การพัฒนาวิธีการแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสเพื่อลอกกาวเส้นไหม

Modification of Screening Method for Silk Degumming Protease Producing Bacteria

เอกสิทธิ์ ฟูเฟื่องสมบัติ[1] ปทุมพร ฉิมเอนก[1]* และอมรรัตน์ พรหมบุญ[2]

Ekkasit Fufeungsombut[1], Patoomporn Chim-anage[1]* and Amornrut Promboon[2]

บทคัดย่อ

เส้นไหมดิบประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดคือ เซริซิน หรือกาวไหม และ ไฟโบรอิน หรือเส้นไหม โดย เซริซินเป็นกาวที่เคลือบอยู่บนเส้นไหมและจะต้องลอกออกโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสหรือสารเคมี แต่การใช้เอนไซม์เป็นวิธีที่เหมาะสมกว่า การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะหาวิธีแยกแบคทีเรียทีสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสซึ่งย่อยเซริซินโดยไม่ย่อยไฟโบรอิน เพื่อป้องกันเอนไซม์ทำลายเส้นไหม วิธีการแยกแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือการแยกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสบนอาหารแข็ง BMSM และ DMRS ได้เชื้อทั้งหมด 205 ไอโซเลต จากนั้นคัดเลือกเฉพาะไอโซเลตที่ย่อยเซริซิน เท่านั้น และพบว่ามีทั้งหมด 21 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ C4 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทิ้งของโรงงานผลิตเส้นไหมเป็นสายพันธุ์ที่เจริญได้เร็ว และผลิตโปรติเอสที่ลอกกาวไหมได้มากที่สุด เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้น คือทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี พบว่า แบคทีเรีย C4 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* และ crude enzyme โปรติเอสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ C4 สามารถลอกกาวหรือเซริซิน ซึ่งคิดเป็นน้ำหนักไหมดิบที่หายไป 20.21% (72.12% ของ เซริซิน ที่มีในเส้นไหมดิบทั้งหมด) หลังจากบ่มที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 37°C ภายในเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับวิธีดั้งเดิม และได้เส้นไหมที่มีความสะอาดและเรียบ ซึ่งยืนยันโดยตรวจสอบด้วย Scanning electron microscope

คำสำคัญ : โปรติเอส *Bacillus sp.* เส้นไหม เซริซิน การลอกกาว

ABSTRACT

The raw silk consists of two major proteins i.e. sericin (gum) and fibroin (silk fabric). Sericin is coated on the silk fabric and must be removed during degumming process by either protease or chemical agents. However, enzymatic process is more suitable. Screening method for protease producing bacteria in this study was focused on the characteristic of the enzyme. It must hydrolyze sericin rather than fibroin to prevent the silk damage. Screening method consisted of two steps, i.e. isolation of protease producing bacteria on BMSM and DMRS agar medium and 205 isolates were obtained. They were subsequently selected for strains possessed protease which hydrolyzed only

[1] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

[2] ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

* Correspondence author E-mail: fscippc@ku.ac.th

sericin and 21 isolates were observed. Among these strains C4, isolated from wastewater of a silk factory, was selected. It grew very fast and showed the highest activity of silk degumming protease. Based on morphological and biochemical characteristics assigned the isolate C4 closed to *Bacillus subtilis.* The crude enzyme from C4 could remove sericin 20.21% (72.12% of total sericin in raw silk) after incubation at pH 7.5 and 37°C for 2 h. The amount of sericin removal was similar to those of conventional methods and obtained clean and smooth silk fibrin which could be confirmed by Scanning electron microscope.

