วารสาร Mahidol R2R e-Journal ปีที่ 8 ฉบับที่ 1 ประจำเดือนมกราคม-เมษายน 2564
Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 และทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในสารซักล้างทางการค้า

Study on the optimal production and partial purification of alkaline protease from alkalotolerant *Bacillus* sp. B12: Feasibility as a commercial detergent additive

พิมล จำนงค์*
Pimon Jamnong*

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสทางอุตสาหกรรมโดยเฉพาะสายพันธุ์ *Bacillus* จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุดที่ 0.44 ยูนิตต่อมิลลิลิตร งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อ (1) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ให้ได้เพิ่มสูงขึ้น และ (2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนและความสามารถในการอยู่ร่วมกันได้กับสารซักล้างทางการค้า โดยทำการศึกษาอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตและการทำงานของอัลคาไลน์โปรตีเอส ประกอบด้วยการศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และปริมาณโปตัสเซียมไนเตรท ความเหมาะสมของกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความเร็วในการเขย่า ประเมินผลผลิตจากอัลคาไลน์โปรตีเอสรวม (CP) ขณะที่การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนและความสามารถในการอยู่ร่วมกันได้กับสารซักล้างทางการค้า ประกอบด้วยการศึกษาปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่เหมาะสมต่อการตกตะกอน CP ให้บริสุทธิ์บางส่วน ความเหมาะสมของกรด-ด่างและอุณหภูมิต่อการทำงานและเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วน (PPP) ประเมินผลผลิตจาก PPP และความสามารถในการอยู่ร่วมกันได้กับสารซักล้างทางการค้า ทำการตรวจวัดกิจกรรมของโปรตีเอสเพื่อประเมินผลของการซักล้างต่อเสถียรภาพของ CP และ PPP

จากผลการศึกษาพบว่าอาหารและสภาวะที่เหมาะสมมากที่สุดในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสให้ได้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในส่วนผสมกากถั่วเหลืองร้อยละ 0.5 โปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.5 พีเอช 9.0 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยเชื้อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุดที่ 0.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้จะพบว่าเชื้อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้เพิ่มสูงขึ้นจากเดิม 1.4 เท่า สภาวะที่เหมาะสมมากที่สุดในการทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอน CP ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ร้อยละ 40-60 จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.9 เท่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของ PPP อยู่ในช่วงพีเอช 8.0 ถึง 11.0 และมีเสถียรภาพต่อพีเอชในช่วง 8.0 ถึง 10.0 นาน 1 ชั่วโมง เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรท อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ PPP อยู่ในช่วง 40 ถึง 70 องศาเซลเซียส และมีเสถียรภาพสูงในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ขณะที่ความสามารถในการอยู่ร่วมกันได้ของโปรตีเอสกับสารซักล้างทางการค้า พบว่า PPP ทำงานได้ดีในสารซักล้างทางการค้าชนิด Baby best, Baby mild, และ Essence ตามลำดับ แต่คงทนต่อสารซักล้างชนิด St'Luke's

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

และ Fineline ได้น้อย ขณะที่ CP ทำงานได้ดีในสารซักล้างทางการค้าทั้ง 5 ชนิด คือ Baby best, Baby mild, Essence, St'Luke's และ Fineline ตามลำดับ และมีเสถียรภาพดีต่อสารซักล้างชนิด Baby best ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ถึง 5.0 Baby mild ร้อยละ 3.0 และ Essence ร้อยละ 1.0 ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่จะนำ CP จาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ไปใช้เป็นส่วนผสมในสูตรสารซักล้างได้

คำสำคัญ: Alkalotolerant *Bacillus* sp., อัลคาไลน์โปรตีเอส, สารซักล้าง, การทำให้โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วน

---

*ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล,กรุงเทพ 10400 ,ประเทศไทย
*Department of Biotechnology, Faculty of Science. Mahidol University,Bangkok 10400,Thailand
*Corresponding Author: pimon.jam@mahidol.ac.th

Abstract

Microorganisms, especially the genus of Bacillus show important roles on the production of commercial alkaline protease. Preliminary study revealed that alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 can produce alkaline protease with the highest activity at 0.44 Unit/ml. The objects of this this study were (1) to investigate the optimal condition to produce alkaline protease by alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 and (2) to study the effect of saturated ammonium sulfate concentration on partial purification of crude alkaline protease (CP), as well as study the compatibilities of CP and partially purified protease (PPP) with commercial detergents. Alkaline protease was produced by alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 and the optimal parameters, including carbon and nitrogen sources, the amount of potassium nitrate, pH, temperature and shaking speed were determined. CP was partial purified by precipitation with various concentrations of saturated ammonium sulfate. The optimal pH and temperature of PPP were investigated. Moreover, the compatibilities of the alkaline protease (CP and PPP) and commercial detergents at 50^0C for 90 min were determined.

The results showed that the most suitable medium for the alkaline protease production was a mixture of 0.5% soybean meal as carbon source and 0.5% KNO_3 as nitrogen source with initial pH 9.0. The most suitable condition to produce the highest yield of the alkaline protease was an incubation at 37^0C for 24 hr with the agitation at 200 rpm. With that condition, alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 produced the highest alkaline protease at 0.63 Unit/ml which was a 1.4-fold increase in protease activity. The most suitable concentration of saturated ammonium sulfate for partial purification of the CP was 40-60% with a 6.9-fold increase in protease purity. The optimal pH and temperature of PPP were pH 8.0 - 11.0 and 40 - 70^0C, respectively. The highest stability of PPP was at pH 8.0 and 10.0, 30^0C

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

and 50^{0}C for 1 hr. For the compatibility of the alkaline proteases and commercial detergents, PPP was active in Baby best, Baby mild and Essence detergents but it was not stable in St'Luke's and Fineline detergents. While CP was active in Baby best, Baby mild, Essence, St'Luke's and Fineline and it was highly stable in 1.0 - 5.0% Baby best, 3.0% Baby mild and 1.0% Essence detergents. Therefore, the crude alkaline protease from alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 could be a potential candidate as an additive in detergent formulations.

