รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดิน

A study of biodiversity of collagenase producing bacteria in soil

จัดทำโดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาส เชียรศิลป์

และนางสาว วริญดา สุภัทรประทีป

กรกฎาคม 2553

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดิน

A study of biodiversity of collagenase producing bacteria in soil

จัดทำโดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาส เชียรศิลป์

และนางสาว วริญดา สุภัทรประทีป

กรกฎาคม 2553

รหัสโครงการ BRT R652098

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดิน

A study of biodiversity of collagenase producing bacteria in soil

คณะผู้วิจัย สังกัด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาส เชียรศิลป์

และนางสาว วริญดา สุภัทรประทีป

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT R652098

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนของเศษเหลือจากปลาในภาคใต้ พบว่ามีเชื้อที่สามารถเติบโตได้ในอาหารวุ้นที่มีการเติมเจลาติน 113 ไอโซเลต สำหรับการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเชิงคุณภาพโดยดูการเกิดวงใส พบว่าในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอช 7.5 พบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้ทั้งหมด 49 ไอโซเลต โดยพบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้สูงทั้งหมด 11 ไอโซเลต ที่ให้ค่า degree of hydrolysis สูงมากกว่า 3.0 หลังจากนั้นทำศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเชิงปริมาณในอาหารเหลวพบว่า เชื้อ CNA1, CNM26, CNN13, CNO3 และ CNO9 สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้สูงสุด เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CNA1 คือเชื้อ *Bacillus cereus* เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CNM26, CNO3 และ CNO9 คือเชื้อ *Serratia* sp. และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CNN13 คือเชื้อ *Enterobacter aerogenes* จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่าเอนไซม์มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อได้

Abstract

In this study, collagenase producing bacteria were isolated from fish waste contaminated soil. 113 colonies which could grow on gelatin agar plate were isolated. Based on qualitative evaluation of collagenase activity 49 were found to show collagenase activity and only 11 isolates showed high activity of collagenase. Based on quantitative evaluation of collagenase activity in liquid medium CNA1, CNM26, CNN13, CNO3 and CNO9 strains gave highest activity of collagenase. CNA1 was identified by 16S rRNA gene sequencing as *Bacillus cereus*. CNM26, CNO3 and CNO9 were identified as *Serratia* sp. CNN13 was identified as *Enterobacter aerogenes*. The study on some properties of collagenase from isolated strains showed their potential use for further application.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

เอนไซม์คอลลาจิเนสเป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดหนึ่งที่สามารถสกัดและย่อยสลายคอลลาเจนได้ เอนไซม์คอลลาจิเนสมีความสำคัญทั้งในด้านอุตสาหกรรมเคมี อาหาร และยา โดยคอลลาเจนที่สกัดด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนสจะมีลักษณะพิเศษแตกต่างกันทั้งในด้านขนาดและลำดับเบสมากกว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีทางเคมี คอลลาเจนสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวัน โดยใช้เป็นส่วนผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมความงาม ผสมในอาหารบำรุงสุขภาพ ยารักษาโรค ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจากกระเพาะของสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตามเอนไซม์จากกระเพาะของสิ่งมีชีวิตจะสกัดได้ในปริมาณน้อยและมีราคาสูง ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ศึกษาเอนไซม์คอลลาจิเนสจากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ เนื่องจากเอนไซม์คอลลาจิเนสจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ในปริมาณที่สูง และจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถคัดแยกได้จากดิน ซึ่งในประเทศไทยมีงานวิจัยที่คัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากอาหารหมักดั้งเดิม แต่ยังไม่พบงานวิจัยที่คัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดิน ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดินในประเทศ โดยได้เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ และคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้สูงทั้งหมด 5 สายพันธุ์ เมื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ พบว่าคือเชื้อ *Bacillus cereus* หนึ่งสายพันธุ์ เชื้อ *Serratia* sp. 3 สายพันธุ์ และเชื้อ *Enterobacter aerogenes* หนึ่งสายพันธุ์ นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตจากเชื้อที่คัดแยกได้เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

Executive Summary

Collagenases, a class of proteases highly specific for collagen extraction and hydrolysis, are widely used in chemical, food and medical industries. The collagen products extracted by collagenases are variable in their lengths and sequences more than that from chemical extraction. Collagen can be applied in daily products such as in cosmetics, healthy products and medicines. Recently, there have been several reports on utilizing digestive proteases from animal stomach for collagen extraction. However, the proteases from animal stomach are expensive and not available in a large amount. Hence, the collagenases from various bacteria are more attractive since they could be produced in large amount and these bacteria can be isolated from soil. In Thailand there are only reports on isolation of bacteria that produce proteases but not collagenases. In addition, those researches focus on isolation from traditional fermented food not from soil. Therefore, this research aimed to isolate and screen collagenase producing bacteria from domestic soil. Five bacterial strains which exhibit high collagenase activity were selected and identified as *Bacillus cereus* one strain, *Serratia* sp. three strains and *Enterobacter aerogenes* one strain. Furthermore, the partial characterization of collagenase from each strain was examined for further application.

บทนำ

เอนไซม์คอลลาจิเนสเป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดหนึ่งที่สามารถสกัดและย่อยสลายคอลลาเจนได้ เอนไซม์คอลลาจิเนสมีความสำคัญทั้งในด้านอาหาร การเกษตร และทางการแพทย์ เอนไซม์คอลลาจิเนสจะแตกต่างจากเอนไซม์โปรติเอสทั่วไปเนื่องจากเอนไซม์คอลลาจิเนสสามารถย่อยสลายพันธะที่แข็งแรงในคอลลาเจนได้ ในการสกัดคอลลาเจนสามารถสกัดได้หลายวิธี เช่น การใช้กรด (Nagai and Suzuki, 2000) และการใช้ด่าง (Morimura *et al.*, 2002) ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจากกระเพาะของสิ่งมีชีวิต (Zhang *et al.*, 2006) และพบว่าคุณลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดโดยใช้เอนไซม์จะมีลักษณะพิเศษกว่าการสกัดโดยใช้สารเคมี และไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายของคน คอลลาเจนที่สกัดได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวัน โดยใช้เป็นส่วนผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมความงาม ผสมในอาหารบำรุงสุขภาพ ยารักษาโรค นอกจากการใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสในการสกัดคอลลาเจนแล้ว เอนไซม์คอลลาจิเนสยังสามารถใช้ในการตรวจรักษาโรคในมนุษย์ โดยสามารถสกัดเซลล์หรือเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาโครงสร้างได้ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus cereus* ที่คัดแยกได้จากดินในการกำจัดปรสิตในพืชเนื่องจากองค์ประกอบหลักของปรสิตในพืชเหล่านี้คือคอลลาเจน (Sela *et al.*, 1998)

