รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์ต่างๆ อย่างรวดเร็ว

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

พันธุวิศวกรรม เกี่ยวข้องกับการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Screening of bioactive compound) และการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพ (Utilization of natural bio-resources)

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

โดยทั่วไปเมื่อต้องการตรวจสอบและคัดกรองเอนไซม์ต่างๆ อย่างรวดเร็ว เช่นการตรวจสอบเอนไซม์ย่อยแป้ง (amylolytic enzyme) เอนไซม์ย่อยไขมัน (lipolytic enzyme) เอนไซม์ย่อยไซแลน (xylanolytic enzyme) และเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) จะใช้วิธีที่เรียกว่าการทดสอบบนเพลท (plate assay) ซึ่งทำได้โดยการผสมสับสเตรท (substrate) ลงไปในอาหารแข็ง (agar medium) แล้วทำการเทแผ่เซลล์ที่ต้องการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ลงบนอาหารที่มีสับสเตรท เช่น ถ้าต้องการคัดกรองหาเอนไซม์ไซแลนเนส (xylanase) มีการใช้สับสเตรท เช่น 0.04% RBB-ไซแลน ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ซึ่งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนสที่เกิดขึ้นจะบอกได้จากการผลิตเคลียร์โซน (clear zone) รอบๆ โคโลนีของจุลินทรีย์ (Stephens et al.; 2007) หรือมีการผสม 1% ของ oat spelt xylan ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนสได้จากเคลียร์โซนที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีหลังจากชะด้วยสารละลายคองโกเรด นอกจากนี้มีรายงานว่ามีการพัฒนาเทคนิคสร้างสารไซแลนสีแดง (เป็นการเชื่อมต่อโมเลกุลของไซแลนกับ Cibacron Brilliant Red 3B-A) ผสมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ได้โดยปรากฏวงรัศมีสีแดง (red halo) รอบๆ โคโลนี (Ten et al.; 2004)

นอกจากการคัดกรองเอนไซม์โดยวิธีการทดสอบบนเพลทแล้ว พบรายงานว่ามีการใช้ 3,5-dinitrosalicyclic acid (DNS method) ในการคัดกรองกิจกรรมของเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่ย่อยโพลีแซกคาไรด์ แต่วิธีนี้มีข้อยุ่งยากคือ ต้องมีการเลี้ยงเซลล์และทำให้เซลล์แตก (break cells) เพื่อให้เอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมาแล้วย่อยไซแลนที่ละลายน้ำ (soluble xylan) ให้เกิดน้ำตาลรีดิวส์ เพื่อทำปฏิกิริยากับ DNS (Miyazaki et al.; 2006)

สำหรับการคัดกรองเอนไซม์เอสเทอเรส พบว่ามีการคัดกรอง โดยผสม 1% สารทวีน 20 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Luria Bertani (LB agar) แล้วตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยดูโซนที่เกิดขึ้นรอบๆ โคโลนี (Rondon et al.; 2000) บางรายงานพบว่ามีการคัดกรองเอสเทอเรสโดยผสมสารไตรบิวไทริน 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และสังเกตเคลียร์โซนรอบๆ โคโลนีเช่นกัน (Voget et al.; 2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานการคัดกรองหาเอสเทอเรสโดยการเททับ (overlay) ด้วย 0.8% วุ้นชั้นบนที่มีสับสเตรท คือ 20 µg/ml Fast blue RR และ 80 µl/ml α-naphthyl acetate ลงบนโคโลนีที่เลี้ยงไว้ที่ 37°ซ ซึ่งเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เอสเทอเรสจะทำให้เกิดสีน้ำตาลรอบโคโลนี (Kim et al., 2006)

ปัญหาที่มักจะเกิดจากการคัดกรองโดยวิธีการทดสอบบนเพลทคือไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แล้วเก็บสะสมไว้ในเซลล์ (Intracellular enzyme) หรือแบคทีเรียที่ปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ได้ในปริมาณน้อย พบว่ามีการใช้สารเคมี เช่น สารดี-ไซโคลเซอรีน (D-cycloserine) ในการทำให้เซลล์รั่วซึ่ง

สารเคมีดังกล่าวมักจะมีราคาแพงจึงไม่เหมาะสมในการคัดกรองเอนไซม์จากแบคทีเรียในปริมาณมากๆ และยังพบว่าในกรณีที่สับสเตรทราคาแพงมักจะเป็นไปได้ค่อนข้างยากในการที่จะผสมสับสเตรทลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้การคัดกรองเชื้อที่สร้างเอนไซม์ที่ต้องการมีความสิ้นเปลืองมาก นอกจากนี้ยังพบปัญหาในกรณีที่สับสเตรทไม่สามารถละลายน้ำได้หรือเป็นเม็ดเล็กๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง มักจะมีปัญหาว่าสับสเตรทจะตกตะกอนอยู่ก้นเพลท ซึ่งเป็นปัญหาต่อการสังเกตกิจกรรมของเอนไซม์ ทำให้สังเกตกิจกรรมของเอนไซม์ได้ค่อนข้างยากสำหรับแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ได้ในปริมาณน้อย

การประดิษฐ์นี้จึงได้ปรับปรุงวิธีการคัดกรองหาเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แล้วเก็บสะสมไว้ในเซลล์ ซึ่งโดยปกติเอนไซม์ที่ถูกผลิตและสะสมในเซลล์จะใช้เวลาค่อนข้างนาน 2-3 วันกว่าเอนไซม์จะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยเกิดการรั่วของเอนไซม์ผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงได้คิดค้นหาวิธีการที่ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียมีรูรั่วและปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาโดยที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวิธีการที่เรียกว่าเทคนิคการเททับ ซึ่งจะผสมสารต่างๆ ที่มีผลต่อการรั่ว (permeabilize) ของผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมา การประดิษฐ์นี้ได้ทำให้เกิดรูรั่วบนผนังเซลล์แทนการใช้สารดี-ไซโคลเซอรีนโดยมีการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์และปลดปล่อยเอนไซม์ออกมา และสามารถคัดกรองเอนไซม์ที่มีสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำโดยใช้เทคนิคการเททับ

ผลงานที่มีอยู่ก่อนหน้ามีการใช้เทคนิคการเททับเพื่อคัดกรองหาเอนไซม์เอสเทอเรสโดยใช้สารเคมีที่ทำให้เกิดการรั่วของเซลล์ คือ สารดี-ไซโคลเซอรีน ซึ่งมีราคาที่ค่อนข้างแพง หากต้องนำมาคัดกรองเชื้อเป็นจำนวนมากก็จะทำให้เสียค่าใช้จ่ายเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการใช้สารเคมี เช่น SDS, สารซาโคซีน, สารไทรทอนเอ็กส์-100 ทดแทนสารดี-ไซโคลเซอรีน จึงช่วยการลดค่าใช้จ่ายได้เป็นอย่างดี และยังให้ผลชัดเจนและรวดเร็วกว่าการใช้สารดี-ไซโคลเซอรีนอีกด้วย

