รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การตรวจสอบเอนไซม์ Peroxidase ในจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนสูง

โดย

อมรรัตน์ พงศ์ดารา
พรรณี อัศวตรีรัตนกุล

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุน
จาก
เงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์
ม.สงขลานครินทร์
ประจำปี 2534

สมอ
QR201.B
34
อ44
2535

#113259

บทคัดย่อ

ได้เก็บตัวอย่างจากบ่อน้ำร้อน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง มาทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 50°C ปรากฏว่าได้จุลินทรีย์ 22 ประเภทที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิดังกล่าว และในจำนวนนี้ก็มีอยู่ 2 ประเภทที่มี activity ของเอนไซม์ peroxidase สูง

เอนไซม์ - จิรัม
จุลินทรีย์ - จิรัม

สนอ
เลขหมู่ QR201.B34 044 2535
เลขทะเบียน 016943
14 ธ.ค. 2535

บทนำ

Peroxidase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกริยา oxidation ของสารประกอบพวกอะโรมาติกวงแหวนใหญ่ซึ่งได้แก่ phenol, hydroquinones และ hydroquidniod amines โดยเฉพาะอนุพันธ์ของ benzidine จัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญและมีความต้องการใช้อย่างมากทั้งในวงการอุตสาหกรรมและทางการแพทย์

ได้มีการสกัดเอนไซม์ peroxidase จากจุลินทรีย์ต่างๆเช่น *Psudomonas fluorescent*, *Streptococus faccalis*, *Escherichia coli*, *Halobacterium halobium*, *Rhodoseudomonas cupsulata*, *Pelliculalis filamentosa* และ *Saccharomyses cerivisiae* ได้สำเร็จ แต่ปรากฏว่ายังไม่ค่อยมีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์นี้ที่สามารถทนความร้อนได้สูง เป็นที่ทราบกันดีว่า จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงๆ สามารถปรับสภาพตัวเองให้อยู่ได้ และเอนไซม์ที่มีอยู่ในจุลินทรีย์ซึ่งเกี่ยวพันกับความอยู่รอดก็น่าจะสามารถทนความร้อนที่สูงได้ด้วย ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะแยกเชื้อจากน้ำพุร้อน ในบริเวณจังหวัดพัทลุง ซึ่งมีอุณหภูมิโดยเฉลี่ย 55°C และนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบว่ามีเอนไซม์ Peroxidase หรือไม่

วิธีดำเนินการวิจัย

1. *อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี*

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Luria-Bertani) มีส่วนประกอบคือ Yeast extract peptone 10%, NaCl 10% และ agar 2%

1.2 สารละลายบัฟเฟอร์

0.1 M sodium phosphate buffer pH 7

0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.4

1.3 สารละลายสำหรับหาปฏิกิริยาของเอนไซม์ peroxidase

0.5 % o- dianisidine

10% H_2O_2

1.4 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน

Alkaline cupper solution ประกอบด้วย 3% $NaCO_3$ และ 0.5% $CuSO_4$

50% Fobin ciocalteau's reagent (B sol^n)

2. *การเก็บสารตัวอย่างและการแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์*

ได้เดินทางไปเก็บสารตัวอย่างที่บริเวณน้ำพุร้อน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง บริเวณดังกล่าวมีบ่อเก็บกักน้ำซึ่งสามารถวัดอุณหภูมิได้ 55°C จึงเก็บตัวอย่างเช่น น้ำ, ตะไคร่สีเขียว, ตะกอนดินที่อยู่ก้นบ่อ เมื่อได้สารตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว นำสารตัวอย่างที่ได้กลับมาที่คณะวิทยาศาสตร์ทันที และ แบ่งสารตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 50°C เป็นเวลา 12 - 24 ชม. ปรากฏว่ามีเชื้อขึ้นบนจานอาหารเป็นจำนวนมากภายใน 12 ชม. และทำ subculture ไปเรื่อยๆจนในที่สุดได้จุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์

3. *การตรวจสอบหา activity ของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่แยกได้*

3.1. <u>การเลี้ยงเชื้อ</u>

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว 5 ml บ่มใน water bath ที่มีแกนเขย่าไปมา เป็นเวลา 12-24 ชม. ที่อุณหภูมิ 50°C โดยวางหลอดทำมุม 45°C เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ให้บันทึกค่า O.D. ที่ 600 nm แล้วนำมาบ่มต่อที่ 55 °C

1 ชม.