อย่างไรก็ตามเอนไซม์โปรติเอสจากกระเพาะของสิ่งมีชีวิตจะสกัดได้ในปริมาณน้อยและมีราคาสูง ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ เนื่องจากเอนไซม์คอลลาจิเนสจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ในปริมาณที่สูง และจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถคัดแยกได้จากธรรมชาติ โดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสส่วนใหญ่จะคัดแยกได้จากดินและอาหารหมัก ซึ่งจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินจะมีความหลากหลายมากกว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากอาหารหมัก อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่คัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดินหรืออาหารหมักยังถือว่าเป็นงานวิจัยส่วนน้อย เนื่องจากงานวิจัยส่วนใหญ่จะศึกษาการคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยไม่ระบุว่าสามารถย่อยคอลลาเจนได้หรือไม่ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยกเอนไซม์โปรติเอสทั่วไปจะแตกต่างจากอาหารที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส ในการคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจะใช้คอลลาเจนหรือคอลลาเจนที่เสียสภาพจากความร้อนหรือที่เรียกว่าเจลาติน แต่ในการคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสทั่วไปจะใช้ skim milk, corn meal หรือ soya meal ทำให้เอนไซม์โปรติเอสที่ได้ไม่สามารถย่อยสลายโครงสร้างพันธะที่แข็งแรงในคอลลาเจนได้

สำหรับงานวิจัยในประเทศไทยจะพบแต่การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากอาหารหมัก แต่ยังไม่พบงานวิจัยที่คัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดินในประเทศ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดินในประเทศโดยได้เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ และคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้สูงหลายสายพันธุ์ เพื่อให้ได้เชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน จากนั้นจึงจำแนกเชื้อที่สามารถผลิต

เอนไซม์คอลลาจิเนสได้สูง และศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่เชื้อผลิตเพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของการวิจัยนี้ คือ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดิน โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้

1) เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดิน
2) เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสในปริมาณสูงหลายสายพันธุ์
3) เพื่อจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้และเก็บรักษาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป
4) เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อที่คัดเลือกเพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วิธีการดำเนินงาน

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 จึงสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้น้ำ และแก๊สออกซิเจนเกิดขึ้น แต่ถ้าหากไม่เกิดฟองแก๊สแสดงว่าให้ผลเป็นลบหรือแบคทีเรียนั้นไม่สร้างเอนไซม์แคทาเลส

1.5 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส

การตรวจวัดการย่อยเจลาตินบนอาหารแข็ง โดยการเททับด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 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 มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย แอลคาไลน์คอปเปอร์ (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

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 ใส่ลงใน ฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (1 ลิตรประกอบด้วยกลูโคส 5.0 กรัม ยีสต์สกัด 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 เจลาติน 15.0 กรัม) ปริมาตร 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 เจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้นเหมาะสม ประมาณ 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) วัดวงใสเพื่อหาค่า degree of hydrolysis

2.1.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเชิงปริมาณ

เลือกโคโลนีที่เกิดวงใสและให้ค่า Degree of hydrolysis สูงมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส 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 โดยการส่งตัวอย่างวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสที่ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล แล้วนำลำดับเบส 16S rRNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบลำดับเบสที่มีอยู่ใน database ซึ่งมีข้อมูลอยู่ในอินเตอร์เน็ต โดยใช้เว็บไซต์ของ http://www.ncbi.nlm.nim.gov ด้วยโปรแกรม BLAST

2.2 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนส

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 1 มาเลี้ยง 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 ดาลตัน ด้วยบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (เปลี่ยนสารละลายทุกๆ 4 ชั่วโมง) นำสารละลายที่ได้ศึกษาสมบัติของเอนไซม์

2.2.1 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

2.2.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสม

ปรับพีเอชของสารละลายเจลาติน และเจือจางเอนไซม์คอลลาจิเนสในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.2.1 ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดอัตราการย่อยเจลาติน

2.2.3 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 2.2.2 เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผ่านการบ่มที่พีเอชต่างๆ มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่เหลือในสภาวะที่หาได้จากข้อ 2.2.1 และ 2.2.2

2.2.4 การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เจือจางเอนไซม์คอลลาจิเนสในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 แล้วนำสารละลายเอนไซม์คอลลาจิเนสไปบ่มที่อุณหภูมิ 4, 20, 30, 37, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วนำเอนไซม์ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่เหลือในสภาวะที่หาได้จากข้อ 2.2.1 และ 2.2.2

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดแยกและจำแนกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากตัวอย่างดินรอบโรงงานแปรรูปอาหารทะเล ดินรอบตลาดสดคลองเรียนที่มีการปนเปื้อนของเศษเหลือจาก ทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ซึ่งแยกโดยอาศัยลักษณะ สี ขนาดโคโลนี และศึกษาการย่อยเจลาตินบนอาหารแข็งโดยการเททับด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 35 จะพบวงใสบริเวณรอบๆ โคโลนีของเชื้อดังแสดงใน Figure 1 ซึ่งเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์สร้างเอนไซม์คอลลาจิเนสเพื่อย่อยเจลาตินซึ่งเป็นโปรตีนให้ได้เป็นกรดอะมิโนเพื่อดูดซึมเข้าตัวเซลล์ของจุลินทรีย์ สำหรับบริเวณที่ไม่ถูกย่อยจะมีสีขาวขุ่นเนื่องจากโปรตีนเกิดการตกตะกอนเมื่อเททับด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก ผลการทดลองคัดแยกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบและที่มีพีเอชเป็นกลาง 7.5 พบว่ามีเชื้อที่สามารถเติบโตได้ที่พีเอช 7.5 เท่ากับ 113 ไอโซเลต จากการศึกษาการเกิดวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชที่ 7.5 พบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้ทั้งหมด 49 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 43.36 และจากการศึกษาค่า degree of hydrolysis ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเท่ากับ 7.5 พบว่ามี 11 ไอโซเลต ที่ให้ค่า degree of hydrolysis สูงมากกว่า 3.0

