรีย์และสารตั้งต้น รวมถึงปริมาณและความเป็นขั้ว (polarity) ของสารเหล่านั้น

น้ำที่ไม่ได้เกาะอยู่กับโมเลกุลของเอนไซม์ (bulk water หรือ free water) น้ำส่วนนี้สามารถถูกแทนที่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้ หรือสามารถกำจัดออกได้โดยที่เอนไซม์ยังคงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา

การระบุปริมาณน้ำที่มีอยู่ในปฏิกิริยาในระบบที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานิยมระบุด้วยค่า water activity (A_w) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความสัมพันธ์ในวัฏภาคที่เป็นก๊าซ ค่า A_w สามารถปรับได้โดยควบคุมปฏิกิริยาให้อยู่ในบรรยากาศที่ควบคุมความชื้นด้วยการใช้สารละลายอิ่มตัวของเกลือชนิดต่างๆ ค่า A_w เป็นค่าที่บ่งชี้ว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ หรือปฏิกิริยาการสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) โดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์มักเกิดขึ้นเมื่อ A_w ลดลงมากพอ การเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีปริมาณน้ำจำกัดจะทำให้เอนไซม์ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ (Klibanov, 1997)

2. พาหะตรึงและวิธีการตรึงเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ เอนไซม์จะมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลเอนไซม์ที่แข็งแรง ทำให้เอนไซม์แพร่กระจายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้น้อยลง เอนไซม์จึงไม่ละลายและเกาะรวมเป็นก้อน การกระจายของเอนไซม์ในตัวทำละลายจึงไม่สม่ำเสมอซึ่งอาจก่อให้เกิดการตันการแพร่ของสารตั้งต้น เข้าไปยังบริเวณภายในและภายนอกของเอนไซม์มีผลทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำ การแก้ไขปัญหานี้สามารถทำได้โดยตรึงเอนไซม์ไว้บนพาหะตรึง การตรึงทำให้เอนไซม์กระจายได้ในบริเวณกว้างและป้องกันเอนไซม์จากการทำลายของตัวทำละลายอินทรีย์ได้ สามารถแยกเอนไซม์ในรูปเอนไซม์ตรึงเพื่อนำไปใช้ใหม่ได้ พาหะตรึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากพาหะตรึงแต่ละชนิดมีความสามารถในการดึงน้ำจากตัวทำละลายอินทรีย์แตกต่างกัน จึงมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ต่างกัน

3. ตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวทำละลายอินทรีย์มีความสำคัญต่อกิจกรรมเอนไซม์และมีส่วนสำคัญต่อการคงอยู่ของปริมาณน้ำรอบๆ เอนไซม์ (bound water) ตัวทำละลายอินทรีย์จำแนกได้เป็น 2 กลุ่มคือตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ (water miscible หรือ hydrophilic solvent) และตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ (water immiscible หรือ hydrophobic solvent)

ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ (water miscible หรือ hydrophilic solvent) เช่น acetonitrile, tetrahydrofuran, dioxane และ pyridine เป็นต้น ตัวทำละลายอินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถดึงน้ำรอบๆ โมเลกุลเอนไซม์ ทำให้โครงสร้างโมเลกุลเอนไซม์คลายออกเป็นสาย ส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ต่ำ

ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ (water immiscible หรือ hydrophobic solvent) เช่น heptane, isooctane, diisopropyl ether และ dibutyl ether เป็นต้น ตัวทำละลายอินทรีย์กลุ่มนี้ไม่ดึงน้ำออกจากโมเลกุลเอนไซม์ จึงทำให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเดิม ดังนั้นกิจกรรมเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดนี้จึงสูงกว่าชนิดแรก ในอดีตการเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อาศัยคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น ความมีขั้ว การละลายน้ำ ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant, ϵ) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลจากการทดลองอยู่มาก จากรายงานวิจัยของ Brink และ Tramper (1985) ได้ใช้ Hildebrand solution parameter (δ) และน้ำหนักโมเลกุลในการทำนายผลของตัวทำละลายอินทรีย์พบว่า กิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า Hildebrand solution ต่ำและมีน้ำหนักโมเลกุลสูง แต่ค่า Hildebrand solution

วัดได้ยากในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว ต่อมา Laane และคณะ (1987) ได้ใช้ค่า $\log P$ เพื่อทำนายอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์และใช้ในการเลือกชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ คำนิยามของ $\log P$ หมายถึงค่า $\log$ ของ Partition Coefficient (P) ในระบบสองวัฏภาคระหว่าง octanol/water สามารถวัดได้โดยการทดลองหรือคำนวณจากค่า hydrophobic fragmentation constants โดยที่

$$\log P = \frac{\text{ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในชั้น octanol}}{\text{ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในชั้นน้ำ}}$$

ตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดมีค่า $\log P$ แตกต่างกันไป ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 3 กลุ่มคือ **กลุ่มแรก** ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า $\log P$ น้อยกว่า 2 ตัวทำละลายอินทรีย์จะละลายน้ำได้มากกว่าร้อยละ 0.4 เป็นตัวทำละลายชนิดไฮโดรฟิลิกที่ไม่เหมาะต่อการใช้งาน เนื่องจากมีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำล้อมรอบเอนไซม์เป็นอย่างมาก **กลุ่มที่สอง** ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า $\log P$ อยู่ระหว่าง 2-4 ตัวทำละลายอินทรีย์กลุ่มนี้จะละลายน้ำได้ร้อยละ 0.04-0.4 เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไฮโดรโฟบิกที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูง และมีผลเปลี่ยนแปลงน้ำที่ล้อมรอบเอนไซม์เพียงเล็กน้อย **กลุ่มที่สาม** ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า $\log P$ มากกว่า 4 ตัวทำละลายอินทรีย์กลุ่มนี้จะไม่ละลายน้ำ เป็นไฮโดรโฟบิกอย่างสูงให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด และไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลเอนไซม์

การศึกษาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์

Protease ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันย่อมมีคุณลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันไป ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ของเอนไซม์เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้องเหมาะสม เกิดประสิทธิภาพมากที่สุด ในปัจจุบันนิยมศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ ดังนี้

1. ค่า pH ที่เหมาะสม (optimum pH) หมายถึง ค่า pH ที่ใช้ละลายสารตั้งต้นที่เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุด การศึกษาทำได้โดยบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่างกัน โดยใช้ระบบบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ตามค่าความจุของบัฟเฟอร์ แล้วติดตามการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่มีค่า pH นั้นๆ ค่า pH ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดก็คือค่า pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นั่นเอง

2. ความเสถียรของเอนไซม์ที่ค่า pH ต่าง ๆ (pH stability) แม้ว่าเอนไซม์จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาก็ตาม แต่ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาอาจจะเป็นแค่ช่วงเวลาสั้นๆ จึงจำเป็นต้องศึกษาความเสถียรในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ค่า pH ต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการนำเอนไซม์นั้นๆ ไปใช้ โดยการบ่มเอนไซม์ที่ค่า pH ต่างๆ เป็นเวลามากเกินพอ (โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที จนถึงเป็นชั่วโมงหรือวัน) แล้วติดตามกิจกรรมเอนไซม์นั้นหลังครบเวลาการบ่ม

3. อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) คือ อุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงที่สุดในการศึกษาจะคล้ายกับการหาค่า pH ที่เหมาะสม โดยจะติดตามการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่มีค่า pH ที่เหมาะสมแต่ละบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ อุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดก็คือค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นั่นเอง

4. ความเสถียรที่อุณหภูมิต่างๆ (temperater stability) เช่นเดียวกันกับการศึกษาความเสถียรของ เอนไซม์ที่ค่า pH ต่างๆ แต่ต่างกันตรงที่จะบ่มเอนไซม์ที่ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา และเวลานาน เท่ากัน (ประมาณ 30 นาที จนถึงเป็นชั่วโมงหรือวันขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการทดลอง) ซึ่งจะใช้อุณหภูมิที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างกัน โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 20-90 องศาเซลเซียส

5. ตัวยับยั้ง (inhibitor) และตัวกระตุ้น (activator) การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อาจถูกยับยั้งโดยตัว ยับยั้งบางชนิดไม่ว่าจะเป็นโลหะหนักหรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรท (substrate analog) และถูก กระตุ้นได้โดยสารบางชนิด ผลการทดสอบตัวยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของ protease ทำให้สามารถจัดกลุ่ม protease ได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

Serine protease หรือ alkaline protease จะมีเซรีนเรสซิเดวส์ (serine residues) อยู่ที่บริเวณเร่ง ของเอนไซม์ protease กลุ่มนี้สามารถถูกยับยั้งด้วย diisopropyl fluorophosphate (DFP) และ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และจะทนต่อภาวะที่มี ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)

Cysteine protease หรือ thiol protease เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีนอยู่ที่บริเวณเร่ง ปฏิกิริยาของเอนไซม์ สภาพการเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง pH 6.0-7.5 จะเร่งปฏิกิริยาเมื่อมีสาร รีดิวซ์ (reducing agent) ได้แก่ hydrogencyanide (HCN) และสารประกอบที่มีหมู่ไรเออล EDTA และ mercaptoethanol สามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยโลหะหนักและสารที่มีหมู่ซัลไฮไดรล เช่น p-chloromercury benzoate (PCMB)

Metalloprotease หรือ neutral protease เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะอยู่ในโครงสร้างซึ่ง มักจะเป็นสังกะสี (Zn) หรือเหล็ก (Fe) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35-45 kDa สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับ กรดอะมิโนไลซีนและมีสภาพการเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมอยู่ในช่วง pH 7-8 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส metalloprotease จะมีความเสถียรเพิ่มขึ้นเมื่อมีแคลเซียมไอออนเป็นองค์ประกอบและสามารถถูกยับยั้ง ปฏิกิริยาได้ด้วย EDTA และ 1,10-Phenanthroline

Acid protease หรือ Aspartic protease จะมีปฏิกิริยาจำเพาะกับกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้าง (side chain) เป็นวงอะโรมาติก (aromatic amino acid) เช่นไทโรซีน (Tyrosine-Tyr-Y) ทริปโตเฟน (Tryptophan-Trp-W) ฟีนีลอะลานีน (Phenylalanine-Phe-F) เป็นต้น ถูกยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาด้วย diazoketone แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย EDTA และ DFP เอนไซม์กลุ่มนี้เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH 3-4 มีน้ำหนัก โมเลกุลประมาณ 30-40 kDa

รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาคุณลักษณะบางประการของ protease จากจุลินทรีย์สาย พันธุ์ต่างๆ ที่คัดแยกได้ สรุปไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 คุณสมบัติบางประการของ protease จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สายพันธุ์ต่างๆ

แหล่งเอนไซม์	Protease Classification	Optimum conditions	Stability conditions	Inhibitors	เอกสารอ้างอิง
<i>Aeromonas veronii</i> strain PG01	metalloprotease	pH 7.5, 60 °C	50–60 °C นาน 60 นาที pH 6-10 นาน 3 ชั่วโมงที่ 30 °C	10 mM Zn ²⁺ EDTA	Divakar <i>et al</i> , 2010
<i>Aspergillus fumigatus</i>	serine protease	pH 7, 60 °C	50-80 °C pH 7-11 นาน 60 นาที ที่ 25 °C	5 mM PMSF	Martínez <i>et al</i> , 2011
<i>Bacillus</i> sp.	serine protease	pH 8, 80 °C	40-80 °C นาน 2 ชั่วโมง pH 7-10	10 mM PMSF	Kamran <i>et al</i> , 2015
<i>Cryptococcus</i> sp. strain S-2	aspartic protease	pH 5, 30 °C	20-50 °C pH 3-7 นาน 60 นาที ที่ 30 °C	1 mM pepstatin	Rao <i>et al</i> , 2011
<i>Xanthomonas citri</i>	Cysteine protease	pH 5.5, 30 °C	pH 4.5-6.5, 10-40 °C	1 mM E-64	Papamichael <i>et al</i> , 2010
<i>Halobacillus</i> sp. strain SCSIO 20089	metalloprotease	pH 8, 30 °C	pH 4-10 35-50 °C นาน 30 นาที	1 mM EGTA* 1 mM 1,10-phenanthroline 1 mM Zn ²⁺	Yang <i>et al</i> , 2013

ตารางที่ 4 (ต่อ)

แหล่งเอนไซม์	Protease Classification	Optimum conditions	Stability conditions	Inhibitors	เอกสารอ้างอิง
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strainPseA	metalloprotease	pH 8, 60 °C	40-65 °C pH 6-9 ที่ 25 °C นาน 60 นาที	5 mM EDTA 5 mM 1,10-Phenanthroline	Gupta <i>et al</i> , 2007
<i>Purpureocillium lilacinum</i> strainLPS # 876	serine protease	pH 7, 50 °C	pH 4-9 40-50 °C นาน 180 นาที	1 mM PMSF	Cavello <i>et al</i> , 2013
<i>Shewanella arctica</i>	serine protease	pH 8, 60 °C	pH 6-10 0-80 °C นาน 10นาที	1 mM Chymostatin 5 mM antipain-dihydrochloride 20 mM PMSF	Qouraa <i>et al</i> , 2015