3.2 การสกัดเอมไซม์ Peroxidase จาก เซลล์

- นำเชื้อที่เลี้ยงใน ข้อ 3.1 มา centrifuge ที่ 3,000 rpm 10 นาที
- ละลายตะกอนด้วย 0.1 M phosphas buffer pH 7, 5 ml
- ทำให้เซลแตกโดยใช้ เครื่อง sonicator นาน 10 นาที
- centrifuge ที่ 3,000 rpm 10 นาที จะได้สารละลายใส ให้นำไปหาปริมาณโปรตีน และ activity ของเอนไซม์

3.3 การหาปริมาณ protein

เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ดังต่อไปนี้

ความเข้มข้นของ Protein (mg/ml)	ปริมาตรสารที่ใช้ (ml)					
	BSA	H_2O_2	Alkali sol^n		B sol^n	
0.1	0.05	4.95	2.5	ตั้ง	0.5	วาง
0.2	0.10	4.90	2.5	ไว้	0.5	ทิ้งไว้
0.4	0.20	4.80	2.5	10	0.5	30
0.6	0.30	4.70	2.5	นาที	0.5	นาที
0.8	0.40	4.60	2.5		0.5	

- วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 500 nm
- บันทึกค่าOD แล้วนำไปเขียนกราฟแสดง ความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า OD กับความเข้มข้นของ Protein

ในการหาปริมาณโปรตีนจากส่วนใสที่เตรียมได้จาก 3.2 ก็ทำเช่นเดียวกับตารางข้างต้น โดยใช้ส่วนใส 1 ml.

3.4 การหา activity ของเอนไซม์ peroxidase

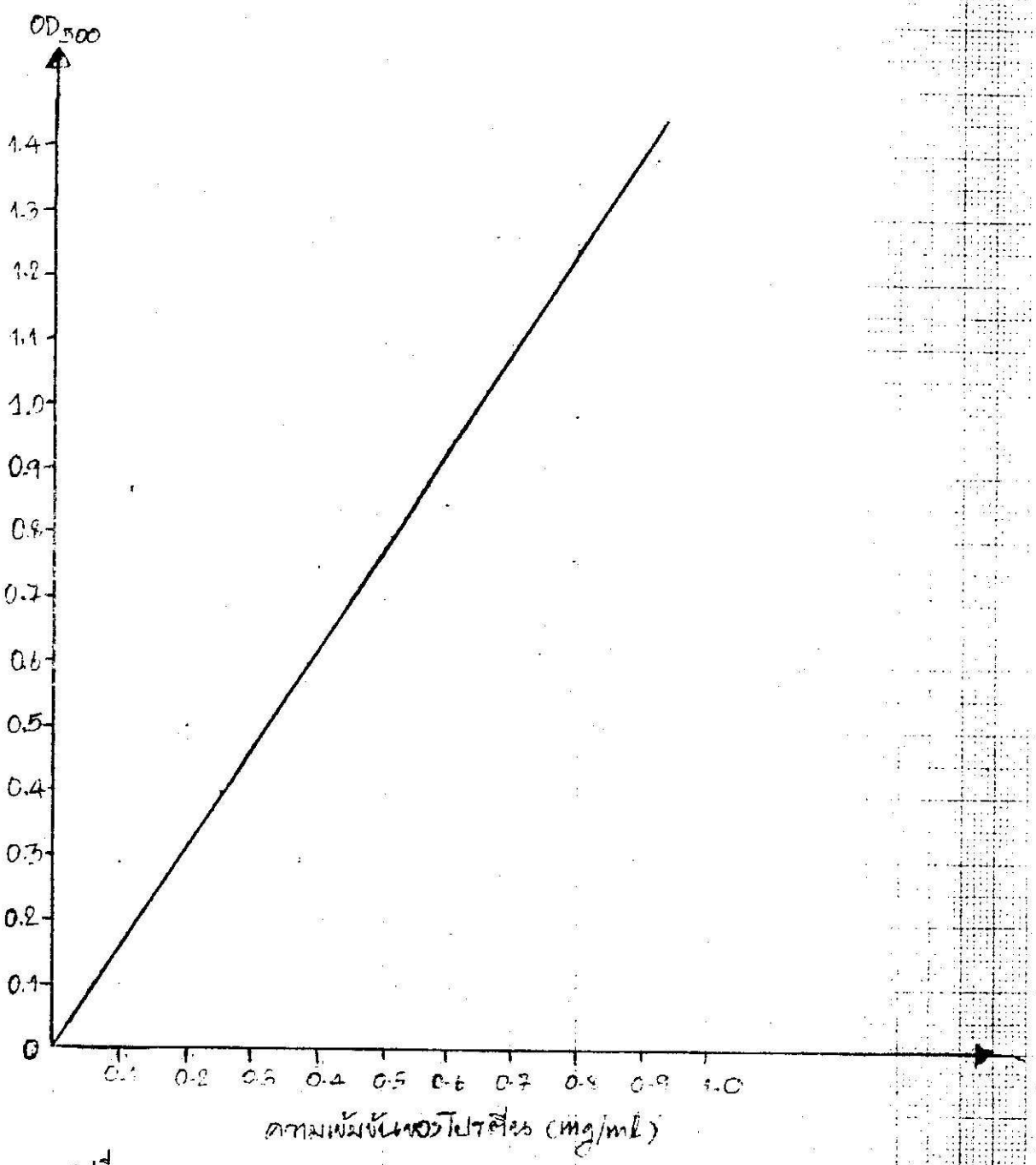
(ดัดแปลงจาก Gallti and Brodbech)

