บทที่ 4
ประสิทธิภาพของโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* MR10 ในการย่อยถั่วเหลือง

บทนำ

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (นิธิยา, 2551) โดยเฉพาะจุลินทรีย์ซึ่งเป็นแหล่งผลิตโปรติเอสที่มีศักยภาพ โปรติเอสถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตนมและผลิตภัณฑ์นม การผลิตซอสปรุงรส การผลิตเบียร์ การทำให้เนื้ อนุ่มเป็นต้น (ปราณี, 2547) ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้โปรติเอสมียอดจำหน่ายในตลาดสูงถึงร้อยละ 60 ของยอดขายเอนไซม์ทั้ งหมด(Merheb *et al*., 2007) ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตโปรติเอส ได้แก่ *Aspergillus oryzae (*อมรรัตน์, 2551*)* *Rhizoppus chinensis* (Tsuru *et al*., 1969) *Saccharomyces cerevisiae* (Ogrydziak, 1993) *Bacillus* sp. *B. licheniformis* และ *B. subtilis* (Gupta *et al*., 2002)

B. subtilis เป็นแบคทีเรียรูปท่อน โดยสร้างเอกโซเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์โปรตีนและแป้งได้ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2552) ในกระบวนการหมักถั่วเหลือง *B. subtilis* จะผลิตโปรติเอสมาใช้ในการย่อยโปรตีนในถั่วเหลือง (เอกชัย และคณะ, 2554) จากศักยภาพการผลิตโปรติเอสของ *B. subtilis* ดังกล่าว ทำให้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโปรติเอสจาก *B. subtilis* เป็นจำนวนมาก เช่น เกตุการ และคณะ (2550) ทำการแยกแบคทีเรียจำนวน 171 isolate จากถั่วเน่า แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส พบว่า แบคทีเรีย isolate TN51 มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงที่สุด Chantawannakul *et al*. (2002) พบว่า โปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* strain 38 มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงที่สุดที่สภาวะที่เหมาะสมในการทำงาน คือ พีเอช 6.5 และอุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส และค่ากิจกรรมโปรติเอสจะลดลงมาก ณ สภาวะการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส Inatsu *et al*. (2006) รายงานว่า *B. subtilis* เป็นแหล่งของโปรติเอสที่ย่อยโปรตีนในการผลิตในถั่วเน่า ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พื้ นบ้านภาคเหนือของไทย เกษม และคณะ (2535) ศึกษาการผลิตโปรติเอสจาก *B. subtilis* TISTR 25 โดยใช้วัตถุดิบการเกษตรที่แตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน คือ cornsteep liquor corn gluten wheat gluten กากถั่วเหลือง และกากเมล็ดทานตะวัน เปรียบเทียบกับการใช้ yeast extract ในปริมาณร้อยละ 2 พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอส คือ กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวัน โดยให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 482 และ 435 หน่วย ตามลำดับ และพีเอชที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 10.5

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในปัจจุบันมีการนำ *B. subtilis* ไปผลิตเพื่อใช้กับอาหารจำหน่ายในเชิงการค้าแล้ว ยกตัวอย่าง เช่น Corolase 7089 ผลิตโดยบริษัท Rohm ประเยอรมนี Bioprase SP-10 ผลิตโดยบริษัท Nagase Biochemicals ประเทศญี่ปุ่น HT-proteolytic ผลิตโดยบริษัท Solvay Enzymes ประเยอรมนี เป็นต้น (Gupta *et al*., 2002) จากคุณลักษณะการย่อยโปรตีนของโปรติเอสที่ผลิตจาก *B. subtilis* ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเปปไทด์ กรดอะมิโนต่างๆ จึงเป็นแนวคิดของการศึกษาครั้งนี้ในการนำเอา *B. subtilis* ที่คัดแยกได้จากถั่วเน่าและผ่านการทดสอบแล้วว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ (Wongputtisin, 2008) มาใช้ในการผลิตโปรติเอส เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของโปรติเอสที่ผลิตได้และสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยถั่วเหลือง

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

อุปกรณ์และวิธีการ

4.1 การเตรียมโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* MR10

4.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 บริสุทธิ์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งnutrient agar (NA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ *B. subtilis* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ลงในอาหารเหลว (nutrient broth; NB) จำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอ่างควบคุมอุณหภูมิพร้อมเขย่า (water bath shaker; GLF, 1083, Germany) ด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร (A_{600}) ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer; Jenway, U.K.) และนำไปเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ทำการเพาะเลี้ยงในอ่างควบคุมอุณหภูมิพร้อมเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (cemtrifuge) ที่ระดับความเร็ว 8,000*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้ใช้เป็นโปรติเอสหยาบ (crude protease) เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

