รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกและจำแนกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเพื่อประยุกต์ใช้ในการสกัดคอลลาเจนจากวัสดุเศษเหลือโรงงานแปรรูปอาหารทะเลที่เป็นหนังปลา

Screening and characterization of collagenase producing microorganism for application in collagen extraction from fish skin waste of seafood processing plant

โดย

ผศ.ดร.เบญจมาส เชียรศิลป์
และนางสาววริญดา สุภัทรประทีป

คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

เอนไซม์คอลลาจิเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยคอลลาเจนและเจลาตินได้ โดยทั่วไปเอนไซม์คอลลาจิเนสใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา ห้องปฏิบัติการ และทางการเกษตร ในงานวิจัยนี้ได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากอาหารหมักปลาและดินที่มีการปนเปื้อนของเศษเหลือจากปลา โดยคัดแยกบนอาหารแข็งที่เสริมเจลาตินซึ่งมีพีเอช 2 สภาวะคือ พีเอชที่เป็นกลาง (pH 7.5) และพีเอชที่เป็นกรด (pH 4.8) พบเชื้อที่สามารถย่อยเจลาตินได้ 83 โคโลนี ที่พีเอช 7.5 และ 62 โคโลนี ที่พีเอช 4.8 เมื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสในอาหารเหลว พบว่าเชื้อที่ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดที่พีเอช 7.5 และ 4.8 คือ เชื้อ *Bacillus cereus* CNA1 และ *Klebsiella pneumoniae* CNL3 ตามลำดับ จากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งสองเชื้อให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุด เมื่อเทียบกับกลูโคส ซูโครส และแลคโตส พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 คือพีเอช 7.5 และ 6.0 ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับทั้งสองเชื้อ คือ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และเจลาตินร้อยละ 1.0 น้ำหนักต่อปริมาตร เชื้อ CNA1 ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 20.99 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเชื้อ CNL3 ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 9.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมการทำงานสูงสุดที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวในช่วงพีเอช 6-8 และอุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน พบว่ามีกิจกรรมการทำงานสูงสุดที่พีเอช 6 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวในช่วงพีเอช 5-7 และอุณหภูมิต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 ที่แยกได้ในสภาวะที่เป็นกรด มีความคงตัวที่พีเอชต่ำได้ดีกว่าเอนไซม์จากเชื้อ CNA1 ที่แยกได้ในสภาวะที่เป็นกลาง ในการประยุกต์ใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสเพื่อสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอนซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล ผลการทดลองพบว่า การสกัดโดยใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และเชื้อ CNL3 ให้ผลผลิตคอลลาเจนร้อยละ 3.70 และ 2.26 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งให้ผลที่น้อยกว่าการสกัดด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่ให้ผลผลิตคอลลาเจนร้อยละ 36.5 อย่างไรก็ตาม การใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และเชื้อ CNL3 ร่วมกับการใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตคอลลาเจนทั้งหมดเป็นร้อยละ 54.56 และ 53.93 ตามลำดับ และจากการศึกษาขนาดของคอลลาเจนที่สกัดได้พบว่า คอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอน

ประกอบด้วยสาย α ที่ต่างกัน 2 สายคือ $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ และจำแนกได้เป็นชนิดที่ 1 ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งผลจากการสกัดด้วยกรดและเอนไซม์พบว่าขนาดของสายคอลลาเจนที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน

ABSTRACT

Collagenases are enzymes that can hydrolyze both native collagen and gelatin. Collagenases are generally used in food industry, pharmaceutical, laboratory work and agriculture. In this study, collagenase producing bacterium were isolated from fermented fish and fish waste contaminated soil. 83 and 62 colonies which could hydrolyze gelatin when grown on gelatin agar plate were isolated at neutral pH (pH 7.5) and acidic pH (pH 4.8), respectively. Two isolates that gave the highest collagenase activity in broth medium at pH 7.5 and 4.8 were *Bacillus cereus* CNA1 and *Klebsiella pneumoniae* CNL3, respectively. The culture conditions for collagenase production from both strains were optimized. Glycerol was the suitable carbon source for the highest collagenase production from both strains among glucose, sucrose and lactose determined. The optimal initial pH for collagenase production by CNA1 and CNL3 were observed at pH 7.5 and 6.0, respectively, and the optimum temperature was found at 37 °C for both strains. The maximum collagenase production by CNA1 (20.99 U/ml) and CNL3 (9.77 U/ml) were observed at the concentration of 0.5% (w/v) glycerol and 1.0% (w/v) gelatin. The maximum activity of partial purified collagenase from CNA1 were observed at pH 7 and 45 °C and its pH stability and thermal stability were in the range of 6-8 and below 40 °C, respectively. While the maximum activity of partial purified collagenase from CNL3 were observed at pH 6.0 and 40 °C and its pH stability and thermal stability were in the range of 5-7 and below 37 °C, respectively. It was found that collagenase from CNL3 which was isolated at acidic pH showed higher stability at low pH compared to that from CNA1 which was isolated at neutral pH. Collagenase from both strains was applied for collagen extraction from salmon skin, wastes from seafood processing plant. The results found that collagenases from CNA1 and CNL3 could extract collagen from salmon skin only 3.70 and 2.26% base on dry weight, respectively, which were much lower than treating with 0.5 M acetic acid (36.51%). However, the combination of each collagenase from CNA1 and CNL3 with 0.5 M acetic acid treatment could yield high collagen of 54.56 and 53.93%, respectively. Moreover, the study of collagen size showed that collagen from salmon fish skin consisted of two different α chains ($\alpha 1$ and $\alpha 2$), and was characterized as collagen type I with no disulfide bond. There was no difference in size of collagen extracted by acid and collagenase.

สารบัญ

หน้า

สารบัญ.. (5)

LIST OF TABLES.. (6)

LIST OF FIGURES.. (8)

บทที่

1 บทนำ.. 1

- บทนำต้นเรื่อง.. 1
- บทตรวจเอกสาร.. 3
- วัตถุประสงค์.. 24

2 วิธีการวิจัย.. 25

- วิธีดำเนินการ... 25
- วัสดุและอุปกรณ์... 34

3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง... 36

4 บทสรุปและ.. 65

เอกสารอ้างอิง.. 67

ภาคผนวก.. 72

ประวัติผู้เขียน.. 82

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน... 85

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Type of collagen..	5
2.	Amino acid composition of collagen (residues/ 1000 residues)...................	6
3.	Microbial growth and alkaline protease production from *B. licheniformis* MIR 29 with different sources..	14
4.	Effect of medium composition on growth of *Salinivibrio* genus 18AG and protease production..	15
5.	Morphology and partial biochemical test of gelatin hydrolysis isolates in liquid medium pH 7.5..	37
6.	Morphology and partial biochemical test of gelatin hydrolysis isolates in liquid medium pH 4.8..	38
7.	Total and yields of collagen by acid extraction and collagenase of CNA1 and CNL3 extraction..	62
8.	pH and temperature of sample for isolated bacteria..............................	80
9.	Growth and collagenase production from 8 isolates in liquid medium pH 7.5 incubated at 37 °C for 48 h..	80
10.	Growth and collagenase production from 13 isolates in liquid medium pH 4.8 incubated at 37 °C for 48 h..	81
11.	Effects of carbon sources on growth and collagenase production by CNA1 strain Samples were withdrawn after incubation for 48 h at 37°C................	81
12.	Effects of carbon sources on growth and collagenase production by CNL3 strain. Samples were withdrawn after incubation for 48 h at 37°C................	82
13.	Effects of initial pH on growth and collagenase production by CNA1 strain. Samples were withdrawn after incubation for 48 h at 37°C......................	82
14.	Effects of initial pH on growth and collagenase production by CNL3 strain. Samples were withdrawn after incubation for 48 hours at 37°C................	82
15.	Effects of incubation temperature on growth and collagenase production by CNA1 strain. Samples were withdrawn after incubation for 48 h................	83

LIST OF TABLES

Table **Page**

16. Effects of incubation temperature on growth and collagenase production by CNL3 strain. Samples were withdrawn after incubation for 48 h................ 83
17. Effect of glycerol concentration on growth and collagenase production from CNA1 incubated at 37 °C... 84
18. Effect of glycerol concentration on growth and collagenase production from CNL3 incubated at 37 °C... 85
19. Effect of gelatin concentration on growth and collagenase production from CNA1 incubated at 37 °C... 86
20. Effect of gelatin concentration on growth and collagenase production from CNL3 incubated at 37 °C... 88
21. Effect of pH on collagenase activity at 37 °C from CNA1 strain................ 89
22. Effect of pH on collagenase activity at 37 °C from CNL3 strain................ 89
23. Effect of temperature on collagenase activity from CNA1 strain at pH 7.0...... 90
24. Effect of temperature on collagenase activity from CNL3 strain at pH 6.0...... 90
25. Effect of pH on collagenase stability from CNA1 strain.......................... 90
26. Effect of pH on collagenase stability from CNL3 strain.......................... 91
27. Effect of temperature collagenase stability from CNA1 strain.................... 91
28. Effect of temperature collagenase stability from CNL3 strain at pH 6.0......... 92
29. Dry weight of fish skin... 92

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Schematic representation of the conformation of tropocollagen....................	4
2.	Build up of a collagen fiber (a) from tropocollagen (b) molecules................	4
3.	Effect of glucose concentration (0–2 %, w/v) on growth (●) and protease activity (▲)...	16
4.	Effect of different carbon sources on growth and protease production. The incubation was carried out at 30 °C for 48 h (A). Effect of glycerol concentration on growth and protease production (B)..............................	17
5.	Effect of gelatin concentration (0-2%, w/v) on growth (●) and protease activity (▲).	18
6.	Effect of pH on activity of collagenase for collagen hydrolysis..................	20
7.	Effect of pH on collagenolytic activity..	21
8.	Effect of temperature on activity (A) and stability of protease (B).................	22
9.	Clear zone of gelatin hydrolysis after addition of trichoroacetic acid............	37
10.	Growth and collagenase production from 6 isolates in liquid medium pH 7.5 incubated at 37 °C for 48 h..	41
11.	Growth and collagenase production from 8 isolates in liquid medium pH 4.8 incubated at 37 °C for 48 h..	41
12.	Effects of carbon sources on growth and collagenase production by CNA1 strain (a) and CNL3 strain (b). Samples were withdrawn after incubation for 48 h at 37°C..	43
13.	Effects of initial pH on growth and collagenase production by CNA1 strain (a) and CNL3 strain (b). Samples were withdrawn after incubation at 37°C for 48 h...	45
14.	Effects of incubation temperature on growth and collagenase production by CNA1 strain (a) and CNL3 strain (b).	47

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

15. Effect of glycerol concentration on growth (a) and collagenase production (b) from CNA1 incubated at 37 °C.. 49

16. Effect of glycerol concentration on growth (a) and collagenase production (b) from CNL3 incubated at 37 °C.. 50

17. Effect of gelatin concentration on growth (a) and collagenase production (b) from CNA1 incubated at 37 °C.. 52

18. Effect of gelatin concentration on growth (a) and collagenase production (b) from CNL3 incubated at 37 °C.. 53

19. Effect of pH on activity of collagenase from CNA1 strain (a) and CNL3 strain (b) at 37 °C.. 55

20. Effect of temperature on activity of collagenase from CNA1 strain (a) at pH 7.0 and CNL3 strain (b) at pH 6.0.. 57

21. Effect of pH on stability of collagenase from CNA1 strain (a) and CNL3 strain (b).. 59

22. Effect of temperature on stability of collagenase from CNA1 strain (a) at pH 7.0 and CNL3 strain (b) at pH 6.0.. 60

23. SDS PAGE pattern of collagen from salmon skin under reducing and non-reducing condition. Lane 1: high MW protein markers; lane 2: collagen type I; lane 3, 4 and 5: collagen from acid extraction, collagen from collagenase of CNA1 and collagen from collagenase of CNL3, respectively, under non-reducing condition; lane 6, 7 and 8: collagen from acid extraction, collagen from collagenase of CNA1 and collagen from collagenase of CNL3, respectively, under reducing condition.. 64

24. Standard curve glycines at 750 nm.. 77

25. Standard curve proteins at 750 nm... 79

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เอนไซม์คอลลาจีเนสสามารถย่อยสลายคอลลาเจนและคอลลาเจนที่เสียสภาพหรือเจลาตินได้ ซึ่งเอนไซม์คอลลาจิเนสไม่ได้ใช้ในทางเคมีหรืออุตสาหกรรมยาเพียงอย่างเดียวเท่านั้น แต่สามารถใช้ในทางอาหารและวิทยาศาสตร์ชีวภาพได้อีกด้วย (Tran and Nagano, 2002) คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อร่างกาย อยู่ใต้ชั้นหนังแท้เป็นตัวช่วยสร้างความตึงกระชับให้กับผิว ปัจจุบันนิยมนำคอลลาเจนมาประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวัน โดยใช้เป็นส่วนผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมความงาม ผสมในอาหารบำรุงสุขภาพ ยารักษาโรค เนื่องจากปัจจุบันคนเราหันมาสนใจสุขภาพร่างกายทั้งภายในและภายนอก โดยเฉพาะผู้หญิงจะให้ความสนใจต่อผิวพรรณภายนอก เมื่ออายุมากขึ้นจะเกิดความเหี่ยวย่นของผิวหนัง ผิวเกิดริ้วรอยหยาบกระด้าง ไม่ ยืดหยุ่น อันเนื่องมาจากโปรตีนในร่างกายถูกทำลาย ทำให้การสร้างคอลลาเจนในร่างกายลดลง ซึ่งคอลลาเจนสามารถสกัดได้จากเนื้อสัตว์ กระดูก หนังสัตว์ และเกล็ด ส่วนใหญ่นิยมสกัดคอลลาเจนจากหมูและวัว ซึ่งคอลลาเจนที่ได้ทนต่อความร้อนได้ดี แต่ด้วยปัญหาผลิตภัณฑ์จากหมูจะไม่ได้รับฮาลาลสำหรับผู้นับถือศาสนาอิสลาม ส่วนวัวจะมีปัญหาการเป็นโรคต่างๆ เช่นโรคแอนแทรกซ์ โรคปากเท้าเปื่อย โรคไข้สมองอักเสบ ซึ่งมีความกังวลว่าจะส่งผลต่อผู้บริโภคได้ (Zhang *et al.*, 2007) ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาการใช้วัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล เช่น หนัง กระดูก และเกล็ดปลา มาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัด ซึ่งนอกจากคอลลาเจนจากหนังปลาจะมีคุณลักษณะเหมือนกับคอลลาเจนจากหนังหมูแล้ว ยังเป็นการลดต้นทุนการผลิตคอลลาเจนและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่วัสดุเศษเหลืออีกด้วย คอลลาเจนสามารถสกัดได้หลายวิธี เช่น การใช้กรด (Nagai and Suzuki, 2000) และการใช้เอนไซม์คอลลาจิเนส (Nagai and Suzuki, 2000; Zhang *et al.*, 2006) ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาการสกัดคอลลาเจนโดยเอนไซม์ที่สกัดจากกระเพาะของสิ่งมีชีวิต (Jongjareonrak *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006) และพบว่าคุณลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดโดยเอนไซม์มีลักษณะพิเศษกว่าการสกัดโดยสารเคมี และได้ผลผลิตที่สูงกว่า (Zhang *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามการสกัดเอนไซม์จากกระเพาะของสิ่งมีชีวิตมีข้อจำกัดคือ ได้ปริมาณน้อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเลือกใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในการย่อยหนังปลาเพื่อสกัดคอลลาเจน เนื่องจากเอนไซม์จากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ในปริมาณที่สูง และไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายของคน อีกทั้งยังเป็นการลดปริมาณสารตกค้างจากการสกัดด้วยสารเคมีได้ และในการศึกษา

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา โดยส่วนใหญ่จะสกัดด้วยกรดเนื่องจากคอลลาเจนละลายได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด ดังนั้นเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ควรจะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดด้วย อย่างไรก็ตามจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนจากเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ จะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางหรือด่าง ในงานวิจัยนี้จึงคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในสภาวะที่เป็นกลางและเป็นกรด เพื่อให้ได้เอนไซม์คอลลาจิเนสที่มีกิจกรรมสูงทั้งในสภาวะที่เป็นกลางและเป็นกรด โดยงานวิจัยเริ่มจากคัดแยกจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากแหล่งดินที่มีการสะสมของวัสดุเศษเหลือประเภทโปรตีน และอาหารหมักปลาพื้นบ้าน โดยจะทำการคัดแยกภายใต้สภาวะที่เป็นกลางและเป็นกรดเพื่อให้ได้เชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสที่มีกิจกรรมต่างกัน จากนั้นจึงทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้ปริมาณสูง และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์คอลลาจิเนสและลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสจากจุลินทรีย์และเปรียบเทียบกับการใช้กรดสกัด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. วัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล

อุตสาหกรรมการแปรรูปอาหารทะเลกำลังเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญของประเทศ ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกสูงในปี 2548 ยังมีแนวโน้มสูงขึ้น และการนำเข้าอาหารทะเลเพื่อนำมาแปรรูป มีปริมาณสูงเช่นกัน ในปี 2548 มีการนำเข้าปลาแซลมอนปริมาณร้อยละ 10 ของปริมาณทั้งหมดของสินค้าที่นำเข้าและเป็นอันดับ 2 ของการนำเข้าจากประเทศชิลี (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2549) เพื่อนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ แล้วส่งออกผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแปรรูป ซึ่งจากกระบวนการผลิตมักมีวัสดุเศษเหลือเพิ่มสูงขึ้นตามมาด้วย วิธีการดั้งเดิมในการกำจัดวัสดุเศษเหลือทิ้งจากการแปรรูปอาหารทะเล คือการนำไปทิ้งทะเล ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนในด้านแรงงานและพลังงาน เมื่อมองถึงคุณค่าทางโภชนาการ พบว่าในวัสดุเศษเหลือเหล่านี้มีองค์ประกอบ เช่น โปรตีน ไขมัน ซึ่งการนำไปทิ้งเป็นการสูญเสียสิ่งที่นำมาใช้ประโยชน์ได้ ในการกระบวนการแปรรูปปลาแซลมอนมีวัสดุเศษเหลือประมาณร้อยละ 15 ของน้ำหนักเปียก (Arnesen and Gildberg, 2007) ซึ่งวัสดุเศษเหลือเหล่านี้ได้แก่ หนัง กระดูก เกล็ด ครีบ โดยหนังมีปริมาณมากที่สุด องค์ประกอบที่สำคัญในหนังปลาแซลมอนคือ คอลลาเจน ซึ่งในหนังปลาจะมีปริมาณของคอลลาเจนอยู่สูงประมาณร้อยละ 50-70 ของปริมาณวัตถุดิบ (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005) การสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดอะซิติก (acid-soluble collagen) และการใช้เอนไซม์เปปซิน (pepsin-soluble collagen) พบว่าสามารถสกัดคอลลาเจนได้เท่ากับร้อยละ 23.7 และ 70.5 ของคอลลาเจนทั้งหมด ตามลำดับ (Aidos *et al.*, 1999)

Arnesen และ Gildberg (2007) ศึกษาการสกัดเจลาตินจากหนังปลาแซลมอน โดยใช้กรดอะซิติก เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (acid-soluble collagen) ซึ่งให้ผลการสกัดเท่ากับร้อยละ 39.7 โดยน้ำหนักเปียกของหนังปลาแซลมอน โดยเมื่อเทียบกับหนังปลาคอดมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนเหมือนกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 แต่ปริมาณกรดอิมิโน (โพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน) ของหนังปลาแซลมอนมีปริมาณสูงกว่าปลาคอดร้อยละ 1.2 ทำให้อุณหภูมิเสียสภาพของเจลาตินจากหนังปลาแซลมอนสูงกว่าเจลาตินจากหนังปลาคอด

2. คอลลาเจน (Collagen) และเจลาติน (Gelatin)

2.1 โครงสร้างของคอลลาเจน

องค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ของสัตว์ คือ คอลลาเจน ซึ่งองค์ประกอบนี้เป็นส่วนสำคัญในการช่วยให้ความแข็งแรงแก่กล้ามเนื้อของสัตว์ คอลลาเจน

บางส่วนสามารถละลายได้ในสารละลายเกลือ บางส่วนละลายในสารละลายกรด บางส่วนไม่สามารถละลายได้ (Foegeding *et al.*, 1996) คอลลาเจนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีประมาณร้อยละ 20-25 ของโปรตีนทั้งหมด (Burghagen, 1999) คอลลาเจนมีขนาดโมเลกุล 300 กิโลดาลตัน โมเลกุลของคอลลาเจนเรียกว่า โทรโพคอลลาเจน (tropocollagen) มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกยาวประมาณ 2800 อังสตอม และเส้นผ่านศูนย์กลาง 14–15 อังสตอม ซึ่งประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 3 สาย มี 2 สายที่มีลักษณะเหมือนกัน ซึ่งสายโพลีเปปไทด์ 2 สายที่มีลักษณะที่เหมือนกันเป็นชนิดแอลฟา 1 และอีกหนึ่งสายเป็นชนิดแอลฟา 2 (Foegeding *et al.*, 1996) ทั้ง 3 สายพันกันเป็นเกลียว (triple helix) ดังแสดงใน Figure 1

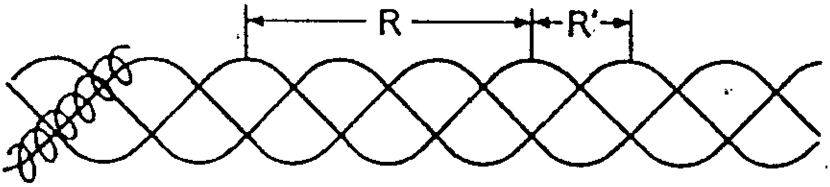

Figure 1. Schematic representation of the conformation of tropocollagen.
ที่มา : Burghagen (1999)

โมเลกุลของโทรโพคอลลาเจน จะเชื่อมต่อกันระหว่างหัวต่อปลาย (head-to-tail) ซึ่งจะต่อเหลื่อมกันทำให้เกิดเป็นลายขวางบนเส้นใยคอลลาเจน (Foegeding *et al.*, 1996) ดังแสดงใน Figure 2 ทำให้โครงสร้างคอลลาเจนมีลักษณะเป็นตาข่าย ซึ่งช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Burghagen, 1999)

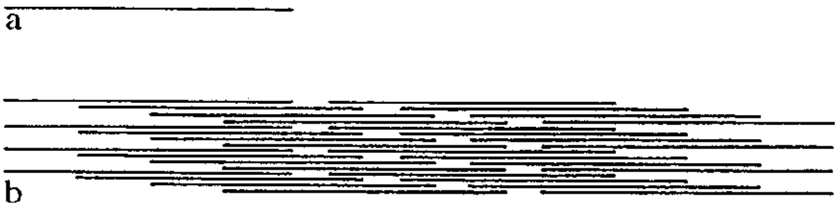

Figure 2. Build up of a collagen fiber (a) from tropocollagen (b) molecules.
ที่มา : Burghagen (1999)

ชนิดของคอลลาเจนจะมีความแตกต่างของเปปไทด์และองค์ประกอบของโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน และในชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันก็มีความแตกต่างเช่นกัน (Burghagen, 1999) ดังแสดงใน Table 1

กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบหลักในโมเลกุลของคอลลาเจนประกอบด้วย ไกลซีน โพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีน (Burghagen, 1999) ซึ่งไกลซีนจะมี 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด และกระจายอยู่ทุกๆ ตำแหน่งที่สามของสายโซ่เปปไทด์ ซึ่งจะต่อกันในลักษณะ –Gly-Pro-X- (-ไกลซีน-โพรลีน-X-) ซึ่ง X อาจจะเป็นไฮดรอกซีโพลีน หรือกรดอะมิโนตัวอื่นๆ (Suzuki *et al.*, 2006) ยกเว้นช่วงของกรดอะมิโน 14 ตัวแรกนับจากปลายไนโตรเจน และช่วงกรดอะมิโน 10 ตัวแรกนับจากปลายคาร์บอนจะไม่มีการจัดเรียงในลักษณะดังกล่าว ปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบของคอลลาเจนแสดงใน Table 2 พบว่าปริมาณของกรดอิมิโน ได้แก่ โพรลีนและไฮดรกซีโพรลีน ของปลามีปริมาณน้อยกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่น หมูและวัว ซึ่งมีผลต่อความเสถียรของสายคอลลาเจน (Foegeding *et al.*, 1996) เนื่องจากโครงสร้างที่เป็นวงของโพรลีน และการมีหมู่ไฮดรอกซีของไฮดรอกซีโพรลีนจะเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโพลีเปปไทด์ทำให้โครงสร้างมีความแข็งแรงมากขึ้น (Zhang *et al.*, 2007)

Table 1. Type of collagen.

Type	Peptide chains[a]	Molecular composition	Occurrence
I	α^1, α^2	$[\alpha^1(I)]_2\,\alpha^2(I)$	Skin, tendons, bones, muscle (epimysium)
II	α^1	$[\alpha^1(II)]_3$	Cartilage
III	α^1	$[\alpha^1(III)]_3$	Fetal skin, cardiovascular system, synovial membranes, inner organs, muscle (perimysium)
IV	α^1, α^2	$[\alpha^1(IV)]_3$(?)[b] (?)	Basal membrane, capsule of lens, glomeruli Placental membrane, lung, muscle (endomysium)
V	αA, αB, αC (?)	$[\alpha B]_2\,\alpha A$ or $(\alpha B)_3+(\alpha A)_3$ or $(\alpha C)_3$(?)	Placental membrane, cardiovascular system, lung, muscle (endomysium), secondary component of many tissues

[a] Since the α chains of various type of collagen differ, they are called α^1(I), α^1(II), αA etc.