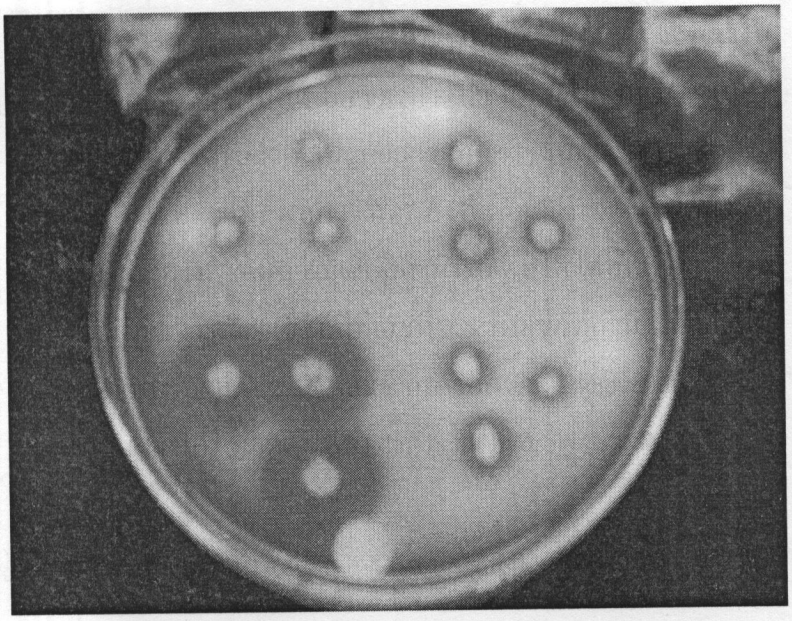


Figure 1. Clear zone of gelatin hydrolysis after addition of trichoroacetic acid.

จาก Table 1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อที่ให้ค่า degree of hydrolysis สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 7.5 พบว่าเชื้อที่คัดแยกจากตัวอย่างดินรอบโรงงานแปรรูปอาหารทะเล 8 ไอโซเลต ให้ค่า degree of hydrolysis ในช่วง 3.0-5.3 และเชื้อที่คัดแยกจากตัวอย่างดินรอบตลาดสดคลองเรียนที่มีการปนเปื้อนของเศษเหลือจากปลา 3 ไอโซเลต ให้ค่า degree of hydrolysis ในช่วง 3.0-5.3 ซึ่งเชื้อที่คัดแยกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 7.5 ส่วนใหญ่เป็นเชื้อแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง สร้างสปอร์ และสามารถสร้างเอนไซม์แคทาเลสได้ แต่พบว่ามี 1 ไอโซเลต มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างเอนไซม์แคทาเลส ซึ่งคัดแยกจากตัวอย่างดินรอบโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

Table 1. 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	+	+
CNM8	soil from fresh market	3.25	+	rod	-	+
CNM21	soil from fresh market	3.25	+	rod	+	+
CNM26	soil from fresh market	3.22	+	rod	-	+
CNN13	soil from sea food industry	3.38	-	rod	-	+
CNN16	soil from sea food industry	3.75	+	rod	+	+
CNN17	soil from sea food industry	3.22	+	rod	-	+
CNN19	soil from sea food industry	3.13	+	rod	+	+
CNO3	soil from sea food industry	3.38	+	rod	-	+
CNO9	soil from sea food industry	3.25	+	rod	-	+
CNO12	soil from sea food industry	3.44	+	rod	+	+

จากการศึกษาของ Kawahara และคณะ (1993) ที่คัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคอลลาเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนและมีพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 พบว่าเชื้อที่ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดเป็นเชื้อแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง สร้างสปอร์ เมื่อบ่งชี้สายพันธุ์คือเชื้อ *Bacillus alvei* DC-1 เช่นเดียวกับการทดลองของ Okamoto และคณะ (2001) ที่ศึกษาการคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 7.2 พบว่าเชื้อที่ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุดในอาหารเหลวเป็นเชื้อแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง สร้างสปอร์ ซึ่งเมื่อบ่งชี้สายพันธุ์คือเชื้อ *Bacillus* sp. strain MO-1

เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้บนอาหารแข็งมาศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเชิงปริมาณในอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร โดยการวัดกิจกรรมเอนไซม์คอลลาจิเนสของเชื้อที่คัดแยกจากอาหารที่มีพีเอช 7.5 ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 2 พบว่าในอาหารเหลวที่มีพีเอช 7.5 เชื้อ CNA1, CNM26, CMN13, CNO3 และ CNO9 ให้การเติบโตของเชื้อสูงโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรในช่วง 3.54-3.92 เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส พบว่าเชื้อ CNA1, CNM26, CMN13, CNO3 และ CNO9 ให้การผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงอยู่ในช่วง 15.81-16.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกเชื้อ CNA1, CNM26, CMN13, CNO3 และ CNO9 เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสต่อไป

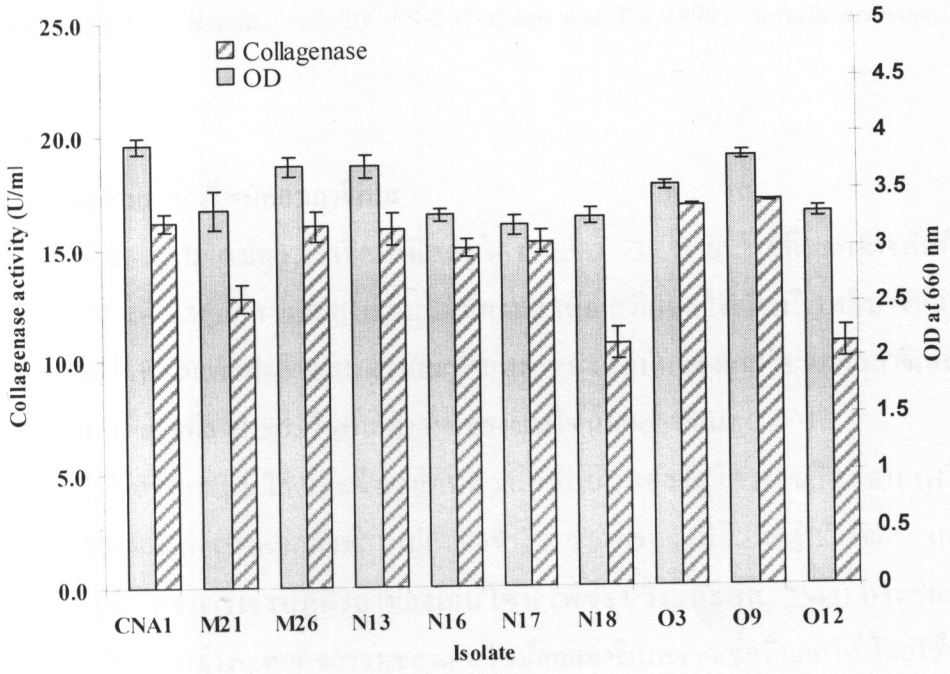


Figure 2. Growth and collagenase production from 6 isolates in liquid medium pH 7.5 incubated at 37 ^{o}C for 48 h.

จากการศึกษาการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA1, CNM26, CMN13, CNO3 และ CNO9 โดยวิธีทางกายภาพและชีวภาพเบื้องต้น พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต CNA1 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินรอบโรงงานแปรรูปอาหารทะเล เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง มีการสร้างสปอร์ และสามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลสได้ แบคทีเรียไอโซเลต CNM26 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินรอบตลาดสดคลองเรียน เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์ และสามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลสได้ แบคทีเรียไอโซเลต CNN13 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินรอบโรงงานแปรรูปอาหารทะเล เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์ และสามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลสได้ แบคทีเรียไอโซเลต CNO3 และ CNO9 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินรอบโรงงานแปรรูปอาหารทะเล เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์ และสามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลสได้ จึงศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CNA1 คือเชื้อ *Bacillus cereus* ซึ่งมีความเหมือน (identities) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CNM26, CNO3 และ CNO9 คือเชื้อ *Serratia* sp.ซึ่งมีความเหมือน (identities) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CNN13 คือเชื้อ *Enterobacter aerogenes* stain T2 ซึ่งมีความเหมือน (identities) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเชื้อที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่พบว่าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสภายใต้สภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี พีเอชเป็นกลางส่วนใหญ่ได้แก่ *Bacillus* sp. strain MO-1 (Okamoto *et al.*, 2001), *Bacillus cereus* (Lund and Granum, 1999), *Bacillus* sp. strain NTAP-1 (Nakayama *et al.*, 2000), *Bacillus subtilis* FS-2 (Nagano and To, 1999), *Seratia proteamaculans* 94 (Mozhina *et al.*, 2008)

2. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนส

ศึกษาสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ 3 สายพันธุ์ที่แตกต่างกันคือ CNA1, CNM26 และ CNN13 โดยนำสารละลายเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตได้ทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 และนำมาทดสอบสมบัติของเอนไซม์คอลลาจิเนส

2.1 การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนส

การเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (H^+) การเปลี่ยนแปลงพีเอชจะมีผลต่อการแตกตัวของหมู่แขนงข้าง R ของกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ แอคทีฟของของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (พัชรา วีระกะลัส, 2543) การศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อที่แยกได้ โดยใช้สารละลายเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสในช่วงพีเอช 4–9 โดยใช้สารละลาย อะซิเตทบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.15 โมลาร์ (พีเอช 4- 6) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15โมลาร์ (พีเอช 6-7) และทริสไฮโดร-คลอริกบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15โมลาร์ (พีเอช 7-9) ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 3 จาก Figure 3a พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 ที่คัดแยกจาก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเป็นกลางมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7ในสารละลายทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15โมลาร์ และพบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6-8 โดยมีกิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 73.9 ที่พีเอช 6 และร้อยละ 86.7 ที่พีเอช 8 ซึ่งค่าพีเอชจะมีผลต่อปริมาณของสับสเตรทที่อยู่ในรูปของไอออนที่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ เนื่องจากสับสเตรทอาจแตกตัวได้ ซึ่งเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่อยู่ในสภาพไอออนแบบใดแบบหนึ่งเท่านั้น (พัชรา วีระกะลัส, 2543)

สำหรับผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNM26 ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNM26 ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.5 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15โมลาร์ (Figure 3b) และสำหรับผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNN13 ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNN13 ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7ในสารละลายทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15โมลาร์ (Figure 3c)

จากรายงานการทดลอง Nagano และ To (1999) ที่ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* FS-2 ที่คัดแยกได้จากน้ำปลา พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 9.0 จากผลการทดลองของ Kanayama และ Sakai (2005) ที่ศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Microbacterium liquefaciens* พบว่าช่วงของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โปรติเอสคือ พีเอช 5.5-7.0 และเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 40 เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง (พีเอช 9.0)

จากรายงานของ Kawahara และคณะ (1993) ที่ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ *Bacillus alvei* DC-1 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีคอลลาเจนเป็นแหล่งไนโตรเจน 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