- ใส่ 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.4, 1.4 mL ลงใน cuvette
- เติม 0.5 % o- dianisidine 200 μl

- ปิเปตส่วนใสที่ได้จาก ข้อ 3.2 1 mL
- เติม H_2O_2 400 μl เขย่า
- นำไปวัดค่า OD ที่ 460 nm ทุก ๆ 15 วินาที จนครบ 3 นาที

กำหนดให้ enzyme activity = $\frac{\Delta \text{ OD ใน 1นาที}}{\text{mg of protein}}$

กราฟแสดง ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{500} กับความเข้มข้นของโปรตีน (Standard BSA)



รูปที่ 1

ผลการทดลอง

1. *จุลินทรีย์ที่แยกได้*

สามารถแยกจุลินทรีย์จากสารตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณบ่อน้ำร้อนในจังหวัดพัทลุงได้ทั้งหมด 22 ตัว ดังต่อไปนี้ 11/4, 4/4, 29, 15/5, 1/1, 3/2, 4/2, น้ำ 5, 25, 25/1, 27/1, 27/2, 3/1, น้ำ 4, 17/2.1, 13, 25/2, 21/2.1, 1/2, 12/1, น้ำ 2, 21/2

2. *การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และปริมาณโปรตีนที่สกัดได้*

ตารางที่ 1 Standard curve เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีน

ความเข้มข้น Protein (mg/ml)	OD_{500}
0.1	0.29
0.2	0.50
0.4	0.75
0.6	0.85
0.8	0.99

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณของจุลินทรีย์ (ด้วยค่า O.D. 600) พร้อมทั้งปริมาณโปรตีนในส่วนใสที่ได้ภายหลังเซลล์ของจุลินทรีย์ถูกทำให้แตก