[b] (?) Not completely elucidated

ที่มา : Burghagen (1999)

Table 2. Amino acid composition of collagen (residues/ 1000 residues).

Amino acid	Grass carp skin collagen	Pig skin collagen	Calf skin collagen	Bigeye snapper skin collagen	Cod skin*	Salmon skin*	Ocellate puffer collagen
Hyp	65	97	94	77	56	60	67
Asp	42	44	45	51	52	54	50
Thr	24	16	18	29	23	23	25
Ser	39	33	33	36	63	46	48
Glu	61	72	75	78	71	74	87
Pro	121	123	121	116	98	106	103
Gly	334	341	330	286	358	366	351
Ala	135	115	119	136	103	104	106
Cys	4	0	0	0	0	0	2
Val	31	22	21	22	17	15	17
Met	10	6	6	12	17	18	12
Ile	10	10	11	5	11	9	12
Leu	22	22	23	24	20	19	23
Tyr	2	1	3	4	5	3	4
Phe	17	12	3	15	12	13	10
Hyl	8	7	7	10	0	0	0
Lys	23	27	26	31	24	24	19
His	5	5	5	10	13	13	8
Arg	57	48	50	60	53	53	54
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Imino acid	186	220	215	193	166	166	170

ที่มา : Zhang และคณะ (2007), * Arnesen และ Gildberg (2007)

2.2 เจลาติน (Gelatin)

เจลาติน (gelatin) ได้มาจากการแปรรูปคอลลาเจน (collagen) ที่มีอยู่ในผิวหนัง กระดูก รวมทั้งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นิยมนำมาทำการผลิต โดยการใช้ความร้อนและใช้สารอื่นช่วย เช่น กรดหรือด่าง หรือการใช้เอนไซม์ ทำให้โครงสร้างคอลลาเจนถูกทำลายและเปลี่ยนแปลงเป็นเจลาติน ซึ่งเจลาตินสามารถละลายน้ำได้ ปัจจุบันมีการนำเจลาตินมาใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น เครื่องสำอาง ยา อาหาร และฟิล์มถ่ายรูป โดยเฉพาะทางด้านอุตสาหกรรมอาหารซึ่งเป็นตลาดที่ใหญ่ที่สุดของเจลาติน ตลาดที่ใหญ่รองลงมาคืออุตสาหกรรมการผลิตยาโดยใช้เจลาตินในการเคลือบเม็ดยาและผลิตเป็นแคปซูล ทั้งชนิดแคปซูลแข็งและแคปซูลนิ่ม (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005)

2.3 การสกัดคอลลาเจน

โดยทั่วไปคอลลาเจนสามารถสกัดจากหนังและกระดูกของหมูและวัว แต่ด้วยปัญหาผลิตภัณฑ์จากหมูจะไม่ได้รับฮาลาลสำหรับผู้นับถือศาสนาอิสลาม ส่วนวัวจะมีปัญหาการเป็นโรคต่างๆ เช่นโรคแอนแทรกซ์ โรคปากเท้าเปื่อย โรคไข้สมองอักเสบ ซึ่งมีความกังวลว่าจะส่งผลต่อผู้บริโภคได้ (Zhang *et al.*, 2007) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการสกัดคอลลาเจนจากวัสดุเศษเหลือจากปลา เช่น หนัง เกล็ด และกระดูกปลา (Nagai and Suzuki, 2000; Morimura *et al.*, 2002; Jongjareonrak *et al.*, 2005; Kittiphattanabawon *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006) ซึ่งวิธีการสกัดมีทั้งการใช้กรดและการใช้เอนไซม์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ พบว่าการสกัดโดยใช้กรดจะให้ผลผลิตต่ำกว่าการใช้เอนไซม์ (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005)

2.3.1 การสกัดโดยการใช้กรด

คอลลาเจนสามารถสกัดได้โดยการใช้กรด (acid-soluble collagen) จากรายงานของ Kittiphattanabawon และคณะ (2005) ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังและกระดูกของปลาตาหวานโดยการใช้กรดอะซิติก เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้ผลผลิตร้อยละ 10.94 และ 1.59 โดยน้ำหนักเปียก ตามลำดับ เมื่อนำไปหาขนาดโมเลกุลโดย SDS-PAGE พบว่ามีแถบ 2 แถบ คือ $\alpha1$ และ $\alpha2$ ซึ่งจำแนกได้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 งานวิจัยของ Hwang และคณะ (2007) ศึกษาการทำคอลลาเจนบริสุทธิ์ซึ่งสกัดมาจากหนังปลา โดยใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ได้ผลผลิตร้อยละ 8.9 โดยน้ำหนักเปียก เมื่อหาขนาดโมเลกุลโดย SDS-PAGE พบว่ามีแถบ 2 แถบ คือ $\alpha1$ และ $\alpha2$ ซึ่งจำแนกได้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 5 คอลลาเจนที่สกัดได้มีค่าอุณหภูมิที่คอลลาเจนเสียสภาพ (Temperature degeneration, T_d) เท่ากับ 28 องศาเซลเซียส และในงานวิจัยของ Liu และคณะ (2007) ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา channel catfish โดยการใช้กรดอะซิติก เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (acid-soluble collagen) ได้ผลผลิตร้อยละ 25.8 โดยน้ำหนักเปียก เมื่อนำไปหาขนาดโมเลกุลโดย SDS-PAGE

พบว่ามี 2 แถบ คือ α1 และ α2 ซึ่งจำแนกได้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 และมีปริมาณไกลซีน ไฮดรอกซีโพรลีน โพรลีน เท่ากับร้อยละ 23.99, 7.3 และ 9.79 ตามลำดับ ซึ่งเหมือนกับคอลลาเจนที่สกัดจากหมู และปริมาณองค์ประกอบของกรดอะมิโนใกล้เคียงกับของคอลลาเจนจากหมู คอลลาเจนที่สกัดได้มีค่าอุณหภูมิที่คอลลาเจนเสียสภาพ (T_d) เท่ากับ 32.5 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าคอลลาเจนจากหนังหมู

2.3.2 การสกัดโดยการใช้เอนไซม์

Morimura และคณะ (2002) ศึกษาการใช้เอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ ในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาและกระดูกของปลาข้างเหลือง พบว่าเอนไซม์โปรติเอส เค จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่พีเอช 7 จะให้อัตราการย่อยสลายร้อยละ 69.2 และในกระดูกมีปริมาณไกลซีน โพรลีน ไฮดรอกซีโพรลีน เท่ากับร้อยละ 27.2, 11.1 และ 6.5 ตามลำดับ แต่จะมีปริมาณต่ำกว่า คอลลาเจนจากหนังหมู ในงานวิจัยของ Jongjareonrak และคณะ (2005) ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังของปลาตาหวานโดยการใช้เอนไซม์เปปซิน (pepsin-soluble collagen) ได้ผลผลิตร้อยละ 4.7 โดยน้ำหนักเปียก เมื่อนำไปหาขนาดโมเลกุลโดย SDS-PAGE พบว่ามี 2 แถบคือ α1 และ α2 ซึ่งจำแนกได้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยประกอบด้วยโมเลกุลที่เกิด cross link มีขนาดเล็กกว่าการสกัดโดยใช้กรดและมีปริมาณไกลซีน ไฮดรอกซีโพรลีน โพรลีน เท่ากับ 235, 86 และ 135 ต่อปริมาณ 1000 ของกรดอะมิโนทั้งหมด ตามลำดับ ในงานวิจัยของ Liu และคณะ (2007) ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา channel catfish โดยการใช้เอนไซม์เปปซิน (pepsin-soluble collagen) ได้ผลผลิตร้อยละ 38.4 โดยน้ำหนักเปียก เมื่อนำไปหาขนาดโมเลกุลโดย SDS-PAGE พบว่ามี 2 แถบคือ α1 และ α2 ซึ่งจำแนกได้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 และมีปริมาณไกลซีน ไฮดรอกซีโพรลีน โพรลีน เท่ากับร้อยละ 23.33, 7.59 และ 10.13 ตามลำดับ ซึ่งเหมือนกับคอลลาเจนที่สกัดจากหนังหมู และในงานวิจัยของ Zhang และคณะ(2007) ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาคาร์พ โดยการใช้เอนไซม์เปปซิน(pepsin-soluble collagen) ได้ผลผลิตร้อยละ 46.6 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อนำไปหาขนาดโมเลกุลโดย SDS-PAGE พบว่ามี 2 แถบคือ α1 และ α2 และเปรียบเทียบกับคอลลาเจนจากหนังวัวพบว่ามีแถบเหมือนกัน แต่มีปริมาณของกรดอิมิโนต่ำกว่าคอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีผลให้ค่าอุณหภูมิที่คอลลาเจนเสียสภาพ (T_d) เท่ากับ 24.6 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าคอลลาเจนจากหมูเช่นกัน โครงสร้างของคอลลาเจนมีลักษณะมีรูพรุน เป็นตาข่ายเมื่อศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (SEM) ซึ่งมีลักษณะที่เหมือนกับคอลลาเจนจากหนังวัว

3. เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme)

เอนไซม์ย่อยโปรตีน (peptide hydrolase, EC. 3.4) หรือที่รู้จักกันในชื่อเรียกทั่วไปว่าเปปทิเดส (peptidase), โปรติเอส (protease), โปรติเนส (proteinase) และโปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ประเภทที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะต่างๆ ด้วยน้ำ (hydrolase หรือ hydrolytic enzyme) ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ โดยพิจารณาจากตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ที่เอนไซม์เข้าไปเร่งปฏิกิริยาการสลาย คือ

- เอนไซม์เปปทิเดส (peptidase, EC. 3.4.11-19) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการตัดพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนที่อยู่ตรงปลายของสายโพลีเปปไทด์ (exopeptidase) ซึ่งได้แก่ อะมิโนเปปทิเดส (aminopeptidase, EC. 3.4.11) ไดเปปทิเดส (dipeptidase, EC. 3.4.13, 15) และคาร์บอกซีเปปทิเดส (carboxypeptidase, EC. 3.4.16-17)
- เอนไซม์โปรติเนส (proteinase, EC. 3.4.21-24) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการตัดพันธะภายใน(endopeptidase) ของสายโพลีเปปไทด์ แบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ตามชนิดของกรดอะมิโนสำคัญที่อยู่ตรงบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ ซึ่งใช้ในการจับกับอะตอมคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group –C=O) ตรงบริเวณพันธะเปปไทด์ของสับสเตรท ได้แก่ ซีรีนโปรติเนส (serine proteinase, EC. 3.4.21), ซีสเตอีนโปรติเนส (cysteine proteinase, EC. 3.4.22) แอซิดโปรติเนส (acid proteinase, EC. 3.4.23) และเมทาลโลโปรติเนส (metalloproteinase, EC. 3.4.24) (Ward, 1983 อ้างโดย อนงนาฏ ไพนุพงศ์, 2541)

เปปไทด์ไฮโดรเลสที่มีความสำคัญในทางการค้า จัดเป็นโปรติเนสมากกว่าเปปทิเดส ได้แก่ ซีรีนโปรติเนส ซึ่งสามารถผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* spp. ที่คัดแยกจากดิน โดยใช้คอลลาเจนและเจลาตินเป็นแหล่งอาหาร จากการศึกษาการคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากดินที่มีความเค็ม ในสภาวะที่เป็นด่าง พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่เป็น *Bacillus* sp. (Nakayama *et al.*, 2000), *Bacillus subtilis* (Tran and Nagano, 2002), *Bacillus mojavensis* (Beg and Gupta, 2003), *Bacillus* sp. (Patel *et al.*, 2005) และ *Bacillus cereus* (Nilegaonkar *et al.*, 2007)

3.1 เอนไซม์โปรติเนส (proteinase, EC. 3.4.21-24)

เอนไซม์โปรติเนสจากจุลินทรีย์มักเป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกสู่นอกเซลล์ ทั้งนี้เพื่อใช้ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมภายนอก ให้ได้เป็นกรดอะมิโนสำหรับดูดซึมเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการเติบโต ซึ่งเอนไซม์โปรติเนสแบ่งตามกลไกการทำงานได้เป็น

3.1.1 ซีรีนโปรติเนส (serine proteinase)

เป็นกลุ่มของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากจุลินทรีย์ที่มีผู้ศึกษากันมาก เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชเป็นกลางถึงด่าง มีหมู่อิมิดาโซลตรงบริเวณเร่ง ซึ่งจะถูกยับยั้งโดย

DPF (diisopropyl-phospho-fluoridate) ที่ทำปฏิกิริยากับหมู่ –OH ของอนุมูลซีริล (seryl residue) ที่บริเวณเร่ง

เอนไซม์ซีรีนโปรติเนสจากจุลินทรีย์ สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อยคือ

1) ซีรีนโปรติเนสที่คล้ายกับทริปซิน เอนไซม์กลุ่มนี้ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช ประมาณ 8 และยังมีความจำเพาะต่อการย่อยพันธะเปปไทด์ ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็นเบส คือ อาร์จินีน (arginie, Arg), ไลซีน (lysine, Lys)

2) ซีรีนโปรติเนสที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่าง เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชประมาณ 10 มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นกรดอะมิโนซึ่งมีหมู่แทนที่เป็นวงแหวน เช่น ไทโรซีน (tyrosine, Tyr) และฟีนิลอะลานีน (phenylalanine, Phe) ตลอดจนกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น ลิวซีน (leucine, Leu) โดยเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ซีรีนอัลคาไลน์โปรติเอส ได้แก่ *Bacillus mojavensis* ซึ่งคัดแยกเชื้อจากดิน (Beg and Gupta (2003), *Bacillus* sp. คัดแยกจากดินที่มีความเค็ม (Patel *et al.*, 2005) และ *Bacillus proteolyticus* คัดแยกจากของเสียของกระบวนการแปรรูปปลา (Bhaskar *et al.*, 2007)

3) ซีรีนโปรติเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม *Myxobacterium* (Myxobacter α-lytic proteinase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่มีผลทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยทั่วไปมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนอะลานีน (alanine, Ala) และวาลีน (valine, Val) เอนไซม์จะถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย DPF

4) ซีรีนโปรติเนสที่ผลิตจาก *Staphylococcus* spp. (Staphylococcal proteinase) เอนไซม์ชนิดนี้ผลิตโดยเชื้อ *Staphylococcus aureus* V8 มีความไวต่อสาร DPF มีความจำเพาะต่อการตัดพันธะเปปไทด์ตรงบริเวณกรดอะมิโนแอสพาร์ติก (aspartic acid, Asp) หรือกลูตามิก (glutamic acid, Glu) (Ward, 1983 อ้างโดย อนงนาฏ ไพนุพงศ์, 2541)

3.1.2 ซีสเตอีนโปรติเนส

เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหมู่ sulfhydryl อยู่ตรงบริเวณเร่ง ส่วนใหญ่สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชเป็นกลาง คือ 6-7.5 และมีความคงทนต่ออุณหภูมิในช่วง 60-80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งโดยสารที่เรียกว่า sulfhydryl reagents หรือ sulfhydryl group (-SH) หรือกลุ่มไทออล (-SH) ทำให้หมู่ซัลไฟริลที่บริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือน

3.1.3 แอซิดโปรติเนส

แอซิดโปรติเอส หมายถึง โปรติเอสที่มีช่วงพีเอชของการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายอยู่ในช่วงพีเอชของกรด เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ส่วนใหญ่ในราและยีสต์ แต่พบน้อยมากใน

แบคทีเรีย มีความสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 2-4 เอนไซม์มีความจำเพาะกับกรดอะมิโนที่มีหมู่แทนที่เป็นวงแหวน และกรดอะมิโนที่มีขนาดใหญ่ เช่น ไทโรซีนและฟีนิลอะลานีน

3.1.4 เมทาลโลโปรติเนส

เป็นเอนโดเปปทิเดสที่มีอิออนของโลหะเป็นส่วนประกอบในบริเวณเร่งหรือในปฏิกิริยาการย่อยสลายกล่าวคือ อยู่ในลักษณะโคแฟคเตอร์ ซึ่งโลหะส่วนใหญ่ได้แก่ Zn^{2+} ซึ่งทำหน้าที่สำคัญคือจับกับสับสเตรท ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้จึงถูกยับยั้งการทำงานด้วย EDTA เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีช่วงปฏิกิริยาที่พีเอชเป็นกลาง (พีเอช 6.5-7.5)

3.2 เอนไซม์คอลลาจิเนส

เอนไซม์คอลลาจิเนส เป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์โปรติเนสที่สามารถย่อยสลาย native collagen ได้ (Tran and Nagano, 2002) เอนไซม์คอลลาจิเนสที่รู้จักในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ เปปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) หรือจากพืช คือ ปาเปน (papain) (Harrington, 1996) เอนไซม์คอลลาจิเนสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Clostridium histolyticum* (Matsushita *et al.*, 1999), *Bacillus subtilis* (Nagano and To, 1999), *Bacillus* sp. (Nakayama *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2001) จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถคัดแยกได้จากดิน อาหารที่มีการหมักปลา เช่น น้ำปลา (Nagano and To, 1999; Tran and Nagano, 2002) โดยทั่วไปเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ย่อยคอลลาเจนจะต้องมี Zn^{2+} เป็นโคเฟคเตอร์ตรงบริเวณเร่ง ซึ่งจัดเป็นเมทาลโลโปรติเนส (Tsuruoka *et al.*, 2003) บางชนิดจัดเป็นซีรีนโปรติเนสและโปรติเอสอื่นๆ รองลงมา (Watanabe, 2004) เอนไซม์คอลลาจิเนสชนิดเมทาลโลโปรติเนสย่อยสลายสายคอลลาเจนตรงพันธะเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนชนิดอื่น กับ ไกลซีน-โพรลีน (Watanabe, 2004)

Kawahara และคณะ (1993) ศึกษาการคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดิน โดยใช้คอลลาเจนเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เมื่อบ่งชี้สายพันธุ์จุลินทรีย์พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus alvei* DC-1 และเมื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์คอลลาจิเนสโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 และศึกษาสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนส พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 4.5 6.0 และ 7.0 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าเชื้อสายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสชนิดใหม่ที่มีกิจกรรมที่พีเอชเป็นกรด ในงานวิจัยของ Nagano และ To (1999) ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* FS-2 ที่คัดแยกได้จากการหมักน้ำปลาแบบดั้งเดิม ในอาหารที่มีการเสริมเจลาติน พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าขนาดโมเลกุลของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากการศึกษาด้วย SDS-PAGE เท่ากับ 125 กิโลดาลตัน เอนไซม์มีความเสถียรต่อพีเอชในช่วง 5-10 และเอนไซม์คอลลาจิเนสจะถูกยับยั้งด้วย 2-β-mercaptoethanol และ diisopropyl-phospho-fluoridate (DPF) สามารถจัดเอนไซม์

คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* FS-2 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรติเนส ในการศึกษาของ Lund และ Granum (1999) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยคอลลาเจนจากเชื้อ *Bacillus cereus* ในอาหาร CGY medium เลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เอนไซม์คอลลาจิเนสที่มีขนาดโมเลกุลจากการศึกษาด้วย SDS-PAGE เท่ากับ 105 กิโลดาลตัน เอนไซม์คอลลาจิเนสจะถูกยับยั้งด้วย EDTA และ 1,10-phenanthroline และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $ZnCl_2$ จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ทำให้สามารถจัดเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus cereus* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเมทาลโลโปรติเนส นอกจากนี้ Nakayama และคณะ (2000) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสทนอุณหภูมิสูงและทนกรดจากเชื้อ *Bacillus* sp. strain NTAP-1 โดยมีเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 3.9 และไม่ถูกยับยั้งโดย EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และเอนไซม์คอลลาจิเนสมีกิจกรรมเหลืออยู่ร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากงานของ Okamoto และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยคอลลาเจนจากเชื้อ *Bacillus* sp. MO-1 ในอาหารที่มีการเติมคอลลาเจนลงไป พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.2 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ได้มีขนาดโมเลกุลจากการศึกษาด้วย SDS-PAGE เท่ากับ 105 กิโลดาลตัน ตำแหน่งเฉพาะที่เอนไซม์ตัดพันธะเปปไทด์ คือ ลิวซีน ไทโรซีน ฮิสทิดีน อะลานีน และไลซีน เอนไซม์คอลลาจิเนสจะถูกยับยั้งด้วย DPF และ phenylmethylsulfonylfluoride ทำให้สามารถจัดเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus* sp. MO-1 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรติเนส ในการศึกษาของ Tsuruoka และคณะ (2003) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสที่ย่อยสลายคอลลาเจน จากเชื้อ *Alicyclobacillus sendaiensis* NTAP-1 ในอาหารเดกโตรส มีพีเอชเท่ากับ 4.8 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์คอลลาจิเนสที่ได้มีขนาดโมเลกุลจากการศึกษาด้วย SDS-PAGE เท่ากับ 40 กิโลดาลตัน เอนไซม์มีความเสถียรต่อพีเอชในช่วง 3.5-5.0 เอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วย EDTA, 2-β-mercaptoethanol และ phenylmethylsulfonylfluoride ทำให้สามารถจัด เป็นเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรติเนส นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Kanayama และ Sakai (2005) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสชนิดใหม่จากเชื้อ *Microbacterium liquefaciens* ซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเจลาติน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเอนไซม์โปรติเอสมีขนาดโมเลกุล 21 กิโลดาลตัน สามารถย่อยเจลาตินที่มีขนาด 100 กิโลดาลตัน ได้เป็นขนาด 60 และ 40 กิโลดาลตัน แต่ไม่สามารถย่อยสายคอลลาเจนได้

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

การเลี้ยงเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสให้มีการเติบโตของเชื้อสูงและมีการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสปริมาณสูง ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่นเดียวกับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทั่วๆไป ดังนี้

4.1 แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสม

คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่แหล่งคาร์บอนจะเป็นคาร์โบไฮเดรต เช่น แป้ง กลูโคส ซูโครส อะราบิโนส เป็นต้น โดย Ferrero และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* MIR 29 โดยเลี้ยงเชื้อที่สภาวะ 45 องศาเซลเซียส และพีเอชเท่ากับ 7.5 และเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ ซูโครส กาแลคโตส ราฟฟิโนส ไซโลส แป้ง เมลิไบโอส แลคโตส กลีเซอรอล กลูโคส อินนูลิน มอลโตส และเคซีน พบว่า การเติบโตของเชื้อ *B. licheniformis* MIR 29 ในอาหารที่มีเคซีนจะให้การเติบโตของเชื้อสูงสุด และรองลงมาในอาหารที่มีน้ำตาลเมลิไบโอสและแป้ง สำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าเคซีนให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 71.5 เอพียูต่อมิลลิลิตร และน้ำตาลกลูโคสกับกลีเซอรอลให้การผลิตสูงรองลงมาเท่ากับ 16.2 และ 17.7 เอพียูต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 3

Lama และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Salinivibrio* genus ซึ่งคัดแยกจากน้ำทะเล ในอาหาร saline solution yeast extract (SSY medium) มีพีเอชเท่ากับ 9 และศึกษาความแตกต่างของแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส มอลโตส ซูโครส กาแลคโตส ฟรุคโตส อะซิเตท แมนโนส แลคโตส กลีเซอรอล โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่า แมนโนส กลูโคส และซูโครส ให้การเติบโตของเชื้อสูงสุดเมื่อวัดการเติบโตที่ 540 นาโนเมตร แต่การผลิตเอนไซม์โปรติเอสพบว่า กลีเซอรอล แลคโตส และ อะซิเตตให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูง ดังแสดงใน Table 4

Table 3. Microbial growth and alkaline protease production from *B. licheniformis* MIR 29 with different sources.

Carbon source	Biomass (A_{560})	Enzyme production (APU/ml)
Sucrose	0.95	0.00
D-(+)-Galactose	2.65	4.16
Ramnose	2.85	5.73
D-(+)-Xylose	2.55	0.00
Starch	3.14	12.3
D-(+)-Melibiose	3.20	5.97
Lactose	1.80	6.33
Glycerol	1.28	17.7
Glucose	2.15	16.2
Inulin	0.72	8.39
Maltose	1.55	0.00
Casein	3.78	71.5

ที่มา : Ferrero และคณะ (1996)

Patel และคณะ (2005) ศึกษาผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้กลูโคสในช่วงร้อยละ 0.5-2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีค่าพีเอชเท่ากับ 10 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคสร้อยละ 0.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้การเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. สูงสุด และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด (Figure 3)

Table 4. Effect of medium composition on growth of *Salinivibrio* genus 18AG and protease production.