* ethyleneglycol tetraacetic acid (EGTA)

รายงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

ปี ค.ศ. 1999 มีรายงานการศึกษา protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PST-01 ที่มีความคงตัวและมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยลำดับแรกๆ ที่ศึกษาและพบว่า protease สามารถทนต่อสารละลายอินทรีย์ที่ความเข้มข้นสูงถึง 25% (v/v) การแยกบริสุทธิ์ protease ที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PST-01 โดยการตกตะกอนด้วย 60% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย Butyl-Toyopearl column chromatography เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 38 kDa เมื่อศึกษาคุณลักษณะเอนไซม์พบว่าอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมคือ 55 °C และ 8.5 ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวในช่วง pH 8.0–12.0 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส และอยู่ในกลุ่ม metalloprotease เนื่องจากมีความไวต่อ EDTA และ 1,10-phenanthroline เอนไซม์สามารถคงตัวในตัวทำละลายอินทรีย์ 1,4-butanediol ($\log P = -0.42$), 1,5-pentanediol ($\log P = 0.27$), ethanol ($\log P = -0.3$), 1-hexanol ($\log P = 1.858$), DMSO ($\log P = -1.35$), 2-propanol ($\log P = 0.05$), triethylene glycol ($\log P = -1.5$), tert-butanol ($\log P = 0.584$) และ 1-heptanol ($\log P = 2.62$) พบว่าเอนไซม์ที่บ่มใน DMF ($\log P = -1.01$), 1-octanol ($\log P = 3.07$), 1-butanol ($\log P = 0.84$), acetone ($\log P = -0.24$), 1-decanol ($\log P = 4.57$), 1,4-dioxane ($\log P = -1.1$) และ toluene ($\log P = 2.73$) มีความเสถียรกว่าเอนไซม์อิสระโดยมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) อยู่ในช่วง 12-25 วัน (Ogino *et al*, 1999)

ปี ค.ศ. 2007 มีรายงานการสังเคราะห์เปปไทด์ N-carbobenzoxy-L-arginine-L-leucine amide และ N-carbobenzoxy-L-alanine-L-leucine amide ในระบบ monophasic aqueous-organic โดยใช้ protease ที่ผลิตจาก PST-01 ซึ่งให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่สูง ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จะนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์แอสปาร์แตม (aspartame)

Beg และ Gupta (2003) ได้ศึกษา serine protease จาก *Bacillus mojavensis* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 kDa สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 10.5 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วง pH คือ 7.0-11.5 และมีค่าครึ่งชีวิตที่อุณหภูมิ 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส เท่ากับ 150 15 และ 7 นาทีตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งได้โดย PMSF, bestatin, chymostatin, iodoacetamide acid และ N-bromosuccinimide ในขณะที่ 2-mercaptoethanol, glutathione และ dithiothreitol จะกระตุ้นให้กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 2 เท่า ต่อมา Gupta และคณะ (2005) ได้ศึกษา protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PseA ที่แยกได้จากดินสามารถหลั่ง alkaline protease ชนิดใหม่ซึ่งทนต่อ detergents, surfactants และ organic solvents เอนไซม์ถูกทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 11.6 เท่าได้ yield 60% โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Q-Sepharose) และโครมาโตกราฟีที่ใช้แรงระหว่างไฮโดรโฟบิก (Phenyl Sepharose) เอนไซม์มีมวลโมเลกุลประมาณ 35 kDa เอนไซม์คงตัวในช่วง pH 6.0–9.0 และเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH 8 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาค่า K_m และ V_{max} เมื่อใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้นเท่ากับ 2.7 mg/ml และ 3.03 $\mu\text{mol/min}$ ตามลำดับ เอนไซม์อยู่ในกลุ่ม metalloprotease เนื่องจากถูกยับยั้งด้วย EDTA และ 1,10-phenanthroline

ปี ค.ศ. 2010 Divakar และคณะ ได้ศึกษา protease ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผลิตจาก *Aeromonas veronii* สายพันธุ์ PG01 ซึ่งแยกจากน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ protease ที่หลั่งออกนอกเซลล์ถูกทำให้บริสุทธิ์ใน 2 ขั้นตอนคือ ion-exchange chromatography และ gel permeation chromatography พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 53.4 เท่าได้ yield 32% มีมวลโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 33 kDa เอนไซม์นี้มีความคงตัวในช่วง pH 6.0-10.0 และอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์มีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีความคงตัวในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด และพบว่ายังคงเหลือค่ากิจกรรมเอนไซม์อยู่เมื่อบ่มใน benzene-hexane และ n-dodecane (Divakar *et al*, 2010)

ปี ค.ศ. 2013 Anbu ได้คัดแยกแบคทีเรียผลิต protease จำนวน 18 สายพันธุ์จากน้ำเสียที่อยู่ใกล้โรงงานผลิตผงซักฟอก โดยพบว่า *Bacillus koreensis* สายพันธุ์ BK-P21A สามารถผลิต protease สูงสุด เมื่อนำเอนไซม์มาผ่านการแยกบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย 80% (w/v) ammonium sulphate แล้วผ่านคอลัมน์ Superdex 200 10/300 GL และ Superdex 75 10/300 GL column chromatography ตามลำดับ เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5 เท่า คิดเป็นร้อยละ 23 มวลโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 48 kDa เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 9 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ถูกยับยั้งโดย PMSF ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ในกลุ่ม serine protease คุณสมบัติที่น่าสนใจของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้คือ เอนไซม์มีความเสถียรใน H_2O_2 คิดเป็นร้อยละ 81 เสถียรในสารละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิสูง และ pH ที่แตกต่าง ซึ่งสามารถนำไปเป็นทางเลือกในอุตสาหกรรมต่างๆ และการสังเคราะห์สารอินทรีย์ในสภาวะตัวทำละลายที่ไม่ใช้น้ำ (Anbu, 2013)

ปี ค.ศ. 2015 มีรายงานการศึกษา protease จาก *Stenotrophomonas maltophilia* สายพันธุ์ SK ที่แยกได้จากดินในโรงฆ่าสัตว์ แบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทำความสะอาดได้ โดยผู้วิจัยแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ 2 ขั้นตอนคือการตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ และผ่าน DEAE-cellulose ion exchange column chromatography เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.19 เท่าและมี yield 24 % มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 98 kDa นำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติบางประการพบว่าเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้น สามารถกระตุ้นด้วยไอออนของโลหะ เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , และ Fe^{3+} สามารถคงตัวได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น ethanol, methanol และ isopropanol ที่ความเข้มข้น 25% (v/v) และคงตัวได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้น 37.5% (v/v) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้สามารถนำเอนไซม์ที่ได้ไปใช้สำหรับงานในอุตสาหกรรมผงซักฟอก และอุตสาหกรรมยา (Waghmare *et al*, 2015)

ปี ค.ศ. 2015 มีการใช้ protease เป็นตัวเร่งสำหรับการสังเคราะห์เปปไทด์ในระบบที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ในงานวิจัยได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยโคลนนิ่ง (gene cloning) ที่ encoded ยีนจาก *Thermus aquaticus* และ *Deinococcus geothermalis* และให้แสดงออกใน *Escherichia coli* โดยพบว่า protease ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่จะทนต่อ pH และอุณหภูมิสูงได้ดี เอนไซม์ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิสูงและเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เปปไทด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่อุณหภูมิสูงถึง 60 และ 80 องศาเซลเซียส ใน acetonitrile และสามารถคงตัวได้ดีใน N, N-dimethylformamide (DMF) ที่ความเข้มข้นในช่วง 40-50% v/v (Toplak *et al*, 2013)

วิธีดำเนินการวิจัย

การคัดแยกจุลินทรีย์ผลิต protease ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์

เก็บตัวอย่างดิน (soil samples) จากบริเวณชุ่มชื้นที่มีคราบน้ำมันปนเปื้อนในเขตจังหวัดนครปฐม ใส่ในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วปิดด้วยจุกสำลีและหุ้มด้วยพอลิเอทิลีน ซึ่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ที่มี 25 ml modified Luria-Bertani (MLB) broth เติม organic solvent 2.5 ml (DMF หรือ DMSO) ปิดฝาด้วย chloroprene rubber stopper เพื่อป้องกันการระเหยของตัวทำละลายอินทรีย์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหย้าที่ 200 rpm เป็นเวลา 72 ชม. จากนั้นแบ่งเชื้อที่ได้ 5 ml ใส่ใน Erlenmeyer ขนาด 250 ml ที่มี 25 ml MLB broth และเติม organic solvent 2.5 ml ทำการทดสอบซ้ำเช่นเดิม 2 ครั้ง

เมื่อจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนแล้ว นำมาเจือจางด้วย 0.75% NaCl แล้ว spread ลงบน MLB agar แยกเชื้อเดี่ยว (single colony) เก็บไว้ใน MLB slant เพื่อคัดแยกต่อไป

การคัดแยกจุลินทรีย์ผลิต protease บนอาหารแข็ง

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่อยู่บน MLB slant (จากขั้นตอนแรก) มาเพาะเลี้ยงบน minimum medium ที่มี 1.5% casein บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จุลินทรีย์ที่ผลิต protease ได้จะเกิดวงใสรอบโคโลนี บันทึกค่าอัตราส่วนขนาดวงใส (clear zone) ต่อขนาดของโคโลนี จุลินทรีย์ที่ให่วงใสรอบโคโลนีทั้งหมดจะนำไปจัดจำแนกระบุชนิดจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค 16S rDNA

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิต protease ซึ่งทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ในอาหารเหลว

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ใน 30 ml MLB broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเชื้อมา 5 ml ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเติม 20% DMSO (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 9000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ protease activity โดยใช้ azocasein เป็นสับสเตรท (Sarath *et al.*, 1989) จุลินทรีย์ที่ผลิต protease ได้สูงสุดจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การแยกบริสุทธิ์ protease ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2

การศึกษารูปแบบการผลิต protease ในอาหารเหลว

เพาะเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 ใน 30 ml MLB broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อทั้งหมดลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1000 ml ที่มีอาหาร (minimum medium + 1.5% casein) อยู่ 500 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อทั้งหมดใส่ลงถึงหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหาร (minimum medium + 1.5% casein) อยู่ 3,000 ml (pH เริ่มต้น 8.0) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วการหมุนใบพัด 200 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 9,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใส (supernatant) ที่ได้คือ crude protease

การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$

วัดปริมาณเอนไซม์ที่จะนำมาตกตะกอนโปรตีนและคำนวณปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องเติมลงไปในช่วงความเข้มข้นอิ่มตัว 60% เริ่มตกตะกอนโปรตีนโดยเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ลงใน crude enzyme อย่างช้าๆ พร้อมทั้งกวนสารละลายเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนเกลือละลายหมดทิ้งไว้ข้ามคืนจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 15,000 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีแยกส่วนใส่ออกจากตะกอนและละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.01 M Tris-HCl buffer pH 8.0

การแยกโปรตีนด้วยเจลโครมาโตกราฟี ด้วยเครื่อง Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC with Frac-900 ; Amersham pharmacia, Sweden) ใช้คอลัมน์ XK26 ที่บรรจุ Sephadex G-25 ปรับสมดุลคอลัมน์ (ประมาณ 4 bed volume) ด้วย 25 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 อัตราการไหล 1 ml/min สะโปรตีนด้วยบัฟเฟอร์เดิม (เก็บ fraction ละ 4 ml) นำแต่ละ fraction วัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัด protease activity นำ Fraction ที่มี protease activity มารวมกัน

การแยกโปรตีนด้วยโครมาโตกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุ ด้วยเครื่อง Fast Flow Protein Liquid Chromatography (FPLC with Frac-900; Amersham pharmacia, Sweden) ผ่านคอลัมน์ XK26 ที่บรรจุ Q-Sepharose ปรับสมดุลคอลัมน์ด้วย 25 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 ที่อัตราการไหล 2 ml/min สะโปรตีนแบบขั้นบันได (stepwise elution) ด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มี NaCl ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ปริมาตรของและความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 100 ml (ความเข้มข้น NaCl ที่ใช้เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6 และ 1 M NaCl ตามลำดับ) เก็บ Fraction (fraction ละ 4 ml) นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์ protease activity นำ Fraction ที่มี protease activity มารวมกัน แล้วนำไปทำให้แห้งแบบระเหิด (lyophilization)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน protease ด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (Sambrook *et al.*, 1989) กำหนดกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 25 mA เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐาน (BioRad, USA)

การวิเคราะห์ protease activity บนแผ่นเจล ด้วยเทคนิค Zymogram โดยใช้ azocasein เป็นสับสเตรท (Sana *et al.*, 2006)

การวิเคราะห์ค่า pI ด้วยเทคนิค two dimensional gel electrophoresis (Friedman *et al.*, 2009)

การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีบางประการของ purified protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2

Optimum pH และ Stability pH โดยวิเคราะห์ protease activity ในสภาวะที่มี 0.5% (w/v) Azocasein ที่ละลายในบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ดังนี้