อันดับที่	หมายเลขจุลินทรีย์	O.D. 600	O.D.500	Protein (mg/ml)
1	11/4	0.410	0.46	0.250
2	4/4	0.405	0.30	0.150
3	29	0.155	0.64	0.340
4	15/5	0.420	0.42	0.220
5	1/1	0.288	0.57	0.310
6	3/2	0.151	0.44	0.240
7	4/2	0.266	0.24	0.130
8	น้ำ 5	0.224	0.24	0.130
9	25	0.112	0.36	0.200
10	25/1	0.156	0.42	0.230
11	27/1	0.261	0.50	0.279
12	27/2	0.197	0.32	0.170
13	3/1	0.230	0.92	0.500
14	น้ำ 4	0.395	0.71	0.380
15	17/2.1	0.110	0.74	0.400
16	13	0.246	0.85	0.460
17	25/2	0.366	0.71	0.380
18	21/2.1	0.469	0.35	0.190
19	1/2	0.337	0.57	0.310
20	12/1	0.102	0.51	0.280
21	น้ำ 2	0.294	0.60	0.330
22	21/2.2	0.278	0.56	0.300

3. *Enzyme activity ของจุลินทรีย์*

ตารางที่ 3 แสดงค่า O.D. ที่ 460 ที่เปลี่ยนแปลงภายใน 3 นาที

time (sec.)	ค่า O.D. ที่ 460 ของจุลินทรีย์หมายเลข...							
	1/4	4/4	29	15/5	1/1	3/2	4/2	น้ำ 5
15	0.150	0.060	0.260	0.100	0.095	0.317	0.101	0.067
30	0.160	0.062	0.270	0.120	0.112	0.335	0.105	0.068
45	0.180	0.065	0.280	0.13	0.143	0.347	0.108	0.070
60	0.200	0.070	0.280	0.150	0.152	0.366	0.110	0.075
75	0.220	0.074	0.290	0.170	0.160	0.383	0.114	0.077
90	0.230	0.080	0.300	0.175	0.184	0.390	0.117	0.080
105	0.245	0.085	0.310	0.185	0.192	0.390	0.121	0.083
120	0.260	0.090	0.320	0.200	0.204	0.397	0.122	0.085
150	0.280	0.100	0.330	0.220	0.237	0.420	0.128	0.090
135	0.270	0.095	0.325	0.210	0.218	0.411	0.124	0.085
165	0.295	0.110	0.335	0.230	0.259	0.414	0.132	0.094
180	0.300	0.120	0.340	0.240	0.280	0.400	0.136	0.096
ΔO.D./min	0.050	0.020	0.027	0.047	0.062	0.023	0.012	0.010