Nutrient	Cell growth (OD_{540})	Protease units	Protease production (U/OD_{540})
SSY medium pH 9.0	1.9	15	7.9
SSY medium pH 7.5	1.5	8	5.3
SSY medium + gelatin (10%)	2.0	16	8.0
gelatin (10%)	2.1	67	32.0
Glucose	2.0	2.5	1.25
Maltose	1.8	5.7	3.2
Sucrose	2.0	3.5	1.75
Galactose	1.9	0.8	0.4
Fructose	2.0	0.9	0.45
Acetate	0.8	7.0	8.7
Mannose	2.1	4.0	1.9
Lactose	1.4	11.5	8.2
Threalose	2.0	7.5	3.75
Glycerol	1.7	19.0	11.0

ที่มา : Lama และคณะ (2005)

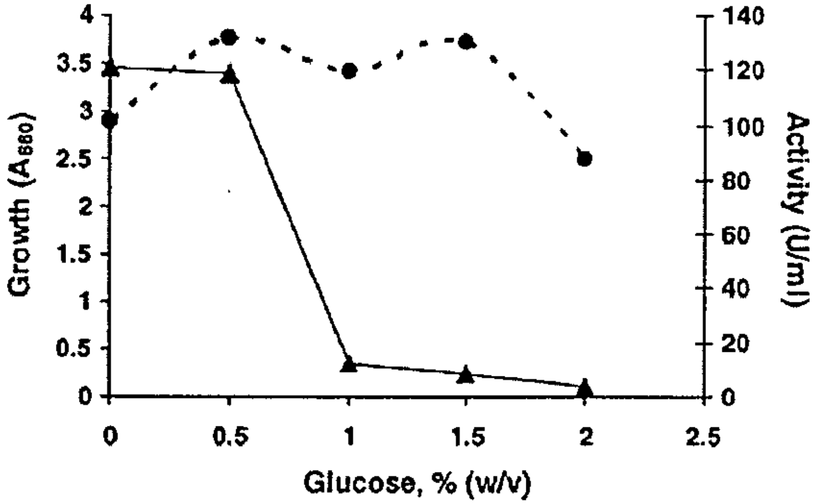

Figure 3. Effect of glucose concentration (0–2 %, w/v) on growth (●) and protease activity (▲). Samples were withdrawn after incubation for 66 h at 37 °C.

ที่มา : Patel และคณะ (2005)

Gupta และ Khare (2007) ศึกษาผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PseA ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีเอช 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยศึกษาความแตกต่างของแหล่งคาร์บอน คือ กลีเซอรอล กลูโคส คาร์บอกซีเมตทิว-เซลลูโลส (CM-cellulose) ซูโครส มอลโตส และ ฟรุคโตส เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงใน Figure 4A พบว่าเชื้อสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ยกเว้นกลูโคสซึ่งมีผลต่อการยับยั้งกลไก catabolic repression ของการสังเคราะห์เอนไซม์ ส่วนคาร์บอกซีเมตทิว-เซลลูโลส (CM-cellulose) มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด รองลงมาคือ กลีเซอรอล ซูโครส มอลโตส และ ฟรุคโตส แต่เนื่องจากคาร์บอกซีเมตทิว-เซลลูโลส (CM-cellulose) มีราคาสูง ผู้วิจัยจึงศึกษาความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสม และพบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.7 ให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด (Figure 4B)

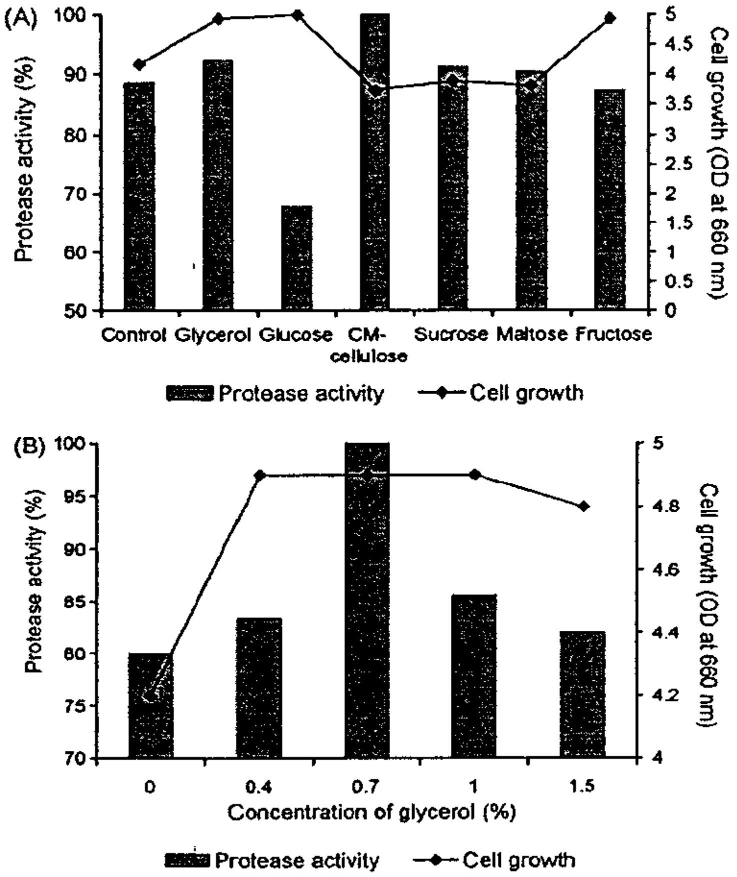

Figure 4. Effect of different carbon sources on growth and protease production. The incubation was carried out at 30 °C for 48 h (A). Effect of glycerol concentration on growth and protease production (B).

ที่มา : Gupta และ Khare (2007)

4.2 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์มีทั้งสารอินทรีย์ที่เป็นสารผสมเชิงซ้อน เช่น ยีสต์สกัด เปปโตน ทริปโตน และสารที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน.เช่น โปรตีนต่างๆ และแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น เกลือแอมโมเนียม และเกลือไนเตรท แต่การผลิตเอนไซม์โปรติเอสนิยมใช้โปรตีนชนิดต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสจะถูกสร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์ของสายโพลีเปปไทด์ในโปรตีน

Lama และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Salinivibrio* genus ที่คัดแยกจากน้ำทะเล ในอาหาร saline solution yeast extract (SSY medium) ที่มีพีเอชเท่ากับ 9 และศึกษาการเติมเจลาตินใน SSY medium ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 12 (กรัมต่อลิตร)

เปรียบเทียบกับที่ไม่เติมเจลาติน พบว่าการเติบโตของเชื้อเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเจลาตินเพิ่มขึ้น พบว่าเมื่อเติมเจลาตินร้อยละ 10 และ 12 (กรัมต่อลิตร) สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงกว่าอาหารที่ไม่เติมเจลาติน ในการศึกษาของ Patel และคณะ (2005) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. ได้แก่ โซยาเปปโตน ทริปโตน เคซิไอโตน เจลาติน กรดคาซามิโน เปปโตน และยีสต์สกัด พบว่าเจลาตินให้การเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุด และเมื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในช่วงร้อยละ 0-2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าที่ความเข้มข้นของเจลาตินร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้การเติบโตสูงสุด และค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเจลาตินเพิ่มขึ้นดังแสดงใน Figure 5

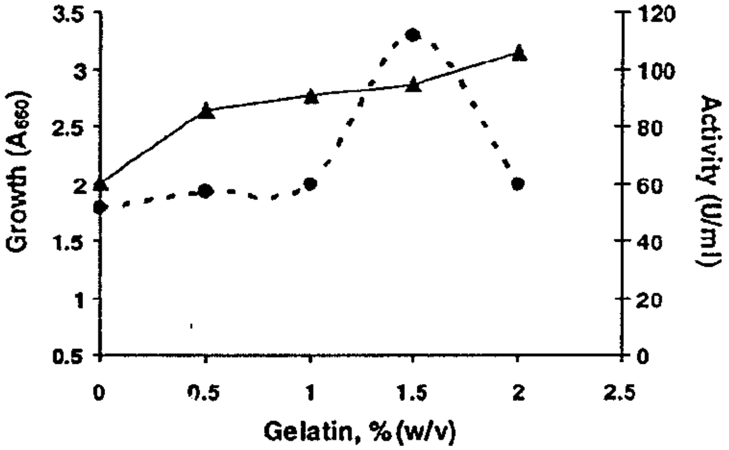

Figure 5. Effect of gelatin concentration (0-2%, w/v) on growth (●) and protease activity (▲). Samples were withdrawn after incubation for 66 h at 37 °C.

ที่มา : Patel และคณะ (2005)

4.3 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ตลอดจนโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ การเติบโตของจุลินทรีย์อาจมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตแตกต่างจากพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งเชื้อชนิดเดียวกันอาจมีพีเอชที่เหมาะสมต่างกันขึ้นอยู่กับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะอื่นๆ ในการศึกษาของ Patel และคณะ (2005) ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและการเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. ในช่วงพีเอช 7-10 ในอาหาร CMB medium พบว่าที่พีเอช 7-8 ให้การเติบโตสูงสุด และเมื่อพีเอชเป็น 9 กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง นอกจากนี้ Gupta และ Khare (2007) ได้ศึกษาผลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิต

เอนไซม์ โปรติเอสจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PseA ซึ่งศึกษาที่พีเอช 6.0-10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่พีเอช 7 ให้การเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด โดยการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะลดลงเมื่อพีเอชเท่ากับ 10 ซึ่งมีสภาวะเป็นด่าง และในการศึกษาของ Nilegaonkar และคณะ (2007) ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและการเติบโตของเชื้อ *Bacillus cereus* MCM B-326 ซึ่งเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบ โดยศึกษาผลของพีเอชในช่วง 4-12 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงคือพีเอช 9 และเมื่อพีเอชสูงขึ้นเป็น 10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะลดลง

4.4 อุณหภูมิที่เหมาะสม

จุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามอุณหภูมิที่ใช้ในการเติบโต คือ กลุ่มที่เติบโตที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (Psychrophiles) กลุ่มที่เติบโตที่อุณหภูมิห้องประมาณ 40 องศาเซลเซียส (mesophiles) และกลุ่มที่เติบโตสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (thermophiles) ซึ่งการผลิตเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตอาจจะแตกต่างจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ จากการศึกษาของ Bhaskar และคณะ (2007) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตของเชื้อ *Bacillus proteolyticus* CFR 3001 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ในช่วงอุณหภูมิ10-60 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเติบโตดีและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด และพบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เอนไซม์โปรติเอสจะมีกิจกรรมลดลงร้อยละ 18 และงานในการศึกษาของ Gupta และ Khare (2007) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PseA พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* PseA เติบโตได้ที่อุณหภูมิ 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสคือ 30 องศาเซลเซียส

4.5 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

ความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อชนิดของเอนไซม์ ว่าเป็นชนิดชอบเกลือหรือไม่ชอบเกลือและมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และการเติบโตของเชื้อ โดยในการศึกษาของ Tran และ Nagano (2002) ศึกษาผลความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* และการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0-8 พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ให้การเติบโตสูงขึ้น แต่ให้กิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสลดลง ซึ่งในชุดทดลองที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ พบว่าจะให้กิจกรรมเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Gupta และคณะ (2005) ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากดิน ซึ่งศึกษาในช่วงความเข้มข้น 0-0.17 โมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.03 โมลาร์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

และในการศึกษาของ Patel และคณะ (2005) ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. และการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วงร้อยละ 0-20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเท่ากับ 9.0 พบว่าความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเชื้อเท่ากับร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่มีค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เช่นกัน ซึ่งได้จัดเชื้อ *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียชอบเกลือ

5. กิจกรรมการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนส

5.1 พีเอชที่เหมาะสมในการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนส

Kawahara และคณะ (1993) ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสและการเติบโตของเชื้อ *Bacillus alvei* DC-1 ซึ่งคัดแยกจากดิน พบว่าสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 4.5, 6.0 และ 7.0 ซึ่งเชื้อสายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสชนิดใหม่ที่มีกิจกรรมที่พีเอชเป็นกรด (Figure 6)

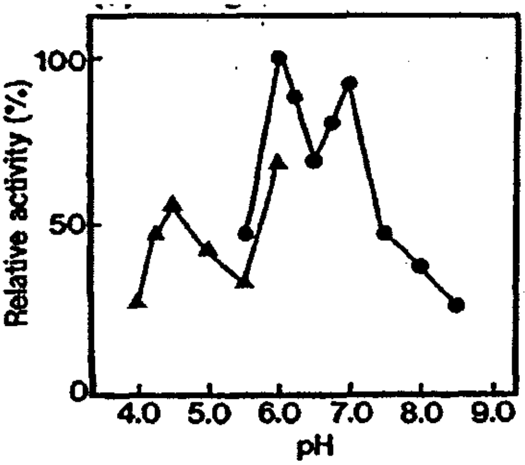

Figure 6. Effect of pH on activities of collagenase for collagen hydrolysis.

ที่มา : Kawahara และคณะ (1993)

Nagano และ To (1999) ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* FS-2 ซึ่งคัดแยกจากน้ำปลา ในช่วงพีเอช 5-10 พบว่าที่พีเอช 9.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุด และเอนไซม์คอลลาจิเนสมีความเสถียรต่อพีเอชในช่วง 5-10 และการศึกษาของ Nakayama และคณะ (2000) ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรม

ของเอนไซม์คอลลาจิเนสและการเติบโตจากเชื้อ *Bacillus* sp. NTAP-1 ในช่วงพีเอช 2-10 พบว่าที่พีเอช 3.9 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุด (Figure 7)

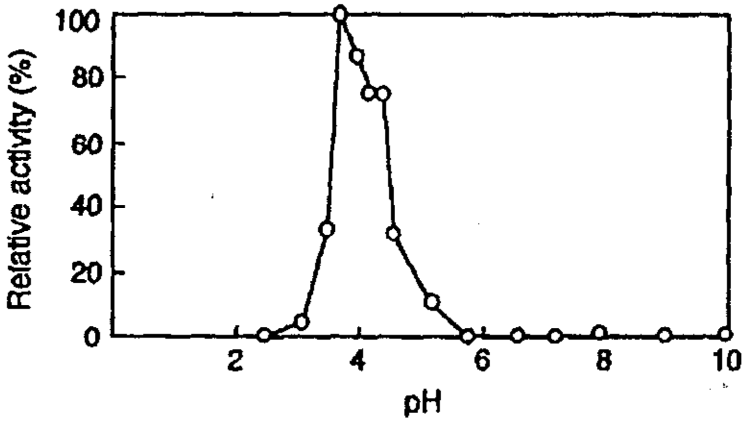

Figure 7. Effect of pH on collagenolytic activity.

ที่มา : Nakayama และคณะ (2000)

5.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนส

Ferrero และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* MIR 29 โดยศึกษาความสามารถในการทำงานและความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์โปรติเอสในช่วง 30-70 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดคือที่ 60 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์โปรติเอสจะเสียสภาพ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ70 ในการศึกษาของ Gupta และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่คัดแยกจากดิน และศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในช่วง 5-50 องศาเซลเซียส และความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์โปรติเอส ในช่วง 37-90 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Figure 8A) และโดยผลของการบ่มที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์จะมีกิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 92 และ 85 ตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือน้อยมากเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 80 และ 90 องศาเซลเซียส (Figure 8B) เนื่องจากอุณหภูมิทำให้เอนไซม์เสียสภาพ

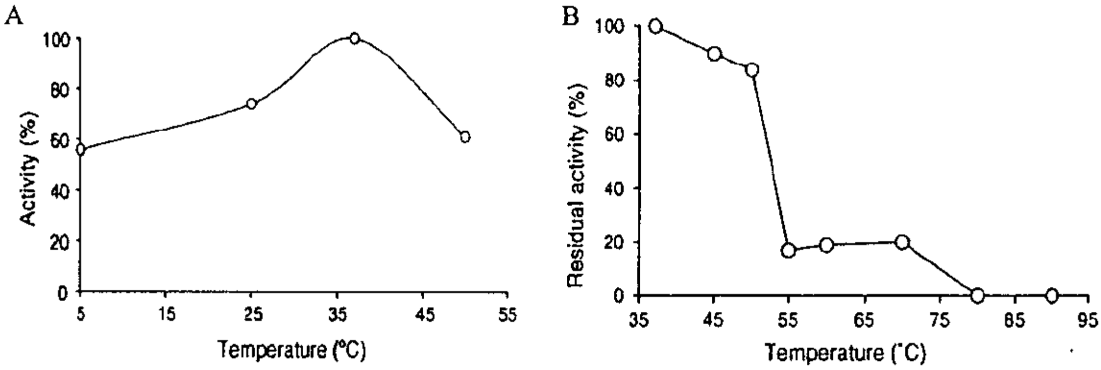

Figure 8. Effect of temperature on activity (A) and stability of protease (B).
ที่มา : Gupta และคณะ (2005)

Kanayama และ Sakai (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสชนิดใหม่จากเชื้อ *Microbacterium liquefaciens* ซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเจลาติน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมการทำงานสูงที่อุณหภูมิ 37-42 องศาเซลเซียส และผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Microbacterium liquefaciens* พบว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์โปรติเอสมีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 60 แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์โปรติเอสจะสูญเสียกิจกรรมหมด แต่เมื่อเก็บเอนไซม์ไว้ที่ -80 ถึง 0 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

6. การประยุกต์ใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์

การนำเอนไซม์ย่อยโปรตีนมาใช้แทนสารเคมี ในขั้นตอนการย่อยสลายโปรตีนของกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมต่างๆ นั้น มีข้อได้เปรียบบางประการ คือ ปฏิกิริยาของเอนไซม์มีความไวและความจำเพาะสูง อีกทั้งดำเนินไปภายใต้สภาวะที่รุนแรงน้อยกว่า ดังนั้นจึงทำให้สามารถควบคุมอัตราการผลิตตลอดจนคุณภาพของผลผลิตได้ง่าย โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งการประยุกต์ใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจมากในอุตสาหกรรมต่างๆ ดังนี้

6.1 การไฮโดรไลส์โปรตีน (Protein hydrolysis)

การพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์สำหรับอุตสาหกรรมการไฮโดรไลส์โปรตีนเนื้อปลา และเนื้อต่างๆ ซึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ได้แก่ ความจำเพาะของเอนไซม์ ขอบเขตในการทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีน ความเข้มข้นของ

สับสเตรทและเอนไซม์ อุณหภูมิและพีเอช โปรตีนในธรรมชาติโดยทั่วไปไม่มีความไวต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเอส เนื่องจากมีโครงสร้างที่แข็งแรง การทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนเป็นผลจากการคลายตัวของโมเลกุลโปรตีนออกมา ทำให้พันธะเปปไทด์สัมผัสกับภายนอก และมีความไวต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์เพิ่มขึ้น ผลผลิตที่ได้จากการไฮโดรไลส์เจลาติน สามารถใช้ประโยชน์ได้ เช่น ใช้เป็นสารให้ฟองในแชมพู ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องดื่มที่ให้พลังงานต่ำ

6.2 การรักษาโรค

ใช้เป็นส่วนประกอบในยาที่ใช้รักษาโรค เช่น อาหารปวดท้องอย่างรุนแรงในทางเดินอาหาร อาการเจ็บรกในครรภ์ ช่วยกำจัดเชื้อก่อโรคต่างๆ และช่วยยับยั้งการเกิดโรคมะเร็ง (Watanabe, 2004)

6.3 ใช้ในห้องปฏิบัติการ

ใช้ในการแยกเซลล์ตับของหนูออกมา และการย่อยคอลลาเจนเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Watanabe, 2004) ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมี (Okamoto *et al.*, 2001) ใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* V8 ในการศึกษาแผนที่เปปไทด์ของคอลลาเจน (Jongjareonrak *et al.*, 2005)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส
3. เพื่อศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนและสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนส
4. เพื่อศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาโดยเอนไซม์คอลลาจิเนสเปรียบเทียบกับการใช้กรด

ขอบเขตงานวิจัย

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากตัวอย่างดิน ซึ่งมีการสะสมของแหล่งโปรตีน เช่น ดินรอบโรงงานแปรรูปอาหารทะเล ดินบริเวณรอบตลาดสด และอาหารพื้นบ้านที่ใช้ปลาหมัก เช่น น้ำปลาที่อยู่ระหว่างการหมัก จากนั้นจึงจำแนกเชื้อที่คัดแยกได้โดยวิธีทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อที่คัดเลือกได้ รวมทั้งศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนและสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนส รวมถึงการประยุกต์ใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสที่ได้ในการย่อยหนังปลาเพื่อสกัดคอลลาเจนโดยเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยกรด และศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดได้

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วิธีดำเนินการ

1. วิธีวิเคราะห์

1.1 การวัดการเติบโตของเชื้อ

นำน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร โดยเจือจางน้ำหมักให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.2-0.8

1.2 การย้อมแกรมแบคทีเรีย (Gram staining)

หยดน้ำกลั่น 1 หยดลงบนแผ่นสไลด์ สเมียร์ (smear) เชื้อให้กระจายและรอให้แห้ง ตรึงเซลล์โดยนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ หยดสีคริสตัลไวโอเลต บนเชื้อที่สเมียร์ ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เทสีทิ้งล้างด้วยน้ำประปา หยดสารละลายแกรมไอโอดีน ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ล้างน้ำและซับน้ำจนแห้ง หยดเอทานอล ร้อยละ 95 จนสีถูกชะออกหมด ล้างด้วยน้ำ จากนั้นหยดสีซะฟรานิน ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที ล้างสีด้วยน้ำ นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

หมายเหตุ : เซลล์ติดสีม่วงของ crystal violet – Gram positive bacteria

เซลล์ติดสีชมพูของ safranin – Gram negative bacteria

1.3 การย้อมสปอร์แบคทีเรีย

หยดน้ำกลั่น 1 หยดลงบนแผ่นสไลด์ สเมียร์เชื้อให้กระจายและรอให้แห้ง ตรึงเซลล์โดยนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ หยดสารมาลาไคต์กรีนร้อยละ 0.5 ให้ท่วมบริเวณที่สเมียร์เชื้อไว้ นำสไลด์ไปอังเหนืออ่างน้ำเดือด ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที (คอยเติมมาลาไคต์กรีนอยู่เสมอ ระวังอย่าให้แห้ง) ล้างสีด้วยน้ำ หยดสีซะฟรานิน ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที ล้างสีด้วยน้ำ นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

หมายเหตุ : ส่วนที่ติดสีเขียว – เอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย

ส่วนที่ติดสีชมพู – เซลล์ส่วนอื่นที่ไม่ใช่เอนโดสปอร์

1.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลส

ใช้เข็มเขี่ยแตะตรงกลางโคโลนีของแบคทีเรียที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง วางบนสไลด์ แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 3 ลงบนแบคทีเรียดังกล่าว (ใช้เข็มเขี่ยผสมแบคทีเรียกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) ตรวจดูผลจากฟองแก๊สที่เกิดขึ้นทันทีทันใด ถ้ามีฟองเกิดขึ้นบันทึกผลเป็นบวก คือ แบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์แคทาเลสได้ จึงสลายไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์ได้น้ำ และแก๊สออกซิเจนเกิดขึ้น แต่ถ้าหากไม่เกิดฟองแก๊สแสดงว่าให้ผลเป็นลบหรือแบคทีเรียนั้นไม่สร้างเอนไซม์แคทาเลส

1.5 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส

การตรวจวัดการย่อยเจลาตินบนอาหารแข็ง โดยการเททับด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 35 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Medina and Baresi, 2007) วัดขนาดวงใสและขนาดของโคโลนี นำมาคำนวณ เพื่อหาค่า Degree of hydrolysis

$$\text{Degree of hydrolysis} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}$$

การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสในสารละลายเชิงปริมาณ ทำตามวิธีของ Tran และ Nagano (2002) นำตัวอย่างเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร เติมเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 0.2 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติม Tris-HCl พีเอช 7.5 เข้มข้น 0.15 โมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.012 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำสารผสมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลายนินไฮดรินเข้มข้นร้อยละ 0.35 ในเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 0.36 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (ชุดควบคุมเติมตัวอย่างเอนไซม์และเติมกรดไฮโดรคลอริกก่อนเติมเจลาติน และ Tris-HCl นำไปบ่มเช่นเดียวกัน) ใช้แบล็งค์เป็นบัฟเฟอร์ (buffer) แทนสารละลายเอนไซม์ แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไกลซีน

1 หน่วยของเอนไซม์ย่อยโปรตีน หมายถึง กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนได้เป็นกรดอะมิโนไกลซีน ปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

หมายเหตุ : ในสภาวะที่เป็นกรด ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส โดยนำตัวอย่างเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร เติมเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 0.2 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติม Tris-HCl พีเอช 4.8 เข้มข้น 0.15 โมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.012 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มเช่นเดียวกับข้างต้น

1.6 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์คอลลาจิเนส (ดัดแปลงจาก Lowry *et al.*, 1951)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (ประกอบด้วย Na_2CO_3 ร้อยละ ใน NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์, $CuSO_4$ ร้อยละ 1 และ $NaKC_4H_4O_6 \cdot H_2O$ ร้อยละ 2 ในอัตราส่วน 100:1:1)

ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลายโฟลิน (Folin-Ciocalteau's phenol reagent) ซึ่งเจือจางในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เทียบกับแบล็งค์ ซึ่งใช้น้ำกลั่นหรือบัฟเฟอร์ (buffer) แทนสารละลายตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

1.7 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) (ดัดแปลงวิธีของ Laemmli, 1970)