- 50 mM Potassium Phosphate buffer (pH 6-7)
- 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8-9)
- 50 mM Glycine-NaOH buffer (pH 10-11)

การศึกษาความเสถียรของ protease ที่ pH ต่างๆ ทำโดยผสม purified protease กับบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ protease activity ทุกชั่วโมงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (วิเคราะห์ protease activity ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยละลาย azocasein ใน 0.05 M Tris-HCl buffer pH 8.0)

Optimum temperature และ Stability temperature โดยวิเคราะห์ protease activity ที่อุณหภูมิ ต่างๆ (20-80 องศาเซลเซียส)

การศึกษาความเสถียรของ protease ที่อุณหภูมิต่างๆ ทำโดยผสม purified protease กับบัฟเฟอร์ pH ที่เหมาะสม (stability pH) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ (20-60 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ protease activity ทุกชั่วโมงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (วิเคราะห์ protease activity โดยใช้ 0.05 M Tris-HCl buffer pH 8.0, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส)

ศึกษาผลของไอออนโลหะและ reagent ต่อ protease activity

ผสม purified protease กับ สารละลาย NaCl, KCl, KNO₃, LiCl₂, MgCl₂, MnSO₄, CaCl₂, CuCl₂, BaCl₂, Fe₂SO₄, FeCl₃, ZnCl₂, PMSF, EDTA, 1,10 phenanthroline และ 2-Mercaptoethanol โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของไอออนโลหะหนักและ reagent เท่ากับ 1 mM และ 10 mM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์ protease activity ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและใช้สับสเตรตที่ละลายใน 0.05 M Tris-HCl buffer pH 8.0 เปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่เติมบัฟเฟอร์แทนสารละลายไอออนโลหะหนักและ reagent

ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว (surfactant) และสารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) ต่อ protease activity

ผสม purified protease กับ Triton-X 100, Tween-20, Tween-80, SDS และ H₂O₂ ความเข้มข้น 10, 30 และ 50% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์ protease activity เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม

ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) ที่มีต่อความเสถียรของ protease

ผสมเอนไซม์เข้ากับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังนี้ acetone (log P = 3.4), dimethyl formamide (DMF: log P = -1.01), dimethyl sulfoxide (DMSO: log P = -1.35), ethanol (log P = -0.3), isopropyl alcohol (log P = 0.05), methanol (log P = -0.74) และ toluene (log P = 2.73) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลายอินทรีย์เท่ากับ 75% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกครึ่งชั่วโมงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัด protease activity และคำนวณค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ (half-life) ตามสมการ

$$\ln[A]_t = \ln[A]_0 - k_1 t$$

เมื่อ $[A]_t$ หมายถึง กิจกรรมเอนไซม์ protease ที่คงเหลือที่เวลาใดๆ (%relative activity)

$[A]_0$ หมายถึง กิจกรรมเอนไซม์ protease ที่เวลาเริ่มต้น (%relative activity)

k_1 หมายถึง อัตราการลดลงของ protease activity (first order rate constant: t^{-1})

t หมายถึง เวลาที่ใช้ในการบ่ม (h)

กราฟระหว่าง $\ln [A]_t$ กับ t จะเป็นเส้นตรงที่มีจุดตัดบนแกน Y ที่ $\ln [A]_0$ และมีความชันหรือค่าอัตราการลดลงของ protease activity เป็น $-k_1$

$$\ln[A]_t = \ln[A]_0 - k_1 t$$

$$\ln[A]_t - \ln[A]_0 = -k_1 t$$

$$\ln \frac{[A]_t}{[A]_0} = -k_1 t$$

$$\frac{[A]_t}{[A]_0} = e^{-k_1 t}$$

ค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยา (half-life, $t_{1/2}$) $t = t_{1/2}$

$$\text{จะได้ว่า } \frac{[A]_0}{2} = [A]_0 e^{-k_1 t_{1/2}} ; \frac{1}{2} = e^{-k_1 t_{1/2}}$$

$$\ln \frac{1}{2} = -k_1 t_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \frac{-\ln \frac{1}{2}}{k}$$

$$\text{ดังนั้น } t_{1/2} = \frac{0.693}{k_1}$$

การศึกษาการสังเคราะห์ trehalose ester ด้วย protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2

ผสมสารตั้งต้น (0.8 M Trehalose, 0.8 M Vinyl laurate ละลายใน DMF:DMSO (1:1, v/v)) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) เติม crude protease (10 mg/ml) ที่ผ่านกระบวนการกำจัดเกลือ (dialysis) และทำแห้งแบบระเหิด (lyophilization) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, 850 รอบต่อนาที นาน 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ trehalose ester ด้วย TLC โดยใช้ Chloroform : Methanol (5:1 v/v) เป็น mobile phase และวิเคราะห์ด้วย HPLC (คอลัมน์ ACE Excel 5 Super C18 (150 × 4.6 mm id) column temp 50 °C , Mobile phase ใช้ acetonitrile : water (1:1 v/v) , flow rate 1 ml/min, RI detector)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดแยกจุลินทรีย์ผลิต protease ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้หลายประเภท รวมถึงการใช้ประโยชน์ในด้านสิ่งแวดล้อมได้ เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถเร่งปฏิกิริยาเคมีได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษ งานวิจัยนี้ได้คัดแยกจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวอย่างดินที่คาดว่าจะน่าจะมีตัวทำละลายอินทรีย์ปนเปื้อนอยู่

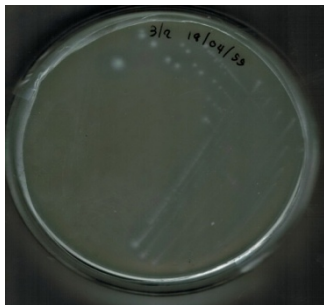
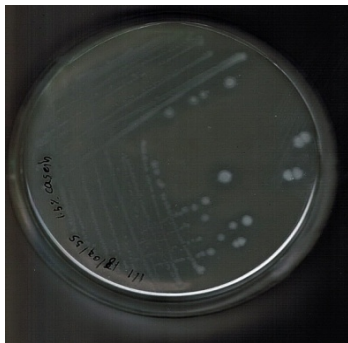
ผลการทดลองสามารถแยกจุลินทรีย์ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากอุโมงค์มรดกในเขตจังหวัดนครปฐมในบริเวณที่มีคราบน้ำมันปนเปื้อนอยู่ จุลินทรีย์ทั้ง 8 สายพันธุ์สามารถเจริญในอาหาร MLB ที่มี 10% (v/v) DMSO และ 10% (v/v) DMF โดยมี 5 สายพันธุ์เจริญได้ใน 10% DMSO และ 3 สายพันธุ์เจริญได้ใน 10% DMF (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์ผลิต protease ในตัวทำละลายอินทรีย์ (DMF และ DMSO)

สายพันธุ์	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (DC, mm)	เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนใส (DTC, mm)	DTC/DC	คัดเลือกได้จากอาหารที่มี
SU1	3.12	5.50	1.76	10% DMSO
SU2	3.00	6.72	2.24	10% DMSO
SU3/1	2.54	-	-	10% DMSO
SU3/2	4.28	6.13	1.54	10% DMSO
SU4/1	2.25	-	-	10% DMF
SU4/2	2.13	-	-	10% DMF
SU5	2.4	-	-	10% DMF
SU6	4.58	7.65	1.67	10% DMSO

เมื่อนำจุลินทรีย์ทั้ง 8 สายพันธุ์มาคัดแยกต่อบนอาหารแข็ง (minimum medium+1.5% casein) พบว่ามี 4 สายพันธุ์ที่ให้ส่วนใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง โดยสายพันธุ์ SU2 ให้ค่าอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงสุด ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งของจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ และผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rDNA แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง (minimum medium+1.5% casein) และผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ ด้วยวิธี 16S rDNA

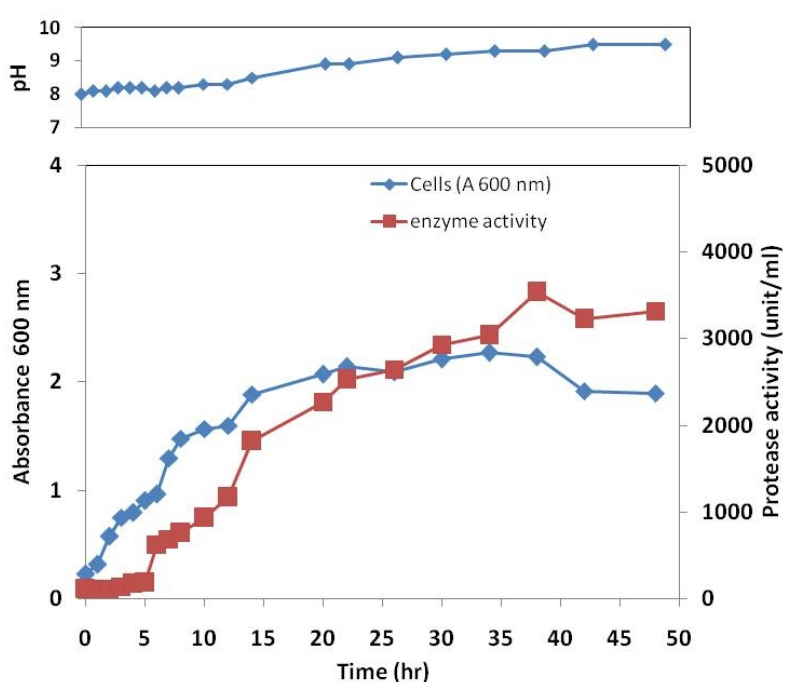
สายพันธุ์	ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ (ระบุด้วย 16S rDNA)
SU1		<i>Brevibacterium luteolum</i> (98.82% similarity)
SU2		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (99.91% similarity)
SU3/2		<i>Enterococcus faecalis</i> (99.82% similarity)
SU6		<i>Staphylococcus epidermidis</i> (100.00 % similarity)

จากผลการทดลอง ผู้วิจัยได้เลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ SU2 (*Pseudomonas aeruginosa*) เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การแยกบริสุทธิ์ protease ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2

การเจริญและการผลิต protease ของ *Pseudomonas aeruginosa* ใน minimum medium ที่มี 1.5% casein

ผลการศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิต protease ของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในอาหาร minimum medium (+ 1.5% casein) ที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 8.0 พบว่า เซลล์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (log phase) ในช่วง 24 ชั่วโมง หลังเติม inoculum จากนั้นจึงเข้าสู่ stationary phase และเริ่มเข้าสู่ในช่วง death phase หลังชั่วโมงที่ 38 ปริมาณ protease (unit/ml) ที่เซลล์ผลิตได้เพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (growth associated pattern) โดยมีปริมาณเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 40 เท่ากับ 3650 unit/ml (รูปที่ 1)



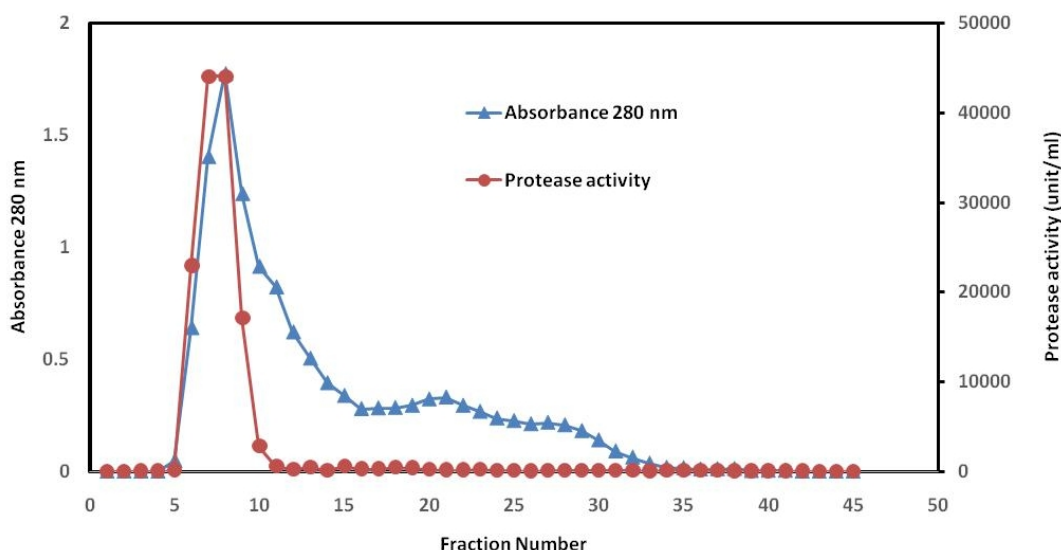
รูปที่ 1 การเจริญและการผลิต protease ของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหาร minimum medium ที่มี 1.5% casein (w/v) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 200 rpm, อัตราการให้อากาศ 1 VVM (กำหนดให้ 1 หน่วย protease หมายถึงการเพิ่มขึ้นของ $A_{440\text{ nm}}$ 0.01 หน่วย)

การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$

นำ crude enzyme มาตกตะกอนด้วย 60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 15000 g เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.01 M Tris-HCl buffer pH 8 วัดปริมาณเอนไซม์ได้ 25,020 Unit/ml คำนวณกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะได้เท่ากับ 102.12 Unit/mg protein ซึ่งสูงกว่า Crude enzyme และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.2 เท่า (ตารางที่ 6)