4.1.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอสหยาบจาก *B. Subtilis* MR10

1) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10

นำโปรติเอสหยาบไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอสตามวิธีดัดแปลงจาก Chomsri (2001) และ Khan *et al.* (2003) โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 30 37 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นคัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

2) ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10

นำโปรติเอสหยาบไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส โดยทำการศึกษาที่พีเอช 4 5 6 7 8 และ 9 โดยพีเอช 4 5 และ 6 ใช้สารละลาย citrate buffer ความเข้มข้น 0.05 M สำหรับพีเอช 7 และ 8 ใช้สารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 M สำหรับพีเอช 9 ใช้สารละลาย tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.05 M จากนั้นคัดเลือกค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 ในการย่อยโปรตีนถั่วเหลือง

4.2.1 การเตรียมโปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* MR10

ถ่ายเชื้อ *B. subtilis* MR10 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำแขวนลอยไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (A_{600}) แล้วปิเปตสารแขวนลอยของเชื้อ *B. subtilis* MR10 ลงในถั่วเหลืองที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave, LS–2, Kaohsiung, Taiwan) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเติมน้ำสะอาดที่อัตราส่วนระหว่างถั่วเหลืองหมักต่อน้ำสะอาด 1:4 (โดยน้ำหนัก) แล้วปั่นละเอียดด้วยเครื่องบดผสม (OTTO; BE-122G, China) กรองด้วยผ้าขาวบาง นำของเหลวที่ได้จากกการกรองไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมโปรติเอส ดังภาพที่ 11

4.2.2 การศึกษาการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองของโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10

วางแผนการทดลองโดยมีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือ อัตราส่วนระหว่างถั่วเหลืองต่อโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 5 ระดับ คือ 1:1 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 และระยะเวลาในการย่อยของโปรตีนถั่วเหลือง 4 ระดับ คือ 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง ทำได้โดยชั่งถั่วเหลืองเมล็ดแห้งบดละเอียดจำนวน 25 16 12 10 และ 8 กรัม จากนั้นเติมโปรติเอสหยาบจำนวน 25 34 38 40 และ 42 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 12) โดยทำการย่อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการต้มให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วทำการวิเคราะห์ผลิตผลที่ได้จากการย่อยดังนี้ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณ FAN และจำแนกโปรตีนถั่วเหลืองหลังจากการย่อยด้วยวิธี SDS-PAGE

4.3 การจำแนกโปรตีนถั่วเหลืองหลังจากการย่อย

จำแนกขนาดของโปรตีนในถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทโดยใช้วิธี SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.3