Keywords : Protease, *Bacillus* sp., silk, sericin, degumming

E-mail : **kusc6237@hotmail.com**

คำนำ

ผ้าไหมไทยเป็นสินค้าหัตถกรรมอย่างหนึ่งที่มีชื่อเสียงของประเทศไทย การเลี้ยงหนอนไหมบ้าน (The silkworm, *Bombyx mori*) ในประเทศไทยในปัจจุบันมี 3 แบบคือ 1) การเลี้ยงไหมพันธุ์ต่างประเทศ 2) การเลี้ยงไหมพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ต่างประเทศและพันธุ์พื้นเมือง และ 3) การเลี้ยงไหมพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งการเลี้ยงไหมประเภทหลังนี้ในปี 2544 มีเกษตรกรเลี้ยงไหมเพื่อเป็นรายได้เสริมประมาณ 161,868 ครัวเรือนมีปริมาณผลผลิตรังไหม 2,800 ตัน ซึ่งสามารถส่งออกไหมและผลิตภัณฑ์ไหมคิดเป็นมูลค่ามากกว่า 1,000 ล้านบาท

การเลี้ยงไหมในปัจจุบันของเกษตรกรไม่สามารถแข่งขันกับราคาเส้นไหม ที่นำเข้าจากต่างประเทศได้ การหาสารที่มีมูลค่าสูงจากส่วนเหลือทิ้งจากหม่อนและไหมเป็นทางออกอีกอย่างหนึ่งที่จะเพิ่มมูลค่าของอาชีพนี้ การหาสารที่มีมูลค่าสูงจากส่วนที่เหลือทิ้งของหม่อนและไหมได้แก่การผลิตกาวเซริซิน หลังจากการลอกกาวไหม การผลิต ไฟโบรอิน จากรังเสียหรือรังที่ถูกตัดด้วยวิธีชีวภาพ การสกัดฟอสฟอลิพิดจากตัวดักแด้และผีเสื้อ การหาสารออกฤทธิ์จากมูลไหม ตลอดจนการใช้เปลือกของต้นหม่อนทำกระดาษหรือเป็นวัสดุในการปลูกเห็ด เป็นต้น นอกจากจะทำให้เกษตรกรที่มีอาชีพปลูกหม่อนเลี้ยงหม่อนไหมมีรายได้สูงขึ้นแล้วยังช่วยลดมลภาวะที่เกิดขึ้นจากการปลูกหม่อนเลี้ยงไหม และทอผ้าไหม ทั้งนี้เนื่องจากอุตสาหกรรมการผลิตเส้นไหม เป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่ทำให้เกิดน้ำเสียเป็นปริมาณมาก โดยน้ำเสียเกิดจากกระบวนการลอกกาว ซึ่งจะใช้การต้มเดือดในด่างอุณหภูมิประมาณ 95°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เซริซินที่เคลือบอยู่บนผิวของเส้นไหมหลุดออก แต่เส้นไหมที่ได้จะถูกทำลายไปบ้าง เนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ของไหมดิบเป็นโปรตีน 2 ชนิด คือ ไฟโบรอิน (เส้นไหม) และ เซริซิน (กาวที่เคลือบเส้นไหม)ดังนั้นการลอกกาวก็คือการย่อยโปรตีน เซริซิน ออกไป ปัจจุบันได้มีการศึกษาการลอกกาวเส้นไหมโดยใช้เอนไซม์ โปรติเอส พบว่าสามารถลอกกาวเส้นไหมได้ อย่างสมบูรณ์ ทำให้มีผิวสัมผัสที่เรียบและดูเงางามมากขึ้น (Gulrajani *et al*., 2000; Freddi *et al*., 2003) โดยไม่ใช้สภาวะที่รุนแรง

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรติเอสที่ลอกกาวเส้นไหมได้ดี ในสภาวะที่ไม่รุนแรง เพื่อไม่ให้ทำลายสิ่งแวดล้อม และตรวจสอบความสามารถในการลอกกาวของแบคทีเรียที่แยกได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส

นำตัวอย่างดิน น้ำเสีย ตัวอ่อนหนอนไหม และใบหม่อน ที่เก็บจากบริเวณโรงงานผลิตเส้นไหม และแหล่งผลิตเส้นไหมทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย มาเจือจางและ spread ลงในอาหารแข็ง Davis minimal medium (Davis and Mingioli, 1980) ที่เติมผงไหมดิบลงไป 0.05% ของอาหาร (DMRS) หรือ ไฟโบรอิน (DMF) หรือ เซริซิน (DMS) และ อาหาร แข็ง Basal medium skim milk (BMSM) (จุฑาพร, 2543) ที่ปรับ pH เป็น 7.5 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 ถึง 20 วัน ยกเว้น BMSM agar ซึ่งบ่มเพียง 1 วัน เลือกแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง DMRS, DMS และสร้างโซนใสบน BMSM แต่ไม่เจริญบนอาหารแข็ง DMF