ตรวจหาขนาดโมเลกุลขององค์ประกอบโปรตีนในคอลลาเจนที่สกัดได้ โดยใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (sodium dodecyl sulfate-polyacylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) โดยนำตัวอย่างคอลลาเจน 50 มิลลิกรัม ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ที่มีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กวนต่อเนื่องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที นำส่วนใสหาปริมาณโปรตีน และเจือจางโปรตีนในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.2 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ที่มีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้มา 150 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 6.8 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่มีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และกลีเซอรอลเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เติมและไม่เติม β-mercaptoethanol (βME) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร แล้วนำไปแยกโปรตีนโดยหยอดสารละลายของโปรตีนให้ได้ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม ลงบนเจลโพลีอะคริลาไมด์ที่มีเจล staching ความเข้มข้นร้อยละ 4 และ เจล separating ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 และนำไปแยกโดยใช้กระแสไฟ 15 มิลลิแอมแปร์ หลังจากนั้นย้อมเจลโดยใช้ Coomassie blue R-250 เข้มข้นร้อยละ 0.05 น้ำหนักต่อปริมาตร ในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 15 ปริมาตรต่อปริมาตร ที่มีกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นล้างด้วยเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตรต่อปริมาตร ที่มีกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร โดยใช้โปรตีนมาตรฐานซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 53-212 กิโลดาลตัน ชนิดโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนมาตรฐาน (High molecular weight protein markers) ได้แก่ Myosin ขนาด 212 กิโลดาลตัน α_2-Macroglobulin ขนาด 170 กิโลดาลตัน β-Galactosidase ขนาด 116 กิโลดาลตัน Transfernin ขนาด 76 กิโลดาลตัน

Normal-subunit of α_2-Macroglobulin ขนาด 70 กิโลดาลตัน Glutamic-dehydrogenase ขนาด 53 กิโลดาลตัน โดยสาย $\alpha 1$ ของคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีขนาดประมาณ 116 ดาลตัน ซึ่งใหญ่กว่าสาย $\alpha 2$ ที่มีขนาด89 กิโลดาลตัน เมื่อทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (Jongjareonrak *et al.*, 2005)

1.8 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษาจะมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (replication) ในการศึกษาแต่ละครั้งเท่ากับ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for Social Science) Version 10

2. วิธีการทดลอง

2.1 การคัดเลือกและจำแนกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

2.1.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสบนอาหารแข็ง

ชั่งตัวอย่างดิน 1.0 กรัม หรือตัวอย่างอาหารหมัก 1 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดลองที่เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร (จำนวน 3 ซ้ำ) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากันด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดูดตัวอย่างจากฟลาส์กมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากันด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำซ้ำเช่นนี้ 2 ครั้ง เจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้นเหมาะสมประมาณ 10^{-1}-10^{-3} เท่า ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เกลี่ยเชื้อ (spread plate) ให้กระจายทั่วจานอาหารแข็ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่เกิดขึ้นมาทำการ restreak บนอาหาร ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว นำไป spot บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเจลาตินอยู่ร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง และตรวจดูวงใสรอบโคโลนีหลังจากเททับด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 35 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Medina and Baresi, 2007) วัดวงใส เพื่อหาค่า degree of hydrolysis

2.1.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเชิงปริมาณ

เลือกโคโลนีที่เกิดวงใสและให้ค่า Degree of hydrolysis สูงมาเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ใช้เชื้อเริ่มต้น (inoculum) ที่เพาะเลี้ยงมาแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรให้มีค่าเท่ากับ 1.0) ปริมาณร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำสารละลายที่ปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อแล้วไปศึกษากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสเชิงปริมาณ และเลือกเชื้อที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสสูง เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

2.1.3 การจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ รูปร่าง, การติดสีแกรม และย้อมสปอร์ (endospore) ของแบคทีเรีย และลักษณะทางชีวเคมี โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลส

2.1.4 การจำแนกแบคทีเรียที่คัดแยกได้

จัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยใช้ 16S rRNA โดยการส่งตัวอย่างวิเคราะห์เพื่อหา ลำดับเบสที่ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล แล้วนำลำดับเบส 16S rRNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบลำดับเบสที่มีอยู่ใน database ซึ่งมีข้อมูลอยู่ในอินเตอร์เน็ต โดยใช้เว็บไซต์ของ http://www.ncbi.nlm.nim.gov ด้วยโปรแกรม BLAST

2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

2.2.1 ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

การเตรียมกล้าเชื้อจะทำการเขี่ยเชื้อจากข้อ 1.2 ลงในอาหารเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้มาปรับปริมาณเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

2.2.2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้กลูโคส ซูโครส มอลโตส แลคโตส และกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเพื่อหาการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และปั่นแยกเซลล์แบคทีเรีย

ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงอัตราเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส เลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2.2.3 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 4, 4.8, 6, 7.5 และ 8.5 ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเพื่อหาการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงอัตราเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส เลือกพีเอชที่ให้ปริมาณเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2.2.4 อุณหภูมิที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.2 ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเพื่อหาการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงอัตราเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส เลือกอุณหภูมิที่ให้ปริมาณเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2.2.5 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เมื่อได้แหล่งคาร์บอนที่ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุด นำมาศึกษาความเข้มข้นที่ร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.2 ปริมาตร 95 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 ชั่วโมง เพื่อหาการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงอัตราเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส เลือกอุณหภูมิที่ให้ปริมาณ

เอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุด เลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2.2.6 ความเข้มข้นเจลาตินที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 กำหนดความเข้มข้นเจลาตินที่ร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 น้ำหนักต่อปริมาตร ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.2 ปริมาตร 95 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 ชั่วโมง เพื่อหาการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงอัตราเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส เลือกอุณหภูมิที่ให้ปริมาณเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุด เพื่อเลือกความเข้มข้นเจลาตินที่ให้ปริมาณเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุด

2.3 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนส

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส (ข้อ 2) แล้วนำสารละลายมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วัดปริมาตรส่วนใส แล้วทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส และหาปริมาณโปรตีน จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 80 น้ำหนักต่อปริมาตร ทิ้งไว้12 ชั่วโมง นำไปเซ็นตริฟิวจ์ 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ นำไปไดอะไลซิส (dialysis) โดยใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีขนาด molecular weight cut-off เท่ากับ 8,000 คาลตัน ด้วยบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (เปลี่ยนสารละลายทุกๆ 4 ชั่วโมง) นำสารละลายที่ได้ศึกษาสมบัติของเอนไซม์

2.3.1 การทดสอบพีเอชที่เหมาะสม

ปรับพีเอชของสารละลายเจลาติน และเจือจางเอนไซม์คอลลาจิเนสในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 4–9 (0.15 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ (พีเอช 4-6), 0.15 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-7) และ 0.15 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (พีเอช 7-9)) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดอัตราการย่อยเจลาติน

2.3.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสม

ปรับพีเอชของสารละลายเจลาติน และเจือจางเอนไซม์คอลลาจิเนสในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดอัตราการย่อยเจลาติน

2.3.3 การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่พีเอชต่าง ๆ

เจือจางเอนไซม์คอลลาจิเนสในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 4–9 (0.15 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ (พีเอช 4-6), 0.15 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-7) และ 0.15 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (พีเอช 7-9)) นำไปบ่มที่อุณหภูมิจากข้อ 3.2 เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผ่านการบ่มที่พีเอชต่างๆ มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่เหลือในสภาวะที่หาได้จากข้อ 3.1 และ 3.2

2.3.4 การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เจือจางเอนไซม์คอลลาจิเนสในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 แล้วนำสารละลายเอนไซม์คอลลาจิเนสไปบ่มที่อุณหภูมิ 4, 20, 30, 37, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วนำเอนไซม์ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่เหลือในสภาวะที่หาได้จากข้อ 3.1 และ 3.2

2.4 เปรียบเทียบการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอนโดยใช้กรดและเอนไซม์คอลลาจิเนส

2.4.1 การปรับสภาพหนังปลาก่อนการสกัดคอลลาเจน

การปรับสภาพหนังปลาก่อนการสกัดคอลลาเจน ดัดแปลงจาก Jongjareonrak และคณะ (2005) โดยนำหนังปลาแซลมอน ที่เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส มาทำความสะอาดโดยล้างด้วยน้ำประปา ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1.0 × 1.0 เซนติเมตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นำมากำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน โดยแช่หนังปลาในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (อัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลาย เป็น 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร) แช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนสารละลายทุกๆ 6 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกรองจนมีค่าพีเอชเป็นกลาง จากนั้นกำจัดไขมันออกจากหนังปลา โดยการแช่ในไอโซโพรพานอลความเข้มข้นร้อยละ 10 (อัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลาย เป็น 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร) แช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนสารละลายทุกๆ 6 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกรองจนพีเอชเป็นกลาง

2.4.2 การศึกษาการสกัดโดยการใช้กรด (ดัดแปลงจาก สิทธิพงศ์ นลินานนท์, 2549)

นำหนังปลาที่ปรับสภาพแล้วแช่ในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (อัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลาย เป็น 1:15 น้ำหนักต่อปริมาตร) กวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30

นาที นำส่วนใสไปตกตะกอนคอลลาเจน โดยนำสารละลายคอลลาเจนที่สกัดได้เติมด้วยทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ อัตราส่วน 1:1 แล้วตกตะกอนด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.6 โมลาร์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ นำไปไดอะไลซิส (dialysis) โดยใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีขนาด molecular weight cut-off เท่ากับ 8,000 ดาลตัน ด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (เปลี่ยนสารละลายทุกๆ 4 ชั่วโมง) จากนั้นไดอะไลซิสด้วยน้ำกลั่นจนพีเอชเป็นกลาง แล้วนำไปทำแห้งเยือกแข็ง (freeze-dried) คำนวณปริมาณผลผลิตที่ได้ ศึกษาขนาดโมเลกุลด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

2.4.3 การศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาที่ผ่านการสกัดด้วยกรดแล้วโดยเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อที่คัดแยกได้ (ดัดแปลงจาก สิทธิพงศ์ นลินานนท์, 2549)

นำหนังปลาที่ปรับสภาพแล้วมาแช่ในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (อัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลาย เป็น 1:15 น้ำหนักต่อปริมาตร) กวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนที่เหลือล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีพีเอชเป็นกลาง นำไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อที่คัดแยกได้ โดยมีเอนไซม์คอลลาจิเนสความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ยูนิตต่อกรัมหนัง (อัตราส่วนหนังต่อสารละลาย 1:15 น้ำหนักต่อปริมาตร) กวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนใสไปตกตะกอนคอลลาเจน โดยนำสารละลายคอลลาเจนที่สกัดได้เติมด้วยทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ อัตราส่วน 1:1 แล้วตกตะกอนด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.6 โมลาร์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสนำไปไดอะไลซิส (dialysis) โดยใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีขนาด molecular weight cut-off เท่ากับ 8,000 ดาลตัน ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนส ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไดอะไลซิสด้วยน้ำกลั่นจนพีเอชเป็นกลาง นำไปทำแห้งเยือกแข็ง (freeze-dried) คำนวณปริมาณผลผลิตที่ได้ ศึกษาขนาดโมเลกุลด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

2.4.3 การศึกษาการสกัดโดยเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 และเชื้อ CNA1 (ดัดแปลงจาก สิทธิพงศ์ นลินานนท์, 2549)

นำหนังปลาที่ปรับสภาพแล้วมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อที่คัดแยกได้ โดยมีเอนไซม์คอลลาจิเนสความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ยูนิตต่อกรัมหนัง (อัตราส่วนหนังต่อสารละลาย 1:15 น้ำหนักต่อปริมาตร) กวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนใสไปตกตะกอนคอลลาเจน โดยนำสารละลายคอลลาเจนที่สกัดได้เติมด้วยทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ อัตราส่วน 1:1 แล้วตกตะกอนด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.6 โมลาร์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสนำไปไดอะไลซิส (dialysis) โดยใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีขนาด molecular weight cut-off เท่ากับ 8,000 ดาลตัน ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนส ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไดอะไลซิสด้วยน้ำกลั่นจนพีเอชเป็นกลาง นำไปทำแห้งเยือกแข็ง (freeze-dried) คำนวณปริมาณผลผลิตที่ได้ ศึกษาขนาดโมเลกุลด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

วัสดุและอุปกรณ์

1. แหล่งตัวอย่างสำหรับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

1.1 ดินบริเวณที่มีการสะสมของเศษปลา ได้แก่ ดินรอบโรงงานแปรรูปอาหารทะเลจาก บริษัท คิวฟู้ด จำกัด จังหวัดสงขลา ดินบริเวณตลาดสดคลองเรียน

1.2 อาหารหมักปลาพื้นบ้าน ได้แก่ น้ำปลาที่อยู่ระหว่างการหมัก ปลาส้ม ปลาแป้งแดง ปลาร้า

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส (ดัดแปลงจาก Tran and Nagano, 2002)

อาหารแข็งสำหรับคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส ประกอบด้วย กลูโคส ร้อยละ 0.5, ยีสต์สกัดร้อยละ 0.1, K_2HPO_4 ร้อยละ 0.7, KH_2PO_4 ร้อยละ 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ร้อยละ

0.01, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ร้อยละ 0.01, เจลาตินร้อยละ 0.5 และวุ้นร้อยละ 1.5 ปรับพีเอชเป็น 7.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส (ดัดแปลงจาก Tran and Nagano, 2002)

มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่ไม่เติมวุ้น

หมายเหตุ: การคัดแยกเชื้อในสภาวะที่เป็นกรดจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.8

3. วัตถุดิบหนังปลา

หนังปลาแซลมอนจาก บริษัท นิสซุย (ประเทศไทย) จำกัด จังหวัดสงขลา

4. สารเคมี (ภาคผนวก ก)

4.1 สารเคมีที่ใช้การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส

4.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

4.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

5. อุปกรณ์

5.1 อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

5.1.1 เครื่องแก้วสำหรับการเพาะเลี้ยงทางจุลินทรีย์ เช่น ฟลาก์ส หลอดทดลอง ขวดดูแรน ปิเปต จานเพาะเชื้อ

5.1.2 เครื่องเขย่า รุ่น VRN-480 บริษัท Gwmmy industrial corporation

5.1.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd

5.1.4 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack

5.1.5 ตู้บ่มเชื้อ รุ่น MIR-153 บริษัท Sanyo

5.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

5.2.1 เครื่องวัดพีเอช รุ่น 420A บริษัท Orion Research, Inc.

5.2.2 เครื่องมือในการทำเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส

5.2.3 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 บริษัท Technical Cooperation

5.2.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 5430 บริษัท Eppendrof

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดแยกและจำแนกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากตัวอย่างดินรอบโรงงานแปรรูปอาหารทะเล ดินรอบตลาดสดคลองเรียนที่มีการปนเปื้อนของเศษเหลือจากปลา และจากตัวอย่างอาหารหมักปลา เช่น น้ำปลาที่อยู่ระหว่างการหมัก ปลาส้ม ปลาร้า และปลาแป้งแดง ทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ซึ่งแยกโดยอาศัยลักษณะ สี ขนาดโคโลนี และศึกษาการย่อยเจลาตินบนอาหารแข็งโดยการเททับด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 35 จะพบวงใสบริเวณรอบๆ โคโลนีของเชื้อดังแสดงใน Figure 9 ซึ่งเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์สร้างเอนไซม์คอลลาจิเนสเพื่อย่อยเจลาตินซึ่งเป็นโปรตีนให้ได้เป็นกรดอะมิโนเพื่อดูดซึมเข้าตัวเซลล์ของจุลินทรีย์ สำหรับบริเวณที่ไม่ถูกย่อยจะมีสีขาวขุ่นเนื่องจากโปรตีนเกิดการตกตะกอนเมื่อเททับด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก ผลการทดลองคัดแยกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบและที่มีพีเอชเป็นกลาง 7.5 และพีเอชเป็นกรด 4.8 พบว่ามีเชื้อที่สามารถเติบโตได้ที่พีเอช 7.5 เท่ากับ 124 ไอโซเลต โดย 81 ไอโซเลตมาจากแหล่งดินและ 25 ไอโซเลตมาจากอาหารหมักปลา และพีเอช 4.8 เท่ากับ 89 ไอโซเลตโดย 59 ไอโซเลตมาจากแหล่งดินและ 30 ไอโซเลตมาจากอาหารหมักปลา จากการศึกษาการเกิดวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชที่ 7.5 พบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้ทั้งหมด 83 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 67 และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.8 ทั้งหมด 62 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 70 และจากการศึกษาค่า degree of hydrolysis ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเท่ากับ 7.5 พบว่ามี 16 ไอโซเลต ที่ให้ค่า degree of hydrolysis สูงมากกว่า 3.8 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเท่ากับ 4.8 พบเชื้อ 8 ไอโซเลต ที่ให้ค่า degree of hydrolysis สูงมากกว่า 2.0 นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อที่แยกในอาหารเลี้ยงเชื้อพีเอช 4.8 จะให้ค่า degree of hydrolysis ต่ำกว่าเชื้อที่แยกในอาหารเลี้ยงเชื้อพีเอช 7.5 จากการศึกษาของ Tran และ Nagano (2002) ซึ่งคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากน้ำปลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าจากการคัดแยกจากตัวอย่าง 17 ตัวอย่าง พบเชื้อ 12 โคโลนี ที่ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสบนอาหารแข็งและพบว่าเชื้อที่ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดในอาหารเหลวเป็นเชื้อแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง เมื่อบ่งชี้สายพันธุ์คือเชื้อ *Bacillus subtilis* CN2 Nakayama และคณะ (2000) ศึกษาการคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากสิ่งแวดล้อมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนและมีพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.8 พบว่าเชื้อที่ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูง

Table 5. Morphology and partial biochemical test of gelatin hydrolysing isolates in liquid medium pH 7.5.

Isolate	**Source**	**Degree of hydrolysis**	**Gram stain**	**Shape**	**Spore forming**	**Catalase test**
CNA1	soil from sea food industry	5.3	+	rod	+	+
CNA5	soil from sea food industry	3.6	+	rod	+	+
CNA13	soil from sea food industry	3.6	+	rod	+	+
CND4	soil from sea food industry	3. 7	+	rod	+	+
CND7	soil from sea food industry	3.5	+	short rod	-	-
CND11	soil from sea food industry	4.0	+	rod	+	+
CND15	soil from sea food industry	3.5	+	rod	+	+
CNB6	fish sauce	3.6	+	rod	+	+
CNB10	fish sauce	3.8	+	rod	+	+
CNB12	fish sauce	3.9	+	rod	+	+
CNB13	fish sauce	4.2	+	rod	+	+
CNC6	fish sauce	3.6	+	short rod	-	-
CNC10	fish sauce	3.8	+	rod	+	+
CNC12	fish sauce	3.9	+	rod	+	+
CNE24	soil from fresh market	3.5	+	rod	+	+
CNE27	soil from fresh market	3.5	+	rod	+	+

จาก Table 6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อที่ให้ค่า degree of hydrolysis สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.8 พบว่าเชื้อที่คัดแยกจากตัวอย่างปลาส้ม 1 ไอโซเลต ให้ค่า degree of hydrolysis เท่ากับ 2.0 เชื้อที่คัดแยกจากตัวอย่างปลาร้า 1 ไอโซเลต ให้ค่า degree of hydrolysis เท่ากับ 2.2 เชื้อที่คัดแยกจากตัวอย่างปลาแป้งแดง 3 ไอโซเลต ให้ค่า degree of hydrolysis เท่ากับ 2.0 และเชื้อที่คัดแยกจากตัวอย่างน้ำปลาที่อยู่ระหว่างการหมัก 7 สายพันธุ์ ให้ค่า degree of hydrolysis ในช่วง 3.2-3.4 ซึ่งเชื้อที่คัดแยกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.8 ส่วนใหญ่เป็นเชื้อแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง สามารถสร้างเอนไซม์แคทาเลส แต่ไม่สร้างสปอร์

Table 6. Morphology and partial biochemical test of gelatin hydrolysing isolates in liquid medium pH 4.8.

Isolate	**Source**	**Degree of hydrolysis**	**Gram stain**	**Shape**	**Spore forming**	**Catalase test**
CNI1	pla-som	2.0	-	short rod	-	+
CNJ3	pla-ra	2.2	-	rod	-	+
CNK4	pla-pang-dang	2.0	-	rod	-	+
CNK18	pla-pang-dang	2.0	-	rod	-	+
CNK19	pla-pang-dang	2.0	-	rod	-	+
CNL3	fish sauce	3.2	-	rod	-	+
CNL6	fish sauce	3.4	-	rod	-	+
CNL8	fish sauce	3.3	-	rod	-	+

เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้บนอาหารแข็งมาศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเชิงปริมาณในอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร โดยการวัดกิจกรรมเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อที่คัดแยกจากอาหารที่มีพีเอช 7.5 จะวัดที่พีเอช 7.5 และเชื้อที่คัดแยกจากอาหารที่มีพีเอช 4.8 จะวัดที่พีเอช 4.8 ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 10 พบว่าในอาหารเหลวที่มีพีเอช 7.5 เชื้อ CNA1, CNB13 และ CND4 ให้การเติบโตของเชื้อสูงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรในช่วง 3.79-3.92 เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส พบว่าเชื้อ CNA1, CNB13 และ CND4 ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงอยู่ในช่วง 15.70-16.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เชื้อ CNA1 ให้การผลิตเอนไซม์

คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 16.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกเชื้อ CNA1 เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสต่อไป สำหรับในอาหารเหลวที่มีพีเอช 4.8 จาก Figure 11 พบว่าเชื้อทั้ง 8 ให้การเติบโตของเชื้อต่ำโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรในช่วง 0.81-1.69 และการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสต่ำในช่วง 0.25-0.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าเชื้อ CNL3 ให้การเติบโตของเชื้อสูงสุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 0.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกเชื้อ CNL3 เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสต่อไป ในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสในสภาวะที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.8 จะให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสและการเติบโตของเชื้อต่ำกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 7.5 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารที่มีพีเอชเป็นกรด ไม่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส Russell และคณะ (1979) รายงานว่า ที่พีเอชต่ำทำให้แบคทีเรียมีพลังงานไม่เพียงพอต่อการดึงโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ขณะที่พีเอชสูงทำให้มีพลังงานไม่เพียงพอต่อการสังเคราะห์ ATP ซึ่งแบคทีเรียโดยทั่วไปเติบโตได้ดีในช่วงพีเอชเป็นกลาง 6-8 แต่อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรียที่สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดได้ (Teresa Thiel, 1999)

จากการศึกษาการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA1 และ CNL3 โดยวิธีทางกายภาพและชีวภาพเบื้องต้น พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต CNA1 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินรอบโรงงานแปรรูปอาหารทะเลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 7.5 เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง มีการสร้างสปอร์ และสามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลสได้ ส่วนแบคทีเรียไอโซเลต CNL3 คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาที่อยู่ระหว่างการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.8 เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง และสามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลสได้ ไม่มีการสร้างสปอร์ และเพื่อความแม่นยำในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย จึงศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CNA1 คือเชื้อ *Bacillus cereus* ซึ่งมีความเหมือน (identities) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CNL3 คือเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งมีความเหมือน (identities) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่พบว่าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสภายใต้สภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเป็นกลางส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *Bacillus* sp. ซึ่งได้แก่ *Bacillus subtilis* CN2 (Tran and Nagano, 2002), *Bacillus alvei* DC-1 (Kawahara *et al*., 1993), *Bacillus* sp. strain MO-1 (Okamoto *et al*., 2001), *Bacillus cereus* (Lund and Granum, 1999), *Bacillus* sp. strain NTAP-1 (Nakayama *et al*., 2000) และ *Bacillus subtilis* FS-2 (Nagano and To, 1999) นอกจากนี้ยังมีเชื้อที่คัดแยกภายใต้สภาวะที่มีพีเอชเป็นกรด ได้แก่ *Bacillus* sp. strain NTAP-1 (Nakayama *et al*., 2000),

Flavobacterium (Labadie, 1982), *Clostridium histolyticum* (Matsushita *et al.*, 1999), *Klebsiella oxytoca* (Tondo *et al.*, 2004) และ *Streptomyces* sp. strain 3B (Petrova *et al.*, 2006)

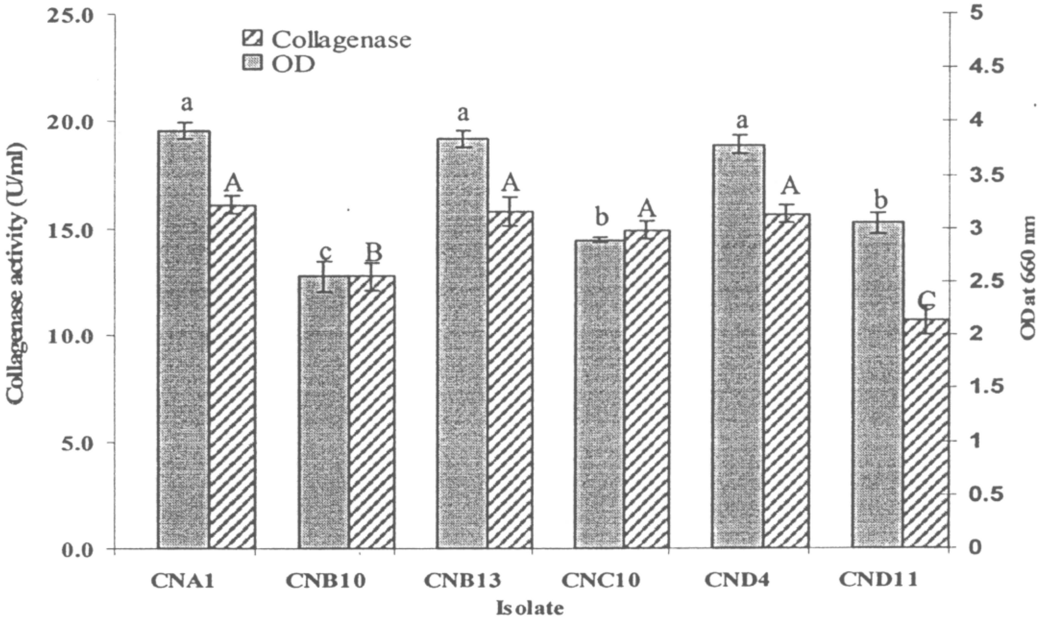

Figure 10. Growth and collagenase production from 6 isolates in liquid medium pH 7.5 incubated at 37 °C for 48 h.