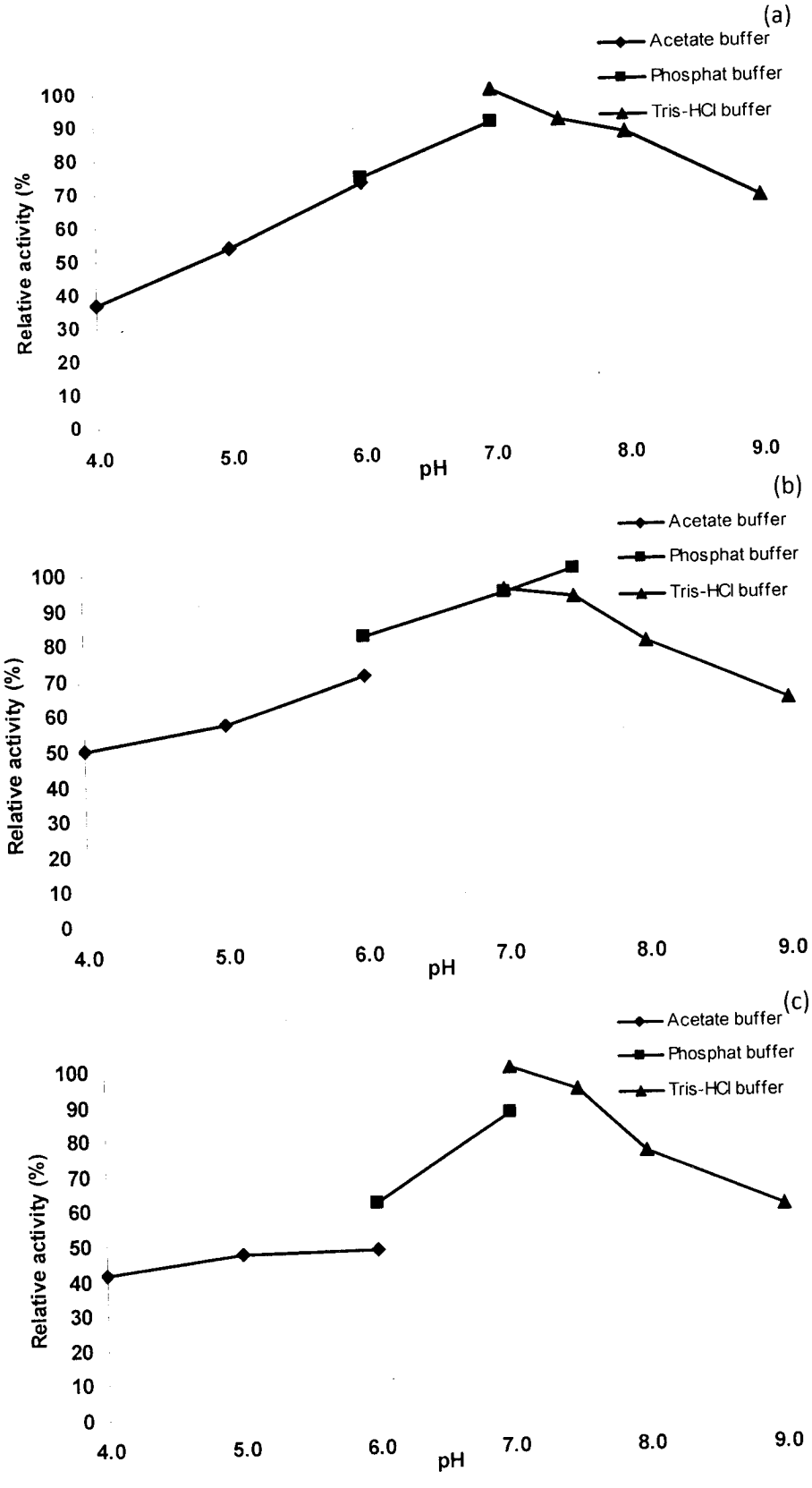


Figure 19. Effect of pH on activity of collagenase from CNA1 strain (a), CNM26 strain (b) and CNN13 strain (b) at 37 °C.

2.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนส

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1, CNM26 และ CNN13 ในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 4 พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้กิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 เพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์คอลลาจิเนสสามารถจับกับสับสเตรท (เจลาติน) ได้มากขึ้น และพบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 มีกิจกรรมสูงในช่วงอุณหภูมิ 37-50 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และจากนั้นการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสจะลดลงเล็กน้อย โดยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมการทำงานสูงกว่าร้อยละ 90 ดังแสดงใน Figure 4a สำหรับการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNM26 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงในช่วงอุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส โดยกิจกรรมเอนไซม์จะสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นและสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังแสดงใน Figure 4b และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสจะลดลงเล็กน้อย โดยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมการทำงานเหลือสูงกว่าร้อยละ 95 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมการทำงานเหลือมากกว่าร้อยละ 80 สำหรับการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNN13 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงในช่วงอุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส โดยกิจกรรมเอนไซม์จะสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นและสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังแสดงใน Figure 4c และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมการทำงานเหลือต่ำกว่าร้อยละ 80

ซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ที่โมเลกุลของสารส่งผลให้เกิดการชนกันในปฏิกิริยาได้มากขึ้นต่อหน่วยเวลา สำหรับปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็เช่นกัน อย่างไรก็ตามเนื่องจากเอนไซม์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนและกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาจะเกิดเนื่องจากโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) เรียงตัวอย่างมีระเบียบในทิศทางที่จะต้องจับกับสับสเตรทที่บริเวณจับและบริเวณเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นหากเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์สูงเกินไป กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์ระดับตติยภูมิเป็นโครงสร้างที่ละเอียดอ่อนมาก โดยมีพันธะอ่อนที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์จำนวนมาก เมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาสูง จะทำให้โมเลกุลของสารปฏิกิริยามีพลังงานมากเกินไปจนทำให้โครงสร้างตติยภูมิของเอนไซม์เสียหาย (disrupt) มีผลให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติและสูญเสียกิจกรรมไป (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1, CNM26 และ CNN13 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) ยังรายงานว่า