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BMSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตรปรับ pH 7.5 ในฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยง จากนั้นเก็บส่วนใส (crude enzyme) เพื่อนำไปทดสอบการลอกกาวเส้นไหมดิบ โดยบ่มเอนไซม์กับเส้นไหม ที่ pH 7.5 และอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอัตราส่วนระหว่างเส้นไหมดิบแห้ง (g) : crude enzyme (มิลลิลิตร) = 1:30 และตรวจสอบน้ำหนักที่หายไปของเส้นไหมดิบ

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

ในการทดลองครั้งนี้ ต้องการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ลอกกาวไหม ดังนั้นสับสเตรตที่ใช้จึงควรเป็นเซริซิน แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งแตกต่างจากการใช้เคซีนเป็นสับสเตรตซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้วัดในรูปของไทโรซีน ผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้โดยใช้เคซีนไปก่อนแล้วตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเคซีน และเซริซินอีกต่อหนึ่ง สำหรับวิธีวิเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสจากไอโซเลต C4 มีดังต่อไปนี้

ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยดูจากความสามารถในการย่อยสลายเคซีน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นภายใต้สภาวะควบคุมที่ pH 8 และ อุณหภูมิที่ 60°C เป็นเวลา 10 นาที โดยให้ 1 หน่วย (unit) ของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับความสามารถในการปลดปล่อยไทโรซีนจากเคซีน ใน 1 นาที

3. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสในการย่อยเคซีน เซริซิน และไฟโบรอินบนอาหารแข็ง

เตรียม casein agar plate, fibroin agar plate และ sericin agar plate หยดเอนไซม์ที่ระดับความเจือจางแตกต่างกัน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในโลหะอลูมิเนียมรูปทรงกระบอกกลวง (ring) บนจาน agar ทั้ง 3 ชนิด และบ่มที่ 37°C โดยใช้เวลา 12 – 24 ชั่วโมง ย้อมด้วย coomassie blue แล้ววัดขนาดของโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

4. การตรวจสอบสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

ตรวจสอบสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในขั้นต้น ทางด้านสัณฐานวิทยา และ ชีวเคมี ตามหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ลอกกาวไหม

ในการแยกเชื้อครั้งนี้ใช้ตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่ที่เลี้ยงหนอนไหม หรือมีการลอกกาวไหมในจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดสุรินทร์ จังหวัดบุรีรัมย์ และดินในพื้นที่ปลูกต้นหม่อน ซึ่งได้นำเส้นไหมไปฝังไว้เป็นเวลา 2 เดือน และนอกจากตัวอย่างดินแล้วยังมีตัวอย่างที่เป็นของเหลวได้แก่ ตัวอย่างน้ำลอกกาวที่เติม EM และตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานลอกกาวไหม โดยการแยกและคัดเลือกเชื้อทำเป็น 2ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 แยกโคโลนีที่สามารถเจริญบน DMRS agar หรือ BMSM agar

เนื่องจากเซริซินเป็นสับสเตรต ที่ละลายน้ำได้บางส่วน และมีขนาดโมเลกุลไม่สม่ำเสมอมีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ การแยกเชื้อด้วยอาหาร DMRS ที่ใช้ผงไหมดิบเป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน แล้วดูโซนใส รอบโคโลนีจึงเป็นไปได้ยาก ผู้ทดลองจึงเปลี่ยนวิธีโดยดูการเจริญบนอาหารนี้แทน แต่เนื่องจาก DMRS เป็น minimal medium ทำให้เชื้อเจริญได้ช้าใช้เวลาประมาณ 15-20 วัน จากผลการทดลองอาหารนี้เหมาะสำหรับเชื้อที่ต้องการอาหารน้อยในการเจริญจึงพบ actinomycyte เป็นส่วนใหญ่ สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญบน DMRS มีเพียง 20.41% ของจำนวนจุลินทรย์ทั้งหมดที่แยกได้ด้วยอาหารนี้ (ตารางที่1)