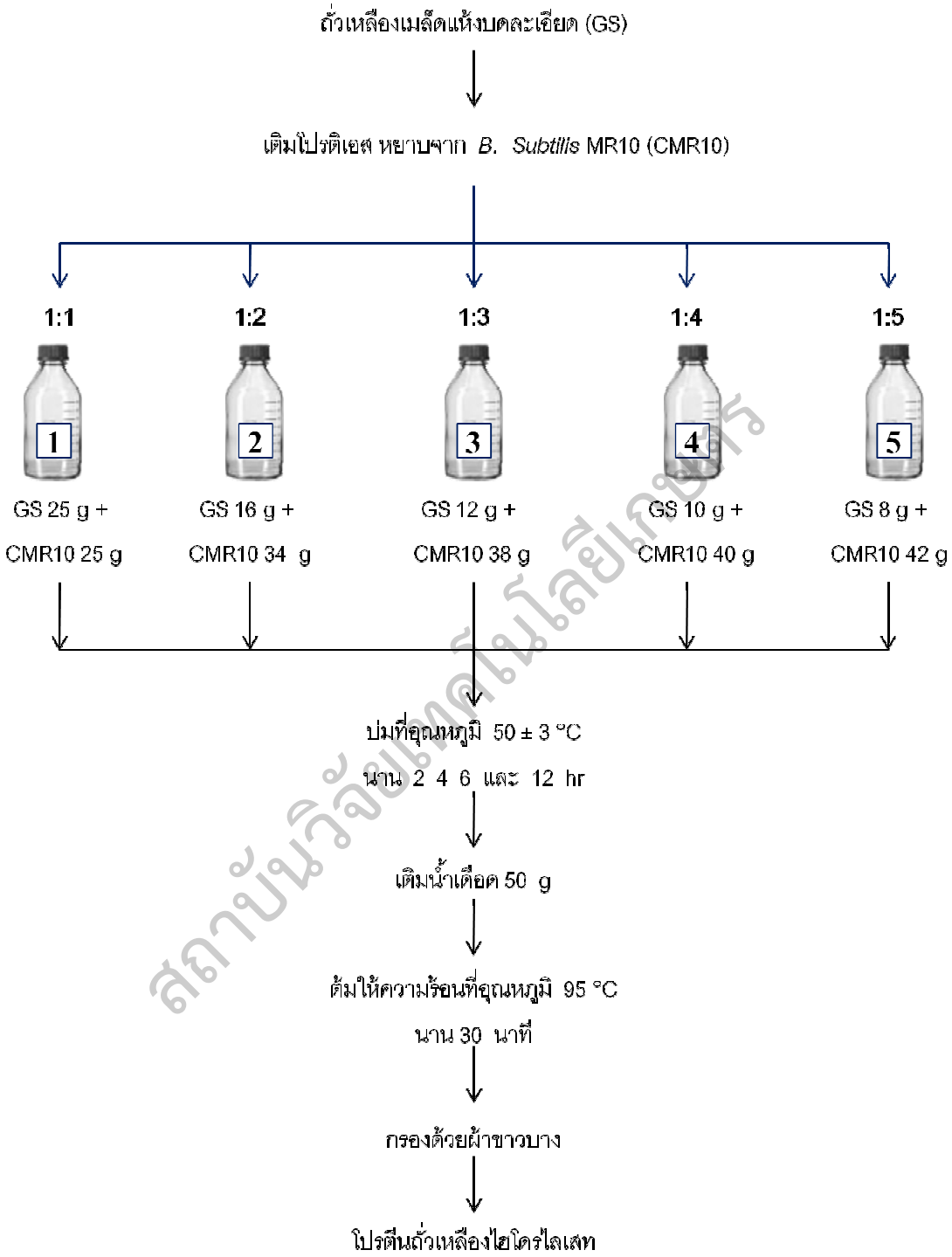
4.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 5x4 factorial in Completely Randomized Design (5x4 factorial in CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบ Duncan's new multiple range test (DMRT) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาพที่ 11 การเตรียมโปรติเอสหยาบจากถั่วเหลืองหมักเพื่อใช้ในการย่อยโปรตีนถั่วเหลือง



ภาพที่ 12 ขั้นตอนการเตรียมโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทด้วยโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

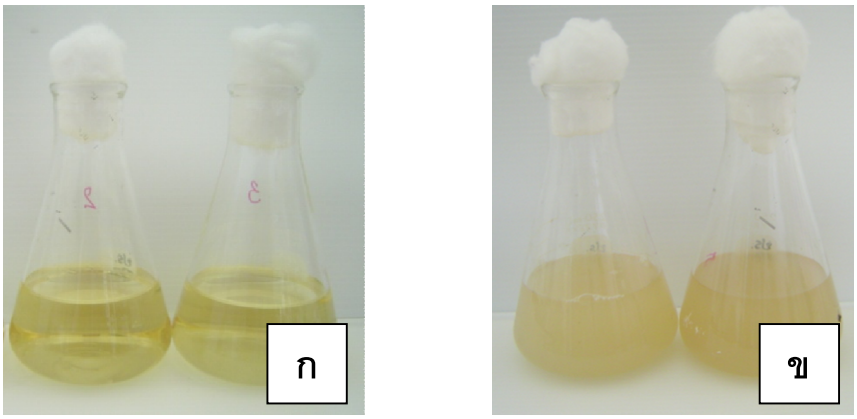
ผลการทดลอง

4.1 คุณลักษณะของโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10

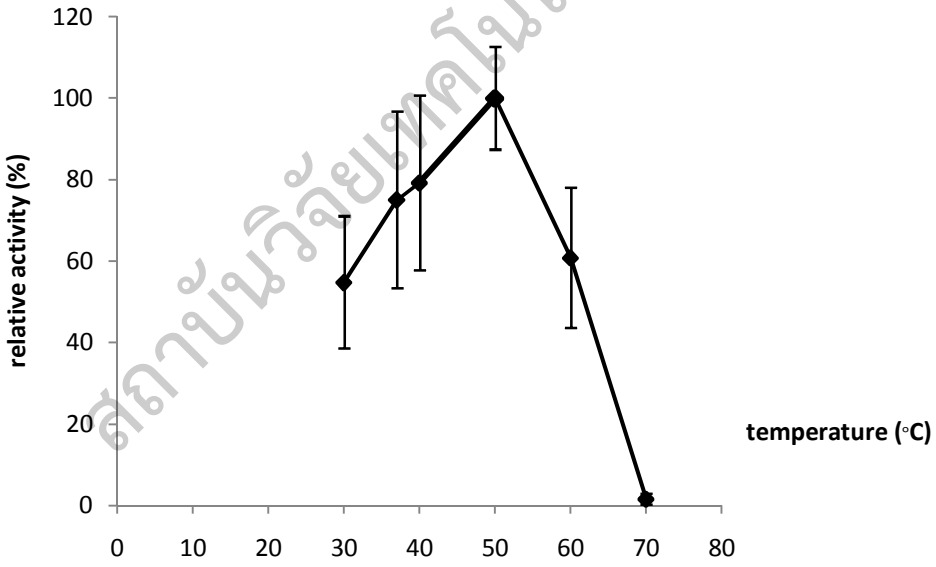
B. subtilis MR10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA อายุ 24 ชั่วโมง มีลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม ขอบมีหยัก ผิวหน้าไม่เรียบ (ภาพที่ 13) เมื่อนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า *B. subtilis* MR10 มีลักษณะเป็นรูปท่อน ติดสีแกรมบวก