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

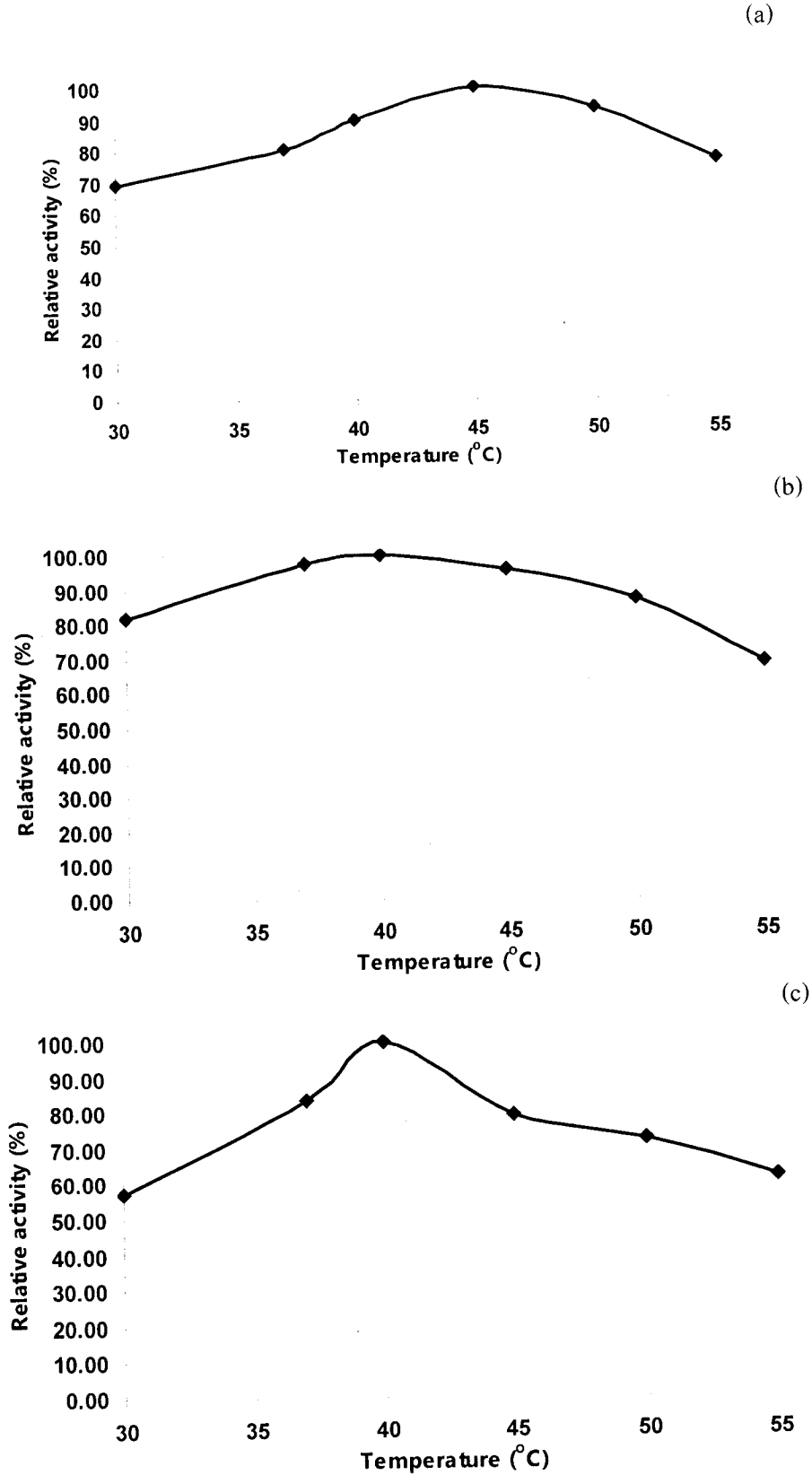


Figure 4. Effect of temperature on activity of collagenase from CNA1 strain (a) at pH 7.0, CNM26 strain (a) at pH 7.5 and CNN13 strain (c) at pH 7.0.

2.3 การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่พีเอชต่างๆ

จากผลการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1, CNM26 และ CNN13 โดยบ่มสารละลายเอนไซม์คอลลาจิเนสในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4-9 ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่ 45, 40 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่เหลือ จาก Figure 5a พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 ที่คัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเป็นกลางมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 6-8 โดยมีกิจกรรมที่เหลือสูงกว่าร้อยละ 80 ที่ช่วงพีเอชดังกล่าว เมื่อบ่มเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 4 หรือ 9 ความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจะลดลงเหลือเพียงร้อยละ 37.7 และร้อยละ 59.1 ตามลำดับ จาก Figure 5b พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNM26 มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 7-9 โดยมีกิจกรรมที่เหลือสูงกว่าร้อยละ 80 ในช่วงพีเอชดังกล่าว และพบว่าเมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 4 และ 5 ความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจะลดลงเหลือร้อยละ 53.48 และร้อยละ 64.22 ตามลำดับ จาก Figure 5c พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNN13 มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 7-9 โดยมีกิจกรรมที่เหลือสูงกว่าร้อยละ 80 ในช่วงพีเอชดังกล่าว และพบว่าเมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 4 และ 5 ความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจะลดลงเหลือร้อยละ 57.06 และร้อยละ 62.15 ตามลำดับ

พีเอชมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์โดยที่ค่าความเป็นกรดสูงกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน ซึ่งที่พีเอชต่ำหรือสูงเกินไปจะทำให้ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปและเสียสภาพ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์หรือการจับกับสับสเตรทลดลงด้วย 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