การแยกบริสุทธิ์ protease ด้วยเทคนิคเจลโครมาโตกราฟี

การแยกบริสุทธิ์โปรตีนด้วยเครื่อง FPLC โดยนำเอนไซม์หลังตกตะกอนมาผ่านคอลัมน์ XK26 ที่บรรจุ Sephadex G-25 หลังผ่านคอลัมน์โปรตีนจะถูกชะได้โครมาโตแกรมดังแสดงใน รูปที่ 2 นำ fraction ที่มี protease activity (fraction ที่ 5-10) มารวมกันเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์และค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะซึ่งมีค่าเท่ากับ 82130 units/ml และ 547.5 units/mg protein ตามลำดับ จากนั้นจึงนำไปผ่าน anion exchanger เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์

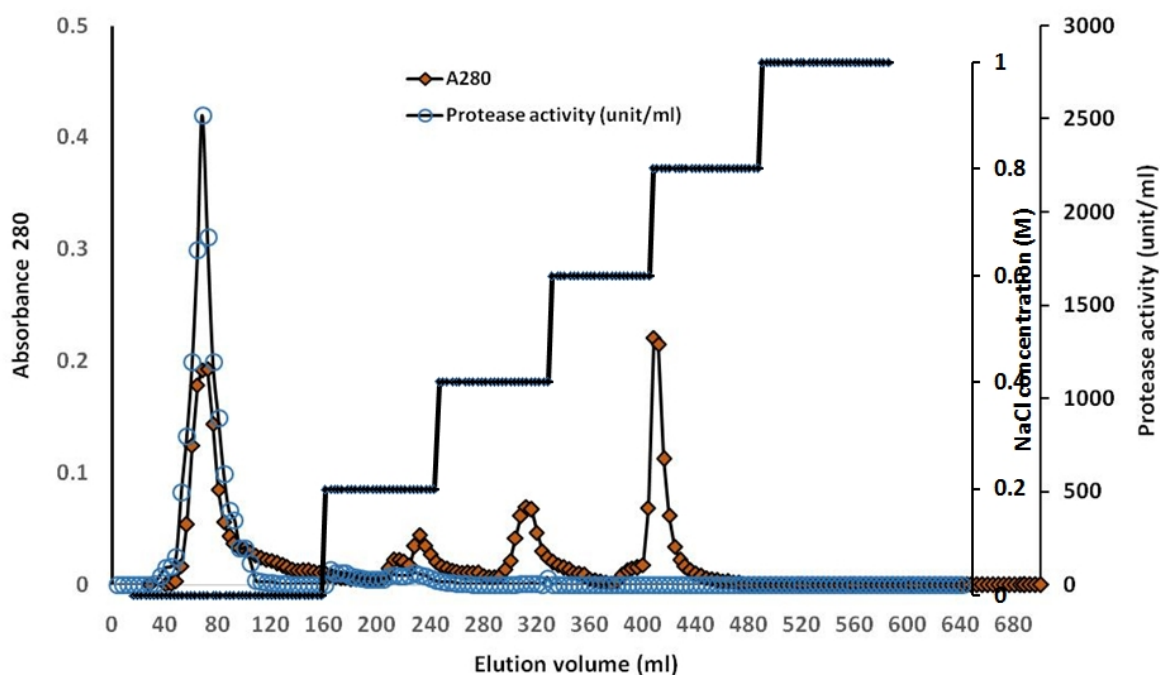


รูปที่ 2 Elution profiles ของ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 โดยไหล

โปรตีน 6 ml ผ่าน XK26 Sephadex G-25 column ชะด้วย 0.025 M potassium phosphate buffer pH 7.0 อัตราการไหล 1 ml/min เก็บ Fraction ละ 4 ml

การแยกบริสุทธิ์ protease ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

นำเอนไซม์ที่ผ่าน Sephadex G-25 (fraction ที่ 5-10) มาแยกบริสุทธิ์ต่อโดยใช้คอลัมน์ XK 26 ที่บรรจุ Q-Sepharose หลังผ่านคอลัมน์โปรตีนจะถูกชะด้วยบัฟเฟอร์ที่มี NaCl ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองพบว่า มีพีคโปรตีน (A_{280}) ในทุกความเข้มข้นของ NaCl และเมื่อนำแต่ละ fraction มาวัด protease activity ได้โครมาโตแกรมที่มีลักษณะดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 Elution profiles ของ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 ผ่าน XK26 Q-Sepharose fast flow column เชื้อด้วย 0.025 M potassium phosphate buffer pH 7.0 ที่มี NaCl ความเข้มข้นต่างๆ เป็นลำดับขั้น (stepwise) อัตราการไหล 2 ml/min เก็บ Fraction ละ 4 ml

จากผลการทดลอง เมื่อนำโปรตีนที่ถูกชะไปวิเคราะห์ protease activity พบว่าโปรตีนที่ต้องการ (protease) ไม่เกาะบนคอลัมน์ (unbound protein) และถูกชะออกมาที่ fraction 10-25 (ปริมาตรชะเท่ากับ 40-100 ml) เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์และค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ มีค่าเท่ากับ 62327 units/ml และ 1154 units/mg protein ตามลำดับ

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของกระบวนการแยกบริสุทธิ์ Protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2

เมื่อนำ crude enzyme จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 ผ่านการแยกบริสุทธิ์ โดยตกตะกอนที่ 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ทำโครมาโตกราฟีแบบเจลโครมาโตกราฟีด้วย Sephadex G-25 column และผ่าน Q-Sepharose column ได้ค่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ (fold) และผลได้ของกระบวนการแยกบริสุทธิ์ (yield) แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การแยกบริสุทธิ์ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2

Purification step	Volume (ml)	activity (units/ml)	Total activity (unit)	protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (Unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	2500	1502	3755000	76	190000	19.76	1.0	100
60%ammonium sulfate precipitation	35	25020	875700	245	8575	102.12	5.2	23.3
Sephadex G-25	14	82130	1149820	150	2100	547.53	27.7	30.6
Q-Sepharose	20	62327	1246540	54	1080	1154.20	58.4	33.2

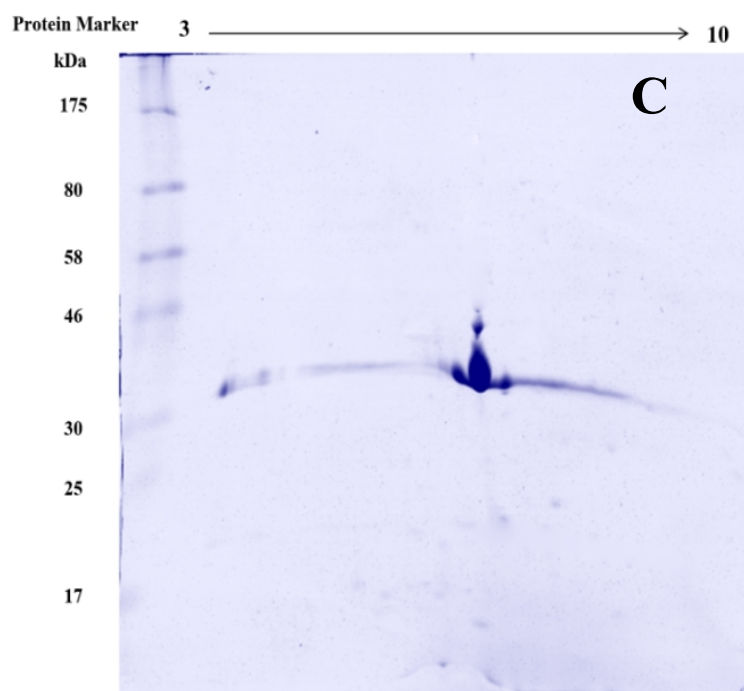
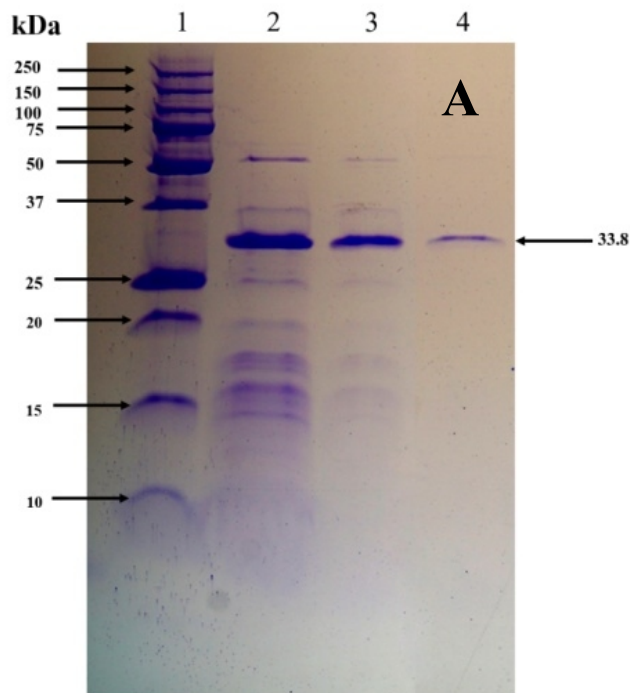
(กำหนดให้ 1 หน่วย protease หมายถึงการเพิ่มขึ้นของ $A_{440\text{ nm}}$ 0.01 หน่วย)

จากตารางที่ 6 เมื่อผ่านขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยกระบวนการทำแห้งแบบระเหยจนเอนไซม์มีค่า protease activity สูงขึ้น ขณะที่ปริมาณโปรตีนรวมลดลงเมื่อเทียบกับ crude enzyme ระดับความบริสุทธิ์ (purification fold) ของเอนไซม์หลังผ่านขั้นตอนสุดท้ายของการแยกมีค่าเพิ่มขึ้น 58.4 เท่า และมีค่าผลได้ของกระบวนการแยกบริสุทธิ์เท่ากับ 33.2%

การตรวจสอบความบริสุทธิ์โปรตีน protease ด้วย SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) การวิเคราะห์ protease zymogram และการวิเคราะห์ค่า pI

เมื่อนำโปรตีน protease ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนมาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE (รูปที่ 4A) จากผลการทดลอง พบว่าโปรตีนที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้าย (แถวที่ 4) ปรากฏแถบโปรตีนเด่นชัดเพียงแถบเดียว เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานในแถวที่ 1 โดยคำนวณน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_f พบว่า purified protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33.86 กิโลดาลตัน และจากการวิเคราะห์ Zymogram (รูปที่ 4B) พบแถบสีขาว (clean band) ที่เกิดจากการย่อย azocasein เพียงแถบเดียว จึงเป็นการยืนยันได้ว่าโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้เป็นแถบโปรตีนของ protease

เมื่อนำโปรตีนไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2-D gel electrophoresis เพื่อประมาณค่า pI ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4C โดยปรากฏจุด (spot) โปรตีนที่เด่นชัดเพียง 1 จุด ที่ค่า pI เท่ากับ 6.25 และเมื่อสกัดโปรตีนบน 2D gel เพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วยเทคนิค LC-MS พบว่าโปรตีนดังกล่าวคือ elastase (E.C 3.4.24.26) (วิเคราะห์ peptide mass fingerprint ด้วย MASCOT program; accession number: sp|P14756)



รูปที่ 4

A การวิเคราะห์ SDS-PAGE

แถวที่ 1 แถบโปรตีนมาตรฐาน (BioRad, USA),

แถวที่ 2 โปรตีนของ crude enzyme (60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$),

แถวที่ 3 โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25

แถวที่ 4 โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ Q-Sepharose Ion-exchang

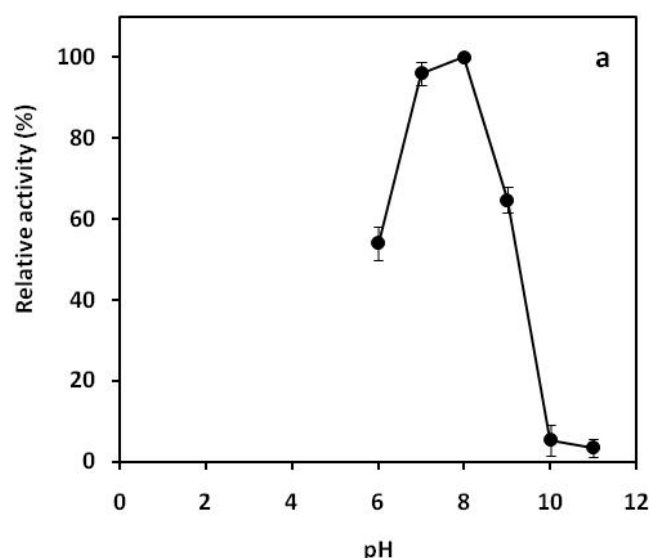
B การวิเคราะห์ Protease activity บนแผ่นเจล (Zymogram)