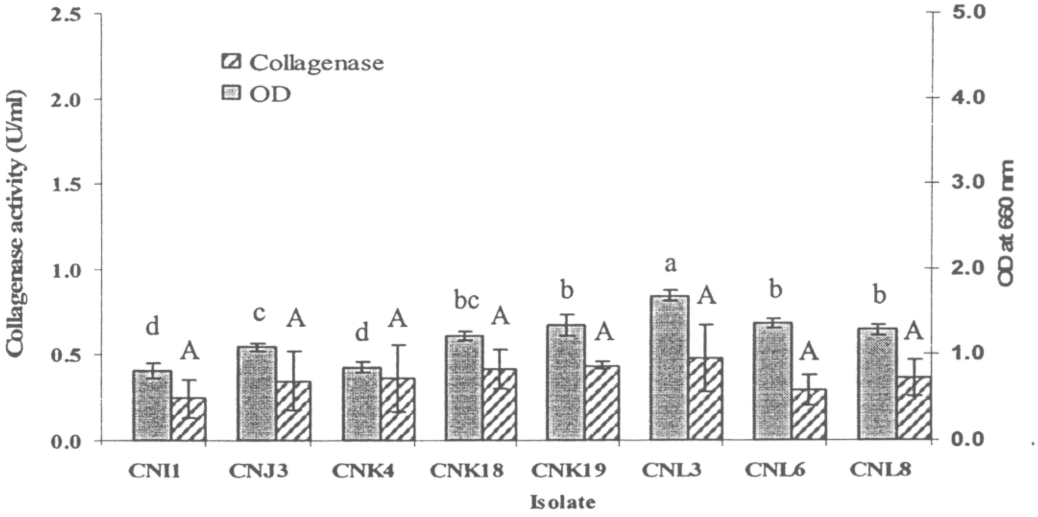

Figure 11. Growth and collagenase production from 8 isolates in liquid medium pH 4.8 incubated at 37 °C for 48 h. Different letters in the same parameter indicate significant difference ($p<0.05$).

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อที่คัดแยกได้

2.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญสำหรับการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการใช้แหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ในการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อ CNA1 และ CNL3 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษา คือ กลูโคส มอลโตส ซูโครส แลคโตส และกลีเซอรอล ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง จาก Figure 12a แสดงการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 พบว่ากลูโคส มอลโตส และซูโครส ให้การเติบโตของเชื้อสูงสุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรในช่วง 4.02-4.21 และแลคโตสกับกลีเซอรอลให้การเติบโตของเชื้อต่ำสุด สำหรับการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส พบว่ากลูโคส มอลโตส ซูโครส และแลคโตส ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และพบว่ากลีเซอรอลให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 23.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จึงเลือกกลีเซอรอลในการศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อ CNA1 สำหรับการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 (Figure 12b) พบว่าซูโครสให้การเติบโตสูงสุดโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรเท่ากับ 1.42 รองลงมาคือ มอลโตสและกลูโคส สำหรับแลคโตสและกลีเซอรอลให้การเติบโตต่ำกว่า ในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส พบว่ากลูโคส มอลโตส ซูโครส และแลคโตสให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งต่ำกว่ากลีเซอรอลที่ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 5.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จึงเลือกกลีเซอรอลในการศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของ CNL3 เช่นเดียวกับเชื้อ CNA1 ซึ่งจะเห็นได้ว่า กลูโคส มอลโตส ซูโครส และแลคโตส มีการส่งเสริมการเติบโตแต่ไม่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* MIR29 (Ferrero *et al.*, 1996), *Salinivibrio* genus (Lama *et al.*, 2005) และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PseA (Gupta and Khare, 2007) ที่พบว่ากลีเซอรอลให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ และพบว่ากลูโคสจะยับยั้งการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยจากการทดลองของ Patel และคณะ (2005) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. พบว่าในการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสจะต้องมีตัวชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และพบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ซึ่งเรียกว่า catabolite repression

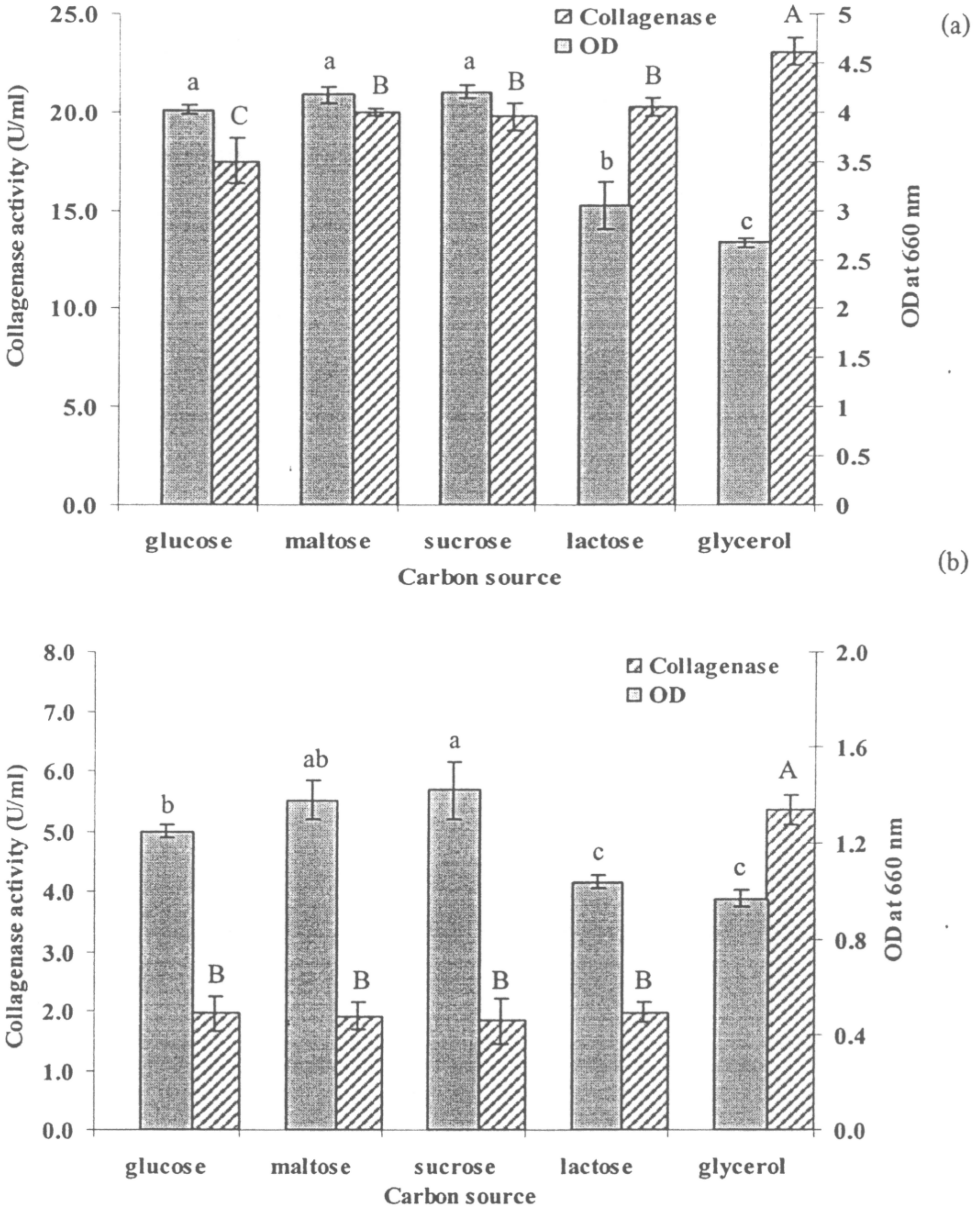

Figure 12. Effect of carbon source on growth and collagenase production by CNA1 strain (a) and CNL3 strain (b). Samples were withdrawn after incubation for 48 h at 37°C. Different letters in the same parameter indicate significant difference ($p<0.05$).

2.2 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

จุลินทรีย์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งจากการศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และเชื้อ CNL3 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0, 4.8, 6.0, 7.5 และ 8.5 จาก Figure 13a แสดงการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อ CNA1 ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ พบว่าเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงขึ้นจากพีเอช 4.0 ถึง 7.5 การเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อ CNA1 เพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.5 โดยให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 23.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 8.5 พบว่าเชื้อ CNA1 มีการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสลดลง จัดได้ว่าเชื้อ CNA1 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง สำหรับผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเติบโตของเชื้อ CNL3 (Figure 13b) พบว่าเชื้อสามารถเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชต่ำในช่วง 4–6 และมีการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 โดยให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 7.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสลดลงเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่าหรือสูงกว่าพีเอช 6.0 จึงจัดได้ว่าเชื้อ CNL3 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ CNA1 และ CNL3 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดไม่แตกต่างกันมากนักแต่กิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 จะสูงกว่าเชื้อ CNL3 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพีเอชที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต่างกันโดยเชื้อ CNA1 ที่คัดแยกจากอาหารที่มีพีเอชเป็นกลางจะวัดกิจกรรมที่พีเอช 7.5 และเชื้อ CNL3 ที่คัดแยกจากอาหารที่มีพีเอชเป็นกรดจะวัดกิจกรรมที่พีเอช 4.8 ในการศึกษาผลของพีเอชในงานวิจัยนี้พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kawahara และคณะ (1993) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดจากเชื้อ *Bacillus alvei* DC-1 และพบว่าการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจะลดลงเมื่อพีเอชต่ำกว่า 6.0 เช่นเดียวกับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. (Patel *et al.*, 2005), *Aureobasidium pullulans* (Chi *et al.*, 2007), *Conidiobolus coronatus* (Laxman *et al.*, 2005) และ *Pseudomonas aeruginosa* PseA (Gupta and Khare, 2007) ที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้ตั้งแต่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6-8 และจากรายงานของ Sharmin และคณะ (2005) พบว่าเชื้อ *Bacillus amovivorus* WP มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่พีเอช 8.5 แต่การเติบโตของเชื้อสูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7

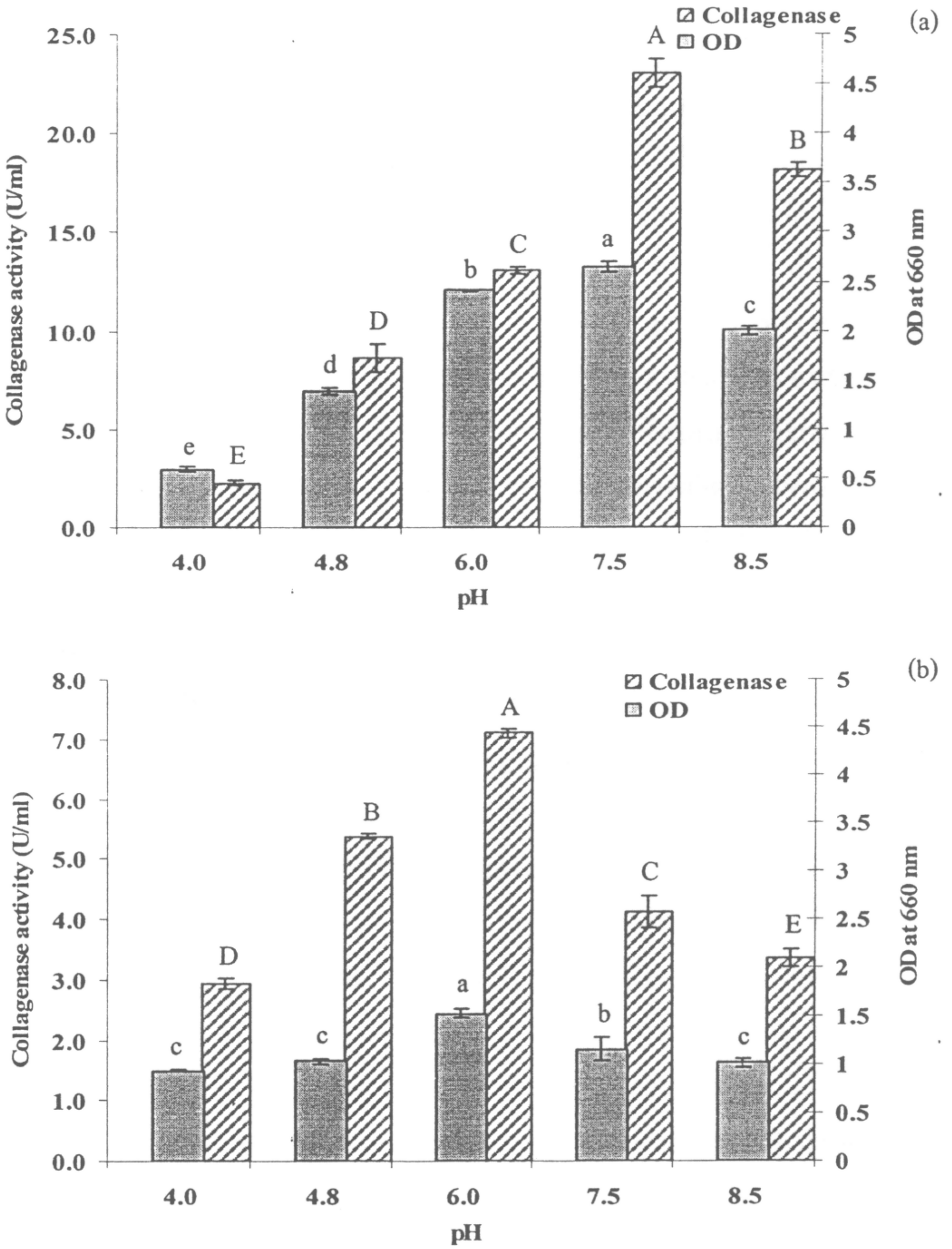

Figure 13. Effect of initial pH on growth and collagenase production by CNA1 strain (a) and CNL3 strain (b). Samples were withdrawn after incubation at 37°C for 48 h. Different letters in the same parameter indicate significant difference ($p<0.05$).

2.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

อุณหภูมิมีผลต่ออัตราการทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีหรือเป็นตัวชักนำหรือตัวยับยั้งการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จะถูกยับยั้งที่อุณหภูมิหนึ่งแต่จะถูกกระตุ้นที่อุณหภูมิอื่นๆ ดังนั้นการบ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์สูงสุด (Sharmin *et al.*, 2005) การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.5 สำหรับเชื้อ CNA1 และ 6.0 สำหรับเชื้อ CNL3 และศึกษาการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 14 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อ CNA1 คืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 23.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส พบว่าการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อลดลงเล็กน้อย สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อ CNL3 คืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับเชื้อ CNA1 โดยให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 7.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร การเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจะต่ำลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากจุลินทรีย์ไม่สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงและเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตขึ้นจะสูญเสียความคงตัวที่อุณหภูมิสูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sharmin และคณะ (2005) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus amovivorus* WP พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและการเติบโตของเชื้อสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากรายงานการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus* sp. I-312 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสคืออุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส (Joo and Chang, 2005) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Gupta และ Khare (2007) พบว่าอุณหภูมิต่ำในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PseA พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสคืออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาของ Laxman และคณะ (2005) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Conidiobolus coronatus* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสคืออุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีการเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

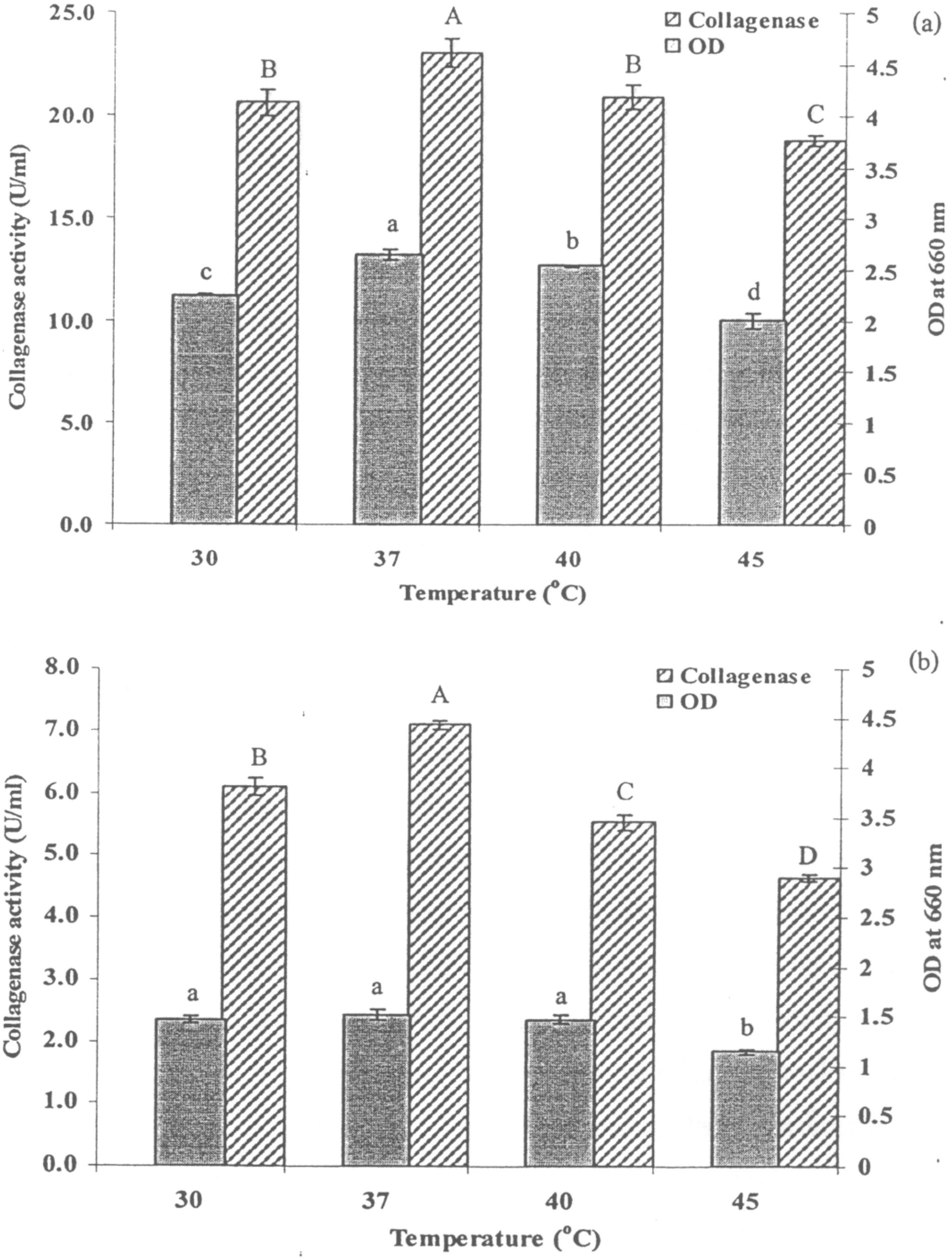

Figure 14. Effect of incubation temperature on growth and collagenase production by CNA1 strain (a) and CNL3 strain (b). Samples were withdrawn after incubation for 48 h. Different letters in the same parameter indicate significant difference ($p<0.05$).

2.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

จากการทดลองศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมพบว่ากลีเซอรอลเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อ CNA1 และ CNL3 เมื่อศึกษาความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0-1.5 น้ำหนักต่อปริมาตร พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.5 สำหรับเชื้อ CNA1 และ 6.0 สำหรับเชื้อ CNL3 และบ่มเชื้อทั้งสองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส Figure 15 แสดงการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อ CNA1 เมื่อใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลต่างกัน ผลการทดลองพบว่าเชื้อ CNA1 มีการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง การเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมกลีเซอรอล โดยที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลร้อยละ 0.5 ให้การเติบโตสูงสุดและไม่แตกต่างกับที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ในช่วง 5.87-5.92 และพบว่าการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสมีความสัมพันธ์กับการเติบโตของเชื้อ CNA1 โดยที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลร้อยละ 0.5 ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 21.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลร้อยละ 1.0 แต่การเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลเป็นร้อยละ 1.5 ทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส โดยการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสลดลงและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองที่ไม่เติมกลีเซอรอล จาก Figure 16 แสดงการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อ CNL3 ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลต่างกัน ผลการทดลองพบว่าเชื้อ CNL3 มีการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมกลีเซอรอล โดยที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลร้อยละ 0.5 พบว่าเชื้อ CNL3 มีการเติบโตสูงสุดโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 2.601 และพบว่าการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสมีความสัมพันธ์กับการเติบโตของเชื้อ CNL3 โดยที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลร้อยละ 0.5 ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 9.47 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และพบว่ามีการยับยั้งการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสโดยสารตั้งต้น โดยการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ คอลลาจิเนสลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลีเซอรอลจนถึงร้อยละ 1.5 เช่นเดียวกับเชื้อ CNA1 และจากผลการทดลองพบว่าการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของทั้งสองเชื้อเมื่อไม่มีการเติม กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อทั้งสองสามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้ แต่การเติบโตของเชื้อทั้งสองจะต่ำกว่าชุดที่มีการเติมกลีเซอรอล โดยในชุดการทดลองที่ไม่เติมกลีเซอรอล พบว่าเชื้อ CNA1 จะมีการเติบโตจนถึง 36 ชั่วโมง แต่หลังจากชั่วโมงที่ 36 การเติบโตของเชื้อ CNA1 จะคงที่

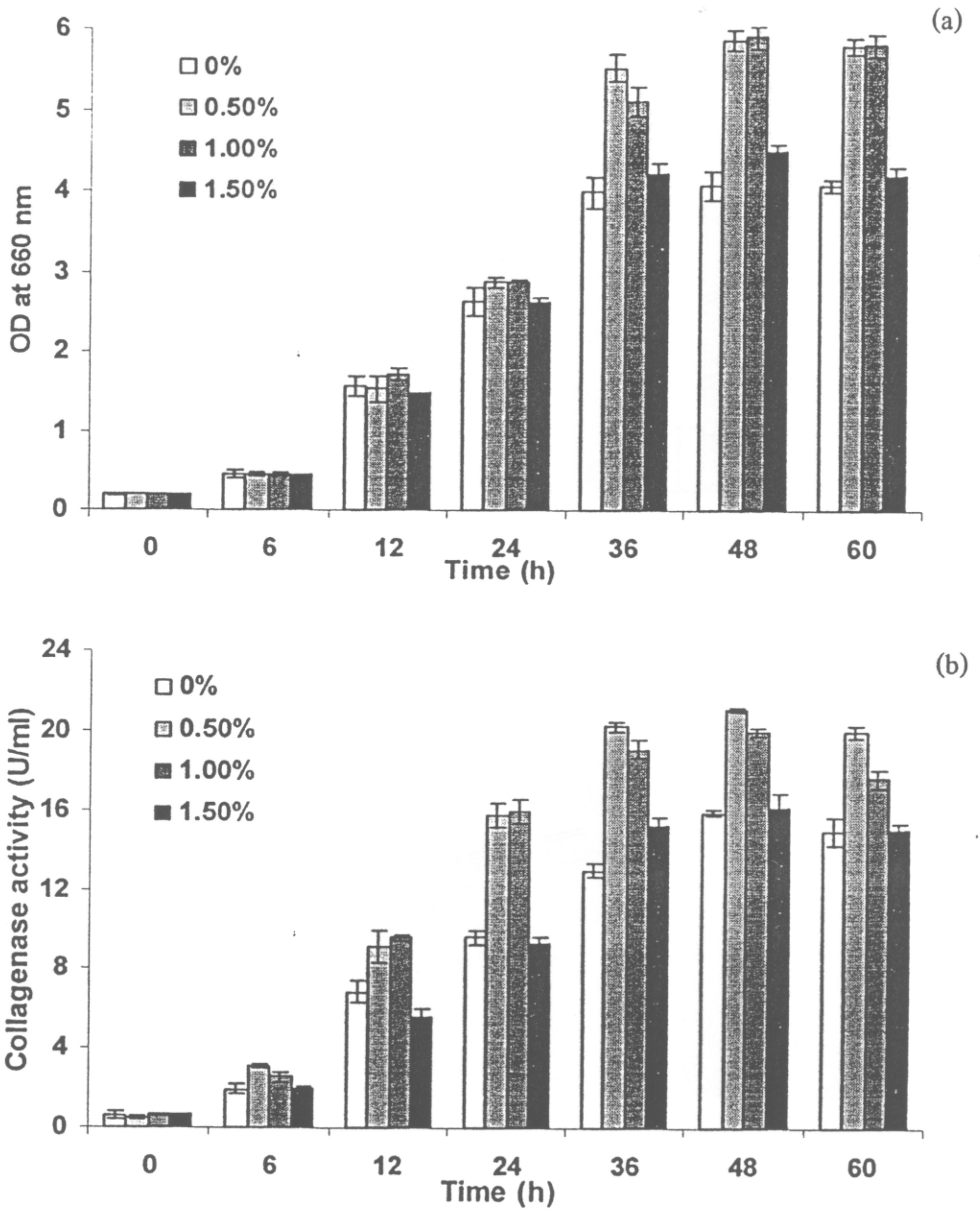

Figure 15. Effect of glycerol concentration on growth (a) and collagenase production (b) from CNA1 incubated at 37 °C.