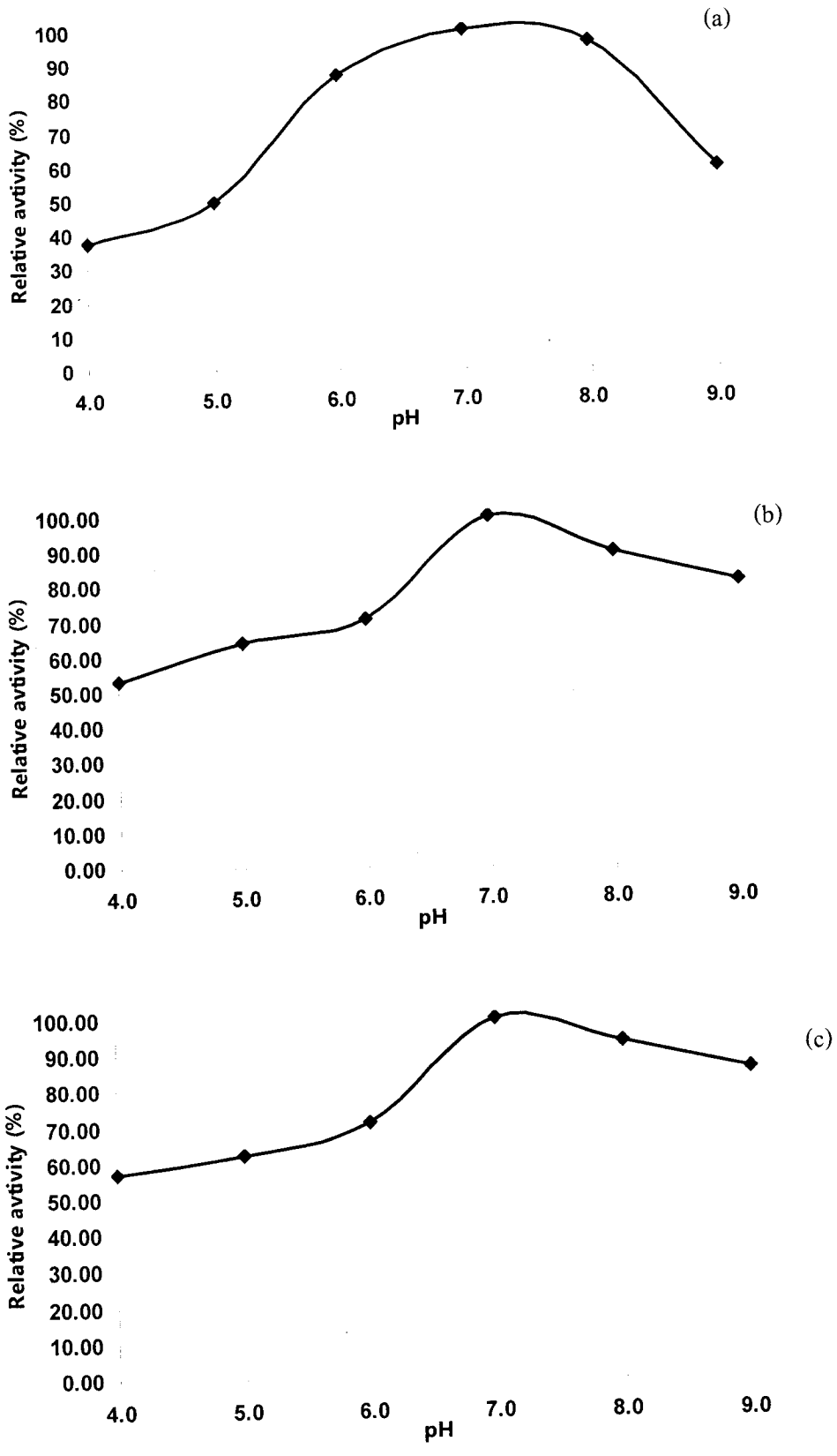


Figure 5. Effect of pH on stability of collagenase from CNA1 strain (a), CNM26 strain (b) and CNN13 strain (c).

2.4 การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่อุณหภูมิต่างๆ

การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1, CNM26 และ CNN13 โดยบ่มในช่วงอุณหภูมิ 4-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่เหลือ ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 6a พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1 มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 4-40 องศาเซลเซียส โดยมีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่ามีกิจกรรมเหลืออยู่เพียงร้อยละ 28.6 จาก Figure 6b ที่แสดงความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNM26 พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNM26 มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 4-40 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์มีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่ามีกิจกรรมเหลืออยู่เพียงร้อยละ 50.61 และจาก Figure 6c ที่แสดงความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNN13 พบว่าเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNN13มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 4-40 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์มีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่ามีกิจกรรมเหลืออยู่เพียงร้อยละ 56.24

ความคงตัวของเอนไซม์คอลลาจิเนสลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในที่ที่มีอุณหภูมิสูง เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนเมื่อถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงจะทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนไป ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์หรือการจับกับสับสเตรทลดลง อีกทั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนจึงสามารถย่อยสลายตัวเองได้ (autolysis) (Kanayama and Sakai, 2005) โดยเอนไซม์คอลลาจิเนสจากเชื้อ CNA1, CNM26 และ CNN13 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

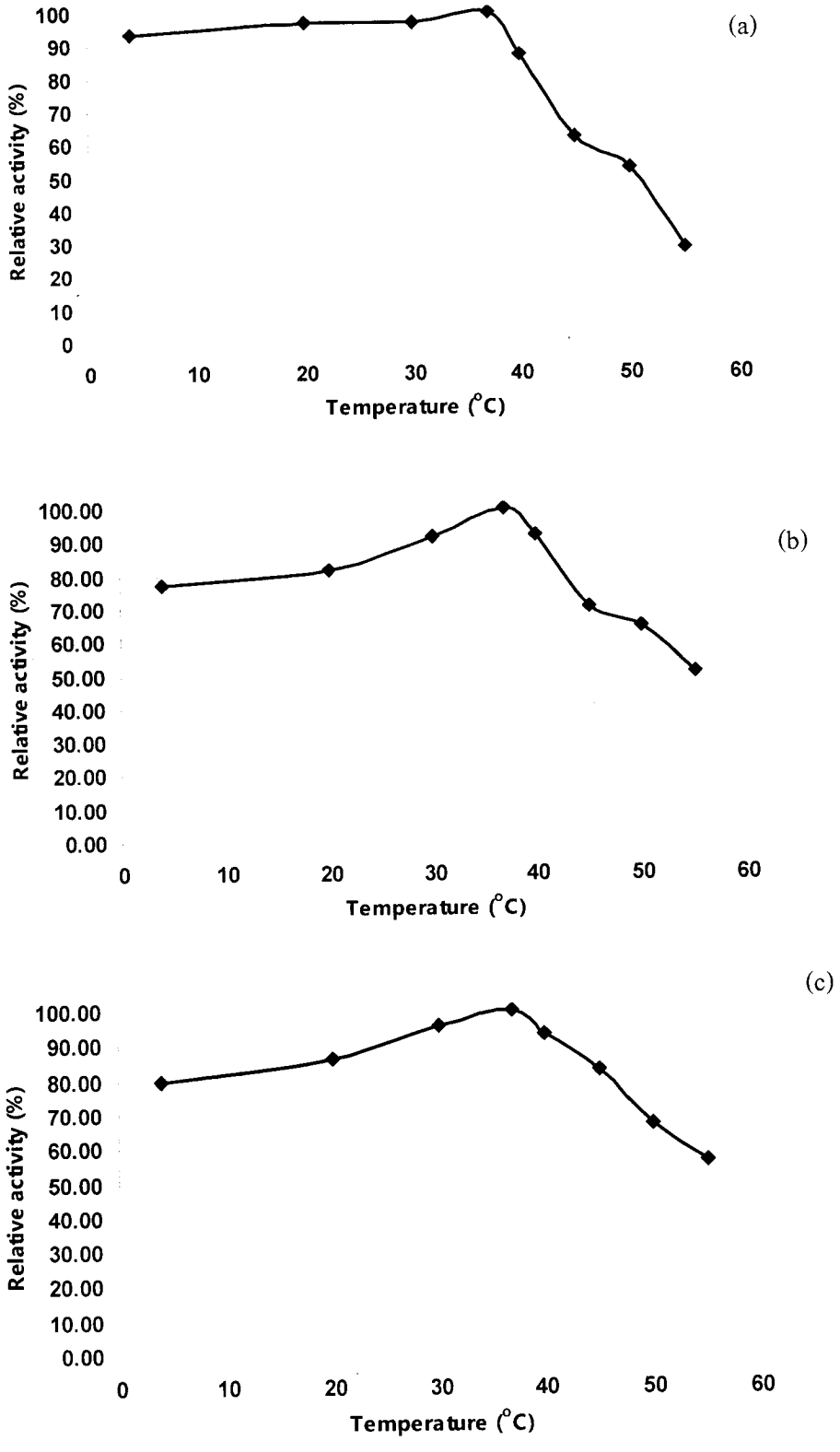


Figure 6. Effect of temperature on stability of collagenase from CNA1 strain (a), CNM26 strain (b) and CNN13 strain (c).

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)

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

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.

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.

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.

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.