สำหรับอาหาร BMSM ใช้ skim milk เป็นแหล่งไนโตเจนของแบคทีเรียแทนเซริซินในการคัดแยก แม้จะเป็นวิธีแบบหยาบๆ โดยเลือกโคโลนีที่มีโซนใสอยู่โดยรอบ แต่มีข้อดีตรงที่สามารถแยก แบคทีเรีย ที่สร้างโปรติเอสได้หลายไอโซเลต (คิดเป็น 98.80% ของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมดที่มีแนวโน้มในการสร้างโปรติเอส) นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังเจริญได้ดีบน BMSM agar และสามารถเห็นโคโลนีและโซนใสได้ชัดเจน เมื่อบ่มเพียง 24 ชั่วโมง การรวบรวมแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสในขั้นตอนนี้อาจจะมีบางสายพันธุ์ที่สามารถย่อยเซริซิน หรือ ไฟโบรอินได้ด้วย

ตารางที่ 1 จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆที่มีแนวโน้มในการผลิตโปรติเอส

Sources	No. Of samples	BMSM		Isolated bacteria %	DMRS		Isolated bacteria %
		Bacteria	Other		Bacteria	Other	
ดินจากจังหวัดนครราชสีมา	7	47	-	100.00	6	39	13.33
ดินจากจังหวัดสุรินทร์	9	12	-	100.00	7	43	14.00
ดินจากจังหวัดบุรีรัมย์	12	17	-	100.00	10	55	15.38
ตัวอย่างน้ำลอกกาว + EM	1	4	2	66.67	5	1	83.33
น้ำเสีย	3	6	-	100.00	4	-	100.00
รังไหมฝังดิน	4	79	-	100.00	8	18	30.77
รวม	36	165	2	98.80	40	156	20.41

ขั้นที่ 2 คัดเลือกเฉพาะไอโซเลต ที่ผลิตโปรติเอสซึ่งย่อยเซริซินแต่ไม่ย่อยไฟโบรอิน

วัตถุประสงค์ของการแยกแบคทีเรียครั้งนี้คือต้องการแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสที่ลอกกาวไหม โดยไม่ย่อยเส้นไหม เพื่อให้ได้เส้นไหมที่สมบูรณ์ โดยนำเชื้อที่แยกจากขั้นที่1 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร DMRS, DMF และ DMS แล้วเลือกเฉพาะเชื้อที่เจริญบน DMRS และ DMS แต่ไม่เจริญบนอาหาร DMF ภายในเวลา 7 วัน เพื่อแสดงถึงความจำเพาะต่อสับสเตรตของเชื้อ ผลการทดลอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมีทั้งหมด 21 ไอโซเลต (ตารางที่ 2) โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร DMRS 14 ไอโซเลต คิดเป็น 35% ของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากอาหาร DMRS agar (156 ไอโซเลต) ในขั้นตอนที่1 และจากอาหาร BMSM 7 สายพันธุ์ คิดเป็น 4.24% ของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากอาหาร BMSM agar (165 ไอโซเลต).ในขั้นตอนที่1 (ตารางที่ 1) และพบว่าเชื้อสายพันธุ์ C4 สามารถเจริญใน minimal medium ได้ดีที่สุด โดยสามารถเจริญบนอาหาร DMRS และอาหาร DMS ได้เร็วที่สุดคือเจริญเมื่อบ่มเพียง 1 วัน ส่วนเชื้ออีก 20 ไอโซเลตพบการเจริญเมื่อบ่มนาน 4-7 วัน

2. การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลว และการตรวจประสิทธิภาพในการลอกกาวไหม

เมื่อนำจุลินทรีย์ทั้ง 21 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BMSM medium เพื่อตรวจสอบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ โดยปรับ pH 7.5 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยง จากนั้นเก็บส่วนใส (crude enzyme) มาลอกกาวไหมพบว่า crude enzyme จากแบคทีเรียสายพันธุ์ C4 สามารถลอกกาวไหมได้ดีที่สุด โดยคิดเป็นน้ำหนักเส้นไหมที่หายไป 20.21% (ตารางที่ 3) หรือสามารถลอกกาว เซริซิน ได้ 72.12% ของปริมาณเซริซินทั้งหมดที่มีในเส้นไหม จึงสรุปได้ว่า C4 สามารถลอกกาวเส้นไหมได้จริง

3. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสในการย่อยเคซีน เซริซิน และไฟโบรอินบนอาหารแข็ง

เพื่อยืนยันคุณสมบัติของเอนไซม์ว่าสามารถย่อยเคซีน เซริซิน และไฟโบรอินได้หรือไม่ โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก แบคทีเรีย C4 มาทดสอบความสามารถในการย่อยบนอาหารแข็ง และวัดขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นผลที่ได้พบว่าเอนไซม์ย่อยได้ทั้งเคซีน และเซริซิน (ภาพที่1) แต่ไม่ย่อยไฟโบรอิน ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีถ้านำไปใช้ในการลอกกาวจากเส้นไหม เพราะเอนไซม์จะไม่ทำลายเส้นไหมซึ่งเป็นไฟโบรอิน ต่างจากเอนไซม์ทางการค้า เช่น alcalase ที่ย่อยทั้ง ไฟโบรอิน และ เซริซิน

ตารางที่ 2 สายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากขั้นตอนที่ 2 ของวิธีการการแยกเชื้อในอาหารแข็ง

Isolated medium	isolate	growth (day)	Isolated medium	isolate	growth (day)
DMRS agar	S1	6	BMSM agar	C4	1
	S2	4		C5	4
	S3	6		C6	4
	S5	6		M1-1	6
	S9	5		M1-4	5
	S10	6		M 72	7
	S13	5		M4-1	6
	S14	5			
	S15	7			
	S16	5			
	S17	5			
	S18	5			
	S19	4			
	S21	5			

หมายเหตุ : growth = ระยะเวลาเป็นวันที่พบการเจริญของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตในอาหารแข็ง DMRS และ BMSM

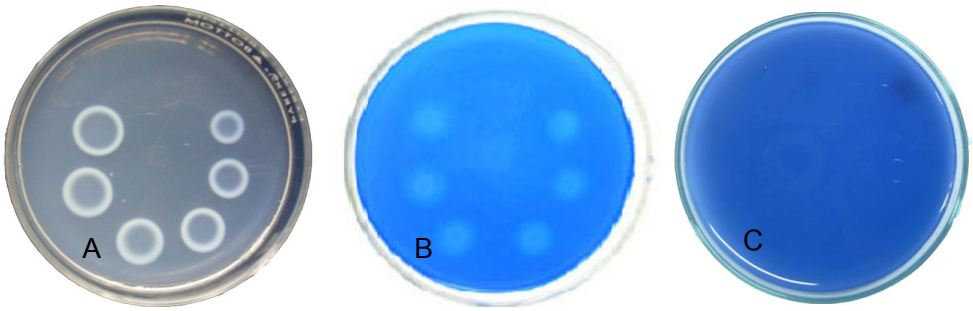
4. **ลักษณะของเส้นไหมที่ผ่านการลอกกาวโดยเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย** C4

ในการศึกษาความสามารถในการลอกกาวเส้นไหมของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย C4 โดยนำเส้นไหมที่ผ่านการลอกกาวจากข้อ 1 โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย C4 ที่คงตัวและ active มาเปรียบเทียบกับเส้นไหมที่ผ่านการลอกกาวโดยใช้เอนไซม์จาก C4 ที่เสียสภาพ (denature) ด้วยความร้อน (ใช้เป็น control) แล้วนำเส้นไหมที่ได้ไปตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด พบว่าเส้นไหมที่ผ่านการลอกกาวโดยเอนไซม์จากแบคทีเรีย C4 ที่ยังไม่เสียสภาพ (ภาพที่ 2B) มีลักษณะที่เรียบ และสะอาดกว่าเส้นไหมที่ผ่านการลอกด้วย