Keywords: Alkalotolerant *Bacillus* sp., Alkaline protease, Detergent, Partial protease purification.

หลักการและเหตุผล

อัลคาไลน์โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้มาจากแหล่งต่างๆ กัน พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยได้มีการนำเอนไซม์โปรตีเอสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายอย่าง ได้แก่ อุตสาหกรรมฟอกหนัง เคมี ทอผ้า อาหาร กระดาษ ยา บำบัดของเสีย สารซักล้าง เป็นต้น โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมสารซักล้าง จะมีการใช้อัลคาไลน์โปรตีเอสไปกำจัดพวกคราบโปรตีนที่ติดอยู่บนเนื้อผ้า เช่น น้ำนม เลือด และอาหาร เป็นต้น ปัจจัยที่พบในการทำงานของอัลคาไลน์โปรตีเอสในสารซักล้างมีหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ พีเอช ส่วนผสมของสารซักล้าง เป็นต้น ในส่วนของเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอสในสารซักล้างถือเป็นสิ่งที่สำคัญที่นำมาใช้ในการใช้เป็นส่วนผสมในสารซักล้าง พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ในปริมาณมากและสกัดได้ง่าย โดยเกือบครึ่งหนึ่งของการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ใช้ในทางการค้าจะได้มาจากสายพันธุ์ *Bacillus* ในประเทศไทยยังมีการผลิตหรือสกัดอัลคาไลน์โปรติเอสได้ในปริมาณที่น้อย ซึ่งส่วนใหญ่ทางโรงงานอตุสาหกรรมจะสั่งซื้อจากต่างประเทศ ทำให้ประเทศไทยเสียดุลทางการค้าได้ ในส่วนของการเลือกใช้วัตถุดิบเพื่อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้ ซึ่งแหล่งวัตถุดิบที่มีการพิจารณาใช้มักเป็นผลพลอยได้จากการแปรรูปผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมเกษตร เพราะมีราคาถูก และมีจำนวนมากตลอดเวลา ไม่มีข้อจำกัดทางฤดูกาล เช่น กากถั่วเหลืองจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันพืช ส่วนใหญ่จะใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์แต่ยังมีสารอาหารเหลืออยู่มาก โดยเฉพาะโปรตีนเหลือร้อยละ 38 (จิตมา แจ่มเมฆ และคณะ, 2540) ถ้าสามารถนำกากถั่วเหลืองมาใช้ในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจะก่อให้เกิดมูลค่าเพิ่มและการใช้ประโยชน์สูงสุด

จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุดเท่ากับ 0.44 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 9.0 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณผลผลิตที่ได้ยังไม่สูงมาก และพบว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสรวมมีเสถียรภาพต่อพีเอชและอุณหภูมิกว้าง สามารถทนต่อสารซักล้างทางการค้าหลายชนิดได้ดี (พิมล จำนงค์, 2546) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ให้ได้เพิ่มสูงขึ้น และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนและความสามารถในการอยู่ร่วมกันได้กับสารซักล้างทางการค้า ซึ่งผลของการศึกษาในครั้งนี้อาจนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้างได้ในภายหน้า

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ให้ได้เพิ่มสูงขึ้น

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนและความสามารถในการอยู่ร่วมกันได้กับสารซักล้างทางการค้า

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสภาวะและอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ให้ได้เพิ่มสูงขึ้น

2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนโปรตีเอสด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่เหมาะสมและทราบสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานที่มีเสถียรภาพต่อพีเอชและอุณหภูมิของอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12

3. ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่มีเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอสรวมและอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ต่อการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในสารซักล้าง

4. ได้ข้อมูลพื้นฐานในการนำอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ไปใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้าง

5. มีประโยชน์โดยตรงต่ออุตสาหกรรมอาหารที่สามารถนำเอาผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตมาใช้ประโยชน์ได้อย่างสูงสุด เช่น อุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันพืช

วิธีการวิจัย

ตอนที่ 1: การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. B12 ให้ได้เพิ่มสูงขึ้น

1. การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส

1.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยง alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ในสูตรอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่มีส่วนผสมของแหล่งคาร์บอนต่างกันคือ ร้อยละ 0.5 ของกลูโคส มอลโตส ฟรุคโตส แลคโตส ซูโครส และแป้งที่ละลายในน้ำ แล้วปรับพีเอชเป็น 9.0 ด้วย 10% Na_2CO_3 บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

1.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยง alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ในสูตรอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่มีส่วนผสมของแหล่งไนโตรเจนต่างกันคือ ร้อยละ 0.5 ของเคซีน เจลาติน ยีสต์สกัด เนื้อสกัด เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรท โปตัสเซียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท และยูเรีย นำไปบ่มและปั่นแยกเซลล์ตามสภาวะในข้อ 1.1 แล้วนำส่วนใสมาตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

1.3 การศึกษาปริมาณโปตัสเซียมไนเตรทที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยง alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ในสูตรอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่มีส่วนผสมของโปตัสเซียมไนเตรทต่างกันคือ ร้อยละ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ 5.0 นำไปบ่มและปั่นแยกเซลล์ตามสภาวะในข้อ 1.1 แล้วนำส่วนใสมาตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.1 การศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยง alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ในสูตรอาหารเหลวเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่มีส่วนผสมของโปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.5 ปรับพีเอชต่างกัน คือ 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 และ 12.0 ด้วย 10% Na_2CO_3 นำไปบ่มและปั่นแยกเซลล์ตามสภาวะในข้อ 1.1 แล้วนำส่วนใสมาตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยง alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ในสูตรอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่มีส่วนผสมของโปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.5 ปรับพีเอชเป็น 9.0 บ่มที่อุณหภูมิต่างกันคือ 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกเซลล์ตามสภาวะในข้อ 1.1 แล้วนำส่วนใสมาตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.3 การศึกษาความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยง alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ในสูตรอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่มีส่วนผสมของโปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.5 ปรับพีเอชเป็น 9.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วต่างกันคือ 100, 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที นำไปปั่นแยกเซลล์ตามสภาวะในข้อ 1.1 แล้วนำส่วนใสมาตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