Mozhina, N. V., Burmistrova, O. A., Pupov, D. V., Rudenskaya, G. N., Dunaevsky, Y. E., Demiduk, I. V. and Kostrov, S. V. 2008. Isolation and properties of *Serratia proteamaculans* 94 cysteine protease. J. Bioorgamic Chem. 34. 274-279.

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.

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

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.

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.

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

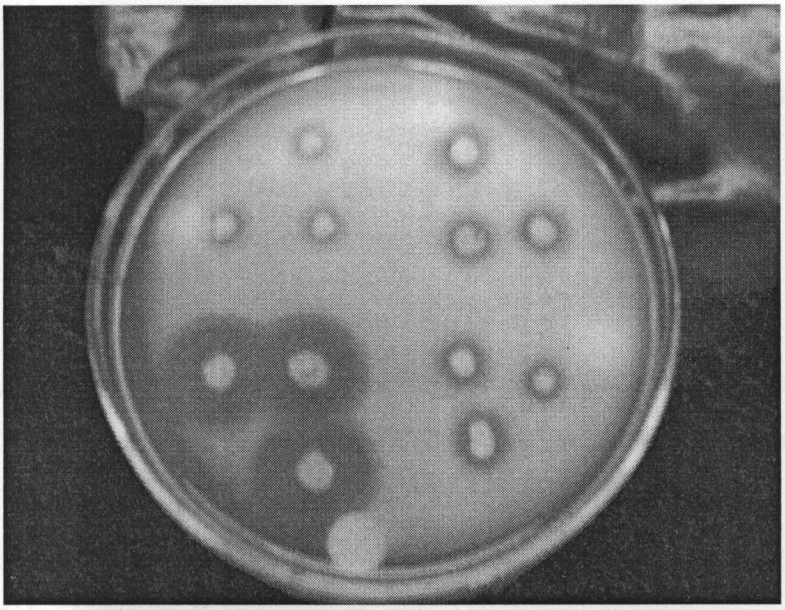
Zhang, Z. K., Li, G. Y. and Shi, B. 2006. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. J. Soc. Leather Technol. Chem. 90: 23–28.

ภาคผนวก

เอกสารสรุปผลงานวิจัยในรูปแบบและภาษาที่เหมาะสมสำหรับการประชาสัมพันธ์เผยแพร่ต่อประชาชนทั่วไป

เอนไซม์คอลลาจิเนสเป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดหนึ่งที่สามารถสกัดและย่อยสลายคอลลาเจนได้ เอนไซม์คอลลาจิเนสมีความสำคัญทั้งในด้านอุตสาหกรรมเคมี อาหาร และยา โดยคอลลาเจนที่สกัดด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนสจะมีลักษณะพิเศษแตกต่างกันทั้งในด้านขนาดและลำดับเบสมากกว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีทางเคมี คอลลาเจนสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวัน โดยใช้เป็นส่วนผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมความงาม ผสมในอาหารบำรุงสุขภาพ ยารักษาโรค ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจากกระเพาะของสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตามเอนไซม์จากกระเพาะของสิ่งมีชีวิตจะสกัดได้ในปริมาณน้อยและมีราคาสูง ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ศึกษาเอนไซม์คอลลาจิเนสจากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ เนื่องจากเอนไซม์คอลลาจิเนสจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ในปริมาณที่สูง และจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถคัดแยกได้จากดิน ซึ่งในประเทศไทยมีงานวิจัยที่คัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากอาหารหมักดั้งเดิม แต่ยังไม่พบงานวิจัยที่คัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดิน

การศึกษาในครั้งนี้จึงสนใจศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดินในประเทศ โดยได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากตัวอย่างดินรอบโรงงานแปรรูปอาหารทะเล ดินรอบตลาดสดคลองเรียนที่มีการปนเปื้อนของเศษเหลือจากปลา ซึ่งพบว่ามีเชื้อที่สามารถเติบโตได้ในอาหารวุ้นที่มีการเติมเจลาติน 113 ไอโซเลต สำหรับการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเชิงคุณภาพโดยดูการเกิดวงใส พบว่าในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอช 7.5 พบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้มีทั้งหมด 49 ไอโซเลต โดยพบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสได้สูงทั้งหมด 11 ไอโซเลต ที่ให้ค่า degree of hydrolysis สูงมากกว่า 3.0 หลังจากนั้นทำศึกษาการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสเชิงปริมาณในอาหารเหลวพบว่า เชื้อ CNA1, CNM26, CNN13, CNO3 และ CNO9 ให้การเติบโตของเชื้อและการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสสูงสุด เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CNA1 คือเชื้อ *Bacillus cereus* เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CNM26, CNO3 และ CNO9 คือ เชื้อ *Serratia* sp. และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CNN13 คือเชื้อ *Enterobacter aerogenes* จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่าเอนไซม์มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต



ภาพแสดงการตรวจวัดการย่อยเจลาตินบนอาหารแข็งโดยการเททับด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก เชื้อที่สร้างเอนไซม์คอลลาจิเนสจะเกิดวงใสรอบโคโลนี

สรุป OUTPUTS ที่ได้รับจากการดำเนินงาน

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสจากดิน

(รหัสโครงการ BRT R652098)

ตั้งแต่เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2552 ถึง กรกฎาคม พ.ศ. 2553

1. การตีพิมพ์บทความในวารสารทางวิชาการ

อยู่ระหว่างการจัดทำต้นฉบับ (in manuscript) จำนวน 1 เรื่อง ดังนี้

Suphatharaprateep, W., Cheirsilp, B. and Jongjareonrak, A. Isolation and Characterization of Collagenase Producing Bacteria and Application of Collagenase for Collagen Extraction from Fish Skin.

2. การนำเสนอผลงานในรูปแบบการนำเสนอ Oral presentation จำนวน 1 เรื่อง ดังนี้

Suphatharaprateep, W., Cheirsilp, B. and Jongjareonrak, A. Screening and characterization of collagenase producing bacterium from fermented fish and soil. The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology TSB 2008 "Biotechnology for Global Care" 2008, Thailand (Oral & Proceeding 166-177).

3. จำนวนนักศึกษาระดับปริญญาโท ในโครงการ จำนวน 1 คน ดังนี้

นางสาว วริญดา สุภัทรประทีป

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดแยกและจำแนกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสและการประยุกต์ใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา

ระดับการศึกษา ปริญญาโท

ลงนาม.....

(ผศ. ดร. เบญจมาส เชียรศิลป์)

วันที่ 30 กรกฎาคม 2553