ภาพที่ 13 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* MR10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA
(ก) ลักษณะของอาหารเหลว NB ก่อนการเจริญของแบคทีเรีย
(ข) แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงใน NB นาน 24 ชั่วโมง

จากการเตรียมโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (ภาพที่ 14) เพื่อใช้ในการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 โดยการวิเคราะห์ค่ากิจกรรม โปรติเอสที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30 37 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โปรติเอสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด และเมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ตรวจไม่พบค่ากิจกรรมโปรติเอส (ภาพที่ 15) และเมื่อนำโปรติเอสหยาบมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอสที่พีเอชต่างๆ คือ 4 5 6 7 8 และ 9 พบว่า ที่พีเอช 7 มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดและที่พีเอช 4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำสุด (ภาพที่ 16)

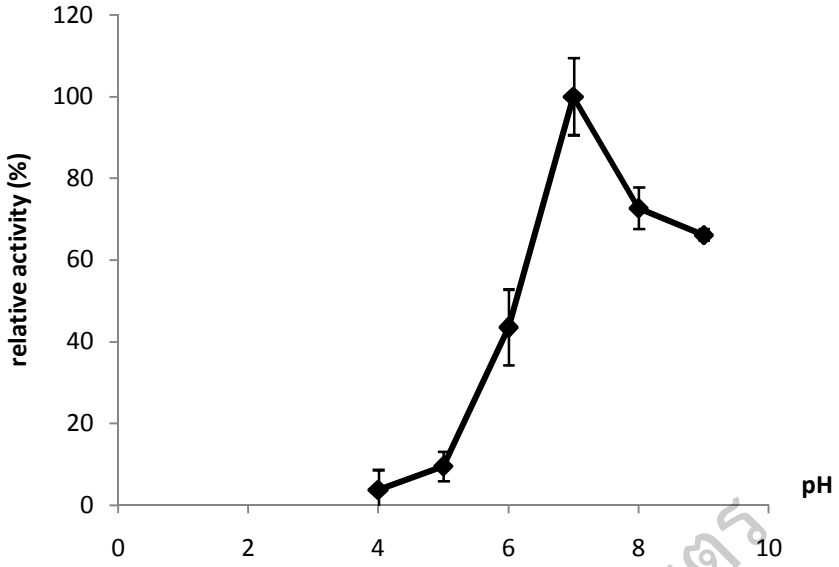


ภาพที่ 14 ลักษณะการเจริญของ *Bacillus subtilis* MR10 ในอาหารเหลว NB
(ก) ลักษณะของอาหารเหลว NB ก่อนการเจริญของแบคทีเรีย
(ข) แบคทีเรียที่เพาะเลี้ ยงในNB นาน 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 15 ค่ากิจกรรมโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 ที่สภาวะการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร



ภาพที่ 16 ค่ากิจกรรมโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 ที่สภาวะการทำปฏิกิริยาที่พีเอชต่างๆ

4.2 สภาวะที่เหมาะสมของโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 ในการย่อยโปรตีนถั่วเหลือง

โปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ที่เตรียมโดยใช้ถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่ากิจกรรมโปรติเอสเท่ากับ 308.66 หน่วย เมื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของโปรติเอสหยาบพบว่า โปรติเอสหยาบที่ได้มีปริมาณ FAN และโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ211.50 และ 117.93 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 8) การใช้โปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ในการเตรียมโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสท โดยใช้อัตราส่วนของถั่วเหลืองบดละเอียดต่อโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 (257.42 หน่วย) ที่อัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 (โดยน้ำหนัก) พบว่า ไฮโดรไลเสทที่ได้มีปริมาณ FAN อยู่ระหว่าง 470.91-1177.29 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 131.53-388.22 มิลลิลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 9) โดยที่ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดมีแนวโน้มลดลง เมื่ออัตราส่วนของถั่วเหลืองต่อโปรติเอสหยาบเพิ่มขึ้นและระยะเวลาในการย่อยนานขึ้น ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณ FAN ของไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยโดยการใช้อัตราส่วนของถั่วเหลืองบดละเอียดต่อโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ทั้ง 4 อัตราส่วน พบว่า ปริมาณ FAN ที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ระยะเวลาการย่อยมีผลต่อปริมาณ FAN โดยการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองด้วยโปรติเอสหยาบ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้ไฮโดรไลเสทได้ที่มีปริมาณ FAN สูงกว่าไฮโดรไลเสทที่ย่อยเป็นเวลา 2 4 และ 6 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) และในการทดลองครั้งนี้ ได้ใช้น้ำแทนโปรติเอสหยาบเติมลงในถั่วเหลืองบดละเอียด โดยใช้สภาวะในการศึกษาเดียวกับการย่อยถั่วเหลืองด้วยโปรติเอสหยาบ เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตร

FAN และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด พบว่า มีค่าโดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 36.90-165.48 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 256.92-510.77 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 8 คุณสมบัติของโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10

คุณสมบัติ	ปริมาณ
ค่ากิจกรรมโปรติเอส (units)	308.66±90.85
ปริมาณ FAN (mg/l)	211.50±2.00
ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด (mg/l)	117.93±3.22

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ตารางที่ 9 ผลของอัตราส่วนของถั่วเหลืองกับโปรติเอสหยาบและระยะเวลาในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองต่อปริมาณ FAN และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดในไฮโดรไลเสท

ปัจจัย	FAN (mg/l)	โปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด (mg/l)
ถั่วเหลือง:โปรติเอสหยาบ (*B. subtilis* MR 10)(w/w)	ns	*
อัตราส่วน 1:1	827.65±340.01	358.32±116.39[a]
อัตราส่วน 1:2	904.53±366.90	255.89±24.86[b]
อัตราส่วน 1:3	760.42±298.57	225.97±95.66[b]
อัตราส่วน 1:4	674.60±325.49	199.28±110.81[b]
อัตราส่วน 1:5	577.03±215.61	154.45±81.30[b]
ระยะเวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	*	ns
2 ชั่วโมง	558.86±366.90[b]	248.89±101.39
4 ชั่วโมง	675.32±271.72[b]	222.33±112.60
6 ชั่วโมง	773.77±315.84[ab]	235.63±141.62
12 ชั่วโมง	989.44±332.57[a]	255.96±127.67
อิทธิพลร่วม (อัตราส่วน x ชั่วโมง)	ns	ns
อัตราส่วน 1:1 x 2 ชั่วโมง	305.14±47.75	662.41±329.91
อัตราส่วน 1:1 x 4 ชั่วโมง	368.02±127.19	862.51±373.91
อัตราส่วน 1:1 x 6 ชั่วโมง	371.90±142.68	915.93±397.83
อัตราส่วน 1:1 x 12 ชั่วโมง	388.22±172.31	999.78±391.74
อัตราส่วน 1:2 x 2 ชั่วโมง	285.95±134.47	598.15±210.73
อัตราส่วน 1:2 x 4 ชั่วโมง	220.73±45.85	799.40±330.14
อัตราส่วน 1:2 x 6 ชั่วโมง	250.39±128.97	913.28±439.70
อัตราส่วน 1:2 x 12 ชั่วโมง	266.50±96.21	1177.29±362.26
อัตราส่วน 1:3 x 2 ชั่วโมง	244.77±116.77	579.01±313.87
อัตราส่วน 1:3 x 4 ชั่วโมง	234.80±101.16	638.79±177.70
อัตราส่วน 1:3 x 6 ชั่วโมง	209.15±114.84	832.93±321.67
อัตราส่วน 1:3 x 12 ชั่วโมง	215.17±103.84	990.95±312.67
อัตราส่วน 1:4 x 2 ชั่วโมง	222.63±101.52	483.83±217.23
อัตราส่วน 1:4 x 4 ชั่วโมง	195.13±78.35	548.49±250.42
อัตราส่วน 1:4 x 6 ชั่วโมง	156.57±184.07	669.41±179.68
อัตราส่วน 1:4 x 12 ชั่วโมง	262.62±113.14	996.66±454.36
อัตราส่วน 1:5 x 2 ชั่วโมง	470.91±168.96	185.97±117.68
อัตราส่วน 1:5 x 4 ชั่วโมง	527.39±197.79	131.53±43.82
อัตราส่วน 1:5 x 6 ชั่วโมง	537.33±214.85	151.60±118.49
อัตราส่วน 1:5 x 12 ชั่วโมง	772.51±248.17	147.33 ±64.89