ตารางที่ 4 แสดงค่า O.D. ที่ 460 ที่เปลี่ยนแปลงภายใน 3 นาที

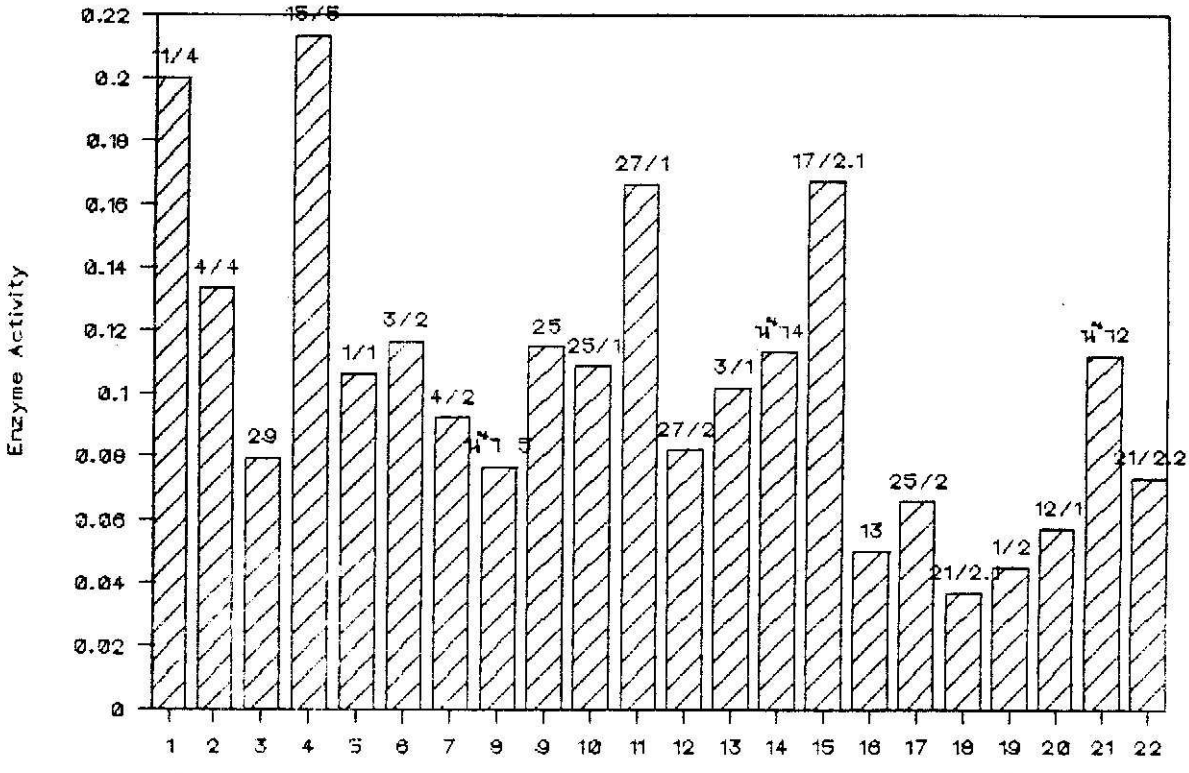
time (sec.)	ค่า O.D. ที่ 460 ของจุลินทรีย์หมายเลข...							
	25	25/1	27/1	27/2	3/1	น้ำ 4	17/2.1	13
15	0.156	0.185	0.054	0.045	0.425	0.335	0.388	0.238
30	0.161	0.199	0.062	0.047	0.444	0.378	0.414	0.242
45	0.175	0.214	0.066	0.051	0.461	0.363	0.435	0.252
60	0.188	0.228	0.070	0.056	0.481	0.379	0.461	0.261
75	0.191	0.244	0.074	0.060	0.495	0.395	0.485	0.268
90	0.205	0.247	0.078	0.064	0.420	0.412	0.304	0.276
105	0.209	0.249	0.083	0.068	0.539	0.426	0.521	0.281
120	0.217	0.233	0.086	0.072	0.547	0.438	0.537	0.287
135	0.224	0.245	0.091	0.075	0.553	0.449	0.557	0.292
150	0.224	0.259	0.095	0.079	0.561	0.460	0.565	0.297
165	0.231	0.262	0.098	0.082	0.571	0.463	0.581	0.302
180	0.224	0.260	0.102	0.086	0.577	0.464	0.590	0.308
ΔO.D/min	0.023	0.025	0.016	0.014	0.051	0.043	0.067	0.023

ตารางที่ 5 แสดงค่า O.D. ที่ 460 ที่เปลี่ยนแปลงภายใน 3 นาที

time (sec.)	ค่า O.D. ที่ 460 ของจุลินทรีย์หมายเลข...					
	25/2	21/2.1	12/1	น้ำ 2	1/2	21/2.2
15	0.379	0.205	0.059	0.088	0.297	0.090
30	0.388	0.208	0.069	0.112	0.301	0.087
45	0.397	0.212	0.070	0.122	0.305	0.094
60	0.405	0.214	0.077	0.137	0.312	0.103
75	0.413	0.215	0.082	0.148	0.318	0.110
90	0.421	0.218	0.086	0.154	0.332	0.116
105	0.428	0.220	0.089	0.162	0.327	0.118
120	0.433	0.223	0.095	0.174	0.329	0.126
135	0.439	0.224	0.099	0.181	0.330	0.132
150	0.445	0.226	0.101	0.184	0.332	0.135
165	0.432	0.227	0.105	0.190	0.335	0.138
180	0.454	0.227	0.107	0.200	0.339	0.146
ΔO.D./min	0.025	0.007	0.016	0.037	0.014	0.210