สำหรับเชื้อ CNL3 จะมีการเติบโตจนถึง 6 ชั่วโมง และหลังจากชั่วโมงที่ 6 การเติบโตของเชื้อ CNL3 จะลดลง เนื่องจากในช่วงแรกเชื้อจะมีสารอาหารจากยีสต์สกัดทำให้สามารถเติบโตได้หลังจากนั้น สารอาหารก็จะลดลงและไม่เพียงพอที่จะนำไปสร้างเซลล์ได้ ซึ่งทำให้การเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อลดลงนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ CNL3 มีการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสน้อยกว่าเชื้อ CNA1 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพีเอชในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต่างกัน โดยเชื้อ CNA1 ที่คัดแยก

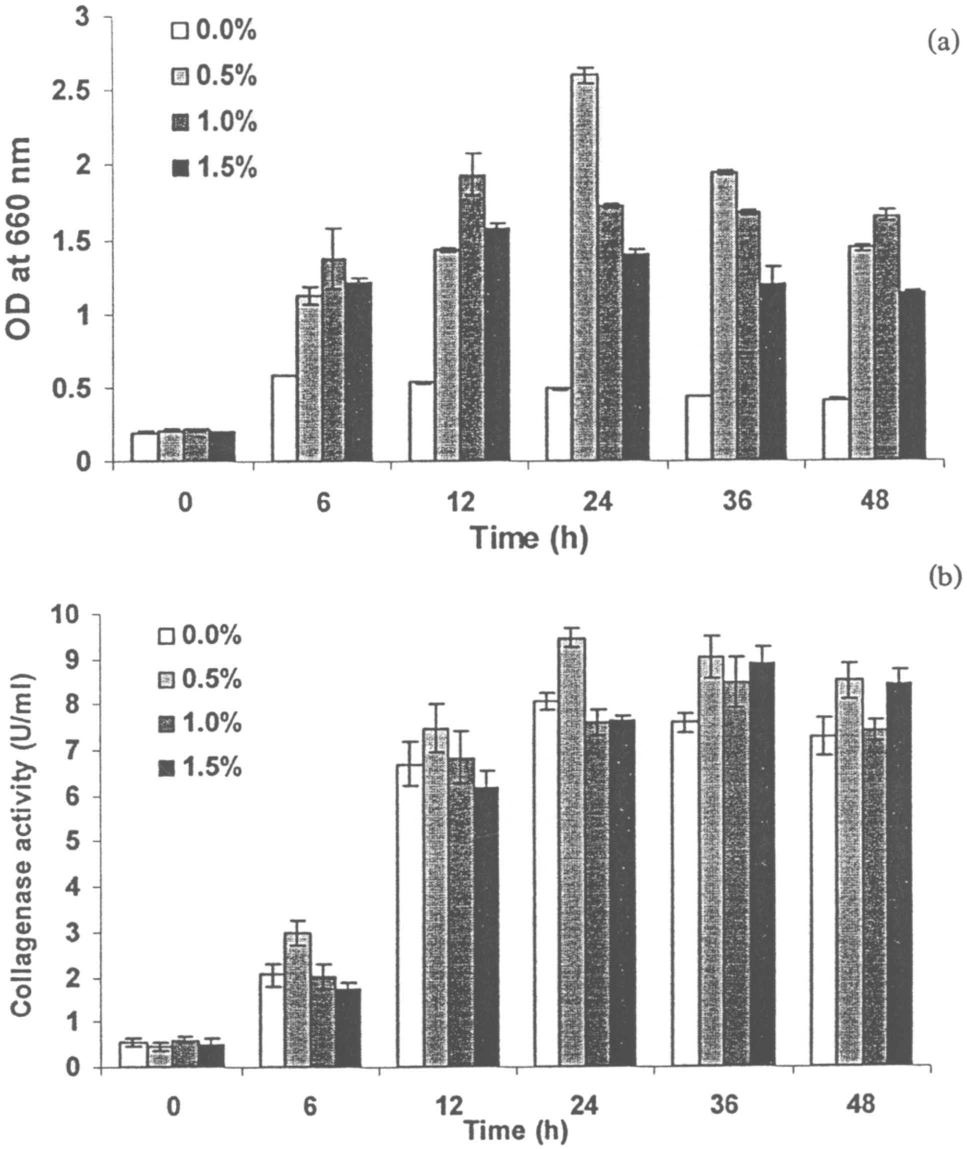

Figure 16. Effect of glycerol concentration on growth (a) and collagenase production (b) from CNL3 incubated at 37 °C.

จากอาหารที่มีพีเอชเป็นกลางจะวัดกิจกรรมที่พีเอช 7.5 และเชื้อ CNL3 ที่คัดแยกจากอาหารที่มีพีเอชเป็นกรด จะวัดกิจกรรมที่พีเอช 4.8 จากการศึกษาผลความเข้มข้นที่เหมาะสมของกลีเซอรอลสอดคล้องกับรายงานการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PseA ที่พบว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลร้อยละ 0.7 และมีการยับยั้งโดยกลีเซอรอล ซึ่งการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 0.7 และการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลีเซอรอลจนถึงร้อยละ 1.5 (Gupta and Khare, 2007)

2.5 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเจลาตินในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ใช้แหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก โปรตีน และองค์ประกอบของผนังเซลล์ โดยเอนไซม์โปรติเอสประกอบด้วยไนโตรเจนร้อยละ 15.6 และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะขึ้นอยู่กับแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Thumar and Singh, 2007) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส โดยศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเจลาตินต่อการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0.5-2.0 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.5 สำหรับเชื้อ CNA1 และ 6.0 สำหรับเชื้อ CNL3 และบ่มเชื้อทั้งสองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 17 และ Figure 18 พบว่าการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อ CNA1 สูงสุดหลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การเพิ่มความเข้มข้นของเจลาตินจากร้อยละ 0.5 เป็น 1.0 ทำให้การเติบโตของเชื้อ CNA1 และ CNL3 เพิ่มสูงขึ้น แต่การเติบโตจะลดต่ำลงเมื่อความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 1.5 และพบว่าการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อ CNA1 มีการผลิตสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ เจลาติน โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของเจลาตินร้อยละ 1.0ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเท่ากับ 20.99 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากที่ความเข้มข้นของเจลาตินร้อยละ 1.5 และ 2.0 มากนัก จึงเลือกความเข้มข้นของเจลาตินร้อยละ 1.0 ในการศึกษาต่อไป สำหรับเชื้อ CNL3 พบว่าการเติบโตและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อ CNA1 สูงสุดหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Figure 18) การเพิ่มความเข้มข้นของเจลาตินจากร้อยละ 0.5 เป็น 1.0 จะทำให้การเติบโตเพิ่มสูงขึ้น แต่การเติบโตจะลดต่ำลงเมื่อความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 1.5 และพบว่าการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 มีการผลิตสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเจลาตินเช่นเดียวกับเชื้อ CNA1 ที่ความเข้มข้นของเจลาตินร้อยละ 1.0 ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเท่ากับ 9.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเจลาตินเป็นร้อยละ 2.0 ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเท่ากับ 10.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อพิจารณาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า แต่กิจกรรมเอนไซม์คอลลาจิเนสเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่แตกต่างจากผลของความเข้มข้นของเจลาตินที่ร้อยละ 1.0 และ 1.5 มากนัก จึงเลือกความเข้มข้นของเจลาตินที่ต่ำกว่าแต่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงคือร้อยละ 1.0 ในการศึกษาต่อไปเช่นเดียวกับเชื้อ CNA1 นอกจากนี้ยังพบว่าการเติบโตของเชื้อ CNA1 และ CNL3 จะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของเจลาตินสูง เนื่องมาจากเมื่อความเข้มข้นของเจลาตินสูงจะมีผลต่อความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้การแพร่ของอากาศลดลง นอกจากนี้เชื้อยังสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงด้วย จากรายงานการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp.นอกจากนี้เชื้อยังสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงด้วย จากรายงานการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp.

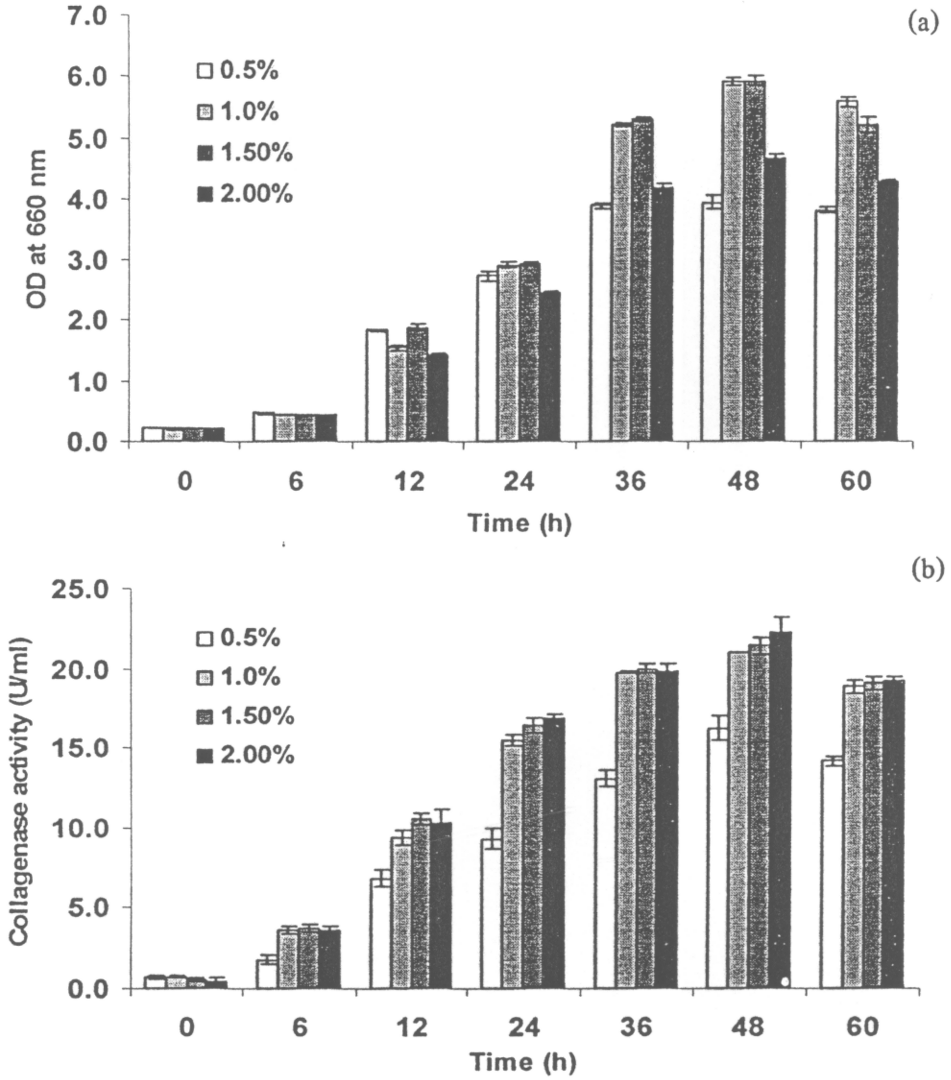

Figure 17. Effect of gelatin concentration on growth (a) and collagenase production (b) from CNA1 incubated at 37 °C.

โดยใช้เจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะสูงในช่วงความเข้มข้นของเจลาตินร้อยละ 0-2 (Patel *et al*., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Salinivibrio* genus ที่มีการผลิตสูงขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของเจลาตินจากร้อยละ 1 ถึง 2 (Lama *et al*., 2005) และจากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Streptomyces clavuligerus* Mit-1 พบว่าเจลาตินให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด โดยให้การผลิต 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 (Thumar and Singh, 2007) และจากงานวิจัยของ Patel และคณะ (2005) พบว่าเจลาตินเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เป็นตัวชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีสำหรับเชื้อ *Bacillus* sp.

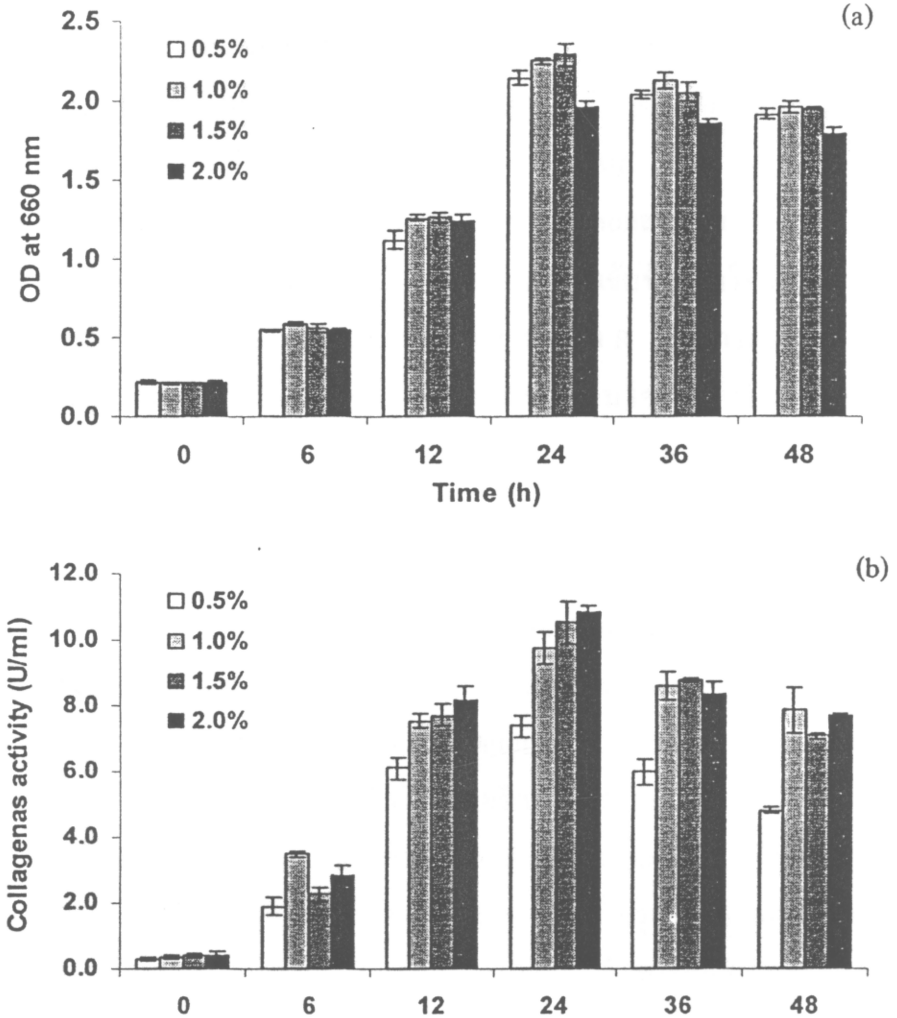

Figure 18. Effect of gelatin concentration on growth (a) and collagenase production (b) from CNL3 incubated at 37 °C.

3. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนส

ศึกษาสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ CNA1 และ CNL3 โดยนำสารละลายเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตได้ทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 และนำมาทดสอบสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนส

3.1 การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนส

การเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (H^+) การเปลี่ยนแปลงพีเอชจะมีผลต่อการแตกตัวของหมู่แขนงข้าง R ของกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณแอคทีฟของของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (พัชรา วีระกะลัส, 2543) การศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 โดยใช้สารละลายเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสในช่วงพีเอช 4–9 โดยใช้สารละลาย อะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ (พีเอช 4- 6) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15โมลาร์ (พีเอช 6-7) และทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15โมลาร์ (พีเอช 7-9) ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 19 จาก Figure 19a พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 ที่คัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเป็นกลางมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7ในสารละลายทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15โมลาร์ และพบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6-8 โดยมีกิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 73.9 ที่พีเอช 6 และร้อยละ 86.7 ที่พีเอช 8 ซึ่งค่าพีเอชจะมีผลต่อปริมาณของสับสเตรทที่อยู่ในรูปของไอออนที่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ เนื่องจากสับสเตรทอาจแตกตัวได้ ซึ่งเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่อยู่ในสภาพไอออนแบบใดแบบหนึ่งเท่านั้น (พัชรา วีระกะลัส, 2543) จากรายงานการทดลอง Nagano และ To (1999) ที่ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* FS-2 ที่คัดแยกได้จากน้ำปลา พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 9.0 จากผลการทดลองของ Kanayama และ Sakai (2005) ที่ศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Microbacterium liquefaciens* พบว่าช่วงของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสคือ พีเอช 5.5-7.0 และเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 40 เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง (พีเอช 9.0) สำหรับผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 ที่คัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเป็นกรด ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 6 ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ (Figure 19b) และเอนไซม์มีกิจกรรมสูงในช่วงพีเอชที่เป็นกรดระหว่างพีเอช 4-6 โดยกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสลดลงเหลือมากกว่าร้อยละ 90 ที่พีเอช 4 จากรายงานของ Kawahara และคณะ (1993) ที่ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus alvei* DC-1 ที่เลี้ยงใน

อาหารที่มีคอลลาเจนเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสมีกิจกรรมสูงในช่วงพีเอช 4.5 6.0 และ 7.0 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีพีเอชเป็นกรด จากรายงานของ Sela และคณะ (1998) ที่ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคอลลาเจนเป็นสับสเตรท พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสมีกิจกรรมสูงในช่วงพีเอช 5.4-8.2 และ 8.9-9.3 โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงร้อยละ 50 เมื่อพีเอชมีค่าต่ำกว่า 5.4 และช่วงพีเอช 9.4-10.2 ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส

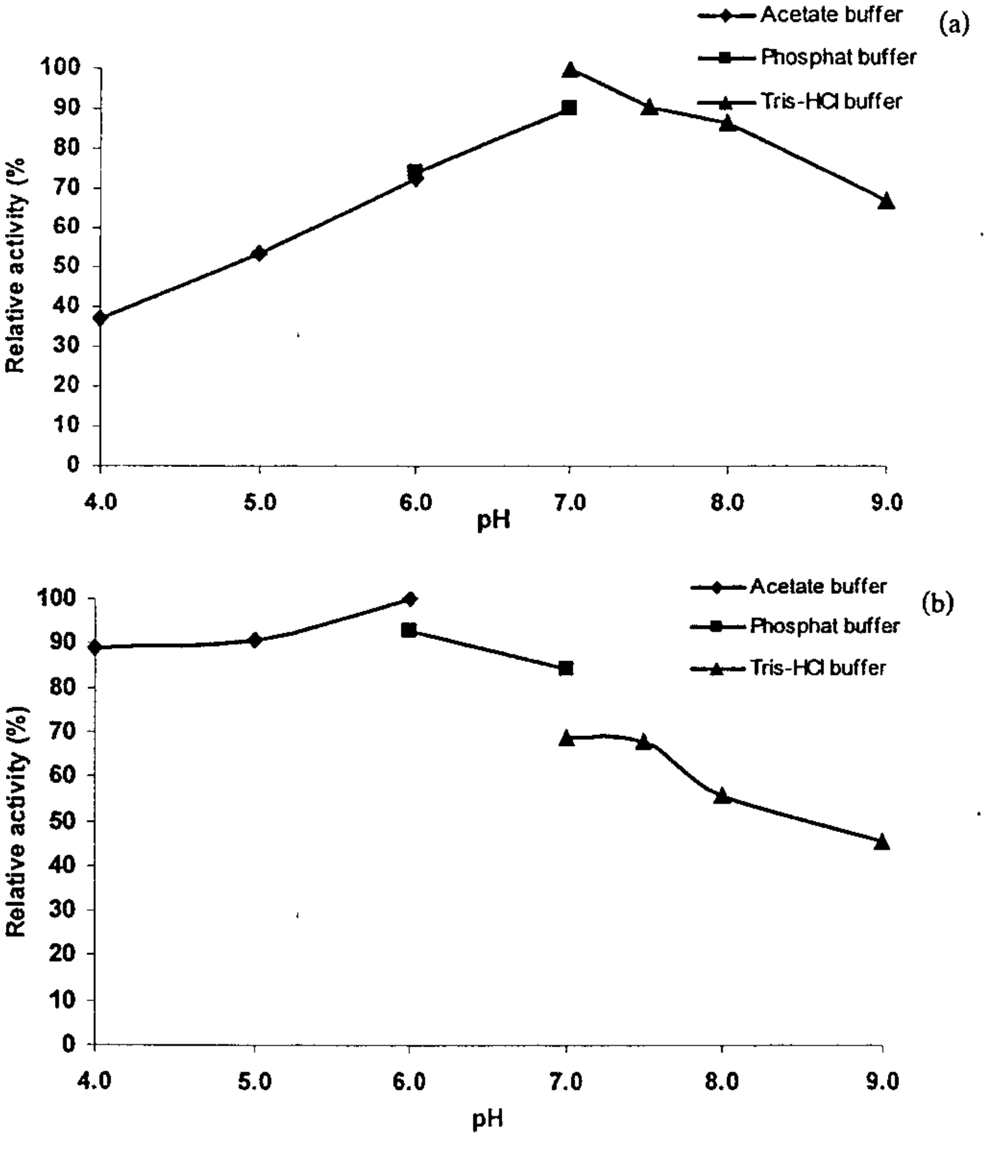

Figure 19. Effect of pH on activity of collagenase from CNA1 strain (a) and CNL3 strain (b) at 37 °C.

3.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนส

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 ในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 20 พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้กิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 เพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์คอลลาจิเนสสามารถจับกับสับสเตรท (เจลาติน) ได้มากขึ้น และพบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 มีกิจกรรมสูงในช่วงอุณหภูมิ 37-50 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และจากนั้นการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสจะลดลงเล็กน้อย โดยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมการทำงานสูงกว่าร้อยละ 90 ดังแสดงใน Figure 20a สำหรับการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงในช่วงอุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส โดยกิจกรรมเอนไซม์จะสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นและสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังแสดงใน Figure 20b และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจะลดลงเล็กน้อย โดยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมการทำงานเหลือสูงกว่าร้อยละ 95 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมการทำงานเหลือสูงกว่าร้อยละ 80 ซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ที่โมเลกุลของสารส่งผลให้เกิดการชนกันในปฏิกิริยาได้มากขึ้นต่อหน่วยเวลา สำหรับปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็เช่นกัน อย่างไรก็ตามเนื่องจากเอนไซม์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนและกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาจะเกิดเนื่องจากโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) เรียงตัวอย่างมีระเบียบในทิศทางที่จะต้องจับกับสับสเตรทที่บริเวณจับและบริเวณเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นหากเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์สูงเกินไป กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์ระดับตติยภูมิเป็นโครงสร้างที่ละเอียดอ่อนมาก โดยมีพันธะอ่อนที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์จำนวนมาก เมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาสูง จะทำให้โมเลกุลของสารปฏิกิริยามีพลังงานมากเกินไปจนทำให้โครงสร้างตติยภูมิของเอนไซม์เสียหาย (disrupt) มีผลให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติและสูญเสียกิจกรรมไป (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) ซึ่งผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คอลลา จิเนสจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 สอดคล้องกับรายงานของ Kanayama และ Sakai (2005) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Microbacterium liquefaciens* และพบว่าเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมการทำงานสูงในช่วงอุณหภูมิ 37-42 องศาเซลเซียส จากรายงานของ Nagano และ To (1999) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* FS-2 พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสมีกิจกรรมการทำงานสูงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Lama และคณะ(2005) ยังรายงานว่าเอนไซม์โปรติเอสที่มีกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงจากเชื้อ *Salinivibrio* genus มีกิจกรรมการ

ทำงานสูงที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับการศึกษาของ Joo และ Chang (2005) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. I-312 และพบว่าเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมการทำงานสูงที่อุณหภูมิสูงถึง 60-65 องศาเซลเซียส แต่กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส

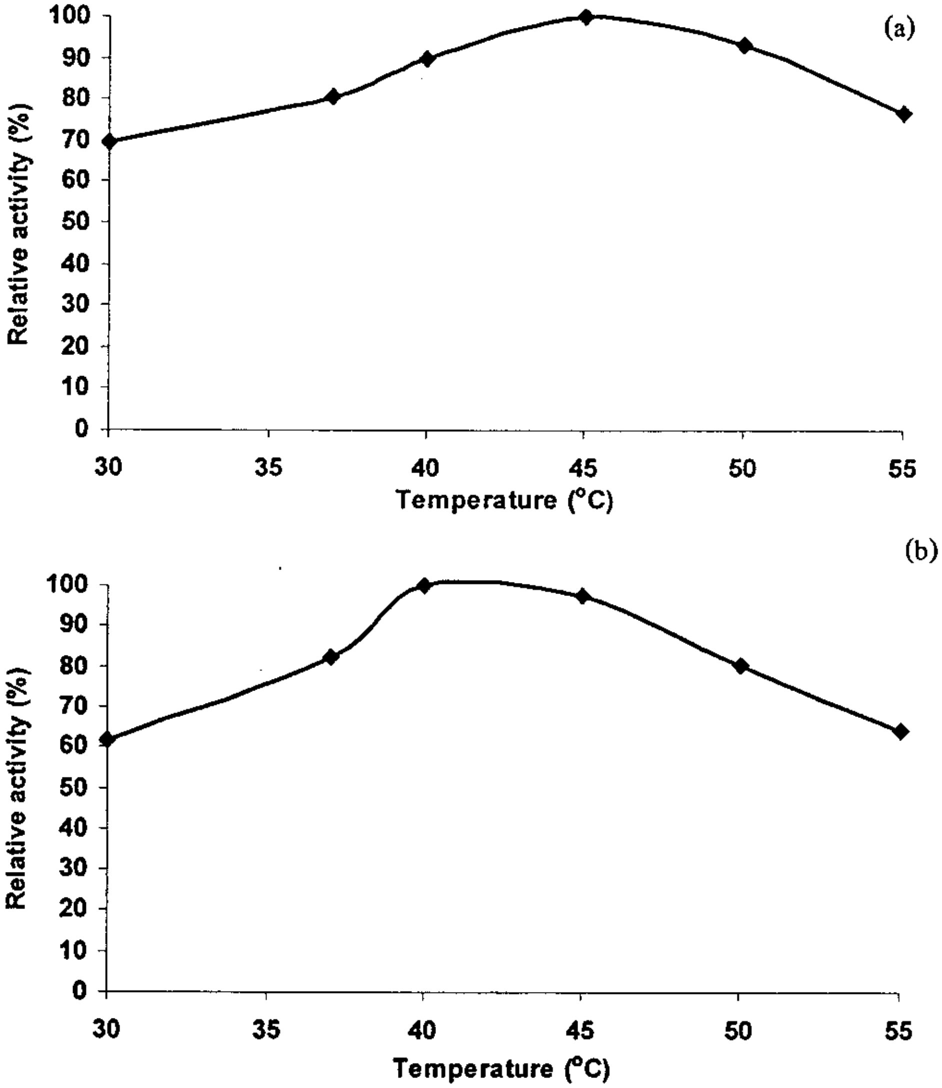

Figure 20. Effect of temperature on activity of collagenase from CNA1 strain (a) at pH 7.0 and CNL3 strain (b) at pH 6.0.