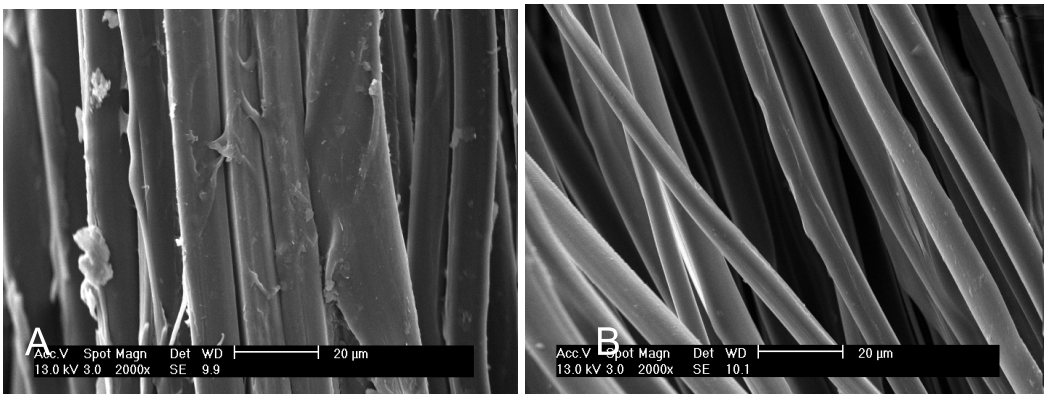
ตารางที่ 3 ความสามารถในการลอกกาวเซริซิน โดยคิดเป็นน้ำหนักที่หายไปของเส้นไหมดิบ หลังจากผ่านการลอกกาวด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้

DMRS agar			Isolated from BMSM agar		
Isolate	Weight loss (%)	Sericin removal(%)	Isolate	Weight loss (%)	Sericin removal(%)
S1	7.35	26.25	C4	20.21	72.12
S2	6.18	22.07	C5	7.04	25.14
S3	2.76	27.63	C6	1.59	5.68
S5	2.89	10.32	M1-1	1.62	5.78
S9	7.01	25.04	M1-4	2.85	10.18
S10	2.99	10.68	M72	6.53	23.32
S13	3.83	13.68	M4-1	0.94	3.36
S14	1.12	4.00			
S15	8.69	31.04			
S16	7.65	27.32			
S17	3.36	12.00			
S18	8.26	31.68			
S19	8.87	31.68			
S21	3.73	13.32			

เอนไซม์ที่เสียสภาพแล้ว (ภาพที่ 2A) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก C4 สามารถลอกกาวได้ดี และเส้นไหม หรือโปรตีนไฟโบรอินยังคงสภาพดีไม่ถูกทำลาย อย่างไรก็ตามยังมีกาวหลงเหลืออยู่บ้าง ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการลอกกาวอย่างละเอียดต่อไป สำหรับภาพ A เส้นไหมยังเกาะตัวกันแน่น ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ที่เสียสภาพไม่สามารถลอกกาวได้ การหลุดลอกของกาวเกิดได้เล็กน้อยเพราะเซริซินสามารถละลายน้ำได้บ้าง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานจาก Chang et al. (2007) กล่าวว่าการกำจัดเซริซิน ออกจากเส้นไหมดิบจะทำให้เส้นไหมมีพื้นผิวที่เรียบไม่มีรอยแตก ซึ่งการใช้เอนไซม์จากแบคทีเรีย C4 สำหรับลอกกาวเซริซิน สามารถลอกกาวได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง และทำให้เส้นไหมมีคุณภาพที่ดีขึ้น



ภาพที่ 1 โซนใสบน agar plate ที่มี 1%เคซีน (A), 1%เซริซุน (B) และ 1%ไฟโบรอิน (C) หลังผ่านการย่อยด้วย crude enzyme โปรติเอสจากแบคทีเรีย C4 ที่ระดับความเจือจาง 1/10, 1/5, 2/5, 3/5, 4/5, 5/5



ภาพที่ 2 ภาพจากกล้องจุลทรรศ์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด แสดงพื้นผิวของเส้นไหมหลังผ่านการลอกด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย C4 โดย ภาพ A เป็นเส้นไหมที่ผ่านการลอกด้วยเอนไซม์ที่เสียสภาพด้วยความร้อน (denatured enzyme) ภาพ B เป็นเส้นไหมที่ผ่านการลอกด้วยเอนไซม์ที่ยังไม่เสียสภาพ

5. การตรวจสอบสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถลอกกาวไหม

เมื่อทำการจัดจำแนกในระดับสกุล (genera) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ C4 โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี ข้อมูลเบื้องต้นพบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ C4 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* มากที่สุด ตามหนังสือ Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2 และจะศึกษาการจัดเรียงลำดับของเบสใน 16s rRNA gene ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. BMSM agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการแยกเชื้อแบคทีเรียทีผลิตโปรติเอสทั่วไป เพราะแบคทีเรียเจริญได้ดี ทำให้ได้โคโลนีที่ผลิตโปรติเอสจำนวนมาก จึงมีโอกาสจะได้สายพันธุ์ที่ดีมากขึ้น และในการทดลองนี้ สายพันธุ์ C4 ก็แยกจาก BMSM agar ส่วน DMRS agar เป็นอาหารที่มีไหมดิบเป็นองค์ประกอบ แบคทีเรียที่แยกจากอาหารชนิดนี้จึงเป็นกลุ่มที่ย่อยไหมได้เป็นส่วนใหญ่ แต่อาหารมีสารอาหารอื่นน้อย จึงทำให้แบคทีเรียเจริญได้ช้า และ พบว่า actinomycete เป็นกลุ่มที่เจริญได้ดีที่สุด และผลการทดลองครั้งนี้พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จาก DMRS agar เจริญได้ช้ากว่า แม้จะเปลี่ยนไปเพาะเลี้ยงใน อาหารอื่น

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสที่ย่อยเฉพาะเซริซินแต่ไม่ย่อยไฟโบรอินเป็นขั้นตอนที่จำเป็น เพื่อป้องกันเส้นไหมถูกทำลายขณะย่อย ซึ่งในการพัฒนาวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์นี้สามารถแยกแบคทีเรีย C4 ที่ผลิตโปรติเอสที่มีคุณสมบัติดังกล่าวโดยใช้อาหาร DMS และ DMF ในการคักเลือก อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาโดยละเอียดต่อไป

3. เราสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ C4 ที่มีความสามารถในการลอกกาวไหมในขั้นต้นนี้ได้ประมาณ 20.21% ของน้ำหนักที่หายไป หรือคิดเป็น 72.12% ของปริมาณเซริซิน ทั้งหมด และกาวไหมถูกกำจัดออกอย่างชัดเจนเมื่อตรวจพิสูจน์โดย scanning electron microscope และเส้นไหมก็เรียบสวย ง่ายต่อการมัดย้อม

4. เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ C4 ไปตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมี พบว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis*

5. สิ่งที่จะต้องศึกษาต่อไปคือ คุณสมบัติของ crude enzyme จากสายพันธุ์ C4 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการลอกกาวไหม เช่น optimum pH and temperature และ pH and temperature stabilityของเอนไซม์ ตลอดจนระยะเวลาที่เหมาะสมในหาลอกกาวไหม และการเก็บรักษาเอนไซม์ ซึ่งจะนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงปฏิบัติได้จริง

กิตติกรรมประกาศ

การทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนทุนในการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว) และสถาบันวิจัยแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

จุฑาพร แสวงแก้ว. 2543. การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Bergey's manual of systematic bacteriology. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology. 8th ed. Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Chang, S.K., J. W. Kim, H.J. Oh, K.H. Lee and Y.H. Park. The effect of residual silk sericin on the structure and mechanical property of regenerated silk filament. Int. J. Biol. Macromol. 2007. 41: 346-353.

Davis, B.D. and E.S. Mingioli. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine of vitamin B12. J. Bacteriol. 1980. 60: 17-28.

Freddi, G., R. Mossotti and R. Innocenti. Degumming of silk fabric with several proteases. J. Biotechnol. 2003. 106: 101-112.

Gulrajani, M.L., R. Agarwal and S. Chand. Degumming of silk with fungal protease. Indian J. Fibre Textile Res. 2000. 25: 138-142.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951. 193: 265-275.