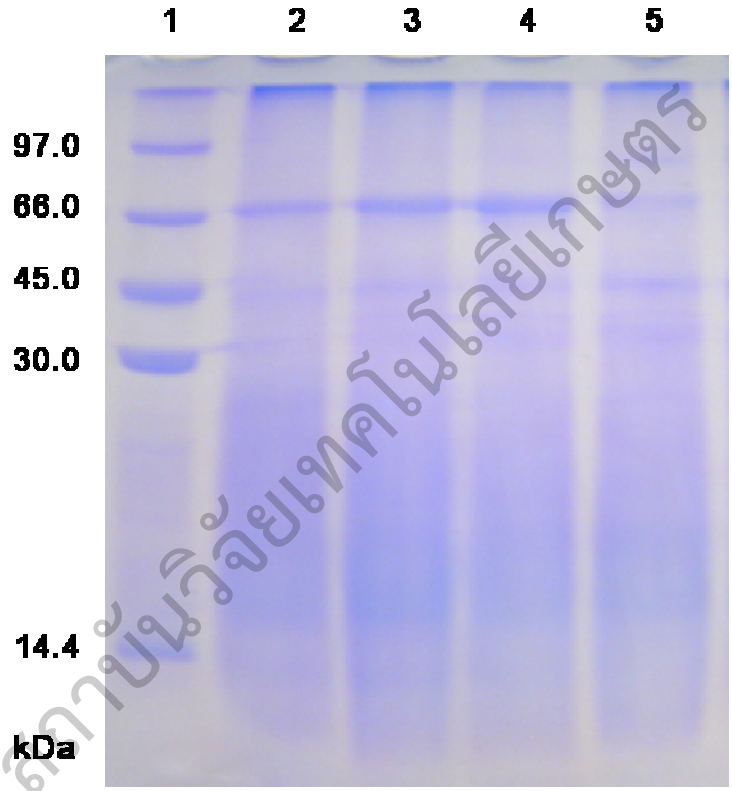
*ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

ns=ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p > 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ผลการจำแนกโปรตีนถั่วเหลืองหลังจากการย่อย

ภาพที่ 17 18 และ 19 แสดงรูปแบบ (pattern) ของโปรตีนถั่วเหลืองที่พบในไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้จากการทดลองครั้งนี้ ผลการเปรียบเทียบและการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนถั่วเหลืองในไฮโดรไลเสทที่เตรียมจากถั่วเหลืองกับโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ที่อัตราส่วน 1:2 ด้วยระยะเวลานาน 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 8) พบว่า โปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 97 ถึงต่ำกว่า 30 kDa ปรากฏบนแถบบนแผ่นเจลเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 17)



สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาพที่ 17 แผ่นเจล SDS-PAGE ของไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยถั่วเหลืองด้วยโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ที่อัตราส่วน 1:2 ที่ระยะเวลาต่างๆ

(1) โปรตีนมาตรฐาน

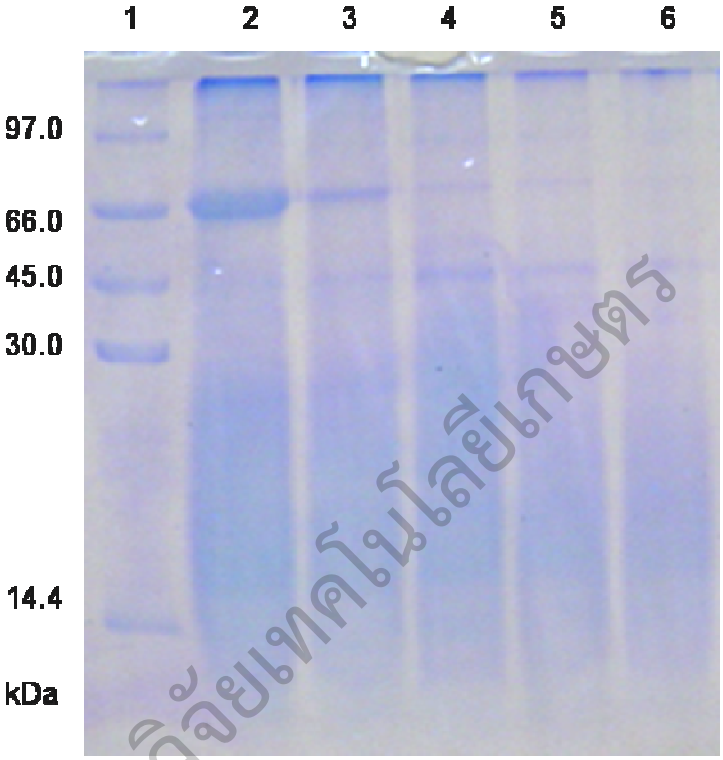
(2) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ นาน 2 ชั่วโมง