C การวิเคราะห์ pI ด้วยเทคนิค two-dimensional electrophoresis

การศึกษาคุณลักษณะบางประการของ protease ที่ผ่านแยกบริสุทธิ์

ผลของ pH

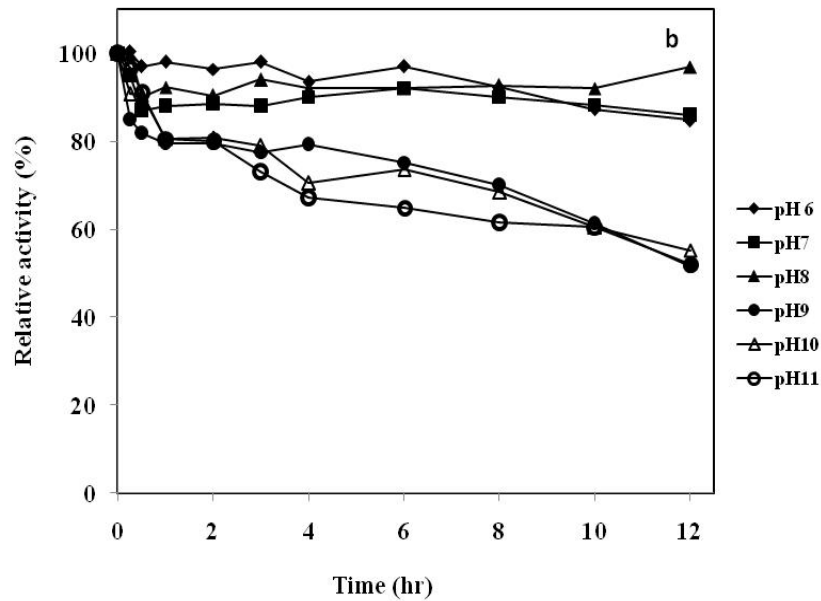
ศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม (optimum pH) ต่อ protease activity การศึกษา pH ที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุด ทำโดยละลาย azocasein ด้วยสารละลาย buffer ที่มีค่า pH ต่างๆ (50 mM potassium phosphate pH 5.0–7.0, 50 mM Tris–HCl pH 8.0–9.0, 50 mM glycine–NaOH pH 10.0–11.0) บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ protease activity ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ผลของ pH ต่อ protease activity

ผลการทดลองพบว่า purified protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH ในช่วง pH 7-8 โดยมีค่า relative activity มากกว่า 80% ไปจนถึง 100% สำหรับ pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือที่ pH 8.0 และที่ pH 9.0 เอนไซม์ยังคงเร่งปฏิกิริยาได้โดยมีค่า relative activity สูงกว่า 60% ผลการทดลองที่ได้สอดคล้อง protease ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ ATCC 27853 (Izrael-Zivkovic *et al.*, 2010; Bayoudh *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ san_ni และสายพันธุ์ K มี optimum pH ที่ 9.0 และ 10.0 ตามลำดับ (Karadzic *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2006)

การศึกษาผลของ pH ต่อความคงตัวของ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 6-11 (50 mM potassium phosphate pH 6.0-7.0, 50 mM Tris–HCl pH 8.0-9.0, 50 mM glycine–NaOH pH 10.0-11.0) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงจนครบเวลา เพื่อนำไปวิเคราะห์ protease activity ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 6

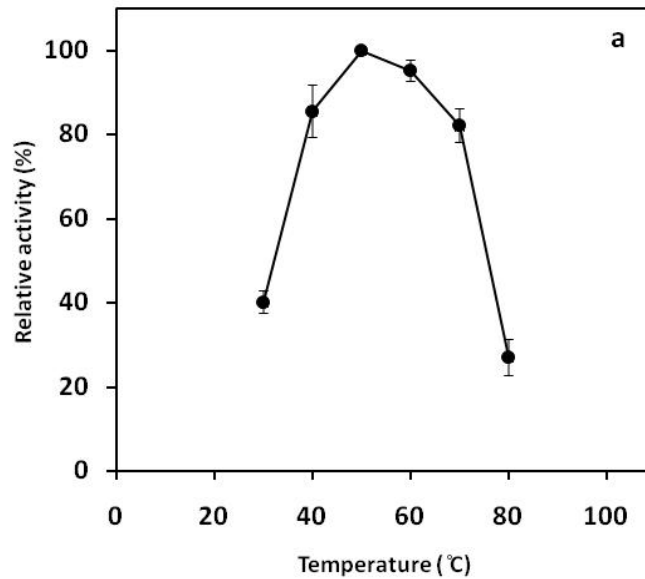


รูปที่ 6 ผลของ pH ต่อความคงตัวของ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 ทดสอบที่ pH 6-11 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

จากผลการทดลองพบว่า protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 มีความเสถียรสูงสุดที่ pH 6-8 โดยมี relative activity ลดลงน้อยกว่า 10% หลังบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง สำหรับที่ pH 9-11 เอนไซม์ยังคงมี activity เหลืออยู่มากกว่า 50% (หลังชั่วโมงที่ 12) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Gupta และคณะ (2005) ซึ่งรายงานว่า protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PseA มีความเสถียรสูงสุดที่ pH 6-9 (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง) และ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PT121 ซึ่งมีความเสถียรสูงสุดที่ pH 6-11 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (Tang, et al., 2010)

ผลของอุณหภูมิ

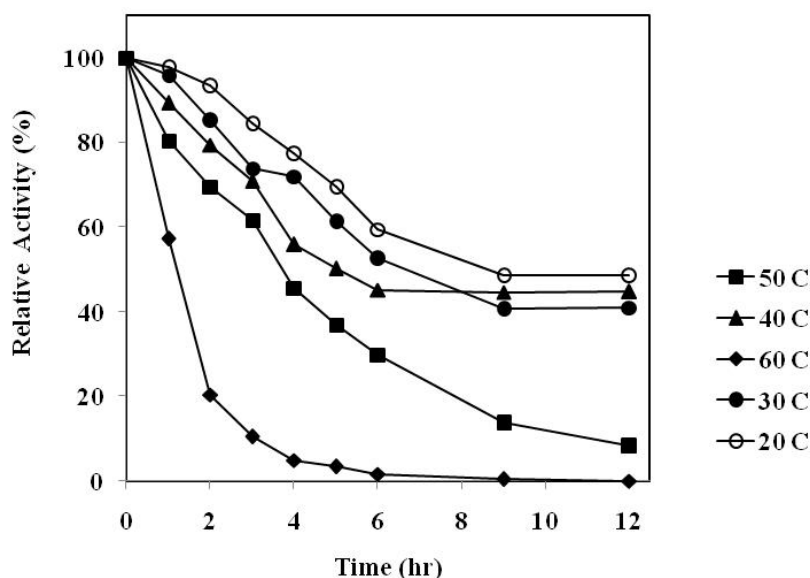
ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อการเร่งปฏิกิริยาของ protease การศึกษาอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงที่สุด ทำได้โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิในช่วง 30-80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อ protease activity

ผลของอุณหภูมิต่อ protease activity ที่อุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทำให้ protease activity มีค่าสูงขึ้น (ในช่วง 30-50 องศาเซลเซียส) และที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) โดยให้ค่า protease activity สูงสุดและเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นมากกว่า 60 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ protease activity ลดลงอย่างรวดเร็ว ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานการศึกษา protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ C111 (Han, *et al.*, 2012) และ สายพันธุ์ PST01 (Ogino, *et al.*, 1999) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเร่งปฏิกิริยาที่ 50 องศาเซลเซียส

ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของ protease โดยบ่มเอนไซม์ไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เอนไซม์คงตัวได้ดี (50 mM Tris-HCl pH 8) เก็บผลทุกชั่วโมงจนครบ 12 ชั่วโมงจากนั้นนำไปวิเคราะห์ protease activity ที่เหลืออยู่ ผลการทดลองที่ได้แสดงรูปที่ 8 พบว่า protease มีความคงตัวในช่วง 20-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีค่า relative activity (%) ในช่วง 40-50% แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง พบว่า protease activity ลดลงเหลือน้อยกว่า 10%



รูปที่ 8 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU 2 ทดสอบที่อุณหภูมิ 20-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

การศึกษาผลของไอออนโลหะและ reagent ต่อ protease activity

สารยับยั้งเอนไซม์ (Protease inhibitor) ต่อ protease activity ทดสอบโดยเติมสารยับยั้งชนิดต่างๆ ได้แก่ EDTA, PMSF, 1,10-phenanthroline และ 2-mercaptoethanol โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 และ 10 mM บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัด protease activity เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมตัวยับยั้งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7 จากตาราง พบว่า protease ถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วย 10 mM EDTA และ 10 mM 1,10 phenanthroline (ค่า relative activity เท่ากับ 1.6 และ 1.7% ตามลำดับ) แสดงว่า protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 เป็น metalloprotease สอดคล้องกับงานวิจัยของ Han และคณะ (2012) และ Ogino และคณะ (1999)

สำหรับ 2-Mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 10 mM ก็มีผลยับยั้งเอนไซม์ได้ โดยค่า relative activity เท่ากับ 68.7% ทั้งนี้อาจเป็นเพราะส่วนหนึ่งในโครงสร้างเอนไซม์มีพันธะ disulfide (S-S) ซึ่งเมื่อถูกรีดิวซ์ด้วย 2-Mercaptoethanol จึงทำให้ activity ของเอนไซม์ลดลง

ผลการทดสอบไอออนโลหะต่อ protease activity (ตารางที่ 7) พบว่า Ba^{2+} , Ca^{2+} และ Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 mM จะช่วยกระตุ้น protease activity ทำให้มีค่า relative activity (%) สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใส่ไอออนโลหะลงไปได้ค่า relative activity (%) เท่ากับ 115, 117 และ 111% ตามลำดับ แต่ Cu^{2+} , Zn^{2+} และ Mn^{2+} มีผลยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีค่า relative activity (%) ลดลงเท่ากับ 3, 11 และ 66% ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไอออนโลหะเป็น 10 mM พบว่า Mn^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} ยับยั้ง protease มี activity อย่างสมบูรณ์ แสดงว่าไอออนโลหะเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมบริเวณเร่ง (active site)

ตารางที่ 7 ผลของโลหะหนักและ reagent ต่อ protease activity

inhibitors / Metal ions	Relative activity	
	1 mM	10 mM
Control	100	100
Inhibitors		
1,10 Phenanthroline	75.6	1.7
EDTA	82.0	1.6
PMSF	102.0	99.7
2-mercaptoethanol	98.0	68.7
Metal ions		
Na ⁺ (NaCl)	100.0	100.0
K ⁺ (KCl)	105.0	94.0
Li ⁺ (LiCl)	109.0	102.0
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	111.0	70.0
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	66.0	0
Ba ²⁺ (BaCl ₂)	115.0	60.0
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	117.0	58.0
Cu ²⁺ (CaCl ₂)	3.0	0
Fe ²⁺ (FeCl ₂)	76.0	3.0
Zn ²⁺ (ZnCl ₂)	11.0	0

การศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว (surfactant) สารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) ต่อ protease activity

การศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวและสารออกซิไดซ์ต่อความคงตัวของเอนไซม์โดยบ่ม purified protease กับสารลดแรงตึงผิว (surfactants) ได้แก่ 10-50% (v/v) Triton X-100, 10-50% (v/v) Tween 20, 10-50% (v/v) Tween 80, 10-30% (v/v) SDS และสารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) ได้แก่ 10-50% (v/v) hydrogen peroxide (H₂O₂) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แสดงผลดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลของสารลดแรงตึงผิว สารออกซิไดซ์ และ สารซักล้าง ต่อ protease activity