ตารางที่ 6 แสดงค่าโปรตีนที่สกัดจากจุลินทรีย์และค่า Enzyme activity

ลำดับที่	หมายเลขจุลินทรีย์	Protein (mg/ml)	Δ OD/นาที	Enzyme activity
1	11/4	0.250	0.050	0.2000
2	4/4	0.150	0.020	0.1333
3	29	0.340	0.027	0.0794
4	15/5	0.220	0.047	0.2136
5	1/1	0.310	0.033	0.1065
6	3/2	0.240	0.028	0.1167
7	4/2	0.130	0.012	0.0923
8	น้ำ 5	0.130	0.010	0.0769
9	25	0.200	0.023	0.1150
10	25/1	0.230	0.025	0.1087
11	27/1	0.270	0.045	0.1667
12	27/2	0.170	0.014	0.0824
13	3/1	0.500	0.051	0.1020
14	น้ำ 4	0.380	0.043	0.1132
15	17/2.1	0.400	0.067	0.1675
16	13	0.460	0.023	0.0500
17	25/2	0.380	0.025	0.0658
18	21/2.1	0.190	0.007	0.0368
19	1/2	0.310	0.014	0.0452
20	12/1	0.280	0.016	0.0571
21	น้ำ 2	0.330	0.037	0.1121
22	21/2.2	0.300	0.021	0.0700



รูปที่ 2 แสดงกราฟเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์จากจุลินทรีย์หมายเลขต่างๆ

$$\text{Enzyme activity} = \frac{\Delta \text{O.D.460}}{\text{mg. Protein}}$$

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการนำสารตัวอย่างซึ่งได้แก่ น้ำ ตะไคร่สีเขียว และ ตะกอนดินที่มีอยู่ในบ่อน้ำร้อน อุณหภูมิ 55°C มาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี agar 2% และบ่มที่ 50°C เป็นเวลา 12-24 ชม. ปรากฏว่าภายใน 12 ชม. มี colonies ลักษณะต่างๆขึ้นมากมาย รวมทั้งพวกที่เป็นเชื้อราด้วย แต่การศึกษาครั้งนี้มุ่งประเด็นไปที่การแยกแบคทีเรีย หรือ ยีสต์ จึงได้พยายาม subculture หลายๆหนเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์ ในการ subculture แต่ละครั้งมักบ่มไว้ที่ 50°C ในที่สุดสามารถแยกได้จุลินทรีย์ 22ตัว ที่มีความสามารถเจริญได้ดีที่ 50°C แต่ความสามารถในการเจริญเติบโตอาจแตกต่างกันบ้าง นำจุลินทรีย์ทั้ง 22 นี้มาสุ่มหา activity ของเอนไซม์ Peroxidase โดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่ 50°C เมื่อเจริญดีแล้วก็นำมาบ่มต่อที่ 55°C นาน 1 ชม. ก่อนทำการหาปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทั้งนี้เนื่องจากเราต้องการเอนไซม์ที่ทนอุณหภูมิสูงที่สุดเท่าที่จะหาได้ โดยในขั้นต้นนี้เลือกใช้อุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับสภาพจริงของสถานที่ที่ไปเก็บสารตัวอย่างมาคือ 55°C ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 1-6 และสรุปไว้ในกราฟรูปที่ 2 ซึ่งปรากฏว่าจุลินทรีย์หมายเลข 11/4 และ 15/5 มี activity ของเอนไซม์สูงที่สุด

อนึ่งการทดลองครั้งนี้เป็นเพียงการเปรียบเทียบภายในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่แยกมาจากสารตัวอย่างจากแหล่งเดียวกัน ดังนั้นที่ระบุว่ามี activity สูงนั้น ยังต้องมีการเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นที่มีผู้อื่นทำการศึกษาอยู่ ซึ่งในอนาคตผู้ทำการวิจัยจะต้องทำการขอจุลินทรีย์มาตรฐานมาทดลองเปรียบเทียบควบคู่กันไป ข้อมูลที่ได้นี้จึงจะสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

จุลินทรีย์ที่มี activity ของเอนไซม์สูงที่สุดในกลุ่มนี้ (11/4 และ 15/5) จัดอยู่ในพวกแบคทีเรีย colonies ค่อนข้างแบน สีเหลืองอ่อน แต่จัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดใด สามารถทนความร้อนได้สูงสุดที่อุณหภูมิใดนั้น จะต้องมีการศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์ของ

เอกสารอ้างอิง

Gallati, H., and Brodbech, H.J. 1981. J. Clin. Chem. Clin. Bio. Chem. 20, 221-225