3.3 การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่พีเอชต่างๆ

จากผลการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 โดยบ่มสารละลายเอนไซม์คอลลาจิเนสในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4-9 ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่ 45 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่เหลือ จาก Figure 21a พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 ที่คัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเป็นกลางมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 6-8 โดยมีกิจกรรมที่เหลือสูงกว่าร้อยละ 80 ที่ช่วงพีเอชดังกล่าว เมื่อบ่มเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 4 หรือ 9 ความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจะลดลงเหลือเพียงร้อยละ 37.7 และร้อยละ 59.1 ตามลำดับ จาก Figure 21b พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 ที่คัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเป็นกรดมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 5-7 โดยมีกิจกรรมที่เหลือสูงกว่าร้อยละ 80 ในช่วงพีเอชดังกล่าว และพบว่าเมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4 และ 5 ความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจะลดลงเหลือร้อยละ 42.5 และร้อยละ 95.9 ตามลำดับ และเมื่อบ่มเอนไซม์คอลลาจิเนสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 9 ความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจะลดลงเหลือร้อยละ 41.5 พีเอชมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์โดยที่ค่าความเป็นกรดสูงกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน ซึ่งที่พีเอชต่ำหรือสูงเกินไปจะทำให้ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปและเสียสภาพ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์หรือการจับกับสับสเตรทลดลงด้วย จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 มีความคงตัวที่พีเอชต่ำได้สูงเอนไซม์จากเชื้อ CNA1 ซึ่งเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 ถือว่ามีศักยภาพในการประยุกต์ใช้สกัดคอลลาเจนในสภาวะที่เป็นกรดได้ ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนส สอดคล้องกับรายงานของ Kanayama และ Sakai (2005) ที่ศึกษาผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Microbacterium liquefaciens* และพบว่าเอนไซม์โปรติเอสมีความคงตัวในช่วงพีเอช 3-9 และรายจากงานของ Joo และ Chang (2005) ที่ศึกษาผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. I-312 พบว่าเอนไซม์ โปรติเอสมีความคงตัวในช่วงพีเอช 4.5-12 เมื่อบ่มไว้ 72 ชั่วโมง

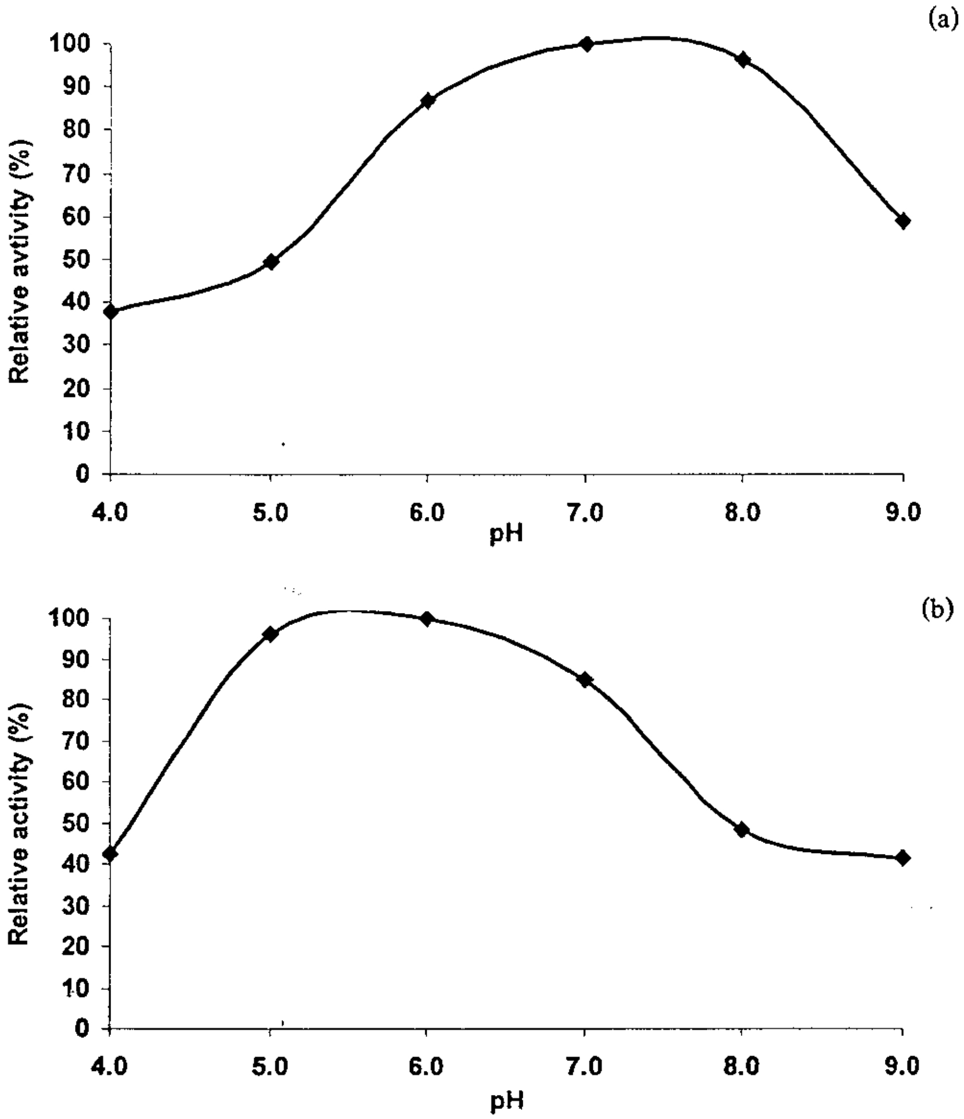

Figure 21. Effect of pH on stability of collagenase from CNA1 strain (a) and CNL3 strain (b).

3.4 การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่อุณหภูมิต่างๆ

การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 โดยบ่มในช่วงอุณหภูมิ 4-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่เหลือ ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 22a พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 4-40 องศาเซลเซียส โดยมีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่ามีกิจกรรมเหลืออยู่เพียงร้อยละ 28.6 จาก Figure 22b ที่แสดงความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ

CNL3 มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 4-37 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์มีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่ามีกิจกรรมเหลืออยู่เพียงร้อยละ 18.5 ความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในที่ที่มีอุณหภูมิสูง เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนเมื่อถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงจะทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนไป ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์หรือการจับกับสับสเตรทลดลง อีกทั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนจึงสามารถย่อยสลายตัวเองได้ (autolysis) (Kanayama and Sakai, 2005)

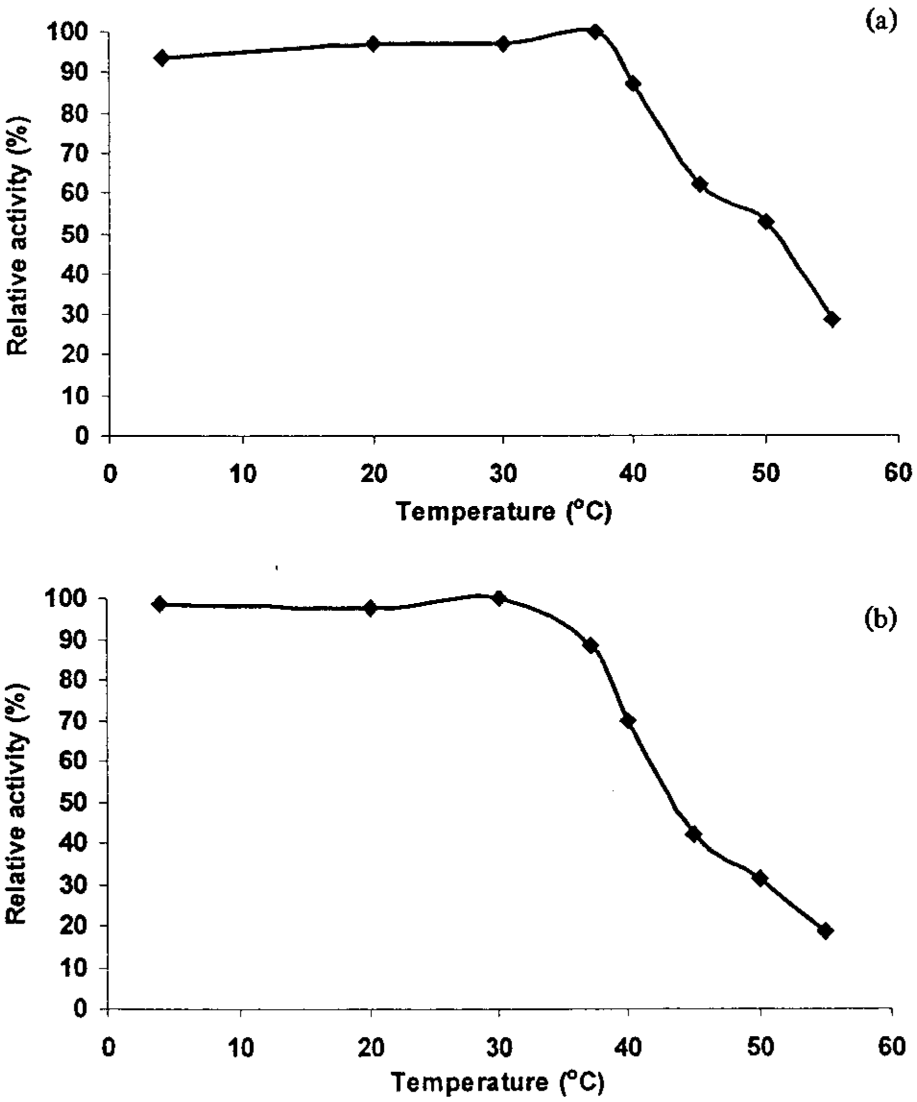

Figure 22. Effect of temperature on stability of collagenase from CNA1 strain (a) at pH 7.0 and CNL3 strain (b) at pH 6.0.

โดยเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 มีความคงตัวต่ออุณหภูมิใกล้เคียงกัน Gupta และคณะ (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. พบว่าเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมเหลืออยู่ร้อยละ 85 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมเหลืออยู่ร้อยละ 18 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Kanayama และ Sakai (2005) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Microbacterium liquefaciens* พบว่าเอนไซม์โปรติเอสมีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 60 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมหมด แต่เมื่อเก็บเอนไซม์ไว้ที่ -80 ถึง 0 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Nagano และ To (1999) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* FS-2 พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสมีกิจกรรมเหลือร้อยละ 15 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4. การประยุกต์ใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอน

4.1 การศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอน

จากการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอนโดยการใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 การใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และการใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสสกัดหลังจากการสกัดด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ผลการทดลองดังแสดงใน Table 7 พบว่าคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดทั้งสามวิธีมีลักษณะเป็น เจลใส ไม่ละลายน้ำ เมื่อนำไปทำแห้งเยือกแข็งพบว่าการสกัดโดยใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 ให้ผลผลิตคอลลาเจนร้อยละ 3.70 โดยน้ำหนักแห้ง และการสกัดโดยใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 ให้ผลผลิตคอลลาเจนร้อยละ 2.26 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งน้อยกว่าการสกัดโดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่ให้ผลผลิตคอลลาเจนร้อยละ 36.51 โดยน้ำหนักแห้ง ในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาที่ผ่านการสกัดด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ แล้วด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 ให้ผลผลิตคอลลาเจนทั้งหมดร้อยละ 54.56 โดยน้ำหนักแห้ง และ 53.93 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ การสกัดหนังปลาที่ผ่านการสกัดด้วยกรดโดยใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และเชื้อ CNL3 ให้ผลผลิตคอลลาเจนสูงกว่าการสกัดโดยใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และเชื้อ CNL3 เพียงอย่างเดียว เนื่องมาจากหนังปลาที่ผ่านการถูกย่อยด้วยกรดแล้วทำให้โครงสร้างหนังปลายุ่ยขึ้นและทำให้เอนไซม์คอลลาจิเนสสามารถย่อยหนังปลาได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 จะให้ผลผลิตคอลลาเจนสูงกว่าการ

สกัดโดยใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 มีความสามารถในการสกัดได้ดีกว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 จากรายงานการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอนโดยการใช้กรดและการใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน พบว่าการใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ให้ผลผลิตคอลลาเจนร้อยละ 33.8 โดยน้ำหนักเปียก และการใช้เอนไซม์เปปซินหลังจากการสกัดด้วยกรดแล้วให้ผลผลิตคอลลาเจนทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 59.2 โดยน้ำหนักเปียก (Aidos *et al.*, 1999) จากการรายงานการสกัดคอลลาเจนจากหนังของปลาตาโตโดยการใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ได้ผลผลิตร้อยละ 9 โดยน้ำหนักเปียก และการใช้เอนไซม์เปปซินหลังจากการใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอีกร้อยละ 4.7 โดยน้ำหนักเปียก (Jongjareonrak *et al.*, 2005) การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาคาร์พโดยการใช้เอนไซม์เปปซินหลังจากการสกัดด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ได้ผลผลิตร้อยละ 46.6 โดยน้ำหนักแห้ง (Zhang *et al.*, 2007) และการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา channel catfish โดยการใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ได้ผลผลิตร้อยละ 25.8 โดยน้ำหนักเปียก และการใช้เอนไซม์เปปซินหลังจากการใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ได้ผลผลิตร้อยละ 38.4 โดยน้ำหนักเปียก (Liu *et al.*, 2007)

Table 7. Total and yields of collagen by acid extraction and collagenase of CNA1 and CNL3 extraction.

Treatment	Collagen weight (mg, dry weight)	% (dry weight)
Collagenase from CNA1	41.3 (7.4)	3.70 (0.66)
Collagenase from CNL3	25.2 (6.5)	2.26 (0.58)
0.5 M Acetic acid	407.6	36.51
Collagenase from CNA1 after treating with 0.5 M Acetic acid	201.5 (20.1)	18.05 (1.73)
Collagenase from CNL3 after treating with 0.5 M Acetic acid	184.5 (15.4)	16.52 (1.38)

* In parentheses show control of collagen extraction in 0.15 M tris-HCl buffer and 0.15 M acetate buffer for collagenase of CNA1 and CNL3, respectively.

4.2 การศึกษาการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) ของคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอน

จากการศึกษาการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) ของคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอน Figure 23 แสดงรูปแบบของคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอนที่สกัดโดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และการใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับการใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 ที่เติมและไม่เติม β-mercaptoethanol (βME) การเติม βME เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) ระหว่างหรือภายในโมเลกุลซึ่งหากสายของโปรตีนถูกแยกออกเป็นสายสั้นแสดงถึงการมีพันธะไดซัลไฟด์เชื่อมประสานระหว่างสายโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งการมีพันธะไดซัลไฟด์อาจบอกถึงการมีกรดอะมิโนซิสเตอีนอยู่ภายในโมเลกุลและสามารถบ่งชี้ชนิดของคอลลาเจนได้ (Cheung *et al.*, 1983) ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 23 โดยแถบที่ 1 คือ MW protein markers แถบที่ 2 คือคอลลาเจนมาตรฐานชนิดที่ 1 จากหนังลูกวัว (Calf skin collagen type I) แถบที่ 3, 4 และ 5 คือคอลลาเจนที่สกัดโดยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ คอลลาเจนที่สกัดโดยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับการใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตจากเชื้อ CNA1 และคอลลาเจนที่สกัดโดยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับการใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตจากเชื้อ CNL3 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่ไม่เติม βME แถบที่ 6, 7 และ 8 คือคอลลาเจนที่สกัดโดยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ คอลลาเจนที่สกัดโดยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับการใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตจากเชื้อ CNA1 คอลลาเจนที่สกัดโดยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับการใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตจากเชื้อ CNL3 ภายใต้สภาวะที่เติม βME จากผลการทำ SDS-PAGE พบว่าเมื่อเติม βME ลงไป ลักษณะแถบที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างจากชุดที่ไม่เติม βME แสดงว่าคอลลาเจนที่สกัดจากทั้งสามชุดการทดลองไม่มีพันธะไดซัลไฟด์เชื่อมระหว่างสายของโมเลกุล ซึ่งอาจเนื่องมาจากไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนในโมเลกุล และพบว่าคอลลาเจนทั้งสามชุดการทดลองประกอบด้วยสายโซ่โพลีเปปไทด์ ซึ่งมี 2 สายที่มีลักษณะเหมือนกันโดยสายโซ่โพลีเปปไทด์ 2 สายที่มีลักษณะที่เหมือนกันเป็นชนิด α1 และอีกหนึ่งสายโซ่เป็น α2 ดังนั้นสายโซ่ α1 และสายโซ่ α2 เป็นองค์ประกอบหลักของคอลลาเจนทั้งสามชุดการทดลอง และพบว่าองค์ประกอบที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประกอบด้วย β-components ซึ่งเป็นสายคอลลาเจนสองสายเกิด cross-linked เป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งการเกิดโมเลกุลที่มี cross-linked จะมีเพิ่มสูงขึ้นตามอายุของสัตว์ (Foegeding *et al.*, 1996) จากผลการทดลองพบว่าแถบ α1 ของคอลลาเจนทั้งสามชุดการทดลอง จะมีความเข้มของแถบมากกว่าแถบ α2 อยู่สองเท่า ซึ่งการพบ แถบ α1 และแถบ α2 เช่นเดียวกับคอลลาเจนมาตรฐานชนิดที่ 1 (แถบที่ 2) จึงสรุปได้ว่าคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอน

เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Type I) ซึ่งคล้ายกับคอลลาเจนจากหนังของปลาตาหวาน (Jongjareonrak *et al.*, 2005) หนังปลา deep-sea redfish (Wang *et al.*, 2008) และหนังปลา channel catfish (Liu *et al.*, 2007) พบว่ามี 2 แถบคือ α1 และ α2 ซึ่งจำแนกได้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 Jongjareonrak และคณะ (2005) รายงานว่าการทำเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสของคอลลาเจนชนิดที่ 1 จะพบเพียงสาย α1 และสาย α2 เท่านั้น และไม่พบสาย α3 อาจเนื่องมาจากไม่สามารถแยกสาย α3 จากสาย α1 ได้จากการทำเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดด้วยกรดกับการสกัดด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนส พบว่าไม่แตกต่างกัน แต่การใช้เอนไซม์ร่วมกับการใช้กรดจะทำให้สามารถสกัดคอลลาเจนได้มากขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์สามารถย่อยพันธะภายในหนังปลาได้มากกว่าการย่อยด้วยกรดเพียงอย่างเดียว

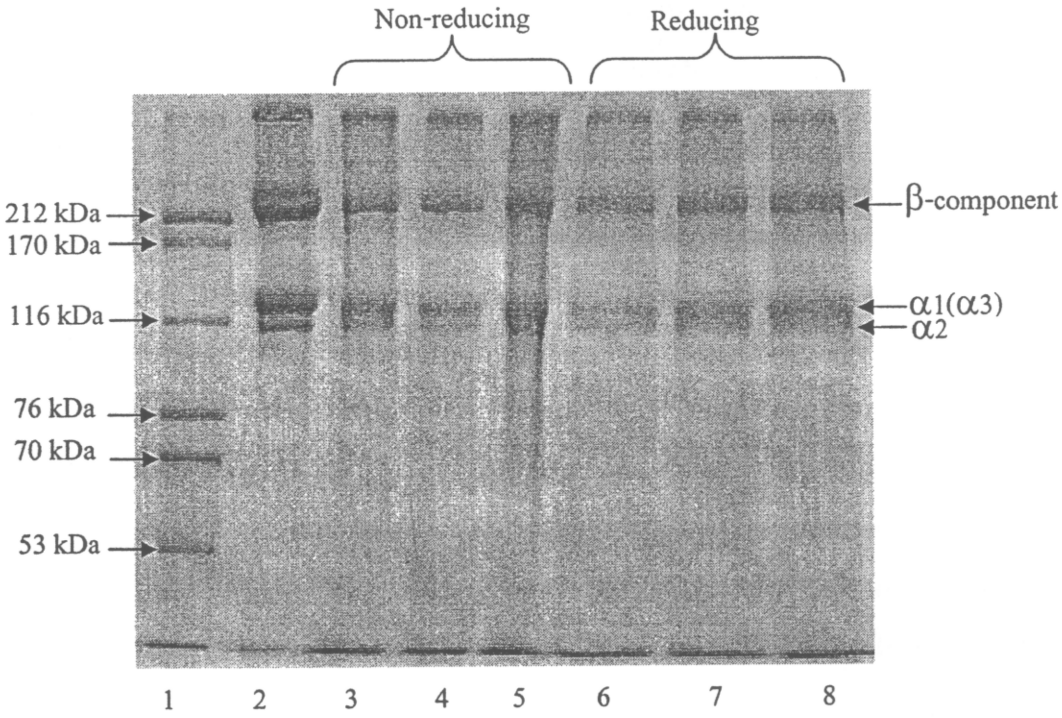

Figure 23. SDS PAGE pattern of collagen from salmon skin under reducing and non-reducing condition. Lane 1: high MW protein markers; lane 2: collagen type I; lane 3, 4 and 5: collagen from acid extraction, collagen from collagenase of CNA1 and collagen from collagenase of CNL3, respectively, under non-reducing condition; lane 6, 7 and 8: collagen from acid extraction, collagen from collagenase of CNA1 and collagen from collagenase of CNL3, respectively, under reducing condition.

บทที่ 4

บทสรุป

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากตัวอย่างดินรอบโรงงาน แปรรูปอาหารทะเล ดินรอบตลาดสดคลองเรียนที่มีการปนเปื้อนของเศษเหลือจากปลา และจากตัวอย่างอาหารหมักปลา เช่น น้ำปลาที่อยู่ระหว่างการหมัก ปลาส้ม ปลาร้า ปลาเป็นแคง ผลการทดลองจากการแยกในสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สภาวะ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 7.5 ซึ่งพบว่ามีเชื้อที่สามารถเติบโตได้ 124 ไอโซเลต และอีกสภาวะหนึ่ง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.8 พบเชื้อ 89 ไอโซเลยต สำหรับการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเชิงคุณภาพโดยดูการเกิดวงใส พบว่าในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอช 7.5 พบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้มีทั้งหมด 83 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 67 และในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.8 พบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสมีทั้งหมด 62 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 70 หลังจากนั้นทำศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเชิงปริมาณในอาหารเหลวพบว่าในสภาวะอาหารเหลวที่มีพีเอช 7.5 เชื้อ CNA1 ให้การเติบโตของเชื้อและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุด สำหรับในสภาวะอาหารเหลวที่มีพีเอช 4.8 พบว่าเชื้อ CNL3 ให้การเติบโตของเชื้อและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุด ในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสในสภาวะที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน พบว่าในสภาวะที่มีพีเอช 4.8 จะให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสและการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียต่ำกว่าในสภาวะที่มีพีเอช 7.5

เมื่อนำเชื้อ CNA1 และเชื้อ CNL3 ที่คัดเลือกได้มาบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA1 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง มีสปอร์ และสามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลสได้ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ CNL3 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลา เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง และสามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลสได้ จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าเชื้อ CNA1 คือเชื้อ *Bacillus cereus* ซึ่งมีความเหมือน (identities) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ CNL3 คือเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งมีความเหมือน (identities) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 ที่คัดเลือกได้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสคือ การใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร และเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.0 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.5

และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับพบว่าสภาวะที่เหมาะสมการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 ที่คัดเลือกได้คือ การใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อนำเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 มาทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนส พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 มีกิจกรรมการทำงานที่เหมาะสมที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 มีกิจกรรมการทำงานที่เหมาะสมที่พีเอช 6 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อทำการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนส พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 มีความคงตัวในช่วงพีเอช 6-8 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 มีความคงตัวในช่วงพีเอช 5-7 และมีความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอนโดยการใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 การใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และการใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสสกัดหลังจากการสกัดด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ผลการทดลองพบว่าคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดทั้งสามวิธีมีลักษณะเป็น เจลใส ไม่ละลายน้ำ เมื่อทำแห้งเยือกแข็งพบว่าการสกัดโดยใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 ให้ผลผลิตคอลลาเจนร้อยละ 3.70 โดยน้ำหนักแห้ง และการสกัดโดยใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNL3 ให้ผลผลิตคอลลาเจนร้อยละ 2.26 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งน้อยกว่าการสกัดโดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่ให้ผลผลิตคอลลาเจนร้อยละ 36.51โดยน้ำหนักแห้ง ในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาที่ผ่านการสกัดด้วยกรด อะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 และ CNL3 ให้ผลผลิตคอลลาเจนทั้งหมดร้อยละ 54.56 โดยน้ำหนักแห้ง และ 53.93 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

จากการศึกษาการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) ของคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอน พบว่าคอลลาเจนที่สกัดจากทั้งสามชุดการทดลองไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุล ซึ่งไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนในโมเลกุล และพบว่าคอลลาเจนทั้งสามชุดการทดลองประกอบด้วย สายโซ่ $\alpha1$ และสายโซ่ $\alpha2$ และโมเลกุลใหญ่ประกอบด้วย β-components ซึ่งมีลักษณะแถบเหมือนกับคอลลาเจนมาตรฐานชนิดที่ 1 จึงสรุปได้ว่าคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอนเป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1

เอกสารอ้างอิง

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัชรา วีระกะลัส. 2543. เอนไซม์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2549. การค้าระหว่างไทย-ชิลี (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.oae.go.th/CountryProfile/datamarch49/chile.htm (20 กรกฎาคม 2550)

สิทธิพงศ์ นลินานนท์. 2549. การใช้เปปซินในการสกัดคอลลาเจนและเจลาตินจากหนังปลาตาหวาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อนงนาฏ ไพนุพงศ์. 2541. การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. PS719 ซึ่งเติบโตได้ดีในสภาวะด่างและอุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Aidos, I., Lie, O. and Espe, M. 1999. Collagen content in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J. Agric. Food. Chem. 47: 1440-1444.

Arnesen, J. A., and Gildberg, A. 2007. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. Bioresour. Technol. 98: 53–57.

Beg, Q. K. and Gupta, R. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. Enzyme Microb. Technol. 32: 294–304.

Bhaskar, N., Sudeepa, E. S., Rashmi, H. N. and Selvi, A. T. 2007. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. Bioresour. Technol. 98: 2758–2764.

Burghagen, M. 1999. Collagen. *In* Food chemistry. 2rd ed. (Belitz, H.D. and Grosch, W., eds.). pp. 540-547. Springer-verlag, Berlin.

Cheung, D. T., Dicesare, P., Benya, P. D., Libaw,E. and Nimni, M. E. 1983. The presence of intermolecular disulfide cross-links in type III collagen. J. Biol. Chem. 258: 7774-7778.

Chi, Z., Ma, C., Wang, P. and Li, H. F. 2007. Optimization of medium and cultivation conditions for alkalineprotease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. Bioresour. Technol. 98: 534–538.

Ferrero, M. A., Castro, G. R., Abate, C. M., Baigoro, M. D. and Sineriz, F. 1996. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. Appl. Microb. Biotechnol. 45: 327-332.

Foegeding, E. A., Lanier, T. C. and Hutin, H. O. 1996. Characteristic of Edible Muscle Tissues. *In* Food Chemistry. 3rd ed. (Fennema, O.R., ed.). pp. 902-906. Marcel Dekker. Newyork.

Gupta, A. and Khare, S.K. 2007. Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. Enzyme Microb. Technol. 42: 11-16.

Gupta, A., Roy, I., Patel, R. K., Singh, S. P., Khare, S. K. and Gupta, M. N. 2005. One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. J. Chromatogr. A. 1075: 103–108.

Harrington, D.J. 1996. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. Infect. Immun. 64: 1885–1891.

Hwang, J. H., Mizuta, S., Yokoyama, Y. and Yoshinaka, R. 2007. Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenojei*). Food Chem. 100: 921-925.

Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. and Tanaka, M. 2005. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). Food Chem. 93: 475–484.

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

Kanayama, Y. and Sakai, Y. 2005. Purification and properties of a new type of protease produced by *Microbacterium liquefaciens*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 916-921.

Kawahara, H., Kusumoto, M. and Obata, H. 1993. Isolation and characterization of a new type of collagenase producing bacterium, *Bacillus alvei* DC-1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57: 1372-1373.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. and Tanaka, M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). Food Chem. 89: 363–372.

Labadie, J. 1982. Isolation of a collagenolytic gram negative yellow pigmented bacterium. Agric. Biol. Chem. 46: 2903-2907.

Lama, L., Romano, I., Calandrelli, V., Nicolaus, B. and Gambacorta, A. 2005. Purification and characterization of a protease produced by an aerobic haloalkaliphilic species belonging to the *Salinivibrio* genus. Research Microb. 156: 478–484.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680–685.

Laxman, R. S., Sonawane , A. P., More, S. V., Rao, B. S., Rele, M. V., Jogdand , V. V., Deshpande, V. V. and Rao, M.B. 2005.Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. Process Biochem. 40: 3152–3158.

Liu, H. Y., Li, L. D. and Guo, S. D. 2007. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctaus*). Food Chem. 101: 621-625.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. T. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 262-275.

Lund, T. and Granum, P. E. 1999. The 105-kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity. FEMS Microb. Letters. 178: 355-361.

Matsushita, O., Jung, C. M., Katayama, S., Minami, J., Takahashi, Y. and Okabe, A. 1999. Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*. J. Bacteriol. 181: 923–933.

Medina, P. and Baresi, L. 2007. Rapid identification of gelatin and casein hydrolysis using TCA. J. Microb. Meth. 69: 391–393.

Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, A. and Shigematsu, T. 2002. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. Process Biochem. 37: 1403–1412.

Nagai, T., Araki, Y. and Suzuki, N. 2002. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). Food Chem. 78: 173–177.

Nagai, T. and Suzuki, N. 2000. Isolation of collagen from fish waste material- skin, bone and fins. Food Chem. 68: 277–281.

Nagano, H. and To, K. A. 1999. Purification of collagenase and specificity of its releated enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 181-183.

Nakayama, T., Tsuruoka, N., Akai, M. and Nishino, T. 2000. Thermostable collagenolytic activity of a novel thermophilic isolate, *Bacillus* sp. strain NTAP- 1. J. Biosci. Bioeng. 89: 612-614.

Nilegaonkar, S. S., Zambare, V. P., Kanekar, P. P., Dhakephalkar, P. K. and Sarnaik, S. S. 2007. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. Bioresour. Technol. 98: 1238 – 1245.

Okamoto, M., Yonejima, Y., Tsujimoto, Y., Suzuki, Y. and Watanabe, K. 2001. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO-1. Appl. Microb. Biotechnol. 57: 103–108.

Patel, R., Dodia, M. and Singh, S. P. 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. Process Biochem. 40: 3569–3575.

Petrova, D., Derekova, A. and Vlahov, S. 2006. Purification and properties of individual collagenases from *Streptomyces* sp. strain 3B. Folia Microbiol. 51: 93-98.

Russell, J. B., Sharp, W. M. and Baldwin, R. L. 1979. The effect of pH on maximum bacterial growth rate and its possible role as a determinant of bacterial competition in the rumen. J.Anim. Sci. 48: 251-255.

Sela, S., Schickler, H., Chet, I. and Spiegel, Y. 1998. Purification and characterization of a *Bacillus cereus* collagenolytic/proteolytic enzyme and its effect on *Meloidogyne javanica* cuticular proteins. Eur. J. Plant Pathol. 104: 59-67.

Sharmin, S., Hossain, Md. T. and Anwar, M. N. 2005. Isolation and characterization of protease producing bacteria *Bacillus amovivorus* and optimization of some factors of culture conditions for protease production. J. Biol. Sci. 5: 358-362.

Shehri, A. S., Abdulrahman, M. and Yasser, M. S. 2004. Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheiformis* isolated from Tihamet Aseer, Saudi Arabia. J. Biol.Sci. 7: 1631-1635.

Suzuki, Y., Tsujimoto, Y., Matsui, H. and Watanabe, K. 2006. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. J. Biosci. Bioeng. 102: 73–81.

Teresa Thiel. 1999. Department of Biology. University of Missouri. St. Louis. (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.umsl.edu/~microbes/pdf/introductiontobacteria.pdf (10 มิถุนายน 2552)

Thumar, J. T. and Singh, S. P. 2007. Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain MIT-1. Braz. J. microbiol. 38: 766-772.

Tondo, E. C., Lakus, F. R., Oliveira, F. A. and Brandelli, A. 2004. Identification of heart stable protease of *Klebsiella Oxytoca* isolated from raw milk. Lett. Appl. Microbiol. 38: 146-150.

Tran, L. H. and Nagano, H. 2002. Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. J. Food Sci. 67: 1184-1187.

Tsuruoka, N., Nakayama, T., Ashida, M., Hemmi, H., Nakao, M., Minakata, H., Oyama, H., Oda, K. and Nishinol, T. 2003. Collagenolytic Serine-Carboxyl Proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* Strain NTAP-1: Purification, Characterization, Gene Cloning, and Heterologous Expression. Appl. Environ. Microb. 69:162–169.

Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L. and Hu, Q. 2008. Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). Food Chem. 108: 616-623.

Ward, O. P. 1983. Proteinase. In Microbial enzymes and biotechnology (ed. W.M. Fogarty). pp 251-31. London Appiled Science Publishers.

Watanabe, K. 2004. Collagenolytic proteases from bacteria. Appl. Microb. Biotechnol. 63: 520–526.

Zhang, Y., Liu, W., Li, G., Shi, B., Miao, Y. and Wu, X. 2007. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Food Chem. 103: 906-912.

Zhang, Z. K., Li, G. Y. and Shi, B. 2006. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. J. Soc. Leather Technol. Chem. 90: 23–28.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและการเตรียมสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

ดัดแปลงจาก Tran and Nagano, 2002 ประกอบด้วย

- Glucose	5.0 กรัม
- Yeast extract	1.0 กรัม
- K_2HPO_4	7.0 กรัม
- KH_2PO_4	2.0 กรัม
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.10 กรัม
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.10 กรัม
- Gelatin	15.0 กรัม
- Agar	15.0 กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1 ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.5 แต่ไม่เติมวุ้นจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

หมายเหตุ : การคัดแยกเชื้อในสภาวะที่เป็นกรดจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.8

3. สารละลายบัฟเฟอร์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ (acetate buffer) เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการคือ 4.0, 5.0 และ 6.0

- สารละลาย A : 0.15 โมลาร์ sodium acetate (ละลาย CH_3COONa 2.46 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

- สารละลาย B : 0.15 โมลาร์ acetic acid (ผสม CH_3COOH เข้มข้น ปริมาตร 1.725 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

3.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการคือ 6.0 และ 7.0

- สารละลาย A : 150 0.15 โมลาร์ monobasic sodium phosphate (ละลาย $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 4.68 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

- สารละลาย B : 0.15 โมลาร์ dibasic sodium phosphate (ละลาย $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 8.055 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

3.3 สารละลายทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) 0.15 โมลาร์ เตรียมได้โดยชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride 18.171 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ตามค่าพีเอชที่ต้องการคือ 6.0 และ 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร

4. จุดอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต

Final concentration of ammonium sulphate % saturation

Initial concentration of ammonium sulphate % saturation

	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
	Grams solid ammonium sulphate to be added to 1.0 L of solution																
0	56	113	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	622	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	618
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30					19	30	62	94	127	162	198	265	273	314	356	449	516
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
50										33	66	101	137	176	214	302	392
55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314
65													34	70	107	109	275
70														35	72	153	237
75															36	115	198
80																77	157
90																	79

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เจลาติน (Gelatin)
- Tris-HCl
- แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- นินไฮดริน (Ninhydrin)
- ไกลซีน

วิธีเตรียมสารเคมี

ก. เตรียม Tris-HCl พีเอช 7.5 เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์

ข. เตรียมสารละลายนินไฮดริน โดยชั่งนินไฮดริน 0.35 กรัม ละลายในเอทานอลร้อยละ 95 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1.1 วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของไกลซีน

ก. เตรียมสารละลายไกลซีนให้มีความเข้มข้น 200, 250, 300 และ 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ข. นำสารละลายไกลซีนจากข้อ ก. มา 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ใช้แบล็งค์เป็นบัฟเฟอร์ (buffer))

ค. เติมเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 0.2 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร

ง. เติม Tris-HCl พีเอช 7.5 เข้มข้น 0.15 โมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.012 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

จ. นำสารผสมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ฉ. หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที

ช. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร

ซ. เติมสารละลายนินไฮดรินปริมาตร 0.36 มิลลิลิตร นำไปต้มนาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร

1.2 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

นำตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ ที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้วเจือจางให้เหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมเช่นเดียวกับข้อ 1.1

(ชุดควบคุมเติมตัวอย่างเอนไซม์และเติมกรดไฮโดรคลอริกก่อนเติมเจลาติน และ Tris-HCl นำไปบ่มเช่นเดียวกัน) แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไกลซีน

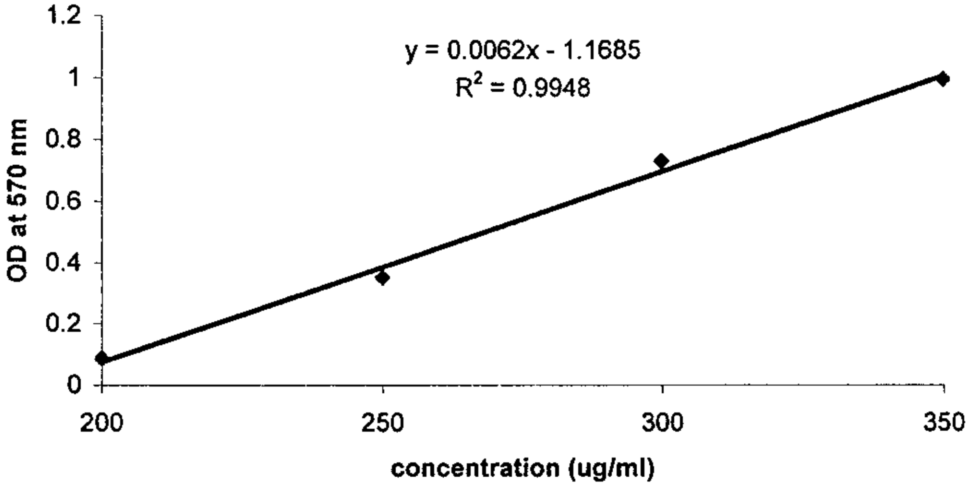

Figure 24. Standard curve of glycine at 750 nm.

1 หน่วยของเอนไซม์ย่อยโปรตีน หมายถึง กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนได้เป็นกรดอะมิโนไกลซีน ปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

หมายเหตุ : ในสภาวะที่เป็นกรด ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส โดยนำตัวอย่างเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร เติมเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 0.2 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติม Tris-HCl พีเอช 4.8 เข้มข้น 0.15 โมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.012 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หากิจกรรมเช่นเดียวกับข้อ 1.1

2. การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด โดยใช้ Folin – Ciocalteau reagent (Lowry, 1951)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
- คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)
- โฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ (Folin – Ciocalteau reagent)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)

วิธีเตรียมสารเคมี

ก. เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N

ข. เตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตร้อยละ 0.5 ในสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตร้อยละ 1

ค. เตรียมสารละลาย Alkali copper โดยผสมสารละลายในข้อ ก. 50 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ ข. 1 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)

ง. เตรียมสารละลาย Folin – Ciocalteau reagent โดยเจือจางโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์กับน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 (เตรียมก่อนใช้)

วิธีการวิเคราะห์

2.1 วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

ก. เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin ให้มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร

ข. ปิเปตสารละลายในข้อ ก. มาความเข้มข้นละ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (blankใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร แทน)

ค. เติมสารละลาย alkali copper ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ง. เติมสารละลาย Folin – Ciocalteau reagent ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

จ. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ฉ. นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณโปรตีน และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

2.2 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับข้อ 2.1

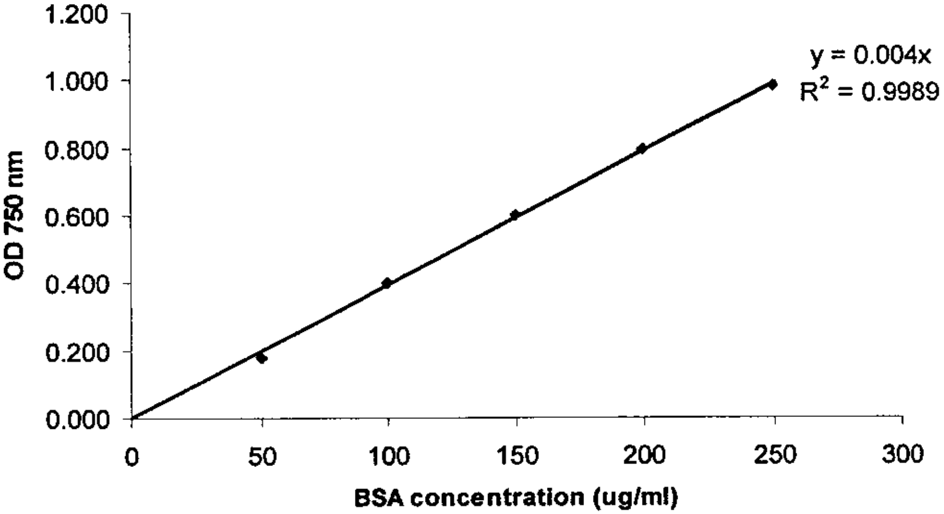

Figure 25. Standard curve of protein at 750 nm.

ผลการพิสูจน์เชื้อแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ โดยการทำ DNA sequencing 16s 500 base pairs ของเชื้อสายพันธุ์ CNA1

```
gb|EU557028.1|  Bacillus cereus strain KU206-3 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1429

 Score = 1109 bits (600),  Expect = 0.0
 Identities = 600/600 (100%), Gaps = 0/600 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    TTAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  31   TTAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC  90

Query  61   CATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  91   CATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCA  150

Query  121  TGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  151  TGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAG  210

Query  181  CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  211  CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT  270

Query  241  CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  271  CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT  330

Query  301  TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  331  TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTC  390

Query  361  GTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  391  GTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGT  450

Query  421  ACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  451  ACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA  510

Query  481  AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTG  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  511  AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTG  570

Query  541  AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  571  AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG  630
```

ผลการพิสูจน์เชื้อแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ โดยการทำ DNA sequencing 16s 500 base pairs ของเชื้อสายพันธุ์ CNL3

```
gb|AY918489.1|  Klebsiella pneumoniae strain 1.3T 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1114

 Score = 1109 bits (600),  Expect = 0.0
 Identities = 600/600 (100%), Gaps = 0/600 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    AGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  19   AGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATG  78

Query  61   GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGTGG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  79   GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGTGG  138

Query  121  GGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  139  GGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGT  198

Query  181  AACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  199  AACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAA  258

Query  241  CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  259  CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC  318

Query  301  AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  319  AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCA  378

Query  361  GCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  379  GCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC  438

Query  421  ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  439  ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT  498

Query  481  TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCA  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  499  TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCA  558

Query  541  ACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCA  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  559  ACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCA  618
```

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวเบญจมาส เชียรศิลป์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Benjamas Cheirsilp

หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
โทรศัพท์ (074) 286374 โทรสาร (074) 446727
E-mail: benjamas.che@psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.	วุฒิปริญญา	สาขาวิชา	สถาบัน
2546	Ph.D	Biotechnology Engineering	Osaka University Japan
2542	M.Eng.	Biotechnology Engineering	Osaka University Japan
2540	B.Eng.	Chemical Engineering	Tohoku University Japan

บทความวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Shibasaki-Kitakawa, N., **Cheirsilp, B.**, Iwamura, K., Kushibiki, M., Kitakawa, A. and Yonemoto, T. (1998) Kinetic model for oligosaccharide hydrolysis using suspended and immobilized enzymes. Biochem. Eng. J. 1(3): 201-209

Cheirsilp, B., Shimizu, H. and Shioya, S. (2001) Modelling and optimization of environmental conditions for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:639-646. (Included in docter thesis)

Cheirsilp, B., Shimizu, H. and Shioya, S. (2003) Enhanced kefiran production of *Lactobacillus kefiranofaciens* by mixed culture with *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. 100(1): 43-53. (Included in docter thesis)

Cheirsilp, B., Shoji, H., Shimizu, H. and Shioya, S. (2003) Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture of kefiran production. J. Biosci. Bioeng. 96 (3): 279-284. (Included in docter thesis)

Cheirsilp, B. (2006) Simulation of kefiran production of *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM6985 in fed-batch reactor. Songklanakarin J. Sci. Technol. 28(5): 1059-1069.

Cheirsilp, B., Shimizu, H. and Shioya, S. (2007) Kinetic modeling of kefiran production in mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochem. 42: 570-579.

Cheirsilp, B., Kaewthong, W. and H-Kittikun, A. (2007) Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase. Biochem. Eng. J. 35(1): 71-80.

Cheirsilp, B. and H-Kittikun, A. (2007) A mathematical model approach to a glycerolysis reaction for monoacylglycerol production. WIT Transactions on Modelling and Simulation 46: 225-232.

Yeesang, C., Chanthachum, S. and **Cheirsilp, B.** (2008) Sago starch as a low-cost carbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. World J. Microbiol. Biotechnol. 24(7): 1195-1201.

Cheirsilp, B. and Umsakul, K. (2008) Processing of banana-based wine product using pectinase and α-amylase. J. Food Process Eng. 31: 78-90.

H-Kittikun, A., Kaewthong, W. and **Cheirsilp, B.** (2008) Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized Lipase PS. Biochem. Eng. J. 40: 116-120.

Cheirsilp, B., H-Kittikun, A. and Limkatanyu, S. (2008) Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. Biochem. Eng. J. 42: 261–269.

บทความวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ

Shioya, S., **Cheirsilp, B.**, Egawa, S., Wardani, A.K., Nagahisa, K., Tada, S., Katakura, K. and Shimizu, H. (2004) Useful substance production with symbiotic cultivation of lactic acid bacterium and yeast. Seibutsu-kogaku Kaishi. 82(9): 438-439. (Japanese)

Cheirsilp, B., Charoenwong, C. and Kittiprechakul, A. (2004-2005) Production of glucose syrup from sago starch by hydrolysis with mixed enzymes: amylase and glucoamylase. Annual Report of ICBiotech. 27: 699-704.

Shimizu, H., **Cheirsilp, B.**, and Shioya, S. (2005) Development of co-culture systems of lactic acid bacteria and yeasts for bioproduction. Japanese J. Lactic Acid Bacteria. 16 (1): 2-10.

Cheirsilp, B. (2006) Study on interaction of two microorganisms in mixed culture for kefiran fermentation by model analysis. Thai J. Biotechnol. 7(1): 52-59.

Jeamjounkhaw, P., H-Kittikun, A. and **Cheirsilp, B.** (2007) Optimization of lipase entrapment in alginate gel bead for palm olein hydrolysis. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29 (Suppl. 2): 261-267. (Thai)

Cheirsilp, B. and H-Kittikun, A. (2008) Synthesis of fatty acid alkyl esters from palm olein using immobilized lipase. Thai J. Biotechnol. 8(1): 134-142.

Cheirsilp, B., Siengoon, S. and Pratumma, A. (2008) Maltodextrins production from native rice flour using enzymatic and acid hydrolysis. Thai J. Biotechnol. 8(1): 55-59.

ชื่อ สกุล นางสาววริญดา สุภัทรประทีป

ประวัติการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี-ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Suphatharaprateep, W., Cheirsilp, B. and Jongjareonrak, A. 2008. Screening and Characterization of Collagenase producing Bacterium from Fermented Fish and Soil. Oral presentation at The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. TSB 2008: Biotechnology for Global Care. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. 14th-17th October 2008. pp. 166-172.