ตอนที่ 2: การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนและความสามารถในการอยู่ร่วมกันได้กับสารซักล้างทางการค้า

1. การศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนอัลคาไลน์โปรตีเอส

นำน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่ผลิต alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในตอนที่ 1 มาปั่นแยกเซลล์ออก แล้วนำสารละลายส่วนใสดำเนินการทดลอง ดังนี้

ก. เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดลงในอัลคาไลน์โปรตีเอสรวม อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กวนอย่างต่อเนื่องจนอิ่มตัวมีความเข้มข้นร้อยละ 20 หลังจากนั้นกวนทิ้งไว้ค้างคืน นำไปปั่นแยกเก็บตะกอนที่เกิดขึ้น แล้วละลายตะกอนด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 หลังจากนั้นนำไปไดอะไลซีสใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 แล้วนำสารละลายเอนไซม์ไปวัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

ข. นำสารละลายส่วนใสจากข้อ ก. มาเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 40 แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 ก.

ค. นำสารละลายส่วนใสจากข้อ ข. มาเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 60 แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 ก.

ง. นำสารละลายส่วนใสจากข้อ ค. มาเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 80 แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 ก.

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานและเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วน

2.1 การศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

แช่อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้สับสเตรทเป็นเคซีนร้อยละ 0.5 ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่พีเอช 6.0-7.0 (sodium phosphate), 7.0-9.0 (Tris-HCl), 9.0-10.0 (sodium carbonate-bicarbonate) และ 10.0-12.0 (Na_2HPO_4/NaOH) ที่

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

แช่อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนในโซเดียมคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

3. การศึกษาความสามารถในการอยู่ร่วมกันได้ของอัลคาไลน์โปรตีเอสกับสารซักล้างทางการค้า

นำอัลคาไลน์โปรตีเอสรวมและอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนเติมลงในสารซักล้างชนิดน้ำความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (v/v) ได้แก่ เบบี้มายด์ เบบี้เบสท์ เอสเซนส์ เซนลุกซ์ และไฟน์ไลน์ แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

การตรวจวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Anson, 1938 โดยเติมอัลคาไลน์โปรตีเอส 0.25 มิลลิลิตร ลงในเคซีนร้อยละ 0.5 ที่ละลายในคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 จำนวน 1.25 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.4 โมลาร์ กรดไทรคลอโรอะซีติก จำนวน 1.25 มิลลิลิตร แล้วเขย่าผสมให้เข้ากัน นำไปแยกตะกอนโดยการปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที แล้วจึงนำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น

โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของอัลคาไลน์โปรตีเอส หมายถึงปริมาณอัลคาไลน์โปรตีเอสที่สามารถย่อยสลายเคซีนร้อยละ 0.5 ให้กลายเป็นไทโรซีน 1 ไมโครโมล ที่พีเอช 10.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 1 นาที

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

ตอนที่ 1: การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. B12 ให้ได้เพิ่มสูงขึ้น

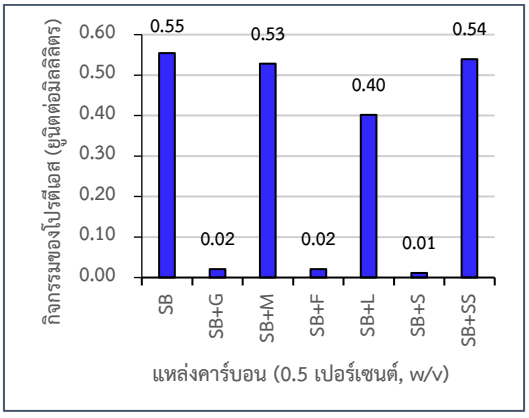
1. การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส

1.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. B12 ในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่เติมคาร์บอนชนิดต่างๆ แล้วปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 9.0 เพาะเลี้ยงไว้นาน 24 ชั่วโมง พบว่ากากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่ไม่เติมคาร์บอนเพิ่มเป็นแหล่งที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตโปรตีเอสเนื่องจากมีกิจกรรมของโปรตีเอสสูงสุด (0.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่เพาะเลี้ยงในกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่ผสมด้วยร้อยละ 0.5 ของแลคโตส มอลโทส และแป้งที่ละลายในน้ำ สามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงขึ้นมากกว่า 0.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่ผสมด้วยร้อยละ 0.5 ของกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ตามลำดับ พบว่าเชื้อผลิตโปรตีเอสออกมาได้น้อยมาก ดังแสดงในรูปที่ 1 อาจเป็นไปได้ว่าในการศึกษาในครั้งนี้ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ไปกดดันการสร้างอัลคาไลน์โปรตีเอส จึงทำให้มีการผลิตเอนไซม์ออกมาได้น้อยมาก ซึ่งจากรายงานของ Özçelik และคณะ (2014) พบว่าเชื้อ *Bacillus pumilus* D3 ผลิตโปรตีเอสได้น้อยที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในซูโครส Joo และคณะ (2002) พบว่าเชื้อ *Bacillus horikoshii* ผลิตโปรตีเอสลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโกสและแลคโตส Joo และคณะ (2004) พบว่า *Bacillus* sp. (*Perriserrula leucophryna*) ที่เลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสจะไปกดดันการสร้างโปรตีเอส ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้กากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเนื่องจากมีกิจกรรมของโปรตีเอสสูงสุด ซึ่งจากการศึกษาของ Patel และคณะ (2019) พบว่า *Bacillus subtilis* AU-2 strain ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มี