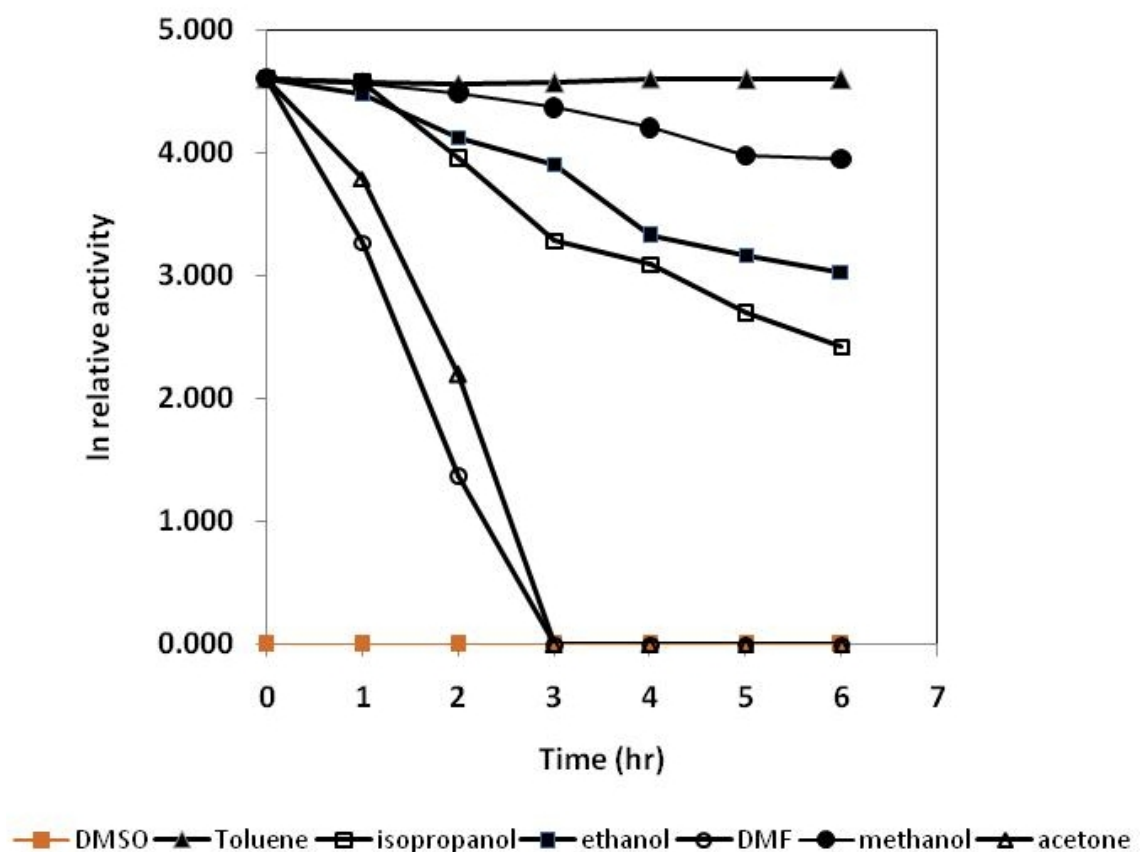
Surfactant/oxidizing agent	Concentration (%)	Residual activity (%)
Control	-	100
Tween 20	10% (v/v)	92.95
	30%	69.19
	50%	70.64
Tween 80	10% (v/v)	80.68
	30%	71.62
	50%	60.00
Triton X-100	10% (v/v)	82.39
	30%	71.62
	50%	1.82
SDS	10% (v/v)	9.09
	30%	0
H ₂ O ₂	10% (v/v)	96.95
	30%	67.90
	50%	40.15

สารลดแรงตึงผิว (surfactant) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ทำให้แรงตึงผิวของของเหลวลดลง ช่วยให้ของเหลวกระจายตัวได้ดีขึ้นแบ่งเป็น 4 ชนิดตามลักษณะส่วนที่ชอบน้ำของโมเลกุล ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (cation) สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anion) สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (nonionic surfactant) และสารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและลบ (amphoteric surfactant) กลุ่มของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดส่วนใหญ่เป็นชนิดไม่มีประจุ (nonionic) ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบกับสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ sodium dodecyl sulfate (SDS) และสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ ได้แก่ triton X-100 polysorbate 20 (tween 20) และ polysorbate 80 (tween 80) ผลการทดลองพบว่า เมื่อนำ protease มาบ่มกับ triton X-100 ที่ความเข้มข้น 10% และ 30% (v/v) นาน 30 นาที เอนไซม์ยังคงมี activity สูงกว่าครึ่งหนึ่ง (เท่ากับ 82.39 และ 71.62% ตามลำดับ) แต่ protease activity จะลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มเอนไซม์กับ triton X-100 ที่ความเข้มข้น 50% (v/v) ส่วนการบ่มเอนไซม์ร่วมกับ 10% (v/v) SDS พบว่า protease activity จะลดลงเหลือเพียง 9% นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความคงตัวต่อสารฟอกขาว (bleaching) คือ hydrogen peroxide (H₂O₂) ที่ความเข้มข้น 30% (v/v) พบว่ายังคงมี protease activity มากกว่าครึ่งหนึ่ง และ protease activity ลดลงเหลือ 40% ที่ความเข้มข้นของ H₂O₂ เท่ากับ 50% (v/v) จึงสรุปได้ว่า protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU 2 มีความคงตัวต่อสารลดแรงตึงผิวที่ไม่

มีประจุ ได้แก่ triton X-100, tween 20, tween 80 ที่ความเข้มข้น 10-30% (v/v) แต่ไม่คงตัวในสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (SDS) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PseA ที่มีความเสถียรใน 0.5% (v/v) tween 80 และ triton X100 (Gupta *et al.*, 2005) จากผลการศึกษาคูณสมบัติความคงตัวของเอนไซม์ต่อสารลดแรงตึงผิวและสารออกซิไดซ์พบว่า protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 อาจมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้างต่อไป

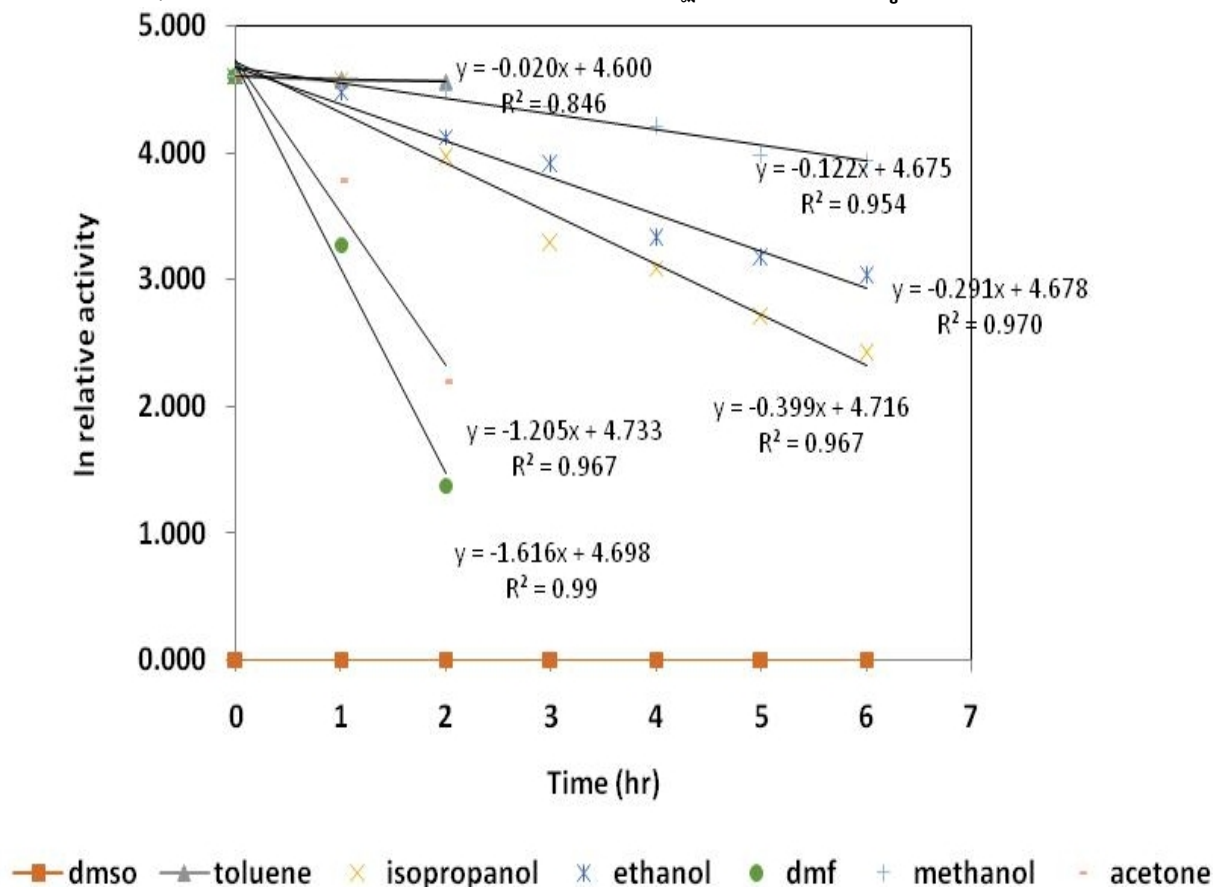
การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) ต่อความเสถียรของ protease

เมื่อบ่มเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ dimethyl formamide (DMF) ($\log P = -1.01$), dimethyl sulfoxide (DMSO) ($\log P = -1.35$), ethanol ($\log P = -0.3$), toluene, ($\log P = 2.73$), isopropyl alcohol ($\log P = 0.05$) และ methanol ($\log P = -0.74$) โดยใช้ความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดเท่ากับ 75% (v/v) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ protease activity ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า Ln (relative activity %) กับเวลา เมื่อบ่มเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเข้มข้น 75% (v/v) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

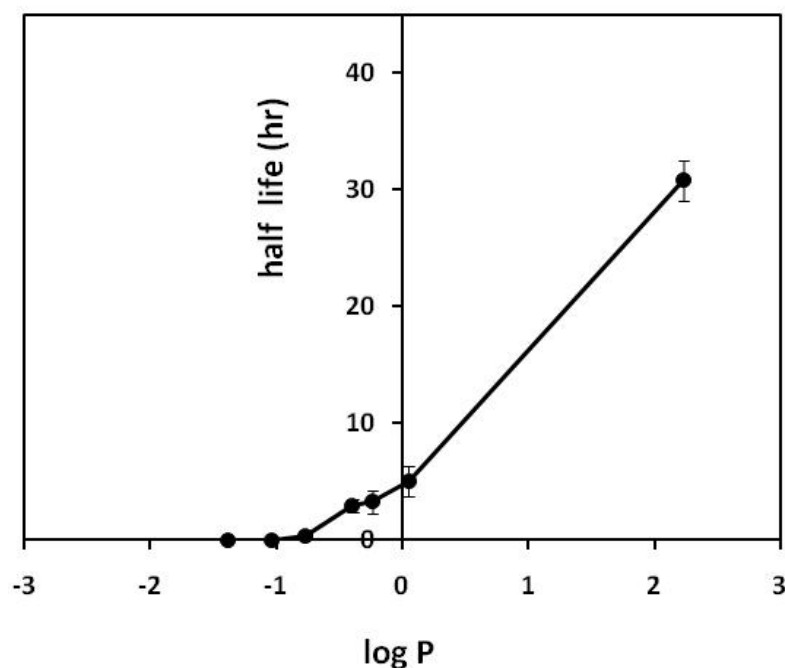
ผลการศึกษาพบว่า protease คงตัวได้ดีใน 75% (v/v) toluene โดยมีค่า relative activity (%) สูงกว่า 90% แต่ไม่คงตัวเมื่ออยู่ใน 75% (v/v) DMSO และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น protease activity ที่ลดลงมีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้นกับเวลา ความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นไปตามหลักจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาลำดับหนึ่ง โดยความคงตัวของ protease สามารถประเมินได้ด้วยค่าคงที่ของปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง ค่า Ln (relative activity %) กับเวลา เมื่อบ่มเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ความเข้มข้น 75% (v/v) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

จากรูปที่ 10 protease คงตัวได้ดีใน 75% (v/v) toluene ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยค่าคงที่ของอัตราการลดลง (k) ของ protease activity มีค่าเท่ากับ 0.02 hr^{-1} ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Shah และคณะ (2010) ที่ศึกษาความคงตัวของ protease บริสุทธิ์จาก *Bacillus cereus* ในตัวทำละลายอินทรีย์และพบว่าเอนไซม์คงตัวได้ดีใน 33% (v/v) toluene เช่นเดียวกัน

ค่า Half life ($t_{1/2}$) ของเอนไซม์เมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์สามารถคำนวณจากอัตราการลดลงของ protease activity ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของ protease บริสุทธิ์กับค่า $\log P$ ของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 75% (v/v) dimethyl formamide ($\log P = -1.01$), dimethyl sulfoxide ($\log P = -1.3$), ethanol ($\log P = -0.24$), toluene ($\log P = 2.5$), isopropyl alcohol ($\log P = 0.05$) และ methanol ($\log P = -0.76$)

การเลือกตัวทำละลายอินทรีย์มีความสำคัญต่อ enzyme activity และมีส่วนสำคัญในการคงอยู่ของปริมาณน้ำรอบๆโมเลกุลเอนไซม์ (bound water) (Gorman and Dordick, 1992) อัตราการลดลงของ protease activity ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มีความสัมพันธ์กับ $\log P$ เมื่อค่า $\log P$ สูงขึ้นจะทำให้เอนไซม์มีความเสถียรเพิ่มขึ้น โดย protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 สามารถคงตัวได้ดีใน 75% (v/v) toluene ($\log P = 2.5$) และมีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 30 ชั่วโมง

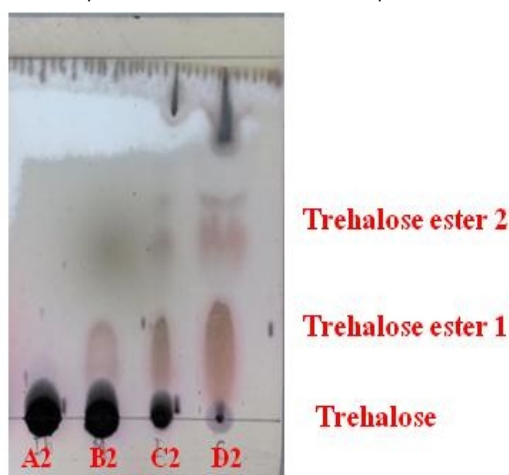
การใช้ค่า $\log P$ เป็นตัวแปรเพื่อทำนายอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับตัวทำละลายอินทรีย์จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า $\log P$ ต่ำ เช่น methanol ($\log P = -0.76$), dimethyl formamide ($\log P = -1.01$), และ dimethyl sulfoxide ($\log P = -1.3$) ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่ชอบน้ำไม่เหมาะสมต่อการใช้งานเนื่องจากมีผลเปลี่ยนแปลงน้ำล้อมรอบเอนไซม์ และ isopropyl alcohol ($\log P = 0.05$) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่ไม่ชอบน้ำมีผลเปลี่ยนแปลงน้ำที่ล้อมรอบเอนไซม์เพียงเล็กน้อย สำหรับปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อธิบายได้ว่าเอนไซม์ต้องการน้ำเพียงเล็กน้อยในการรักษาโครงสร้างของเอนไซม์เอาไว้ถ้าปริมาณน้ำในเอนไซม์มากเกินไปจะไปต้านทานการแพร่ของสารตั้งต้น (substrate) ที่จะเข้ามาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ทำให้ activity เอนไซม์ลดต่ำลงและถ้าปริมาณน้ำน้อยเกินไปก็จะไม่มีผลต่อการคงรูปของเอนไซม์ทำให้โครงสร้างสามมิติ (conformation) ของเอนไซม์ไม่ยืดหยุ่น สารตั้งต้นไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ ทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา

Gupta (1992) รายงานว่าการใช้เอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์จะช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิให้มากขึ้นอาจเป็นเพราะว่าโมเลกุลของเอนไซม์หรือโปรตีนที่อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์จะมีโครงสร้างที่แข็งแรง (rigidity) มากขึ้นหรืออาจเกิดเนื่องจากการใช้เอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์นั้นทำให้กระบวนการต่างๆที่เอนไซม์เสียสภาพ เช่นการเกิด deamination การไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์เกิดได้น้อยลง

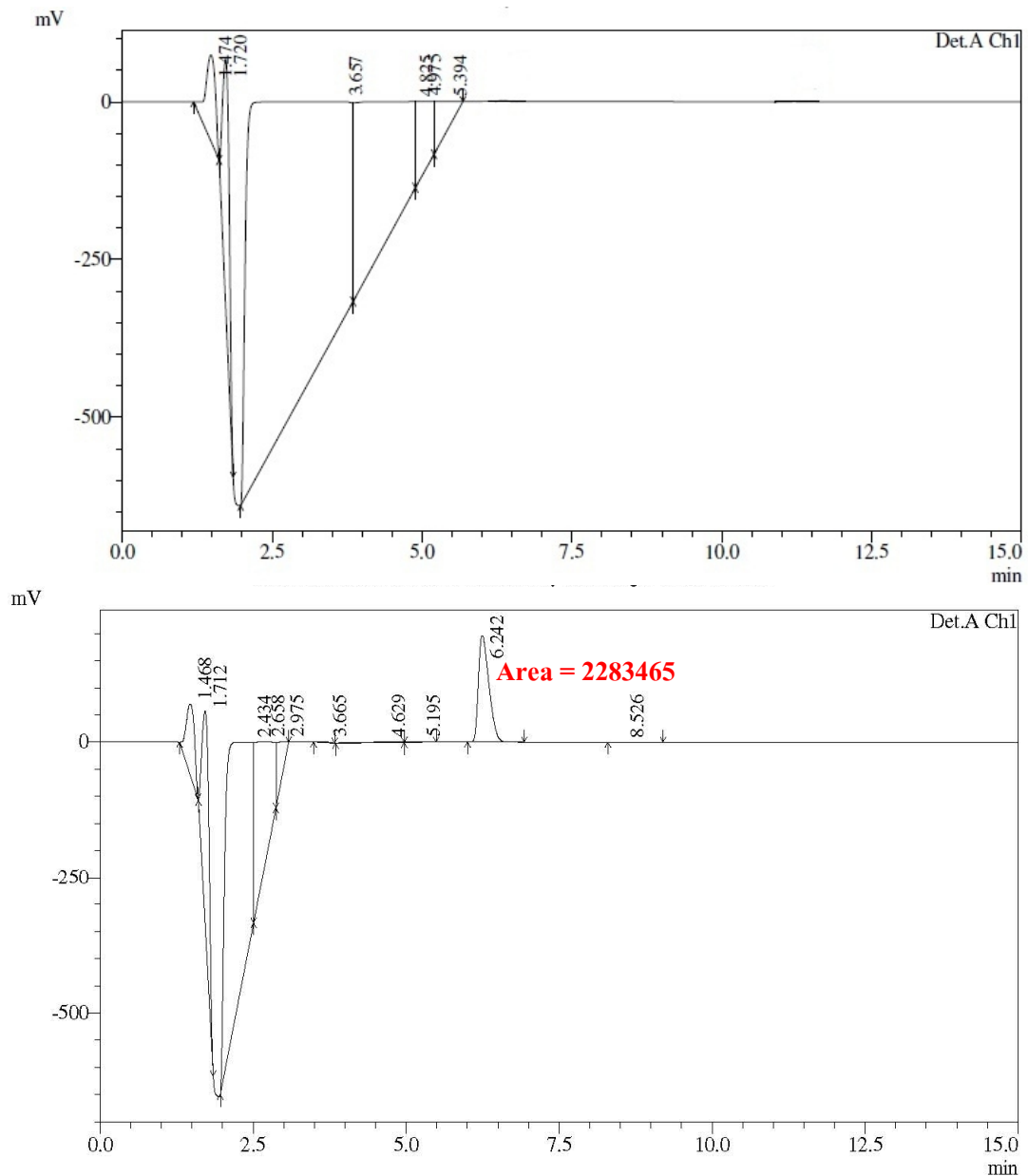
Reslow และคณะ (1987) ได้ศึกษาผลการเร่งปฏิกิริยาของ chymotrypsin ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P แตกต่างกันพบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ที่มีค่า log P สูงให้ activity สูงกว่าตัวทำละลายชนิดไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) ที่มีค่า log P ต่ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไฮโดรโฟบิกใช้ปริมาณน้ำน้อยกว่าชนิดไฮโดรฟิลิกเพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาได้สูงสุดตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไฮโดรโฟบิกทำให้เอนไซม์มีความเสถียรดีกว่าตัวทำละลายชนิดไฮโดรฟิลิกซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zaks และ Klibanov (1988) ที่พบว่าความเสถียรต่ออุณหภูมิและการเก็บรักษาเอนไซม์จะมีค่าสูงในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไฮโดรโฟบิก

การสังเคราะห์ Trehalose esters ในตัวทำละลายอินทรีย์ด้วย protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2

ผลการทดสอบการสังเคราะห์ trehalose ester จาก trehalose และ vinyl laurate ในตัวทำละลาย DMF:DMSO (1:1, v/v) และใช้ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเมื่อวิเคราะห์ trehalose esters ด้วยเทคนิค TLC ปรากฏแถบ (band) ขึ้น 2 แถบ (รูปที่ 12) แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยมี RI เป็น detector พบ peak ของผลิตภัณฑ์เพียง peak เดียวที่เวลา 6.3 นาที (รูปที่ 13)



รูปที่ 12 การวิเคราะห์ Trehalose ester จากการสังเคราะห์ด้วย protease ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 ด้วยเทคนิค TLC (Mobile phase: Chloroform: Methanol (5:1 v/v)) (สังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, อัตราส่วนของ Trehalose กับ Vinyl laurate 1:1 (v/v))
A2 : control: (substrate + inactive enzyme) หลังบ่มนาน 24 ชั่วโมง
B2 : Reaction (substrate + active enzyme) หลังบ่มนาน 12 ชั่วโมง
C2 : Reaction (substrate + active enzyme) หลังบ่มนาน 24 ชั่วโมง
D2 : trehalose ester ที่สกัดด้วย methanol-chloroform-water



รูปที่ 13 HPLC Chromatogram ของการวิเคราะห์ trehalose ester จากการสังเคราะห์ด้วย protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 (สังเคราะห์ใน DMF:DMSO (1:1 v/v) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, อัตราส่วน Trehalose ต่อ Vinyl laurate เท่ากับ 1:1 (v/v), เวลา 48 ชั่วโมง)

A: control: (substrate + inactive enzyme) หลังบ่มนาน 24 ชั่วโมง

B: Reaction (substrate + active enzyme) หลังบ่มนาน 24 ชั่วโมง

(retention time ของ trehalose และ trehalose ester เท่ากับ 1.4 นาที และ 6.24 ตามลำดับ)

Raku และคณะ (2003) ได้รายงานการสังเคราะห์ 6-*O*-lauroyl trehalose จาก trehalose และ vinyl laurate ในตัวทำละลาย dimethylformamide (DMF) โดยใช้ protease จาก *Bacillus subtilis* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าให้ค่าผลได้ (yield) ของการสังเคราะห์สูงกว่า 88% นอกจากนี้ยังพบรายงานการใช้ protease จาก *Bacillus licheniformis* เพื่อสังเคราะห์ 6,6'-*O*-divinyladipate trehalose ใน pyridine (Park *et al.*, 2000) ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการสังเคราะห์ trehalose ester ในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

สรุปผลการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกบริสุทธิ์จุลินทรีย์ผลิต protease ที่มีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์และศึกษาสมบัติของ protease ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้ว ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ (DMF และ DMSO) ได้ 8 สายพันธุ์ โดยมี 4 สายพันธุ์ที่ให้ผลการทดสอบบน minimum medium ที่มี 1.5% casein สำหรับจุลินทรีย์สายพันธุ์ SU2 พบว่ามีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ทดสอบมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น ผลการจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ของสายพันธุ์ SU2 ด้วยเทคนิค 16S rDNA ระบุว่าเป็น *Pseudomonas aeruginosa* (99.91% similarity)

การศึกษาการแยกบริสุทธิ์ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 โดยใช้กระบวนการแยกทั้งหมด 3 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนด้วย 60% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ผ่าน Sephadex G-25 gel filtration column และ Q-Sepharose ion exchange column พบว่า protease มีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเพิ่มขึ้น 1154.2 U/mg มีผลได้ของกระบวนการแยกบริสุทธิ์ เท่ากับ 33.2% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 58.4 เท่า สมบัติของ protease บริสุทธิ์แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สรุปผลการศึกษาสมบัติของ Protease ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์

Property	
Molecular weights	33.86 kDa
pI	6.25
Peptide fingerprint analysis	Elastase (EC 3.4.24.26)
Optimum temperature	50 องศาเซลเซียส
Temperature stability	อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส
Optimum pH (azocasein)	50 mM Tris-HCl pH 8.0
pH stability	50 mM Tris-HCl pH 8.0
Metal ion activators	1 mM Ba^{2+} , Ca^{2+} และ Mg^{2+}
Metal ion Inhibitors	1 mM Cu^{2+} , Zn^{2+} และ Mn^{2+}
Type of protease	metallo protease
Surfactant and oxidizing agent stability (for 30 min)	30% (v/v) Triton X
ซึ่งให้ค่า residual activity มากกว่า 50%	50% (v/v) Tween 20 และ 50% (v/v) Tween 80
Organic solvent stability Conc. 75% (v/v)	30% (v/v) H_2O_2
	toluene (Tol)
	$t_{1/2} = 30$ hrs

เมื่อนำ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 ไปทดสอบการสังเคราะห์น้ำตาลเอสเทอร์ พบว่าสามารถสังเคราะห์ trehalose ester ได้ เมื่อพิจารณาสมบัติของ protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 ที่ได้จากงานวิจัยนี้ อาจนำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสังเคราะห์น้ำตาลเอสเทอร์ชนิดอื่นๆ และการนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพของสารชักล้าง

บรรณานุกรม

- Anbu, P. (2013) Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). **International Journal of Biological Macromolecules**, 56: 162-168.
- Anitha T.S. and Palanivelu P. (2013) Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, 88:214-220.
- Banga, J.R. and Singh, R.P. (1994) Optimization of air drying of foods. **Journal of Food Engineering**, 23: 189-211
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254.
- Beg, Q.K. and Gupta, R. (2003) Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, 32: 294-304.
- Brink, L.E.S. and Tramper, J. (1985) Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. **Biotechnology and Bioengineering**, 27(8): 1258-1269.
- Bhunja, B., Basak, B. and Dey, A. (2012) A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp. **Journal of Biochemical Technology**, 3(4): 448-457
- Bayoudh A., Gharsallah N., Chamkha M., Dhouib A., Ammar S. and Nasri M., (2000) Purification and characterization of alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 24: 291-295.
- Cavello I.A., Hours R.A., Rojas N.L. and Cavalitto S.F. (2013) Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. **Process Biochemistry**, 48:972–978.
- Chutmanop, J., S. Chuichulcherm, Y. Chisti and Srinophakun P. (2008) Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agro-industrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 83: 1012–1018.
- Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G.Q. and Wen, T.Y. (2010) Purification and characterization of a surfactant-stable high alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. **Bioresource Technology**, 101: 7100-7106.

- Devi, P.R., VijayaRaghavan, P., Vasudheven, I., Joshua, L and VijayaKumar, M. (2011) Purification and Characterization of Protease from *Rhizopus oligosporus*. **International Journal of Biological Technology**, 2: 46-49.
- Divakar, K., Deepa, J., Arul, P. and Pennathur, G. (2010) Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from *Aeromonas veronii* PG01. **Molecular Catalysis B**, 66:311–318.
- Doukyu, N. and Ogino, H. (2010) Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, 48: 270–82.
- Dowd, A.J., Dooley, M., Fagain, C. and Dalton, J.P. (2000) Stability studies on the cathepsin proteinase of the helminth parasite *Fasciola hepatica*. **Enzyme and Microbial Technology**, 27: 599–604.
- Dunn, B.M. (2001) Determination of Protease Mechanism. In: **Proteolytic enzymes: a practical approach** (Eds) Beynon, R.J., and Bond, J.S. Oxford University Press, New York.
- EL-Tanash, A.B., Sherief, A.A. and Nour, M (2011) A catalytic properties of immobilized tannase produced from *Aspergillus aculeatus* compared with the free enzyme. **Brazilian. Chemical Engineering Journal**, 28(3): 381–391.
- Emmanuel, V. and Belany, E.A. (2012) Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. **Food Chemistry**, 135: 1848–1854.
- Fernández, J., Mohedano, A.F., Gaya, P., Medina, M. and Nuñez, M. (2000) Purification and properties of two intracellular aminopeptidases produced by *Brevibacterium linens* SR3. **International Dairy Journal**, 10: 241–248.
- Friedman, D.B., Hoving, S., and Westermeier, R. (2009) Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. **Methods in Enzymology**, 463: 515-540.
- Foukis, A., Stergiou, P.-Y., Theodorou, L.G., Papagianni, M. and Papamichael, E.M. (2012) Purification, kinetic characterization and properties of a novel thermo-tolerant extracellular protease from *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 with potential biotechnological interest. **Bioresource Technology**, 123: 214-220.
- Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., (2003) Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, 32: 513–518.
- Gupta, A., Roy, I., Khare, S.K., and Gupta, M.N., (2005) Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Journal of Chromatography A**, 1069: 155–161.

- Gupta, M.N. (1992) Enzyme function in organic solvents. **European Journal of Biochemistry**, 203: 25–32.
- Gorman, L. A. S. and Dordick J. S. (1992) Organic-solvents strip water of enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, 39: 392–397.
- Haddar A., Bougatef A., Agrebi R., Sellami-Kamoun A. and Nasri M. (2009) A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavenensis* A21: Purification and characterization. **Process Biochemistry**, 44: 29-35.
- Hashim, M.M., Mingsheng, D., Iqbal, Z., Guoqiang, M.F. and Xiaohong, C. (2011) Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. **Phytochemistry**, 72: 458–464.
- Hmidet, N., El-Hadj Ali, Haddar, A., Kanoun, S., Alya, K.S. and Nasri, N. (2009) Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochemical Engineering Journal**, 47: 71–79.
- Ire, F.S., Okolo, B.N. and Moneke, A.A. (2011) Purification and characterization of an acid protease from *Aspergillus carbonarius*. **African Journal of Food Science**, 5(12): 695-709.
- Izrael-Zivkovic L., Gojgic-Cvijovic G. and Karadzic I., (2010) Isolation and partial characterization of protease from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **J. Serb. Chem. Soc.** 75(8), 1041-1052.
- Kamran, A., Rehman, H.U., Qader, S.A.U., Baloch, A.H. and Kamal, M. (2015) Purification and characterization of thiol dependent, oxidation-stable serine alkaline protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 13(1): 59-64.
- Karadzic, I., Masui, A. and Fujiwara, N. (2004) Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas aeruginosa* grown in cutting oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 98(3): 145–152.
- Karigar, C.S. and Rao, S.S., (2011) Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. **Enzyme Research**, 31: 1-11.
- Klibanov, A.M. (1997) Why are enzymes less active in organic solvents than in water?. **Trends in Biotechnology**, 15(3): 97-101.
- Kumar, A., Sachdev, A., Balasubramanyam, S.D., Saxena, A.K. and Lata A. (2002) Optimization of condition for production of neutral and alkaline protease from species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. **Indian Journal of Microbiology**, 42: 233-236.

- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Veeger, C. (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, 30(1): 81-87.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. and Wang, X. (2012) Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2: e201209017.
- Martínez, R. H., Sánchezb, G.G., Bergmannb, C.W., Corral, O.L., Domínguez, A.R., Ochoa, S.H., González, C.R. and Barragán, L.A.B. (2011) Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, 46: 2001–2006.
- Miguel, A. and María, E. (2013) Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. **Food Chemistry**, 14: 1902-1907.
- Nakajima, N., Sugimoto, M. and Ishihara, K. (2000) Stable earthworm serine proteases: application of the protease function and usefulness of the earthworm autolysate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 90:174–179.
- Niu, Q., Huang, X., Zhang, L., Li, Y., Li, J., Yang, J. and Zhang, K. (2006) A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes. **Archives of Microbiology**, 185: 439-448.
- Ogino, H. and Ishikawa, H. (2001) Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 91: 109–116.
- Ogino, H., Watanabe, F., Yamada, M., Nakagawa, S., Hirose, T., Noguchi, A., Yasuda, M. and Ishikawa, H. (1999) Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 87(1): 61-68.
- Ogino, H., Yamada, M., Watanabe, F., Ichinose, H., Yasuda, M. and Ishikawa, H. (2007) Peptide synthesis catalyzed by organic solvent-stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 in monophasic aqueous-organic solvent systems. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 88: 513–518.
- Olajuyigbe, M.F. and Falade, A.M. (2014) Purification and partial characterization of serine alkaline metalloprotease from *Bacillus brevis* MWB-01. **Bioresources and Bioprocessing** 1: 8-13.
- Papamichael, E.M., Theodorou, L.G., Perisynakis, A. and Drainas, C. (2010) Purification and Characterization of a novel extracellular protease from a halo-alkalophilic *Bacillus* sp. 17N-1, active in polar organic solvents. **Environmental Technology**, 31: 1073-1082.

- Qouraa, F., Kassaba, E., Reißea, S., Antranikianb, G. and Bruecka, T. (2015) Characterization of a new, recombinant thermo-active subtilisin-like serine protease derived from *Shewanella arctica*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 116: 16-23.
- Rahman RNZA., Geok L.P., Basri M., and Salleh A.B., 2006. An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**. 39: 1484-1491.
- Rahman, R.N.Z.R.A., Mahamad, S. and Salleh, A.B. (2007) A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 34: 509–17.
- Rajkumar R., Jayappriyan K.R. and Rengasamy R. (2011) Purification and characterization of a protease produced by *Bacillus megaterium* RRM2 application in detergent and dehairing industries. **Journal of Basic Microbiology**, 51(6): 614–624.
- Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62(3): 597-635.
- Rao, S., Mizutani, O., Hirano, T., Masaki, K. and Lefuji, H. (2011) Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. S-2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 112(5): 441-446.
- Reslow, M. Adlercreutz, P. and Mattiasson, B. (1987) Organic solvents for bioorganic synthesis. 1. Optimization of parameters for α -chymotrypsin catalysed process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 26(1): 1-8.
- Rifaat, H.M., Hassanein, S.M., El-Said, O.H., Saleh, S.M. and Selim, M.S.M. (2006) Purification and characterization of extracellular neutral protease from *Streptomyces microflavus*. **Arab Journal of Biotechnology**, 9: 51-60.
- Romero, F.J., García, L.A., Salas, J.A., Díaz. M and Quiró L.M. (2001) Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochemistry**, 36: 507–515.
- Ruiz, D.M. and De Castro, R.E. (2007) Effect of organic solvents on the activity and stability of an extracellular protease secreted by the halo alkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 34: 111–115.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- Sana, B., Ghosh, D., Saha, M. and. Mukherjee, J. (2006) Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-*Proteobacterium* isolated from the marine environment of the Sundarbans. **Process Biochemistry**, 41: 208-215.
- Sangster, J.(1989) Octanol–water partition coefficients of simple organic compounds. **Journal of Physical Chemistry Reference Data** 18: 1111–1229.
- Sarath, G., de la Monte, R.S. and Wagner, F.W. (1989) Protease assay methods. In: Beynon, R.J., Bond, J.S. (Eds.), *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, pp. 25–56.
- Shah, K., Mody, K., Keshri, J. and Jha B (2010) Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 67: 85-91.
- Sen, S., Dasu V.V., Dutta K. and Mandal, B. (2011) Characterization of a novel surfactant and organic solvent stable high-alkaline protease from new *Bacillus pseudofirmus* SVB1. **Research Journal of Microbiology**, 6: 769-783.
- Tang XY., Wu B., Ying HJ., and He B.F. (2010) Biochemical properties and potential applications of a solvent-stable protease from the high-yield protease producer *Pseudomonas aeruginosa* PT 121. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 160: 1017-1031.
- Valasaki, K., Staikou, A., Theodorou, L.G., Charamopoulou,V., Zacharaki, P. and Papamichael, E.M. (2008) Purification and kinetics of two novel thermophilic extracellular proteases from *Lactobacillus helveticus*, from kefir with possible biotechnological interest. **Bioresource Technology**, 99: 5804-5813.
- Waghmare, S.R., Gurav, A.A., Mali, S.A., Nadaf, N.H., Jadhav, D.B. and Sonawane, K.D. (2015) Purification and characterization of novel organic solvent tolerant 98 kDa alkaline protease from isolated *Stenotrophomonas maltophilia* strain SK. **Protein Expression and Purification**, 107: 1-6.
- Zaks, A. and Klibanov, A. M. (1988) Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. **Journal of Biological Chemistry**, 263(7): 3194-3201.

ภาคผนวก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ modified Luria-Bertani (MLB) broth
 - Organic solvent 10%
 - Yeast extract 0.5%
 - Tryptone 1.0%
 - NaCl 1.0%
 - MgSO_4 0.05%

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ minimum medium
 - Peptone 0.5%
 - Yeast extract 0.2%
 - K_2HPO_4 0.1%
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 %
 - CaCl_2 0.01%
 - Glucose 0.5%
 - Na_2CO_3 1.0%

ประวัติผู้วิจัย

ตอนที่ 1 ประวัติทั่วไป

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย) นาย สินธุวัฒน์ ฤทธิธรรม
(ภาษาอังกฤษ) Mr Sinthuwat Ritthitham

2. วัน เดือน ปีเกิด 2 พฤศจิกายน 2514

3. หมายเลขประจำตัวประชาชน

4. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ☐ ข้าราชการ / พนักงาน
/ อาจารย์ ☐ ข้าราชการ
☐ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ☐ ข้าราชการ
☐ รองศาสตราจารย์ ☐ ข้าราชการพิเศษ
☐ ศาสตราจารย์ ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

5. สถานที่ทำงาน

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
โทรศัพท์ 0-3421-9360, , 089-0660308 โทรสาร 0-3421-9360
e-mail sinthuwatk@hotmail.com

ที่อยู่ปัจจุบัน

บ้านเลขที่ 25/18 ถนน เพชรเกษม ตำบล ท่าพระ อำเภอ บางกอกใหญ่ จังหวัด กรุงเทพฯ
โทรศัพท์ 02-4723266

6. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา จุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีที่จบ พ.ศ. 2537
ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีที่จบ พ.ศ. 2542
ปริญญาเอก	Ph.D สาขา Biotechnology, Chemistry and Environmental Engineering Aalborg Universitet, Aalborg, DANMARK ปีที่จบ พ.ศ. 2553

7. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ยื่นโครงการ ทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท

ชื่อเรื่อง “Keratinase production by *Bacillus licheniformis* K6 and *Bacillus pumillus* K82,”

ปีที่ดำเนินการ 2539-2542

- ระดับปริญญาเอก

ชื่อเรื่อง “Synthesis of sucrose fatty acid esters as catalyzed by alkaline protease AL89 and *Candida antarctica* lipase B in hydrophilic solvents”

ปีที่ดำเนินการ 2547-2552

8. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา

กลุ่มวิชาอุตสาหกรรมเกษตร

แขนงวิชา Fermentation Process

แขนงวิชา Enzyme Technology

สาขาวิศวกรรมศาสตร์และอุตสาหกรรมวิจัย

กลุ่มวิชาวิศวกรรมศาสตร์

แขนงวิชา Biochemical Engineering

แขนงวิชา Downstream Processes

ตอนที่ 2 ผลงานวิจัย

1. Kaewsri-ngam P. and Ritthitham S. (2012) Isolation and characterization of an extracellular organic solvent-stable protease bacterium. *In the 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology*. (pp. 420-423) Ubon Rachathani, Thailand.
2. Sa-ngasri C and Ritthitham S. (2012). Effect of dialysis buffer on activity and stability of alkaline protease SUAP01 in hydrophilic solvents. *Proceedings of the 7th International Symposium of the Protein Society of Thailand*; 2012 Aug 29-31, Bangkok, 178-181.
3. Ritthitham S. and Sang-Kaew T. (2013). Characterization of tyrosinase from shelf fungus (*Polyporus sp.*). *Proceedings of the 8th International Symposium of the Protein Society of Thailand*; 2013 Aug 5-7, Bangkok, 186-190.
4. Ritthitham S. Wong-La C and Rattanapun U. (2013). Optimization of culture medium for the protease production by *Brevibacterium luteolum*. *In the 5th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Product*. (pp 217-221) Khon Kaen, Thailand.