(3) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ นาน 4 ชั่วโมง

(4) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ นาน 6 ชั่วโมง

(5) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ นาน 12 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองด้วยโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ที่อัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า แถบโปรตีนขนาดใหญ่กว่า 30 kDa จะปรากฏในลักษณะของแถบโปรตีนที่มีความเข้มข้นลดลง (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 แผ่นเจล SDS-PAGE ของไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยถั่วเหลืองด้วยโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ที่อัตราส่วนต่างๆ ระยะเวลานาน 2 ชั่วโมง

(1) โปรตีนมาตรฐาน

(2) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ อัตราส่วน 1:1

(3) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ อัตราส่วน 1:2

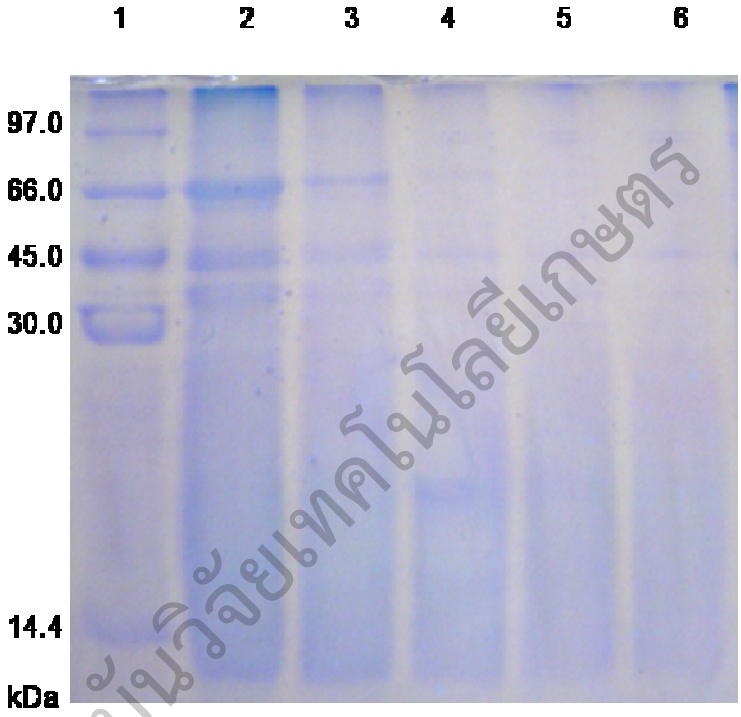
(4) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ อัตราส่วน 1:3

(5) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ อัตราส่วน 1:4

(6) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ อัตราส่วน 1:5

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ผลการจำแนกโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทที่เตรียมจากการใช้ถั่วเหลืองต่อโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ที่อัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 นาน 12 ชั่วโมง พบว่าที่อัตราส่วนการย่อยที่นานขึ้ น ทำให้โปรตีนขนาดใหญ่มีปริมาณลดลง ในทางตรงกันข้ามโปรตีนขนาดเล็กมีจำนวนเพิ่มมากขึ้ น จากการพิจารณาแถบโปรตีนบนแผ่นเจลที่แสดงให้เห็นถึงความเข้มข้นของแถบโปรตีนขนาดใหญ่ (ภาพที่ 19)



สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาพที่ 19 แผ่นเจล SDS-PAGE ของไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยถั่วเหลืองด้วยโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ที่อัตราส่วนต่างๆ ระยะเวลานาน 12 ชั่วโมง

(1) โปรตีนมาตรฐาน

(2) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ อัตราส่วน 1:1

(3) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ อัตราส่วน 1:2

(4) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ อัตราส่วน 1:3

(5) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ อัตราส่วน 1:4

(6) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโปรติเอสหยาบ อัตราส่วน 1:5

วิจารณ์

Bacillus subtilis MR10 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากถั่วเน่า และผ่านการทดสอบแล้วว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ (Wongputtisin, 2008) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *B. subtilis* MR10 พบว่า เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมบวก มีโคโลนีค่อนข้างกลม มีขอบหยัก ผิวหน้าไม่เรียบ และมีคุณสมบัติในการสร้างโปรติเอสส่งออกนอกเซลล์ (extracellular proteases) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Wongputtisin (2008) และ นาถยา (2552)