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

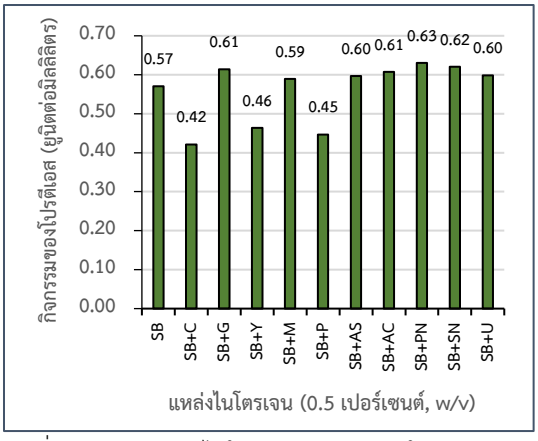
กากถั่วเหลือง โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และแคลเซียมคลอไรด์ ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง Joo และ Chang (2005), Joo และคณะ (2002), Banerjee และคณะ (1999) พบว่าเชื้อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของกากถั่วเหลืองร้อยละ 1.0 ถึง 1.5



รูปที่ 1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตโปรตีเอสของ *Bacillus* sp. B12 โดยที่ SB: ถั่วเหลืองบด, G: กลูโคส, M: มอลโทส, F: ฟรุกโตส, L: แลคโตส, S: ซูโครส และ SS: แป้งที่ละลายในน้ำ

1.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. B12 ในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่เติมไนโตรเจนชนิดต่างๆ แล้วปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 9.0 เพาะเลี้ยงไว้นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในกากถั่วเหลืองร้อยละ 0.5 ที่ผสมด้วยเนื้อสกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ เจลาติน โซเดียมไนเตรท และโปตัสเซียมไนเตรท ร้อยละ 0.5 ตามลำดับ จะเหลือกิจกรรมของโปรตีเอสมากกว่า 0.59 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 เพียงอย่างเดียว และพบว่ากากถั่วเหลืองที่ผสมด้วยโปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตโปรตีเอสเนื่องจากมีกิจกรรมของโปรตีเอสสูงสุด (0.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ส่วนกากถั่วเหลืองที่ผสมด้วยยีสต์สกัด เปปโตน และเคซีนร้อยละ 0.5 พบว่าผลิตโปรตีเอสได้น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในกากถั่วเหลืองร้อยละ 0.5 เพียงอย่างเดียว (น้อยกว่า 0.46 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ดังแสดงในรูปที่ 2 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้กากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่ผสมด้วยโปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.5 เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Joo และ Chang (2005) ที่พบว่า alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้น้อยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเคซีนและเปปโตน แต่จากรายงานการศึกษาของ Beg และ Gupta (2003), Joo และคณะ (2002) และ Ferrero และคณะ (1996) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus mojavensis,Bacillus horikoshii* และ *Bacillus licheniformis* MIR 29 โดยใช้เคซีนเป็นแหล่งไนโตรเจนจะช่วยส่งเสริมการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส

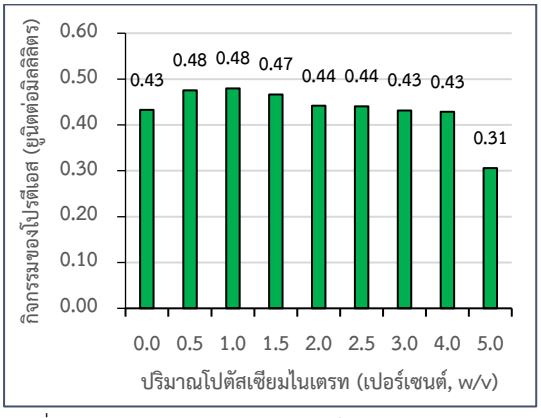


รูปที่ 2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตโปรตีเอสของ *Bacillus* sp. B12 โดยที่ SB: ถั่วเหลืองบด, C: เคซีน, G: เจลาติน, Y: ยีสต์สกัด, M: เนื้อสกัด, P: เปปโตน, AS: แอมโมเนียมซัลเฟต, AC: แอมโมเนียมคลอไรด์, PN: โปตัสเซียมไนเตรท, SN: โซเดียมไนเตรท

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

1.3 การศึกษาปริมาณโปตัสเซียมไนเตรทที่เหมาะสม

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. B12 ในกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่เติมโปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ 5.0 ปรับค่าพีเอชเป็น 9.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรทจนถึงร้อยละ 1.0 เชื้อสามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงสุดเท่ากับ 0.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเพิ่มปริมาณโปตัสเซียมไนเตรทสูงกว่าร้อยละ 1.0 พบว่าการผลิตโปรตีเอสลดลงตามลำดับ และพบว่าการเติมโปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.5 ให้ผลผลิตใกล้เคียงกับการเติมในอัตราส่วนร้อยละ 1.0 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้กากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่ผสมด้วยโปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.5 เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากมีกิจกรรมของโปรตีเอสสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งจากการศึกษาของ Oskouie และคณะ (2008) พบว่าเชื้อ *Bacillus clausii* สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในโปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.52 ซูโครสร้อยละ 0.11 และยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 ส่วนกฤษณา โพธิสารัตนะ (2535) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. B-2 ในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.1, กลูโคสร้อยละ 3.0 และกากถั่วเหลืองร้อยละ 3.0 สามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงสุด



รูปที่ 3 ผลของปริมาณโปตัสเซียมไนเตรทต่อการผลิตโปรตีเอสของ *Bacillus* sp. B12

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส

2.1 การศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. B12 ในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่ผสมด้วยโปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.5 ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 12.0 โดยใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 4.5 X 10^6 CFU/ml เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตโปรตีเอสได้ดีในช่วงค่าพีเอช 7.0 ถึง 10.0 โดยมีกิจกรรมของโปรตีเอสมากกว่า 0.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และที่พีเอช 9.0 มีกิจกรรมของโปรตีเอสสูงสุด (0.44 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และกิจกรรมจำเพาะสูงสุด และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 11.0 เชื้อไม่สามารถผลิตโปรตีเอสออกมาได้ ซึ่งการที่เชื้อ *Bacillus* sp. B12 ไม่สามารถเจริญและผลิตโปรตีเอสที่สภาวะเป็นด่างสูงแต่เจริญและผลิตโปรตีเอสได้ในด่างอ่อนเป็นการยืนยันให้เห็นว่าเชื้อชนิดนี้เป็นพวก alkalotolerant ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกปรับค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 9.0 เนื่องจากมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุด และไม่สิ้นเปลืองโซเดียมคาร์บอเนตเมื่อนำไปผลิตใช้ในระดับอุตสาหกรรม ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับการทบทวนเอกสารของ Sharma และคณะ (2019) ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในช่วงพีเอชระหว่าง 8.0 ถึง 10.0 แต่มีรายงานน้อยมากที่เชื้อสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ที่พีเอชเริ่มต้น 11.0 Gomaa พบว่า *Bacillus pumilus* ATCC 7061 ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส Asha และ Palaniswamy (2018) พบว่า *Bacillus cereus* FT1 ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงที่พีเอช 9.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

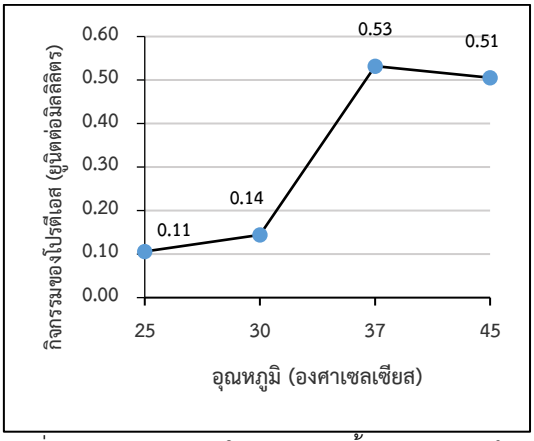
ตารางที่ 1 ผลของพีเอชต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus* sp. B12

พีเอช	กิจกรรมของโปรตีเอส (Unit/ml)	จำนวนเซลล์ (CFU/ml)	กิจกรรมจำเพาะ (Unit/CFUx10^{12})
7.0	0.40	6.80 x10^{10}	5.81
8.0	0.43	7.10 x10^{10}	6.09
9.0	0.44	7.00 x10^{10}	6.34
10.0	0.44	8.00 x10^{10}	5.50
11.0	0.00	5.00 x10^{6}	0.00
12.0	0.00	4.50 x10^{6}	0.00

หมายเหตุ: เป็นกิจกรรมและจำนวนเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง

2.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. B12 ในกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่ผสมด้วยโปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.5 ปรับพีเอชเป็น 9.0 ที่อุณหภูมิ 25.0, 30.0, 37.0 และ 45.0 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25.0 และ 30.0 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตโปรตีเอสออกมาได้น้อย (ประมาณ 0.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ขณะที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37.0 และ 45.0 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตโปรตีเอสได้สูง โดยที่อุณหภูมิ 37.0 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตโปรตีเอสได้สูงสุดเท่ากับ 0.53 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อาจเนื่องจากที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญได้ดีจึงผลิตโปรตีเอสได้สูง ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าการผลิตโปรตีเอสค่อยๆ ลดลง (0.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37.0 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีกิจกรรมของโปรตีเอสสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Verma และ Pandey (2019) พบว่า halophilic bacterium *Citricoccus* sp. สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส Joo และ Chang (2005) พบว่า alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส สุดารัตน์ ดุลสวัสดิ์ และสิรอร กิจธำรงวรกุล (2540) พบว่า *Bacillus* sp. B6 ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในกากถั่วเหลืองบด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



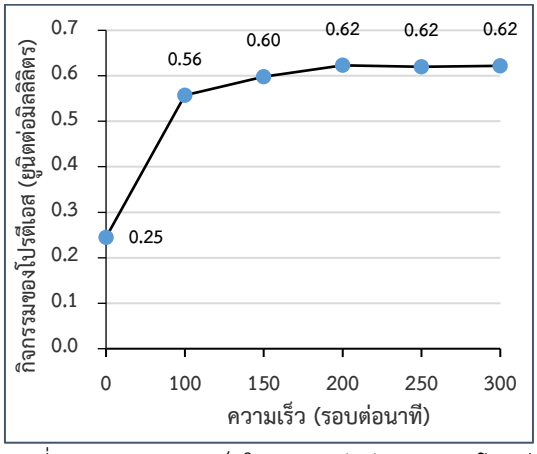
รูปที่ 4 ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตโปรตีเอสของ *Bacillus* sp. B12

2.3 การศึกษาความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสม

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. B12 ในกากถั่วเหลืองบดร้อยละ 0.5 ที่ผสมด้วยโปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.5 ปรับพีเอชเป็น 9.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 0, 100, 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วในการเขย่าอาหารจนถึง 200 รอบต่อนาที เชื้อสามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงขึ้นตามลำดับ โดยเมื่อเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เชื้อผลิตโปรตีเอสได้สูงสุดเท่ากับ 0.62 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 5 อาจเนื่องจาก *Bacillus* sp. B12 เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมทำให้เชื้อเจริญได้ง่ายจึงกระตุ้นการผลิตโปรตีเอสได้ดี ส่วนเมื่อเขย่าด้วยความเร็วมากกว่า 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อยังสามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงเท่ากับที่เขย่าด้วย

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อาจเนื่องจากมีออกซิเจนเหมาะสมที่เพียงพอต่อการเจริญเพื่อกระตุ้นการผลิตโปรตีเอสได้ดีแล้ว ในการทดลองต่อไปจึงเพาะเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เนื่องจากเริ่มมีกิจกรรมของโปรตีเอสสูงสุด ซึ่งจากการศึกษาของ Kumar (2002) รายงานว่า alkaliphilic *Bacillus pumilus* MK6-5 ผลิตอัลคาไลน์เซรีนโปรตีเอสชนิดทนต่อความร้อนได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอช 9.6 กวนด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที



รูปที่ 5 ผลของความเร็วในการเขย่าต่อการผลิตโปรตีเอสของ *Bacillus* sp. B12

ตอนที่ 2: การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนและความสามารถในการอยู่ร่วมกันได้กับสารซักล้างทางการค้า

1. การศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนอัลคาไลน์โปรตีเอส

เมื่อนำอัลคาไลน์โปรตีเอสรวมไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 0-20, 20-40, 40-60 และ 60-80 พบว่าสามารถตกตะกอนเอนไซม์โปรตีเอสออกมาได้ทุกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต โดยมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.64, 0.26, 0.97 และ 0.69 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 จะเห็นว่าเมื่อตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 40-60 มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุด (0.97 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และทำให้โปรตีเอสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.9 เท่า ในการทดลองต่อไปจึงเลือกตกตะกอนโปรตีเอสด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 40-60 ซึ่งจากรายงานของ Sathishkumar และคณะ (2015) พบว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* GA CAS8 สามารถตกตะกอนเมื่อใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 ทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.41 เท่า Moreira และคณะ (2003) พบว่าว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก *Nocardiopsis* sp. สามารถตกตะกอนเอนไซม์ออกมาได้ทุกความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยที่ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0-20 ทำให้โปรตีเอสมีความบริสุทธิ์เพิ่มสูงขึ้น 2.6 เท่า

ตารางที่ 2 ผลของการตกตะกอนโปรตีเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความอิ่มตัวต่างกัน

ความอิ่มตัว (เปอร์เซนต์)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรมของโปรตีเอสทั้งหมด (ยูนิต)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	ผลผลิตของกิจกรรม (เปอร์เซนต์)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
CP	3448.58	509.06	0.15	100.00	1.05
0-20	7.08	4.55	0.64	0.89	4.59
20-40	35.88	9.30	0.26	1.83	1.85
40-60	91.29	88.24	0.97	17.33	6.90
60-80	147.62	102.28	0.69	20.09	4.95

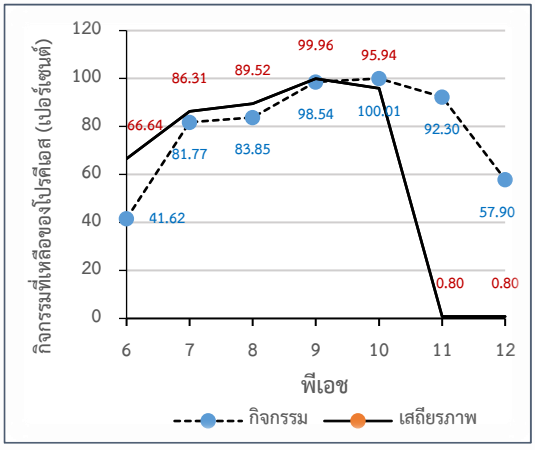
หมายเหตุ: CP หมายถึงอัลคาไลน์โปรตีเอสรวม

วารสาร Mahidol R2R e-Journal ปีที่ 8 ฉบับที่ 1 ประจำเดือนมกราคม-เมษายน 2564
Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานและเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วน

2.1 การศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

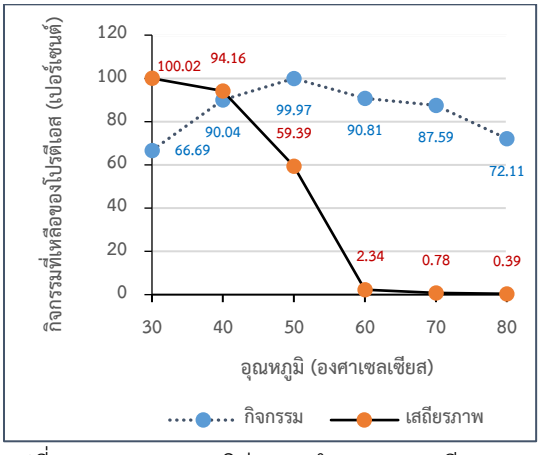
อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 7.0 ถึง 11.0 โดยในช่วงพีเอช 9.0 ถึง 11.0 เหลือกิจกรรมของโปรตีเอสมากกว่าร้อยละ 92 ในขณะที่มีเสถียรภาพต่อพีเอชได้ดีในช่วง 8.0 ถึง 10.0 โดยเหลือกิจกรรมของโปรตีเอสมากกว่าร้อยละ 90 ส่วนที่พีเอชสูงกว่า 11.0 เหลือกิจกรรมของโปรตีเอสน้อยมาก ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ผลของพีเอชต่อการทำงานและเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. B12 หลังจากแช่เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

2.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง 80 องศาเซลเซียส โดยในช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง 70 เหลือกิจกรรมของโปรตีเอสมากกว่าร้อยละ 87 ในขณะที่เอนไซม์มีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิในช่วง 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส โดยเหลือกิจกรรมของโปรตีเอสมากกว่าร้อยละ 60 และพบว่าโปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อชนิดนี้ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า 60 องศาเซลเซียสได้ ดังแสดงในรูปที่ 7 สำหรับสาเหตุที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ขณะที่เสถียรภาพที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสต่ำมากนั้นน่าจะมีสาเหตุมาจากในการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์นั้นอยู่ร่วมกับสับสเตรท ซึ่งสับสเตรทจะช่วยเพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์ (Ratanakhanokchai และคณะ, 1992) ส่วนในกรณีของการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ เอนไซม์อยู่ร่วมกับบัฟเฟอร์เท่านั้น จึงทำให้ทนต่ออุณหภูมิได้น้อยกว่า นอกจากนี้การตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ใช้เวลาเพียง 10 นาที เท่านั้น ส่วนการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ใช้เวลา 60 นาที



รูปที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและเสถียรภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. B12 หลังจากแช่เอนไซม์นาน 1 ชั่วโมง

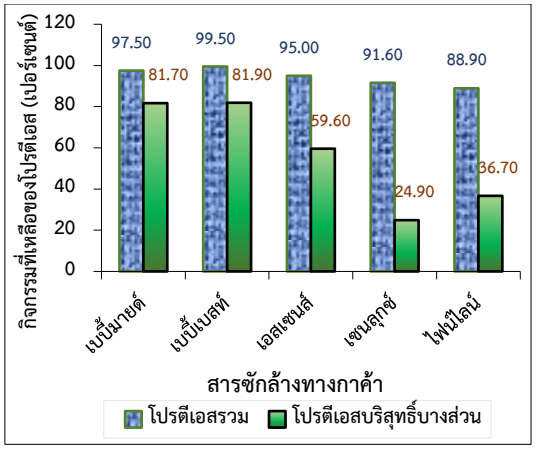
จากผลการทดลองในข้อ 2 แสดงให้เห็นว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. B12 สามารถทำงานได้ดีในช่วงกว้าง มีเสถียรภาพต่อพีเอชได้ดีในช่วง 8.0 ถึง 10.0 และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง และมีเสถียรภาพดีในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส ซึ่งจากรายงานของ Rekik และคณะ (2019) พบว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

Bacillus safensis strain RH12 สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิกว้าง และมีเสถียรภาพดีที่พีเอช 11.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส Lakshmi และคณะ (2018) พบว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* strain S8 ทำงานได้ดีที่พีเอช 10.0 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส Kumar และ Takagi (1999) พบว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่ทำงานได้ดีที่พีเอชอยู่ในช่วง 9.0 ถึง 11.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 50 ถึง 70 องศาเซลเซียส การที่อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. B12 มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานสูง ทำให้มีแนวโน้มที่น่าจะนำโปรตีเอสชนิดนี้มาใช้เป็นส่วนผสมของผงซักฟอก ซึ่งมักต้องทำงานที่สภาวะเป็นด่างประมาณ 8.0 ถึง 12.0 และอุณหภูมิน้อยกว่า 40 องศาเซลเซียส ภายในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

3. การศึกษาความสามารถในการอยู่ร่วมกันได้ของอัลคาไลน์โปรตีเอสกับสารซักล้างทางการค้า

ภายหลังจากเติมอัลคาไลน์โปรตีเอสรวมและอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. B12 ลงในสารซักล้าง 5 ชนิด คือ Baby best, Baby mild, Essence, St'Luke's และ Fineline แล้วตรวจสอบกิจกรรมที่เหลือของโปรตีเอส พบว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสรวมยังคงสามารถทำงานได้สูงในสารซักล้างทั้งหมด โดยเหลือกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 89 โดยเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดในสารซักล้างทางการค้าชนิด Baby best เหลือกิจกรรมร้อยละ 99.5 ในขณะที่อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนที่เติมลงในสารซักล้างชนิด Baby best, Baby mild และ Essence เหลือกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 60 ส่วนอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนที่เติมลงในสารซักล้างชนิด St'Luke's และ Fineline เหลือกิจกรรมร้อยละ 25 และ 37 ตามลำดับ ซึ่งการที่อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนทนต่อสารซักล้างได้น้อยชนิดกว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสรวมอาจมีสาเหตุมาจากอิทธิพลของส่วนประกอบที่ผสมอยู่ในสารซักล้างทั้งห้าชนิดนั้น หรือมีโปรตีเอสอื่นที่ร่วมกันทำงานในอัลคาไลน์โปรตีเอสรวมถูกแยกออกบางส่วนจึงทำให้เอนไซม์มีเสถียรภาพลดลง ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 ผลของสารซักล้างต่อเสถียรภาพของโปรตีเอสรวมและโปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วน หลังจากแช่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

สรุปผลการวิจัย

1. สภาวะที่เหมาะสมมากที่สุดต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ให้ได้เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของกากถั่วเหลืองร้อยละ 0.5 โปตัสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.5 ที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 9.0 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เชื้อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุดที่ 0.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้จะพบว่าเชื้อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้เพิ่มสูงขึ้นจากเดิม 1.4 เท่า

2. สภาวะที่เหมาะสมมากที่สุดในการทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอน CP ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ร้อยละ 40-60 จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.9 เท่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนอยู่ในช่วง

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

8.0 ถึง 11.0 และมีเสถียรภาพต่อพีเอชในช่วง 8.0 ถึง 10.0 นาน 1 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนอยู่ในช่วง 40 ถึง 70 องศาเซลเซียส และมีเสถียรภาพสูงในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ในขณะที่ความสามารถอยู่ร่วมกันได้ของอัลคาไลน์โปรตีเอสกับสารซักล้างทางการค้า พบว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนทำงานได้ดีในสารซักล้างทางการค้าชนิด Baby best, Baby mild, และ Essence ตามลำดับ แต่คงทนต่อสารซักล้างชนิด St'Luke's และ Fineline ได้น้อย ส่วนอัลคาไลน์โปรตีเอสรวมทำงานได้ดีในสารซักล้างทางการค้าทั้ง 5 ชนิดคือ Baby best, Baby mild, Essence, St'Luke's และ Fineline ตามลำดับ และมีเสถียรภาพดีต่อสารซักล้างชนิด Baby best ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ถึง 5.0 Baby mild ร้อยละ 3.0 และ Essence ร้อยละ 1.0 เมื่อแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที

ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

1. นำสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 ไปทดลองผลิตในระดับ Pilot plant เพื่อดูว่าเมื่อผลิตในระดับขนาดใหญ่ขึ้นเชื้อยังคงสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีเช่นเดิม

2. การทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์หลายขั้นตอนจะทำให้สูญเสียกิจกรรมของโปรตีเอส ควรปรับปรุงวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวเพื่อให้ได้ผลผลิตของโปรตีเอสสูงขึ้นหรือหาวิธีการอื่นในการทำให้โปรตีเอสบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น เช่น ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี เจลฟิลชัน เป็นต้น และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

3. อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวในช่วงร้อยละ 0-40 จะมีกิจกรรมของโปรตีเอสต่ำมาก ในขณะที่การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวในช่วงร้อยละ 60-80 จะมี impurity สูงมาก ดังนั้นอาจนำอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวในช่วงร้อยละ 40-70 มาศึกษาเพื่อทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสรวมมีประสิทธิภาพในการซักล้างเพิ่มขึ้น เช่น ผลของความเข้มข้นของสารซักล้าง ระยะเวลาและอุณหภูมิในการแช่เอนไซม์ลงในสารซักล้าง

5. อาจนำผลการวิจัยในครั้งนี้ไปเป็นส่วนหนึ่งในการปรับปรุงบทปฏิบัติการวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพของนักศึกษาระดับปริญญาตรีของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งผู้วิจัยเป็นผู้ช่วยสอนในรายวิชานี้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ของมหาวิทยาลัยมหิดล ที่ใช้สำหรับในการวิจัยในครั้งนี้ ขอชอบคุณ ดร.ธีรรัตน์ ลิขิตวัฒนเศรษฐ ที่กรุณาช่วยตรวจสอบความถูกต้องของบทคัดย่อภาษาอังอังกฤษ ขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ใช้สถานที่อุปกรณ์ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กฤษณา โพธิสารัตนะ. (2535). **การศึกษาสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. ชนิดทนต่อสภาวะด่าง.** (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย).

จิตธนา แจ่มเมฆ, สายสนม ประดิษฐดวง, ทะนง ภัครัชพันธุ์, ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์, เนื้อทอง วนานุวัธ, มาลัยวรรณ อารยะสกุล, ศิวาพร ศิวเวชช, สมจิตร

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

สุรพัฒน์, นภาศรี ไวศยะนันท์, สุคนธ์ชื่น ศรีงาม, อรอนงค์ นัยวิกุล, วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, โชคชัย ธีรกุลเกียรติ, อนุกูล วัฒนสุข, ธนะบูลย์ สัจจาอนันตกุล, วราภา มหากาญจนกุล, สิรี ชัยเสรี และปริศนา สุวรรณาภรณ์. (2540). **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิมล จำนงค์. (2546). **การทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. B12 บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติต่างๆ.** (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี).

สุดารัตน์ ดุลสวัสดิ์ และ สิรอร กิจจำรงวรกุล. (2540). **การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. ในดิน.** (รายงานวิจัยปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี).

Anson, M.L. (1938). **Estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin.** Journal of General Physic, 22, 79- 89.

Anwar, A. and Saleemuddin, M. (1998). **Alkaline proteases: A review.** Bioresource Technology, 64(3), 175-183.

Asha, B. and Palaniswamy, M. (2018). **Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil.** Journal of Applied Pharmaceutical Science 80(2), 119-127.

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(2), 294-304.

Ferero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D. and Sineriz, F. (1996). **Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR29: isolation, production and characterization.** Applied Microbiology and Biotechnology, 45(3), 327-332.

Gomaa, E, Z. (2013). **Optimization and characterization of alkaline protease and carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus pumillus* grown on *Ficus nitida* wastes.** Brazilian Journal of Microbiology, 44(2), 529-537.

Joo, H.S. and Chang, C.H. (2005). **Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: Optimization and some properties,** 40(3), 1263-1270.

Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G., Paik, S.R. and Chang, C.H. (2004**). Bleach-resistant alkaline protease produced by a *Bacillus* sp. isolated from the Korean polychaete, *Periserrula leucophryna*.** Process Biochemistry, 39(11), 1441-1447.

Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Kim, K.T., Paik, S.R. and Chang, C.S. (2002). **Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshi.*** Process Biochemistry, 38, 155-159.

Kumar, C.G. and Takagi, H. (1999). **Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint.** Biotechnology Advances, 17(7), 561-594.

Kumar, C.G. (2002). **Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from**

Received: February 6,2020, Revised: May 6,2020, Accepted: May 12,2020
http://doi.org/10.14456/jmu.....

alkalophilic *Bacillus pumilus*. Letters in Applied Microbiology, 34, 13-17.

Kumar, S., Ananthan, G. and Arun, J. (2015). **Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated Bacillus subtilis GA CAS8 using agricultural wastes**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 4, 214-220.

Lakshmi, B.K.M., Muni Kumar, D. and Hemalath, K.P.J. (2018). **Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8.** Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16(2), 295-304.

Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A. and Kumar A. (2019). **A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches.** Journal of Industrial Biotechnology, 15(2), 69-78.

Moreira, K.A., Porto, T.S., Teixeira, M.F.S., Porto, A.L.F. and Filho, J.L. (2003). **New alkaline protease from *Nocardiopsis* sp.: partial purification and characterization.** Process Biochemistry, 39(1), 67-72.

Oskouie, S.F.G., Yakhchali, F.T.B. and Eftekhar, F. (2008). **Respond surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*.** Biochemical Engineering, 39(1), 37-42.

Özçelik, B., Aytar, P., Gedikli, S., Yardımcı, E., Çalışkan, F., Çabu, A. (2014). **Production of an alkaline protease using *Bacillus pumilus* D3 without inactivation by SDS, its characterization and purification.** Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 29(3), 388-396.

Patel, A.R., Mokashe, N.U., Chaudhari, D.S., Jadhav, A.G. and Patil, U.K. (2019). **Production optimization and characterization of extracellular protease secreted by newly isolated *Bacillus subtilis* AU-2 strain obtained from *Tribolium castaneum* gut.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 19(101122), 1-9.

Ratanakhanokchai, K., Kaneko J., Kamio Y., and Izaki K. (1992). **Purification and properties of a maltotetrose- and maltotriose-producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*.** Applied and Environmental Microbiology, 58(8), 2490-2494.

Rekik, H., Jaouadi, N.Z., Gargourii, F., Bejar W., Frikar, F., Jmal, N., Bejar S. and Jaouadi, B. (2019). **Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strian RH12.** International Journal of Biological Macromolecules, 121, 1227-1239.

Singh, J., Batra, N. and Sobi, R.C. (2001). **Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1.** Process Biochemistry, 36(8-9), 781-785.