การประดิษฐ์นี้สามารถประยุกต์ใช้กับการคัดกรองหาเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิด โดยสามารถดูจากเคลียร์โซน หรือการเกิดสี ซึ่งผลงานที่มีมาก่อนมักจะคัดกรองหาเอนไซม์เพียงชนิดเดียว ดังนั้นถ้าหากสามารถคัดกรองหาเอนไซม์ได้มากกว่า 1 ชนิด และผลที่ได้เป็นที่น่าเชื่อถือ จะทำให้การคัดกรองหาเอนไซม์ได้สะดวกรวดเร็วยิ่งขึ้น โดยสามารถนำวิธีนี้มาคัดกรองเอนไซม์ที่ทำงานที่สภาวะรุนแรง เช่น ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และสารเคมีต่างๆ เช่น เอนไซม์ทนกรดจากแบคทีเรีย เช่น ไซแลนเนส หรือ โปรติเอส เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เอนไซม์ทนด่าง เช่น ไซแลนเนส เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษหรือเอนไซม์เอสเทอเรสทนด่างเพื่อใช้ในปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารเคมีในอุตสาหกรรมยาหรือเครื่องสำอางได้

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้ได้ปรับปรุงวิธีการคัดกรองหาเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แล้วเก็บสะสมไว้ในเซลล์ ซึ่งโดยปกติเอนไซม์ที่ถูกผลิตและสะสมในเซลล์จะใช้เวลาค่อนข้างนานโดยอาจมากถึง 2-3 วันกว่าเอนไซม์จะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์โดยเกิดการรั่วของผนังเซลล์ของแบคทีเรียตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงได้หาวิธีการทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียมีรูรั่วและปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาโดยที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวิธีการที่เรียกว่าเทคนิคการเททับ ซึ่งจะผสมสารต่างๆ ที่มีผลต่อการรั่วของผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้เกิดการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมา การประดิษฐ์นี้ได้มุ่งเน้นการพัฒนาสูตรสารเคมีที่ทำให้เกิดรูรั่วบนผนังเซลล์แทนการใช้สารดี-ไซโคลเซอรีนเพื่อการประยุกต์ใช้ในการคัดกรองเอนไซม์จากจุลินทรีย์

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 ความสามารถของสารเคมีในการทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสหลังการเททับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวุ้น 0.7%

รูปที่ 2 ความสามารถของสารเคมีในการทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสหลังการเททับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวุ้น 0.7%

รูปที่ 3 ความสามารถของสารเคมีในการทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เอสเทอเรสหลังการเททับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวุ้น 0.7%

รูปที่ 4 ความสามารถของสารเคมีในการทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสหลังการเททับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวุ้นที่ผสมกับสารเคมีมากกว่า 1 ชนิด

รูปที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสภายหลังการตรวจสอบด้วยเทคนิคการเททับชนิดที่ใช้สับสเตรทไม่ละลายน้ำ

รูปที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสจากแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูงภายหลังการตรวจสอบด้วยเทคนิคการเททับ โดยทำการผสมสับสเตรท AZCL-xylan ในวุ้น 0.7% ในสารบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ

รูปที่ 7 การพัฒนาเทคนิคการเททับ เพื่อการคัดกรองหาเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิด 7.1) กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสและโปรติเอสภายหลังการตรวจสอบด้วยเทคนิคการเททับ 7.2) กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสและเอสเทอเรสภายหลังการตรวจสอบด้วยเทคนิคการเททับ

รูปที่ 8 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ภายหลังการเลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงเพื่อการคัดกรองหาเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิด 8.1) กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสและโปรติเอสภายหลังการเลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและการตรวจสอบด้วยเทคนิคการเททับ 8.2) กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสและโปรติเอสภายหลังการเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและการตรวจสอบด้วยเทคนิคการเททับ

รูปที่ 9 การนำ เทคนิคการเททับ ไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสและโปรติเอสในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูงภายหลังการเลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็น 48 ชั่วโมงแล้วเททับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวุ้น 0.7% ที่ผสม AZCL-xylan + 0.1% SDS ในสารบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

การประดิษฐ์นี้ได้ทำให้เกิดรูรั่วบนผนังเซลล์แทนการใช้สารดี-ไซโคลเซอรีน เพื่อปลดปล่อยเอนไซม์ออกมา และสามารถใช้ร่วมกับเทคนิคการเททับโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ เพื่อคัดกรองเอนไซม์บนอาหารแข็งตามวิธีปกติหรือวิธีการเททับร่วมกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งทำให้สับสเตรทตกไปสัมผัสผิวโคโลนีโดยตรง ทำให้เอนไซม์สามารถสัมผัสสับสเตรทได้มากขึ้น จึงช่วยให้สามารถตรวจสอบกิจกรรมการทำงานได้ชัดเจนและรวดเร็วขึ้น ทั้งนี้การใช้สารเคมีที่พัฒนาขึ้นร่วมกับเทคนิคการเททับสามารถช่วยให้คัดกรองเอนไซม์จากเชื้อที่ทำงานในสภาวะรุนแรงได้ เช่น ต้องการคัดกรองเอนไซม์ที่ทำงานได้ในสภาวะที่เป็นด่างสูง เช่น pH 10 ถ้าหากใช้การเทแผ่เชื้อลงบนจานวุ้นธรรมดาเพียงอย่างเดียว บางครั้งอาจเกิดปัญหาว่าเชื้อไม่สามารถโตได้ แต่ในการประดิษฐ์นี้เทคนิคการเททับด้วยวุ้น 0.7% สามารถแก้ปัญหาเดิมได้ เนื่องจากการเททับด้วยวุ้นดังกล่าวในสารละลายบัฟเฟอร์นี้จะทำเมื่อเชื้อโตเต็มที่ จึงไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์อีกทั้งยังสามารถปรับเปลี่ยน pH ของวุ้นได้ตามที่ต้องการ

กรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์ต่างๆ อย่างรวดเร็วในการประดิษฐ์นี้มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่ผสมสับสเตรทของเอนไซม์ที่ต้องการตรวจและคัดกรองมีลักษณะพิเศษคือ ประกอบด้วย 0.05% ของสับสเตรทสำหรับคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ และอาจประกอบด้วย 1 มิลลิโมลาร์ IPTG และยาปฏิชีวนะ เช่น แอมพิซิลินหรือกานาไมซิน ที่ความเข้มข้นประมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

   สับสเตรทที่ใช้ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่ต้องการตรวจและคัดกรอง ได้แก่

   a. สับสเตรทไม่ละลายน้ำประเภทโพลีแซคคาไรด์ในกลุ่มเฮมิเซลลูโลส เช่น ไซแลน เซลลูโลสและอนุพันธ์ กลูแคน และแป้ง ซึ่งติดด้วยสีในกลุ่มอะโซ (Azo dye) สำหรับคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มย่อยโพลีแซคาไรด์จำเพาะชนิดต่างๆ ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลสเช่นไซแลเนส เซลลูเลส กลูคาเนส และอไมเลส
   b. สารไตรบิวไทริน 1% และสารกัมแอราบิค 0.1% สำหรับคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตเอสเทอเรส และ
   c. นมพร่องมันเนย 2% สำหรับแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอส

2. การเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการตรวจและคัดกรองบนอาหารแข็ง โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เช่น 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16-48 ชั่วโมงเพื่อให้เชื้อเจริญเติบโต จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียมาลดปริมาณให้มีเซลล์ประมาณ 5-20 โคโลนีต่อเพลท แล้วนำมาเทแผ่บนอาหารแข็งที่ผสมสับสเตรทและสารปฏิชีวนะ จากข้อที่ 1 เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เช่น 37 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเซลล์โตเป็นโคโลนี หรือเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรียที่ผลิตไซแลนเนสและโปรติเอส และประมาณ 48 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรียที่ผลิตเอสเทอเรส

3. การเททับโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการตรวจและคัดกรองด้วยวุ้น 0.7% ที่ผสมสารเคมีที่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์แบคทีเรียรั่วได้ ดังนี้

   a. โดยการผสมสารเคมีที่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์แบคทีเรียรั่วชนิดเดียว ได้แก่ สารดี-ไซโคลเซอรีนที่ความเข้มข้นประมาณ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สาร EDTA ที่ความเข้มข้นประมาณ 10 ถึง 50 มิลลิโมลาร์ สารแอมพิซิลินที่ความเข้มข้นประมาณ 25 ถึง 50 มิลลิโมลาร์ สารโซเดียมโดเดกซิลซัลเฟต (SDS) ที่ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 0.1 ถึง 1.0 สารซาโคซีนที่ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 0.1 ถึง 0.5 และสารไทรทอนเอ็กส์-100 ที่ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 0.05 ถึง 0.1 ทิ้งไว้ประมาณ 5 ชั่วโมง
   b. โดยการผสมสารเคมีที่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์แบคทีเรียรั่วได้มากกว่าหนึ่งชนิดในวุ้น สำหรับเพลทที่มีสับสเตรท AZCL-xylan อยู่ ได้แก่ (1) สารแอมพิซิลินและสาร EDTA (2) สารแอมพิซิลินและสาร SDS (3) สารแอมพิซิลินและสารไทรทอนเอ็กส์-100 (4) สารแอมพิซิลินและสารซาโคซีน (5) สาร SDS และสารซาโคซีน (6) สาร SDS และสารไทรทอนเอ็กส์-100 (7) สารซาโคซีนและสารไทรทอนเอ็กส์-100 และ (8) สาร SDS, สารซาโคซีนและสารไทรทอนเอ็กส์-100 ทิ้งไว้ประมาณ 5 ชั่วโมง
   c. โดยการผสมสับสเตรทไม่ละลายน้ำ ทำได้โดยการผสมสับสเตรทไม่ละลายน้ำประเภทโพลีแซคคาไรด์ติดสี เช่น 0.1% AZCL-xylan กับสารเคมีต่างๆ ที่ทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์ลงไปในวุ้น 0.7% แล้วเททับลงบนโคโลนีที่เจริญอยู่บนเพลท แล้วเลี้ยงเชื้อที่ต้องการตรวจที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ เนื่องจากสับสเตรทตกไปสัมผัสโคโลนีที่โตอยู่บนผิวของวุ้นชั้นล่างโดยตรง ซึ่งวิธีนี้สามารถประหยัดสับสเตรทได้ อย่างน้อยร้อยละ 75 เมื่อเปรียบเทียบกับการผสมสับสเตรทลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชั้นล่างตามขั้นตอนที่ 1a
   d. โดยการผสมวุ้น 0.7% ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่า pH ต่างๆ เช่น 5, 6, 7, 8, 9 และ10 สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ทำกิจกรรมได้ดีที่ pH ต่างๆ ได้ โดยพบว่าสับสเตรทที่

ใช้เททับสามารถปรับเปลี่ยนใช้เพื่อคัดกรองเอนไซม์ต่างๆ ได้ เช่นนมพร่องมันสำหรับคัดกรองเอนไซม์โปรติเอส และสับสเตรทประเภทโพลีแซคคาไรด์ติดสีชนิดอื่นๆ สำหรับการคัดกรองเอนไซม์ที่ย่อยโพลีแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ เช่น AZCL-amylose, AZCL-HE-Cellulose และ AZCL-beta-glucan สำหรับคัดกรองเอนไซม์อไมเลส เซลลูเลส และเบต้ากลูคาเนส ตามลำดับ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงการเททับด้วยวุ้น 0.7% ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่า pH ต่ำๆ เช่น 3-5 เพื่อใช้คัดกรองหาเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะเป็นกรด

e. โดยการผสมสับสเตรทมากกว่าหนึ่งชนิดเพื่อตรวจกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิดในเวลาเดียวกัน เช่น การคัดกรองหาเอนไซม์ไซแลนเนส และโปรติเอสพร้อมกัน หรือ ไซแลนเนสและเอสเทอเรสพร้อมกัน สามารถทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชั้นล่างที่ผสมสารไตรบิวไทริน 1% และสารกัมแอราบิค 0.1% หรือนมพร่องมัน 2% เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเททับโคโลนีด้วยวุ้น 0.7% ที่ผสมสับสเตรทประเภทไม่ละลายน้ำประเภทโพลีแซคคาไรด์ติดสี เช่น AZCL-xylan และสารเคมีที่ทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์ เช่นสารซาโคซีน 0.5% เลี้ยงต่อเป็นเวลา 5-24 ชั่วโมงก็จะสามารถมองเห็นเคลียร์โซนรอบโคโลนีที่เกิดจากย่อยสารไตรบิวไทริน โดยเอสเทอเรส หรือนมพร่องมันโดยโปรติเอส และสามารถเห็นโซนสีน้ำเงินรอบโคโลนีที่เกิดจากย่อย AZCL-xylan โดยไซแลนเนส โดยวิธีการดังกล่าวจะมีข้อดีในการนำไปใช้คัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ได้มากกว่า 1 ชนิด ได้สะดวกและรวดเร็วมากขึ้น

4. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ สรุปได้ว่าสามารถใช้สาร SDS หรือสารซาโคซีน หรือสารไทรทอนเอ็กส์-100 แทนการใช้สารดี-ไซโคลเซอรีน (สารเคมีที่ทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์แบคทีเรีย) ในงานที่เคยปรากฏมาก่อนได้ โดยเทคนิคการเททับโคโลนีด้วยวุ้น 0.7% ที่ผสมกับ สาร SDS หรือ สารซาโคซีน หรือสารไทรทอนเอ็กส์-100 ให้ผลกิจกรรมของเอนไซม์ที่ชัดเจนมากกว่าการเททับด้วยสารเคมีชนิดอื่นๆ หรือ การเททับด้วยวุ้นเพียงอย่างเดียว รูปที่ 1 แสดงความสามารถของสาร SDS และ สารซาโคซีน ในการทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส หลังการเททับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวุ้น 0.7% ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ก) วุ้น 0.7% เพียงอย่างเดียว ข) สารดี-ไซโคลเซอรีนที่ความเข้มข้นประมาณ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค) 0.1% SDS ง) 0.5% สารซาโคซีน ผลการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเป็นเช่นเดียวกันดังแสดงในรูปที่ 2 ส่วนในรูปที่ 3 พบว่าการเททับโคโลนีด้วย สารซาโคซีน และสารไทรทอนเอ็กส์-100 ให้ผลการกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรสชัดเจนมากกว่าการเททับด้วยสารเคมีชนิดอื่นๆ หรือ การเททับด้วยวุ้นเพียงอย่างเดียว

ตัวอย่าง 1

การเททับโคโลนีของแบคทีเรียที่ผสมกับสารเคมีมากกว่า 1 ชนิด

การเททับโคโลนีของแบคทีเรียด้วยวุ้น 0.7% ที่ผสมกับสารเคมีมากกว่า 1 ชนิดในวุ้นจากข้อ 3(b) การใส่ ก) ตัวควบคุมที่ไม่ใช่สารเคมี ข) สารดี-ไซโคลเซอรีนที่ความเข้มข้นประมาณ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค) 0.1% สาร SDS ง) 0.5% สารซาโคซีน จ) สารแอมพิซิลิน 25 mM +0.1% สาร SDS ฉ) สารแอมพิซิลิน 25 mM +0.1% สารซาโคซีน ช) 0.1% SDS+0.1% สารซาโคซีน ซ) 0.1% SDS+0.1% สารไทรทอนเอ็กส์-100 ฌ) สาร 0.1% SDS+0.1% สารซาโคซีน+0.1% สารไทรทอนเอ็กส์-100 ดังแสดงผลในรูปที่ 4 พบว่าการผสมสารเคมีในการทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสหลังการเททับโคโลนี ในรูป (จ) ถึง (ฉ) จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้รวดเร็ว และชัดเจนกว่าการใช้สารเคมีเพียงชนิดเดียว

ตัวอย่าง 2

การเททับโคโลนีของแบคทีเรียชนิดที่ใช้สับสเตรทไม่ละลายน้ำ

การเททับโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ด้วยวุ้น 0.7% ชนิดที่ใช้สับสเตรทไม่ละลายน้ำจากข้อ 3(c) ทำได้โดยการผสมสับสเตรทไม่ละลายน้ำประเภทโพลีแซคคาไรด์ติดสี เช่น 0.1% AZCL-xylan กับสารเคมีต่างๆ ที่ทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์ลงไปในวุ้น 0.7% แล้วเททับลงบนโคโลนีที่เจริญอยู่บนเพลท ดังแสดงผลในรูปที่ 5 หลังการเททับแล้วเลี้ยงเชื้อที่ต้องการตรวจที่เวลาต่างๆ กัน 5.1) เลี้ยงเชื้อด้วยวุ้น 0.7% + 0.1% AZCL xylan ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 5.2) เลี้ยงเชื้อบน LB agar ที่ผสม 0.1% AZCL xylan เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก) ตัวควบคุมที่ไม่ใช่สารเคมี ข) สารดี-ไซโคลเซอรีนที่ความเข้มข้นประมาณ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค) 0.1% สาร SDS ง) 0.5% สารซาโคซีน พบว่าสามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ภายใน 1 ชั่วโมง เนื่องจากสับสเตรทตกไปสัมผัสโคโลนีที่โตอยู่บนผิวของวุ้นชั้นล่างโดยตรง ซึ่งวิธีนี้สามารถประหยัดสับสเตรทได้ อย่างน้อยร้อยละ 75 เมื่อเปรียบเทียบกับการผสมสับสเตรทลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชั้นล่างตามขั้นตอนที่ 1a

ตัวอย่าง 3

การตรวจและคัดกรองเอนไซม์ชนิดที่ทำงานได้ในสภาวะที่เป็นกรดด่างรุนแรง

กรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์ชนิดที่ทำงานได้ในสภาวะรุนแรงจากข้อ 3(d) เช่น สภาวะที่เป็นกรดด่างรุนแรง โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำได้โดยการเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็งเป็นเวลา 2 วัน ก่อนเททับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยสับสเตรทไม่ละลายน้ำประเภทโพลีแซคคาไรด์ติดสี เช่น AZCL-xylan ในวุ้น 0.7% ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่า pH ต่างๆ เช่น 5, 6, 7, 8, 9 และ10 ดังแสดงผลในรูปที่ 6 พบว่าการเททับด้วยวุ้น 0.7% ที่ผสมสารเคมีที่ทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ กันจะแสดงผลกิจกรรมเอนไซม์ในระดับที่ต่างกันโดยชี้วัดจากขนาดและความเข้มของโซนสีน้ำเงินรอบโคโลนี ดังนั้นวิธีการเททับด้วย pH ต่างๆ นี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ทำกิจกรรมได้ดีที่ pH ต่างๆ ได้

ตัวอย่าง 4

การตรวจและคัดกรองเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิดในเวลาเดียวกัน

กรรมวิธีการตรวจกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิดในเวลาเดียวกันจากข้อ 3(e) เช่น การคัดกรองหาเอนไซม์ไซแลนเนส และโปรติเอสพร้อมกัน (รูปที่ 7.1) หรือ ไซแลนเนสและเอสเทอเรสพร้อมกัน (รูปที่ 7.2) สามารถทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชั้นล่างที่ผสมสารไตรบิวไทริน 1% และสารกัมแอราบิค 0.1% หรือนมพร่องมัน 2% เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเททับโคโลนีด้วยวุ้น 0.7% ที่ผสมสับสเตรทประเภทไม่ละลายน้ำประเภทโพลีแซคคาไรด์ติดสี เช่น AZCL-xylan และสารเคมีที่ทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์ เช่นสารซาโคซีน 0.5% เลี้ยงต่อเป็นเวลา 5-24 ชั่วโมงก็จะสามารถมองเห็นเคลียร์โซนรอบโคโลนีที่เกิดจากย่อยสารไตรบิวไทริน โดยเอสเทอเรสหรือนมพร่องมันโดยโปรติเอส และสามารถเห็นโซนสีน้ำเงินรอบโคโลนีที่เกิดจากย่อย AZCL-xylan โดยไซแลนเนส ดังแสดงผลในรูปที่ 7 และ 8 ก) ตัวควบคุมที่ไม่ใช่สารเคมี ข) 0.1% SDS ค) 0.5% สารซาโคซีน โดยวิธีการดังกล่าวจะมีข้อดีในการนำไปใช้คัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ได้มากกว่า 1 ชนิด ได้สะดวกและรวดเร็วมากขึ้น

ตัวอย่าง 5

การตรวจและคัดกรองหาแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสและโปรติเอสที่ทำงานได้ดีในภาวะเป็นด่างจากแบคทีเรียในลำไส้ปลวก

การตรวจและคัดกรองหาแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสและโปรติเอสที่ทำงานได้ดีในภาวะเป็นด่างจากแบคทีเรียในลำไส้ปลวกโดยทำการเลี้ยงเชื้อที่แยกมาได้จากลำไส้ปลวกส่วนที่เป็นด่างเป็นเวลา 2 วัน บนอาหารแข็งชั้นล่างที่ผสมนมพร่องมัน 2% (สับสเตรทสำหรับโปรติเอส) แล้วเททับด้วยวุ้น 0.7% ที่ผสม AZCL-xylan (สับสเตรทสำหรับไซแลนเนส) + 0.1% SDS ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ เช่น 5, 6, 7, 8, 9 และ10 ซึ่งพบว่าวิธีการเททับที่ได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิด (โปรติเอสและไซแลนเนส) ที่ทำกิจกรรมได้ดีที่ pH ต่างๆ ได้จริง และ ยังพบว่าภายหลังการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเทคนิคดังกล่าวแล้วเชื้อยังสามารถเจริญอยู่รอดและผลิตเอนไซม์ต่อไปได้ ดังแสดงผลในรูปที่ 9

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ดังได้แสดงไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อถือสิทธิ

1. กรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์อย่างรวดเร็ว ที่มีขั้นตอนดังนี้

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่ผสมสับสเตรทของเอนไซม์ที่ต้องการตรวจและคัดกรอง

1.2 การเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการตรวจและคัดกรองบนอาหารแข็ง

1.3 การเททับโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการตรวจและคัดกรองด้วยวุ้นที่ผสมสารเคมีที่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์แบคทีเรียรั่วได้ และ

1.4 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

ที่มีลักษณะพิเศษคือ การทำให้เกิดรูรั่วบนผนังเซลล์เพื่อปลดปล่อยเอนไซม์ออกมา ร่วมกับเทคนิคการเททับโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ เพื่อคัดกรองเอนไซม์บนอาหารแข็ง โดยสามารถตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ได้ชัดเจนและรวดเร็วขึ้น

2. กรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์อย่างรวดเร็ว ตามข้อถือสิทธิที่ 1 ที่ซึ่ง อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่ผสมสับสเตรทดังกล่าว มีลักษณะพิเศษคือประกอบด้วย 0.05% ของสับสเตรทสำหรับคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์สารไตรบิวไทริน 1% สารกัมแอราบิค 0.1% หรือ นมพร่องมันเนย 2%

3. กรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์อย่างรวดเร็ว ตามข้อถือสิทธิที่ 1 ที่ซึ่ง การเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการตรวจและคัดกรองบนอาหารแข็ง มีลักษณะพิเศษคือ เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลาประมาณ 16-48 ชั่วโมงจากนั้นนำเซลล์ดังกล่าวมาลดปริมาณให้มีเซลล์ประมาณ 5-20 โคโลนีต่อเพลท แล้วนำมาเทแผ่บนอาหารแข็งที่มีสับสเตรทดังกล่าว และเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวที่อุณหภูมิที่เหมาะสม จนกระทั่งโตเป็นโคโลนี

4. กรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์อย่างรวดเร็ว ตามข้อถือสิทธิที่ 1 ที่ซึ่ง การเททับโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ มีลักษณะพิเศษคือ เททับโคโลนีของแบคทีเรียดังกล่าวด้วยวุ้น 0.7% ที่ผสมสารเคมีที่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์แบคทีเรียรั่วได้ ที่ซึ่งเลือกได้จาก สาร EDTA ที่ความเข้มข้นประมาณ 10 ถึง 50 มิลลิโมลาร์ สารแอมพิซิลินที่ความเข้มข้นประมาณ 25 ถึง 50 มิลลิโมลาร์ สารโซเดียมโดเดกซิลซัลเฟต (SDS) ที่ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 0.1 ถึง 1.0 สารซาโคซีนที่ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 0.1 ถึง 0.5 สารหรือไทรทอนเอ็กส์-100 ที่ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 0.05 ถึง 0.1

5. กรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์อย่างรวดเร็ว ตามข้อถือสิทธิที่ 1 หรือ 4 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่ง การเททับโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ มีลักษณะพิเศษคือ เททับโคโลนีของแบคทีเรียดังกล่าวด้วยวุ้น 0.7% ที่ผสมสารเคมีที่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์แบคทีเรียรั่วได้มากกว่าหนึ่งชนิด ที่เลือกได้จาก (5.1) สารแอมพิซิลินและสาร EDTA (5.2) สารแอมพิซิลินและสาร SDS (5.3) สารแอมพิซิลินและสารไทรทอนเอ็กส์-100 (5.4) สารแอมพิซิลินและสารซาโคซีน (5.5) สาร SDS และสารซาโคซีน (5.6) สาร SDS และสารไทรทอนเอ็กส์-100 (5.7) สารซาโคซีนและสารไทรทอนเอ็กส์-100 หรือ (5.8) สาร SDS, สารซาโคซีนและสารไทรทอนเอ็กส์-100

6. กรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์อย่างรวดเร็ว ตามข้อถือสิทธิที่ 1, 4 หรือ 5 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่ง การเททับโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ มีลักษณะพิเศษคือ เททับโคโลนีของแบคทีเรียดังกล่าวด้วยวุ้น 0.7% ที่ผสมสับสเตรทไม่ละลายน้ำลงบนโคโลนีที่เจริญอยู่บนเพลท แล้วเลี้ยงเชื้อที่ต้องการตรวจที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

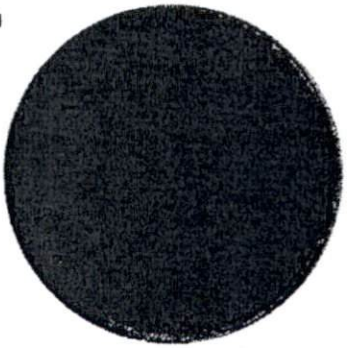
7. กรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์อย่างรวดเร็ว ตามข้อถือสิทธิที่ 1, 4, 5 หรือ 6 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่ง การเททับโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ มีลักษณะพิเศษคือ เททับโคโลนีของแบคทีเรียดังกล่าวด้วยวุ้น 0.7% ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่า pH 3 ถึง 10 เพื่อใช้คัดกรองหาเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดด่างรุนแรง

8. กรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์อย่างรวดเร็ว ตามข้อถือสิทธิที่ 1, 4, 5, 6 หรือ 7 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่ง การเททับโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ มีลักษณะพิเศษคือ เททับโคโลนีของแบคทีเรียดังกล่าวด้วยวุ้น 0.7% ที่ผสมสับสเตรทมากกว่าหนึ่งชนิดเพื่อตรวจกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิดในเวลาเดียวกัน

รูปที่ 1

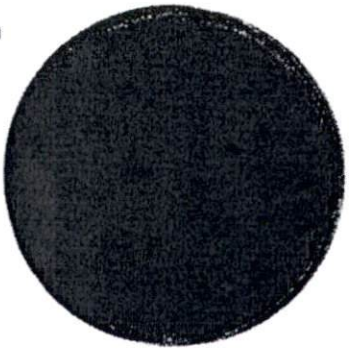
ก

ข

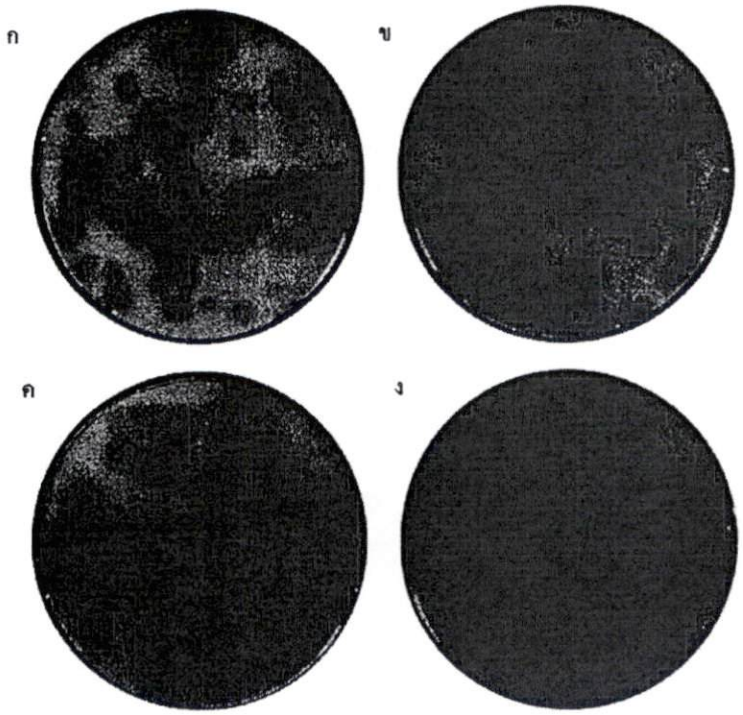


ค

ง



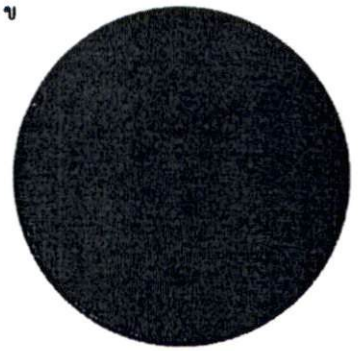
รูปที่ 2



รูปที่ 3

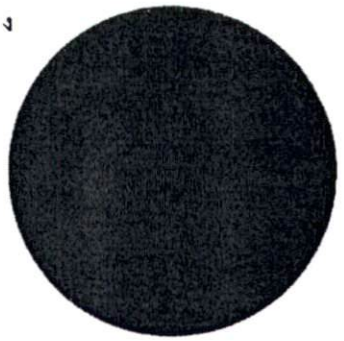
ก

ข

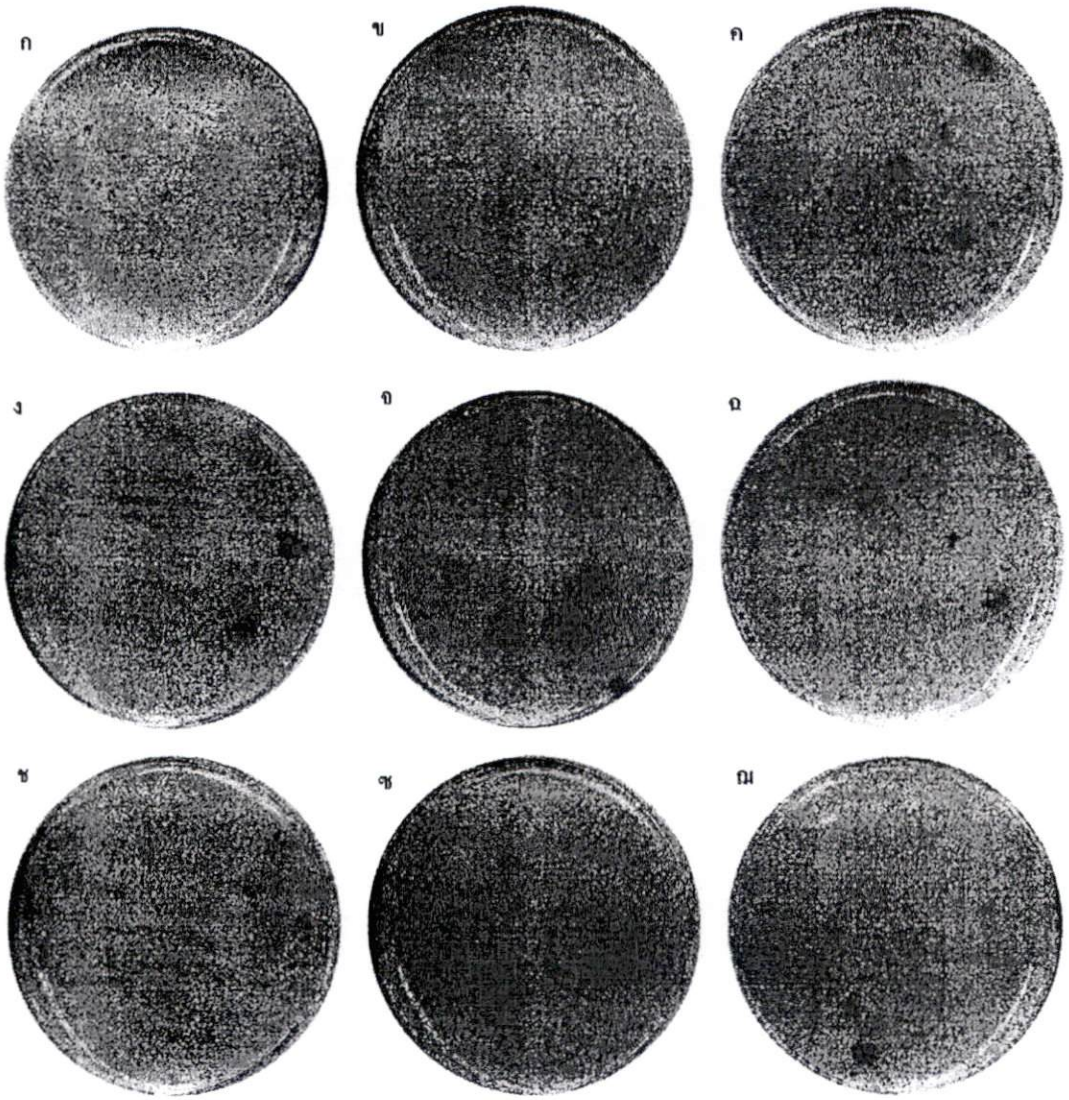


ค

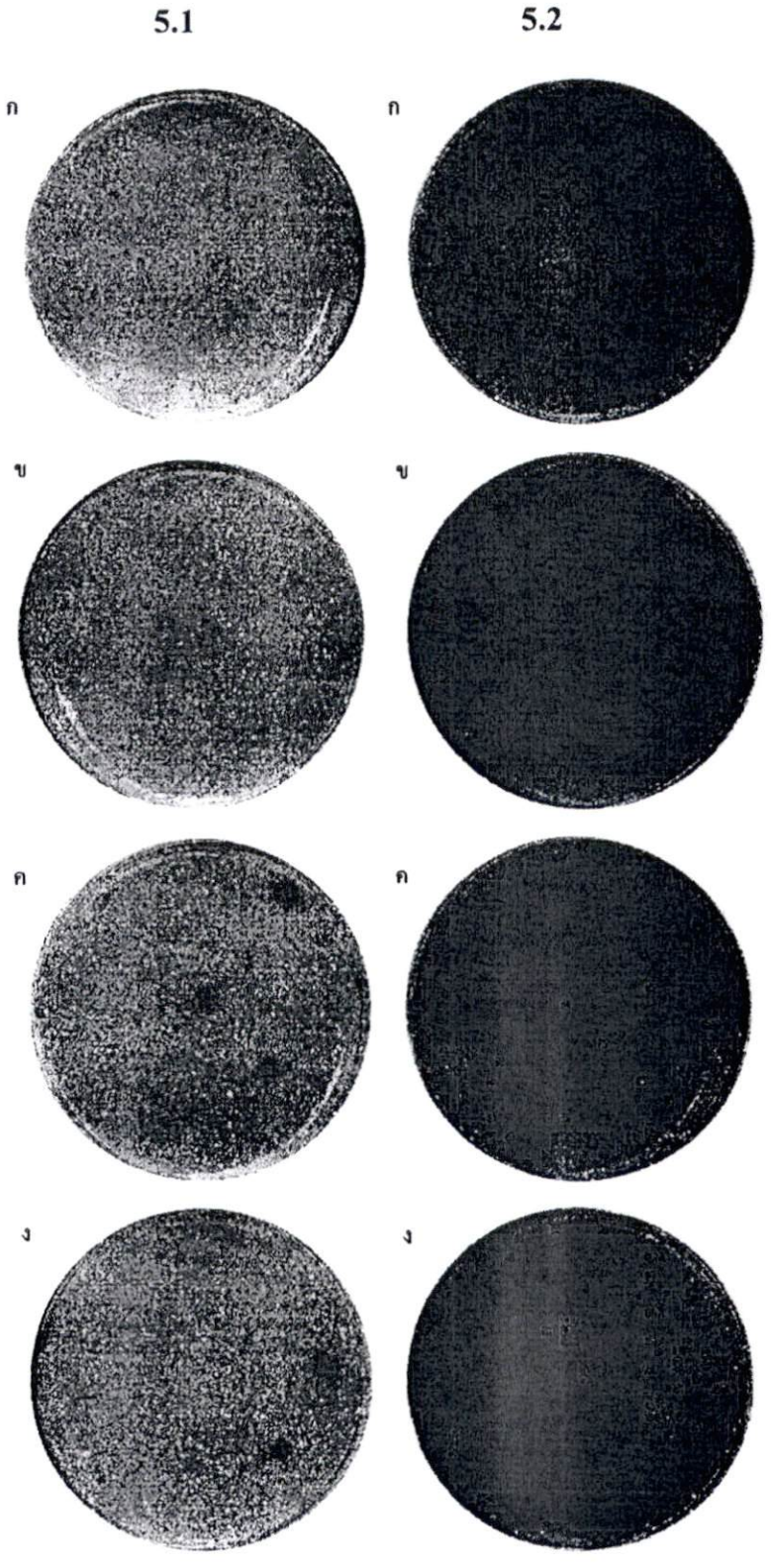
ง



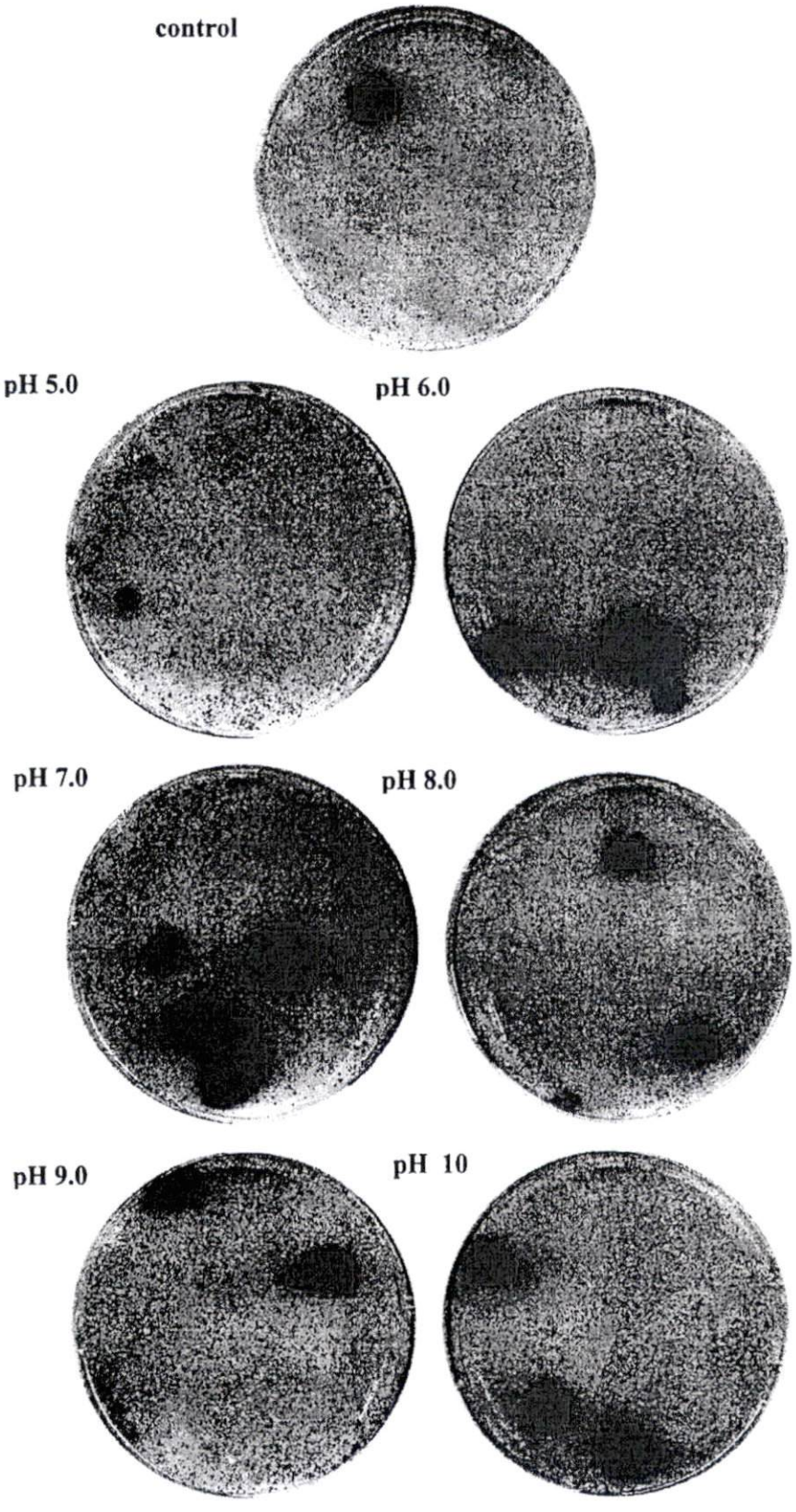
รูปที่ 4



รูปที่ 5



รูปที่ 6



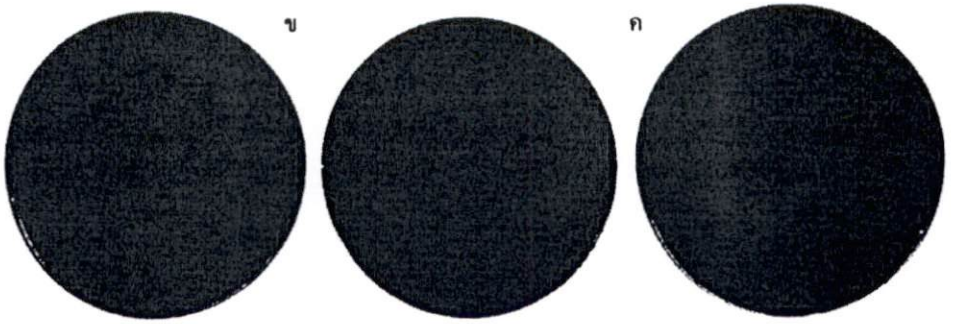
รูปที่ 7

7.1

ก ข ค

7.2

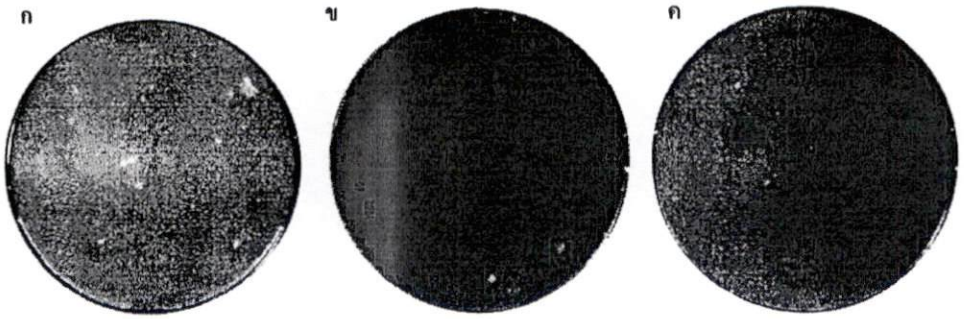
ก ข ค



รูปที่ 8

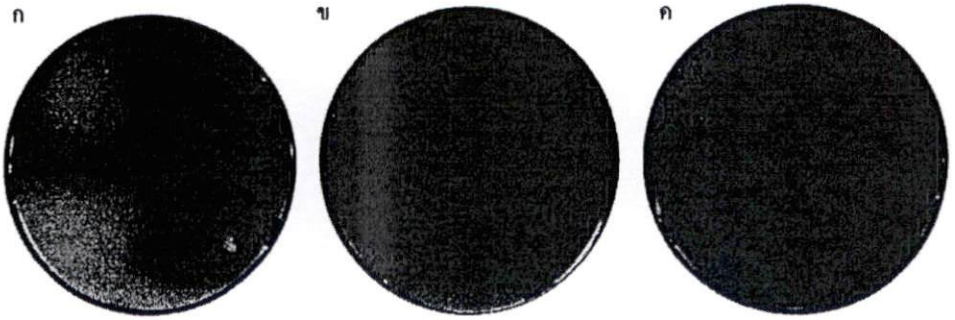
8.1

ก ข ค

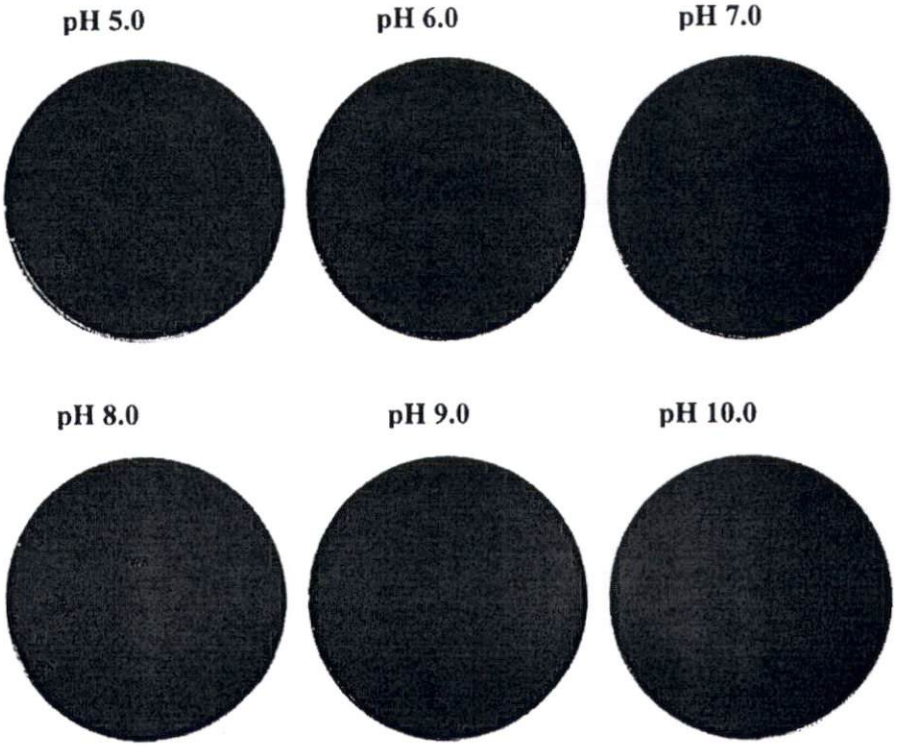


8.2

ก ข ค



รูปที่ 9



บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้ได้มุ่งเน้นการพัฒนากรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์ต่างๆ อย่างรวดเร็วโดยได้ปรับปรุงวิธีการคัดกรองหาเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แล้วเก็บสะสมไว้ในเซลล์ ซึ่งโดยปกติเอนไซม์ที่ถูกผลิตและสะสมในเซลล์จะใช้เวลาค่อนข้างนานกว่าเอนไซม์จะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์โดยเกิดการรั่วของเอนไซม์ผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงได้มีการทดลองหาวิธีการที่ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียมีรูรั่วและปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาโดยที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวิธีการที่เรียกว่าเทคนิคการเททับ ซึ่งจะผสมสารต่างๆ ที่มีผลต่อการรั่วของผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้แบคทีเรียเกิดการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาได้มากขึ้นและรวดเร็วขึ้นทำให้สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ด้วยระดับความไวในการตรวจวัดที่สูงขึ้นและใช้เวลาน้อยลง การประดิษฐ์นี้ได้ใช้สารเคมีที่มีราคาถูกกว่าในการทำให้เกิดรูรั่วบนผนังเซลล์แทนการใช้สารเดิมร่วมกับเทคนิคการเททับด้วยวุ้นบนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยมีการทดสอบความสามารถของสารเคมีในการทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์ เพื่อการประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยโพลีแซคคาไรด์ ไลเปส และโปรติเอสของแบคทีเรีย