ผลการวิเคราะห์หาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 พบว่า โปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 มีค่า relative activity สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 7 แสดงว่า โปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 น่าจะจัดเป็น neutral protease (อุดมลักษณ์, 2533; หัสยา, 2553) อย่างไรก็ตาม หัสยา (2553) ทำการศึกษาการย่อยโปรตีนของโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 พบว่า โปรติเอสดังกล่าวมีความสามารถในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองได้ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้โปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ในการย่อยโปรตีนถั่วเหลือง เพื่อผลิตโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสท โดยโปรติเอสหยาบที่ใช้ในการทดลองมีค่ากิจกรรมโปรติเอสเฉลี่ย 308.66 หน่วย โดย 1 หน่วย แสดงถึงกิจกรรมโปรติเอสที่สามารถย่อยได้ 1 ไมโครกรัมสัมมูลย์ (µg equivalent) ไทโรซีนต่อนาที ณ สภาวะที่กำหนด คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและพีเอช 7.0 (ภาคผนวก ค) การนำโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ไปใช้ย่อยถั่วเหลืองบดละเอียดในการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 มีศักยภาพในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองสายพันธุ์ราชมงคล 1 โดยพิจารณาจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดและปริมาณ free α amino nitrogen หรือ FAN ที่มีค่าเพิ่มขึ้น ตามปริมาณการใช้โปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 และระยะเวลาในการย่อยที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ การเพิ่มปริมาณโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 จากอัตราส่วนของถั่วเหลืองกับโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 จาก 1:1 เป็น 1:5 ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าลดลงร้อยละ 56 และปริมาณ FAN มีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 30 ส่วนการเพิ่มระยะในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองจาก 2 ชั่วโมง เป็น 12 ชั่วโมง ทำให้ปริมาณ FAN มีค่าเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 43 ในขณะที่ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าคงที่ (ตารางที่ 9) การเพิ่มขึ้นของปริมาณFAN และการลดลงของปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดน่าจะเป็นผลเนื่องจากการทำกิจกรรมของโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ในการย่อยโปรตีน ทำให้เกิดหน่วยย่อยของโปรตีน เปปไทด์ และกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น(พัชรา, 2541) โดยที่การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์และเพิ่มระยะเวลาในการย่อยส่งผลต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Rickwood and Hame,

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1992) ทั้งนี้ คณะวิจัยหลายกลุ่มได้รายงานศักยภาพในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองของโปรติเอสในลักษณะใกล้เคียงกับการศึกษานี้ (นาถยา, 2552; หัสยา, 2553) เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ปริมาณ FAN ที่มีผลมาจากปัจจัยของอัตราส่วนของถั่วเหลืองต่อโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 และปัจจัยของระยะเวลาในการย่อยจึงคัดเลือกอัตราส่วนของถั่วเหลืองต่อโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ที่อัตราส่วน 1:2 และปัจจัยของระยะเวลาในการย่อยเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองด้วยโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 เนื่องจากสภาวะดังกล่าว ทำให้เกิดปริมาณ FAN สูงสุดในไฮโดรไลเสท (ตารางที่ 9)

ผลการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรไฟรีซิส ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกและวิเคราะห์ชีวโมเลกุล (อาภัสสรา, 2537) พบว่า โปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ที่เตรียมจากสภาวะที่กำหนดที่แตกต่างกัน ย่อยโปรตีนถั่วเหลืองได้แตกต่างกัน โดยระยะเวลาการย่อยที่นานขึ้น จำนวนโปรตีนขนาดใหญ่ที่มีปริมาณลดลงและจำนวนโปรตีนขนาดเล็กที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 17) ซึ่งเกิดจากการทำงานของโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ในการย่อยโปรตีนถั่วเหลือง (Wongputtisin, 2008; นาถยา, 2552) ทั้งนี้จากผลการศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ยังสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทางเคมีอีกด้วย กล่าวคือ ปริมาณ FAN ที่เพิ่มขึ้นกับโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็กที่มีปริมาณมากขึ้นตามความเข้มข้นของโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 และระยะเวลาในการย่อยที่เพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณ FAN เป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณไนโตรเจนของกรดอะมิโนอิสระ (Fleet, 1992) แสดงว่า ไฮโดรไลเสทที่มีปริมาณ FAN สูงก็จะบ่งชี้ได้ว่าไฮโดรไลเสทนั้นมีกรดอะมิโนอยู่สูงด้วย

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุป

1. อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 7

2. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองด้วยโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 คือ การใช้อัตราส่วนระหว่างถั่วเหลืองบดละเอียดต่อโปรติเอสหยาบจาก *B. subtilis* MR10 ในอัตราส่วน 1:2 และทำการย่อยที่อุณหภูมิ 50 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร