รายงานการวิจัย

เรื่อง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อรา ในสภาพอาหารเหลว

RCH
QP
609
.P78
2545

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43064
วัน, เดือน, ปี 1 ก.ค. 2545

b 11221637
i.....

ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

ปีงบประมาณ 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

จากการศึกษาลักษณะทางสัญฐานวิทยา โดยการย้อมสีด้วยแลคโตฟีนอลคอตตอนบลูและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าลักษณะของเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใย และมีการสร้างสปอร์อเพศที่เรียกว่า โคนิเดีย ที่มีลักษณะลักษณะกลมและมีสีดำและจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อเชื้อ *Aspergillus usamii* ATCC 14341 โดยใช้รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และจมูกข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 0 , 3 , 6 , 9 , 12 , 15 และ18 เปอร์เซ็นต์ พบว่ารำข้าวสาลีที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์จะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเหมาะสมที่สุดคือ 44.913 ยูนิต/มิลลิลิตร และการทดสอบแหล่งไนโตรเจนโดยใช้อาหารทั้งหมด 6 ชนิด คือ ยูเรีย เคซีน บีฟเอคแทค คอร์น สตีป ลิเคอร์ แอมโมเนียมซัลเฟตและโปแตสเซียมไนเตรท ความเข้มข้น 0 , 1 , 2 , 3 , 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้คอร์น สตีป ลิเคอร์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 45.693 ยูนิต/มิลลิลิตร เมื่อทำการทดสอบพีเอชเริ่มต้น 3 , 4 , 5 และ 6 พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 46.015 ยูนิต/มิลลิลิตร เมื่อทำการศึกษาการใช้สารลดแรงตึงผิวได้แก่ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และtween80 เข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่สารลดแรงตึงผิวให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 43.150 ยูนิต/มิลลิลิตร และเมื่อทำการศึกษาแหล่งเกลือแร่ พบว่า ชุดควบคุมที่ไม่ใส่แหล่งเกลือแร่ เชื้อจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 55.887 ยูนิต/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

From the study of morphology of *Aspergillus usamii* ATCC 14341 using lactophenol cotton blue as the dye ,found that the fungus produced dark round conidia as asexual spores.The study of optimization of protease production by using rice bran, wheat bran and wheat germ as carbon sources ranging from 0 , 3 , 6 , 9 , 12 , 15 and 18 percents ,showed that the concentration of 15 percents of wheat bran gave a peak activity of 44.913 unit/ml. When testing the concentrations of 6 nitrogen sources (casein , beef extract , corn steap liquor , ammonium sulfate and potassium nitrate at the percentages of 0 , 1 , 2 , 3 , 4 and 5) found that corn steep liquor at 3 percents gave a peak activity of 45.693 unit/ml. For the effect of pH (3 , 4 , 5 and 6) it was found that pH 4.0 gave good result for fungul growth and activity of 46.015 unit/ml. For the testing of surfactants (tween80 0.1 and 0.2 percentages and sodium dodecylsulfate 0.05 and 0.1 percentages),found that a control medium (without surfactant) gave good activity (43.150 unit/ml.) Finally,for the effect of mineral salts ,the fungus gave the best activity (55.887 unit/ml.) in control medium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคุณประภากร ลาภอำไพ คุณพรทิพย์ คงประพันธ์ และคุณลัดดา พุทธาวงศ์ ผู้ช่วยวิจัยของโครงการนี้ ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2544 ท้ายสุดขอบคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่อนุญาติให้ใช้อุปกรณ์การวิจัย และห้องปฏิบัติการ

อารี ฤทธิบูรณ์

เมษายน 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่องบทคัดย่อ	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์โปรติเอส	3
ประเภทของเอนไซม์โปรติเอส	7
การวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส	16
ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส	17
จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส	17
ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา	21
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และขั้นตอนการดำเนินงาน	25
วัสดุ	25
อุปกรณ์	25
ขั้นตอนการดำเนินงาน	26
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	30
ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	30
ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	30
ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน	31
ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้น	31
ผลการศึกษาสารลดแรงตึงผิวบางชนิด	32
ผลการศึกษาแหล่งเกลือแร่	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	49
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	54
ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ	54
ข. สารเคมีและการเตรียมสารเคมี	55
ค. วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และกราฟมาตรฐาน	56
ง. การตรวจนับสปอร์ของเชื้อราโดย ใช้ Haemacytometer (Improveed Neubrauer)	59
จ. การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์	3
2	ลักษณะโครงสร้างของ กรดอะมิโนชนิดแอลและกรดอะมิโนชนิดดี	4
3	ปฏิกิริยาการทำเคมิคัลโมดิฟีเคชันของปาเปนด้วยไดโบรโมอะซิโตน	10
4	สูตรโครงสร้างของสับสเตรทสังเคราะห์คาร์บอกซิเปปติเดส เอ	12
5	ปฏิกิริยาของเรนนินกับแคปปาเคซีน	14
6	ความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในอินซูลิน ด้วยเรนนิน(R,r) และเปปซิน(P,p)	14
7	กลไกการทำงานของเปปซิน	15
8	ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนอิสระกับนินไฮเดรต	16
9	ลักษณะของ *Aspergillus usamii* ATCC 14341 ในอาหารวุ้นเอียง PDA	28
10	ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อวันที่ 1 – 4	29
11	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของ *Aspergillus usamii* ATCC 14341	34
12	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน	35
13	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้ความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน แตกต่างกัน	36
14	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน	37
15	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน แตกต่างกัน	28
16	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน	39
17	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวแตกต่างกัน	40
18	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้แหล่งเกลือแร่แตกต่างกัน	41
19	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
20	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อใช้ความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน	43
21	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน	44
22	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อใช้ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	45
23	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน	46
24	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวแตกต่างกัน	47
25	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อใช้แหล่งเกลือแร่แตกต่างกัน	48
รูปผนวกที่		
1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อ R_1 และ R_2	4
2	สมบัติและแหล่งของเอนไซม์โปรติเอส	6
3	ลำดับกรดอะมิโนรอบอนุมูลกรดอะมิโนจำเป็น (รอบซีสเตอีนและฮีสติดีน) ในบริเวณเร่งของซัลไฟดริลโปรติเอส	9
4	เอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์	19
5	องค์ประกอบของรำข้าวเจ้า	22
6	องค์ประกอบของรำข้าวสาลี	22
7	องค์ประกอบของจมูกข้าวสาลี	23
ตารางภาคผนวกที่		
1	การเตรียมซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	56
2	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน	60
3	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน	60
4	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน	61
5	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	61
6	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน	62
7	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวบางชนิด	62
8	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้แหล่งเกลือแร่แตกต่างกัน	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ย่อยสลายโปรตีน ซึ่งมีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมความสะอาด อุตสาหกรรมเครื่องหนัง เป็นต้น ดังนั้นเอนไซม์ในกลุ่มนี้จึงมีความสำคัญในการผลิตทางการค้า

เอนไซม์โปรติเอสสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ เอ็กโซเปปติเดส (exopeptidase) และเอ็นโดเปปติเดส (endopeptidase) ซึ่งเอ็นไซม์แอซิดโปรติเอส จัดเป็นเอนไซม์ชนิดเอ็นโดเปปติเดส (endopeptidase) ซึ่งเกิดการสลายพันธะเปปไทด์ภายในสายของพอลิเปปไทด์ทางปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซี

เอนไซม์แอซิดโปรติเอส (acid protease) มีบทบาทในการทำให้เนื้อนุ่ม (meat tenderation) ในการผลิตอาหารหมักโดยเชื้อราจากถั่วเหลือง ข้าวและธัญญาพืชอื่นๆ ใช้ในอุตสาหกรรมเบเกอรี่ และในอุตสาหกรรมนม สำหรับตกตะกอนนมเพื่อการผลิตชีส (cheese) การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในสภาพที่เป็นกรดที่มีความสำคัญทางการค้าจะผลิตจากเชื้อรา และทั้งหมดจะเป็นเอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์

เอนไซม์โปรติเอสพบได้จากแหล่งต่างๆ คือ พืช เช่น ปาเปนจากยางของมะละกอ ฟีซินจากผลมะเดื่อ จากสัตว์ เช่น ไคโมทริปซินจากตับอ่อน เปปซินในกระเพาะของสัตว์มีกระดูกสันหลังทุกชนิด จากแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis* จากเชื้อรา เช่น *Aspergillus niger*

ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ต้นทุนส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของวัตถุดิบ จึงมีมีความพยายามในการนำวัตถุดิบราคาถูกที่มีอยู่ภายในประเทศไทยมาทดแทน เช่น รำข้าว จมูกข้าว เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกซึ่งมีอยู่ในประเทศไทย เพื่อการผลิตเอนไซม์แอซิดโปรติเอส
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอซิดโปรติเอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเชื้อรา *Aspergillus usamii* ATCC 14341
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอซิดโปรติเอส โดยศึกษาแหล่งและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น สารลดแรงตึงผิว และแหล่งแร่ธาตุ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทราบถึงประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอซิดโปรติเอสจากจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษา
2. เป็นการนำวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูกมาใช้ในการผลิตเอนไซม์
3. สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาขั้นสูงต่อไป

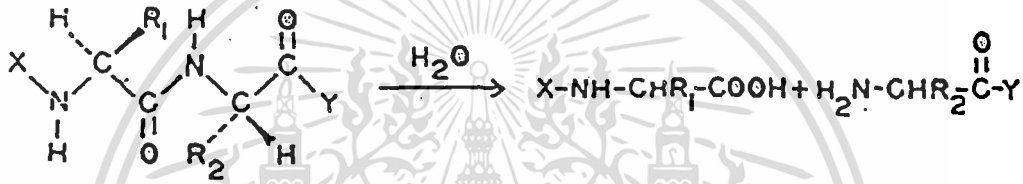
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสมีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เปปทิเคส โปรติเอส โปรติเนส เปปไทด์ไฮโดรเลส และเอนไซม์โปรติโอไลติค มีลักษณะปฏิกิริยา ดังนี้คือ สลายพันธะเปปไทด์ (-CO-NH) ด้วยน้ำ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์

ที่มา : Singn และคณะ (1994)

การเกิดปฏิกิริยาสามารถอธิบายได้ดังนี้

1. ความจำเพาะต่อสับสเตรท

1.1 ลักษณะธรรมชาติของ R_1 และ R_2 จากรูปที่ 1 R_1 และ R_2 เป็นอนุมูลของกรดอะมิโน 2 ชนิด ที่มาทำให้เกิดพันธะเปปไทด์ 12 พันธะ หรืออีกนัยหนึ่ง R_1 และ R_2 ก็คือสายโซ่ (side chain) ของโปรตีน ดังนั้นถ้าโปรติเอสตัวใดมีความจำเพาะต่อ R_1 แสดงว่าเอนไซม์นั้นเข้าตัดพันธะเปปไทด์โดยเข้าทางปลายอะมิโน (N-terminal) โดยที่ R_1 นั้นจะเป็นอะไรก็ได้ ดังแสดงในตารางที่ 1 และในกรณีที่โปรติเอสมีความจำเพาะต่อ R_2 ก็แสดงว่าเอนไซม์นั้นเข้าตัดพันธะเปปไทด์ในโปรตีน โดยเข้าทางปลายคาร์บอกซิล (C-terminal)

1.2 ลักษณะด้านรูปพรรณสัณฐานภายนอก (configulation) ของอนุมูลกรดอะมิโน (R_1 , R_2) เป็น D-form หรือ L-form เอนไซม์โปรติเอสจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของ R_1 และ R_2 และรูปพรรณสัณฐานภายนอกด้วยคือ โครงรูปต้องเป็นตัว L-amino acid เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 2 ทั้งนี้โดยปกติแล้วโปรตีนจะประกอบด้วย L-amino acid เท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อ R_1 และ R_2

เอนไซม์	ความจำเพาะ
α - chymotrypsin	Try,Phe,Try(R_1)
Trypsin	Lys,Arg(R_1)
Pepsin	Phe(R_2)

Try = Trytophan Phe = Phynylalanine Lys = Lysine Arg = Arginine

ที่มา : Farley (1992)

รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของ กรดอะมิโนชนิดแอลและกรดอะมิโนชนิดดี

ที่มา : Farley (1992)

1.3 ขนาดของสารประกอบที่เป็นสับสเตรท เอนไซม์โปรติเอสโดยทั่วไปไม่มีความจำเพาะต่อขนาดของสับสเตรท ยกเว้นแอซิดโปรติเอสที่มีความจำเพาะต่อขนาดของสับสเตรท ตามรูปที่ 1 แสดงสับสเตรทของแอลฟาไคโมทริปซิน (α- chymotrypsin) และทริปซิน (trypsin) ซึ่งจะเห็นว่าสับสเตรททั้งสองชนิดมีขนาดไม่เท่ากัน แต่มีอนุมูลของกรดอะมิโน (R_1) ที่สอดคล้องกับความเจาะจงของเอนไซม์ และอนุมูลของกรดอะมิโนนั้นเป็นแอล-ฟอร์ม

1.4 ลักษณะธรรมชาติของหมู่ X และ Y (H^+ และ OH^-) เอนไซม์โปรติเอสทั่วไปจะมีหมู่ X เป็น H^+ และหมู่ Y เป็น OH^- แต่เมื่อโปรตีนนั้น ๆ มีหมู่ X และหมู่ Y เปลี่ยนไป จะมีผลทำให้ความจำเพาะของเอนไซม์เปลี่ยนไป กล่าวคือ เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อหมู่ X และ Y จะบ่งชี้ลักษณะการตัดสายพอลิเปปไทด์

1.4.1 เอนโดเปปติเดส (endopeptidase) เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระ (rancleanly) ภายในสายโปรตีน ทั้งนี้ต้องให้จำเพาะโดยตรงต่อ R_1 และ R_2 ด้วยจึงตัดด้วยพันธะเปปไทด์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้า R_1 และ R_2 ไม่สอดคล้องกับความจำเพาะของเอนไซม์นั้น การตัดพันธะเปปไทด์จะไม่เกิดขึ้น และจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (activity) สูงสุด ถ้า X และ Y เป็นหมู่อนุพันธ์ที่ไม่ใช่ H^+ , OH^- กล่าวคือ X อาจเป็นกลุ่มเอซิล (acyl group) เช่น อะเซติล (acetyl) เบนโซล (benzole) เบนซิลออกซีคาร์บอนิล (benzyloxycarbonyl) เป็นต้น และ Y เป็นเอไมด์ (amide) กลุ่มเอสเทอร์ (ester group) หรืออะมิโนแอซิดเรซิดิว (amino acid residues)

1.4.2 เอกโซเปปติเดส (exopeptidase) เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายของโปรตีน จะเป็นสายด้านไหนก็ต้องสอดคล้องต่อความจำเพาะของเอนไซม์ต่อ R_1 หรือ R_2 ดังอธิบายไว้ในข้อ 1.1 กล่าวคือ

ถ้าจำเพาะต่อ R_1 , $X = H^+$, Y = อะไรก็ได้ เรียก N — terminal splitting

ถ้าจำเพาะต่อ R_1 , X = อะไรก็ได้ , $Y = OH^-$ เรียก C — terminal splitting

1.4.2.1 คาร์บอกซิเปปติเดส (carboxypeptidase) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีชื่อเรียกตามระบบว่า เปปไทด์อะมิโนแอซิดไฮโดรเลส (peptide amino acid hydrolase) ลักษณะที่สำคัญมีดังนี้คือ มีความเจาะจงสับสเตรทที่มี R_2 และ $Y = OH^-$ และ X = อะไรก็ได้ คือ H^+ หรืออนุพันธ์และจะตัดพันธะเปปไทด์โดยเข้าจากปลายคาร์บอกซิล ($Y = OH^-$) เพื่อให้กิจกรรมสูงสุด พบว่า X ต้องเป็นอนุพันธ์ที่ไม่ใช่ H^+

1.4.2.2 อะมิโนเปปติเดส (amino peptidase) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีชื่อเรียกตามระบบว่า แอลฟา-อะมิโนเอซิลเปปไทด์ไฮโดเลส (α-amino acylpeptide hydrolase ;E.C. 3.4.1.X) ลักษณะที่สำคัญมีดังนี้ คือมีความเจาะจงต่อสับสเตรทที่มี R_1 และ $X = H^+$,และ Y = อะไรก็ได้ คือ OH^- หรืออนุพันธ์ และจะตัดพันธะเปปไทด์โดยเข้าสู่สายจากปลายอะมิโน ($X = H^+$) ไปเรื่อยๆ ตามความเจาะจง R_1 เพื่อให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด พบว่า Y ไม่ควรเป็น OH^- แต่ควรเป็นอนุพันธ์อื่นๆ ได้แก่ ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส (leucine aminopeptidase)

1.4.2.3 ไดเปปติเดส (dipeptidase) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีชื่อเรียกตามระบบว่า ไดเปปไทด์ไฮโดรเลส (dipeptidehydrolase ;E.C. 3.4.3.X) มีความเจาะจงต่อสับสเตรทที่มีหมู่ X และ Y เป็น H^+ และ OH^- เหมือนไดเปปไทด์ทั่วไป และมีความเจาะจงแบบ N-terminal มากกว่า C-terminal สามารถตัดพันธะเปปไทด์ได้ทั้งในสับสเตรทที่เป็นไดเปปไทด์ (dipeptitide) (A-A) และ ไตรเปปไทด์ (tripeptide) (A-A-A)

1.4.2.4 ไตรเปปติเดส (tripeptidase) มีความจำเพาะเจาะจงเหมือนไดเปปติเดสแต่การย่อยสลายพันธะเปปไทด์จะเกิดในสับสเตรทที่เป็นไตรเปปไทด์เท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ความต้องการพันธะเปปไทด์ เอนไซม์โปรติเอสส่วนใหญ่จะย่อยสลายพันธะอื่นๆ ที่มาแทนพันธะเปปไทด์ได้ดีกว่าพันธะเปปไทด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธะเปปไทด์ที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่ต่างๆ เช่น หมู่เอไมด์ ($-NH_2$) เอสเทอร์ (-COOR) ไทโอเอสเทอร์ (-COSR) หรือไฮดรอกซีซาเมท (-CONHOH) แสดงว่า เอนไซม์เหล่านี้มีความจำเพาะต่ออนุมูล R_1 มากกว่า R_2 นั้น พบว่าถ้าพันธะเปปไทด์ ถูกแทนที่ด้วยพันธะอื่นๆ ดังกล่าวมาแล้ว สับสเตรทนั้นก็จะไม่เป็นสับสเตรทของเปปซิน (pepsin) และแอซิดโปรติเอส มีรายงานว่าไคโมทริปซินสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้เป็น 200-1000 เท่า ถ้าพันธะเอไมด์ในแอลฟาเอนอะซิติล — แอล — ไทโรซินาไมด์ (α-N-acetyl-L-tyrosinamide) เปลี่ยนเป็นพันธะจากหมู่เอสเทอร์ (-COOR)

2. ประเภทของเอนไซม์โปรติเอส

ถ้าแบ่งเอนไซม์โปรติเอสตามค่าพีเอชสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ แอซิดโปรติเอส นิวทรอลโปรติเอส (neutral protease) อัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) ซึ่งสามารถแสดงถึงสมบัติและแหล่งของเอนไซม์โปรติเอสทั้ง 3 กลุ่ม ได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สมบัติและแหล่งของเอนไซม์โปรติเอส

Type	Source	Properties	PH Range		Mol.Wt. (approx.)	Inhibitor
			Max Activity	Max Activity		
Acid protease (Carboxypeptidase)	Fungi	Pepsin-like Rennin-like (Milk-clotting)	2-5	2-6	35000	DAN[a]
Neutral protease (Metaloprotease)	Bacteria	Zinc	7-8	7-9	45000	EDTA[b]
Alkaline protease	Fungi	Containingstabilize by Ca2+				
	Bacteria	Trypsin-lierin	9-11(12)	5-10(12)	27500	PMSF[c]
	Fungi	Serine rescue At the active center			(17000)	DFP[d]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา : Escobar และ Barnett (1995)

(a) diazoacetylnorleucinemethyleste

(b) ethylenediaminetetraacetic acid

(c) phenylmethanesulfonylfluoride

(d) diisopropylphosphofluoridate

ถ้าแบ่งตามกลไกการทำงาน สามารถแบ่งเอนไซม์โปรติเอสได้ 4 กลุ่ม คือ

2.1 เซอรีนโปรติเอส (อัลคาไลน์โปรติเอส พีเอช 6.7-9) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่

2.1.1 ไคโมทริปซิน (α , β และ δ chymotrypsin ;E.C. 3.4.4.5)

2.1.2 ไคโมทริปซินบี (chymotrypsin b ;E.C. 3.4.4.6) และไคโมทริปซินซี(chymotrypsin c)

2.1.3 ทริปซิน (trypsin ;E.C. 3.4.4.4)

2.1.4 อีลาสเตส (elastase) (pancreatopeptidase ;E.C. 3.4.4.7)

2.1.5 ทรอมบิน (trombin ;E.C. 3.4.4.1.3)

2.1.6 ซับติลิซิน (subtilisin) (subtilopeptidase A ;E.C. 3.4.4.16)

2.1.7 แอลฟา-ไลติคโปรติเอส (α-lyticprotease) จาก *Sorangium sp.*

สมบัติที่สำคัญของเซอรีนโปรติเอส

1. เอนไซม์เหล่านี้มีสมบัติเหมือนกันคือ ถูกยับยั้งโดยไดโอโซโพรพิลฟอสโฟฟลูโอริเดท (diisopropylphosphofluoridate, DEP) ซึ่งทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ของอนุมูลเซริล (seryl residue) ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ มีอนุมูลเซริลอยู่ที่บริเวณเร่ง เอนไซม์ที่มีอนุมูลเซริลอยู่ที่บริเวณเร่งที่ไม่ใช่โปรติเอสก็มี เช่น ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (phosphoglucomutase) อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkalinephosphatase) เป็นต้น

2. มีหมู่ อิมิดาโซล (imidazole group) อยู่ที่บริเวณเร่ง

3. เอนไซม์ทั้งหมดเป็นพวกเอนโดเปปติเดส

4. เป็นพวกอัลคาไลน์เปปติเดส (alkalinepeptidase) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช มากกว่า 7(พีเอช 7-11)

5. โดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่อนุมูลกรดอะมิโนเป็น R_1

6. แอลฟาไคโมทริปซิน (α-chymotrypsin) พบได้จาก 2 แหล่ง คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.1 ตับอ่อนของควาย (bovine pancreas) ผลิตโปรตีน หรือไซโมเจน (zymogen) ซึ่งอยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่แสดงปฏิกิริยาจนกว่าจะมีการกระตุ้นด้วยการย่อยสลายแบบจำกัด (limited hydrolysis) ด้วยเอนไซม์ก่อนแล้วจะได้เอนไซม์ที่ไวต่อปฏิกิริยา ไซโมเจนทั้ง 2 ชนิด ที่สร้างโดยตับอ่อนของควายนี้คือ ไคโมทริปซิโนเจน เอ และบี มีค่า ไอโซอิเลคตริกพอยน์ (isoelectric point) ต่างกันคือ ไมโครทริปซิโนเจน เอ และบี มีค่าเป็น 8.5 และ 4.5 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อถูกไฮโดรไลซ์จะได้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ ไคโมทริปซิน เอ และบี

6.2 ตับอ่อนของหมู (porcine pancreas) ผลิตไคโมทริปซิโนเจน เอ บี และซี และเมื่อกระตุ้นด้วยทริปซินเกิดเป็นเอนไซม์ ได้ไคโมทริปซิน เอ บี และซี ไคโมทริปซิน ซี มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่ลิวซิลไซด์เชน (leusyl sidechain) มากกว่าสับสเตรทพวกอะโรมาติกเรซิดิว (aromatic residue) เช่นไทโรซิน ฟีนิลอะรานีน และทริปซิน

2.2 ซัลไฟดริลโปรติเอส (sulfydrylprotease, -SH group) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน และจะถูกยับยั้งโดยสารที่เรียกว่า ซัลไฟดริลรีเอเจนท์ (sulfydryl reagent) ซัลไฟดริลกรุ๊ป (sulfydryl group) หรือกลุ่มไธออล (thiol group) ทำให้หมู่อนุมูลซัลไฟดริล (sulfydryl residue) ที่บริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือน อาจสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์สามารถสกัดได้จากพืชชั้นสูง และจุลินทรีย์บางชนิดดังนี้ ปาเปน (papain ,E.C. 3.4.4.10) จากมะละกอ (papaya) ฟีซิน (ficin ,E.C. 3.4.4.12) จากผลมะเดื่อ (fig) โบรมิเลน (bromilain ,E.C. 3.4.4.24) จากสับปะรดและโปรติเอสจาก *Streptococcus* protease (*Stretococcus* protease A ,E.C. 3.4.4.18) เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด แตกต่างกันตามลำดับกรดอะมิโนรอบอนุมูลกรดอะมิโนจำเป็นในบริเวณเร่ง คือ ซิสเตอีน (cysteiene) และฮิสติดีน (histidine) ดังแสดงในตารางที่ 3

สมบัติของซัลไฟดริลโปรติเอส

1. เป็นนิวทรอลโปรติเอส(neutral protease) มีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ที่ พีเอช 6-7.5

2. ถูกยังยั้งด้วยซัลไฟดรอลเอเจนท์(sulfydryl agent) หรืออีกนัยหนึ่งมีกลุ่มซัลไฟดริล (-SH) ในบริเวณเร่ง

3. เป็นเอนโดเปปติเดส

4. ปาเปนและฟีซินจะไฮโดรไลซ์สับสเตรทที่มีแอล — อาร์จินิน (L-arginine) แอล — ไลซีน (L-lysine) ไกลซีน (glycine) และแอล — ซิตรูลิน (L-citrulline) ด้วยประสิทธิภาพเท่ากัน แต่ประจุบวกในอนุมูลอาร์จินินและไลซีนไม่จำเป็นต้องเชื่อมที่บริเวณเร่งของเอนไซม์เพราะสับสเตรทที่มีอนุมูลไกลซีนและซิตรูลินสามารถเชื่อมกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้อย่างแน่นพอดีอยู่แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงลำดับกรดอะมิโนรอบอนุมูลกรดอะมิโนจำเป็น (รอบซีสเตอีนและฮีสติดีน) ในบริเวณเร่งของซัลไฟดริลโปรติเอส

ชนิดของซัลไฟดริลโปรติเอส	ลำดับกรดอะมิโน
Bromelain , stem	-Asn-Gln-Asp-Pro-Cys-Gly-Ala-Cys*-Trp-
Papain	-Pro-Val-Lys-Asn-Gln-Gly-Ser-Cys-Gly-Ser-Cys*-Trp-
Ficin	-Pro-Ile-Arg-Gln-Gln-Gly-Gln-Cys-Gly-Ser-Cys*-Trp-
Proteinase , Streptoccal	-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys*-Val-
Bromelain , stem	-His*-Ala-Val-Thr-Ala-Ile-Gly-Tyr-
Papain	-Val-Gly-Pro-Cys-Gly-Asn-Lys-Val-Asp-His*-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Gly-Tyr-
Ficin	-Thr-Gly-Pro-Cys-Gly-Thr-Ser-Leu-Asp-His*-Ala-Val-Ala-Leu-
Proteinase , Streptoccal	-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His*-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-

Asn = Asparagine Asp = Aspartic acid Ala = Alanine Arg = Arginine Gly = Glycine

Gln = Glutamine Cys = Cysteiene Lys = Lysine Pro = Proline Ile = Isoleucine

Phe = Phenylalanine His = Histidine Ser = Serine Tyr = Tyrosine Thr = Threonine

Trp = Tryptophan Val = Valine

ที่มา : Singh และคณะ (1994)

5. ปาเปนเป็นซัลไฟดริลโปรติเอส ที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ประกอบด้วยกรดอะมิโน 212 กรดอะมิโนและมีมวลโมเลกุล 23,900 ที่บริเวณเร่งมีอนุมูลซิสเตอีน ฮิสติดีน หรือแอสปาราจีน ลักษณะที่สำคัญของปาเปน คือ

5.1 กลุ่มซัลไฟดริลมีบทบาทสำคัญต่อบริเวณเร่ง ดังนี้

5.1.1 เอนไซม์สูญเสียกิจกรรม เมื่อหมู่ซัลไฟดริลเปลี่ยนแปลง

5.1.2 ผลจากสเปกโตรโฟโตรเมทรี (spectrophotometry) พบว่า เอซิลเอนไซม์อินเตอร์มิเดียท (acyl enzyme intermediate) เป็นไฮโดรเลสเตอร์ (hydralaster) หรืออีกนัยหนึ่งคือ มีกลุ่มซัลไฟดริล (- SH) ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์

5.1.3 จากค่าทางจลพลศาสตร์ของเอนไซม์ มีค่า พีเค (pK) เท่ากับ 8.3 ค่าความแตกต่างของ Hydrogen ion (ΔH_{ion}) เท่ากับ 3.1 กิโลแครอลี/โมล ดังนั้นอนุมูลกรดอะมิโนควรเป็นกลุ่มซิสเตอีน (-SH) มีกลุ่มอื่นที่มีบทบาทสำคัญร่วมต่อบริเวณเร่ง ดังนี้คือ อาจเป็นหมู่คาร์บอกซิล (แอสปาราจีน) และหมู่อิมิดาโซล (ฮิสติดีน) อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือทั้ง 2 อย่าง

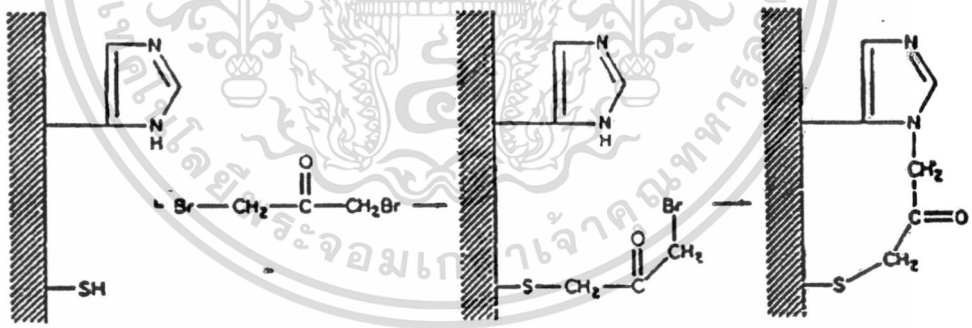
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 คาร์โนซิเนส (amino-acyl-L-histidine hydrolase) ย่อยสลายสับสเตรทพวกเบต้า-อะลานีน (β-alanine) แอล-ฮิสติดีน (L-histidine) เป็นพวกไดเปปติเดส ต้องการ Zn^{2+} โครงร่าง 3 มิติในระหว่างการเชื่อมจับกับโมเลกุลของสับสเตรท ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

5.2.1 วิเคราะห์ค่า pK = 4 และค่าความแตกต่างของไฮโดรเจนไอออนเท่ากับ 0 กิโลแคลอรี /โมล แสดงว่าควรจะเป็นหมู่คาร์บอกซิล

5.2.2 พิจารณาจากผลการทดลองด้านเอกซ์เรย์ดิฟแฟรคชั่น (X-ray diffraction) พบว่าหมู่คาร์บอกซิลที่ใกล้ที่สุด (แอสปาราจีน 158) จะห่างจากหมู่ซัลไฟดริล (ซิสเตอีน) ประมาณ 7.5 อังสตรอม ระยะห่างดังกล่าวอาจจะยาวเกินไปที่จะทำหน้าที่ร่วมกับซิสเตอีน ส่วนหมู่อิมิดา-โซล (ฮีสติดีน 159) ห่างจากหมู่ซัลไฟดริล ประมาณ 4.5 อังสตรอม ดังนั้น ฮิสติดีน 159 ควรเป็นกลุ่มที่มีบทบาทร่วมกับซิสเตอีนได้มากกว่า แอสปาราจีน 158 เพราะระยะต่างกันถึง 3 อังสตรอม (7.5-4.5 = 3 A°) เว้นไว้แต่ว่ามีการเปลี่ยนบริเวณเร่งที่เกาะกับสับสเตรท

5.2.3 พิจารณาผลการทำเคมิคัลโมดิฟิเคชัน (chemical modification) ของเอนไซม์ใช้ไบฟังค์ชันนอลเอเจนท์ (bifunctional agent) ซึ่งมีอยู่ 2 หมู่ทำหน้าที่เดียวกันได้แก่ ไดโบรโมอะซิโตน (dibromoacetone) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ปฏิกิริยาการทำเคมิคัลโมดิฟิเคชันของปาเปนด้วยไดโบรโมอะซิโตน

ที่มา : Shimyo และคณะ (1968)

2.3 เมทัลคอนเทนนิ่งโปรติเอส (metal-containing protease)

หมายถึง โปรติเอสที่มีอิออนของโลหะรวมในโมเลกุลของเอนไซม์ หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลาย กล่าวคืออยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ (cofactor) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 คาร์บอกซิเปปติเดส เอ (peptidyl L-amino acid hydrolase ,E.C. 3.4.2.1) คาร์บอกซีเปปติเดส บี(เปปติดิลแอลไลซีนไฮโดรเลส , peptidyl-L-lysine hydrolase ,E.C. 3.4.2.2) เป็นเอกโซเปปติเดสตัดสายด้านปลายหมู่คาร์บอกซิล ต้องการอิออนของโลหะคือ Zn^{2+}

2.3.2 ไกลซิล - ไกลซีน ไดเปปติเดส (glycyl-glycine hydrolase ,E.C. 3.4.3.1) เป็นเอนไซม์จากกล้ามเนื้อหนู ต้องการ Zn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์

2.3.3 คาร์โนซิเนส (amino-acyl-L-histidine hydrolase ,E.C. 3.4.3.3) ย่อยสลายสับสเตรทพวกเบต้า- อะลานิน แอล-ฮิสติดีน (β-alanyl-L-histidine) เป็นพวกไดเปปติเดส ต้องการ Zn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์

2.3.4 ลิวซิวอะมิโนเปปติเดส (L-leucyl-peptide hydrolase .E.C. 3.4.1.1) ต้องการ Zn^{2+} เป็นพวกอะมิโนเอซิลเปปไทด์ไฮโดรเลส (N-terminal) ได้ผลผลิตเป็นแอลลิวซีน (L-leucine)

2.3.5 โปรลิเดส (amino-acyl-L-proline hydrolase ,E.C. 3.4.3.7) เป็นไดเปปติเดส ซึ่งไฮโดรไลซ์ไดเปปไทด์ มีโปรลีน (proline) หรือไฮดรอกซีโปรลีน (hydroxyproline) ต้องการ Mn^{2+} ได้ผลผลิตที่มีอนุมูลของปลายคาร์บอกซิล

2.3.6 อะมิโนไดเปปติเดส (L-prolyl-amino acid hydrolase ,E.C. 3.4.3.6) เป็นไดเปปติเดส ซึ่งไฮโดรไลซ์ไดเปปไทด์ มีโปรลีนหรือไฮดรอกซีโปรลีน ต้องการ Mn^{2+} เหมือนโปรลิเดส แต่มีความจำเพาะต่างกัน ผลผลิตที่ได้เป็นอนุมูลของปลายอะมิโน

สมบัติทั่วไปของเมทัลคอนเทนนิ่งโปรติเอส

1. เป็นเอกโซเปปติเดสเกือบทั้งหมด
2. เป็นเอนไซม์ที่มีช่วงการทำปฏิกิริยาที่พีเอชเป็นกลาง (พีเอช 6.5-7.5) เรียกนิวทรัลโปรติเอส
3. เนื่องจากมีอิออนของโลหะร่วมในปฏิกิริยาอาจถูกยับยั้งด้วยสารจับอิออนของโลหะ (metal-chelating agents) เช่น 1,10 — ฟีแนนโทรลีน (1,10-phenanthroline) , ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มเมทัลคอนเทนนิ่งโปรติเอส ได้แก่

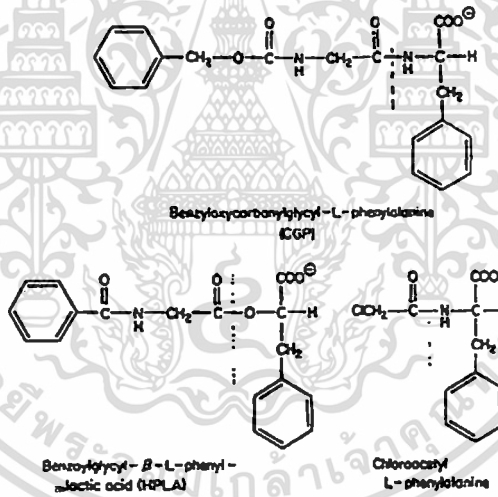
คาร์บอกซิเปติเดส เอ , บี (carboxypeptidase A,B) แหล่งที่พบคือตับอ่อน (pancreas) จะผลิตโปรคาร์บอกซิเปปติเดส(procarboxypeptidase) ซึ่งมีมวลโมเลกุล 80,000 ประกอบด้วยโพลิเปปไทด์ (polypeptide) 8 สาย ซึ่งสารโปรเอนไซม์(proenzyme) นี้จะถูกกระตุ้นด้วยทริปซินทำให้เกิดเป็นคาร์บอกซิเปปติเดส เอ มีมวลโมเลกุลเหลือเพียง 84,500 นอกจากนั้นแล้วในตับอ่อนยังผลิตโปรเอนไซม์อื่นที่เปลี่ยนเป็นคาร์บอกซิเปปติเดส บี โดยทั้ง เอ และบี มีกลไกปฏิกิริยาคล้ายกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบัติของคาร์บอกซิเปปติเดสเอ และบี

1. มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระตรงปลาย หรืออีกนัยหนึ่ง Y = OH^- ส่วน X อาจเป็น H^+ หรือหมู่อื่น ๆ ในกรณีของคาร์บอกซิเปปติเดส เอ และบี จะมีความจำเพาะต่างกัน คือ คาร์บอกซิเปปติเดส บี จำเพาะต่อสับสเตรทที่มีพันธะเปปไทด์ที่มีหมู่อนุมูลคาร์บอกซิลที่ปลายเป็นอาร์จินีนหรือไล-ซีน ส่วนคาร์บอกซิเปปติเดส เอ นั้นจะต่างออกไป คือเป็นอนุมูลฟีนิลอะลานีน และอนุพันธ์ดังรายชื่อตัวอย่างของสับสเตรทในรูปที่ 4

2. มี Zn^{2+} ที่บริเวณเร่ง และสามารถแทนได้ด้วยไดวาเลนท์เมทัลอิออน (divalent metalons)อื่น ๆ เช่น Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} แต่อย่างไรก็ตามระดับแอคติวิตีที่ปรากฏของเอนไซม์จะแตกต่างกัน เมื่ออิออน ของโลหะในบริเวณเร่งนี้ถูกแยกออกไปด้วยสารจับโลหะ เช่น 1,100 phenanthroline จะได้เมทัลฟรีโปรตีน (metal-free protein) ซึ่งไม่มีคุณสมบัติของเอนไซม์แต่ก็ยังสามารถเชื่อมพันธะเปปไทด์ของสับสเตรทได้



รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของสับสเตรทสังเคราะห์คาร์บอกซิเปปติเดส เอ
ที่มา : จันทิมาและสีหนาท (1999)

2.4 แอซิดโปรติเอส หมายถึง โปรติเอสที่มีช่วงพีเอชของการทำปฏิกิริยาย่อยสลาย อยู่ในช่วงพีเอชเป็นกรด (พีเอช น้อยกว่า 7) โดยทั่วไปเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมระหว่างพีเอช 2-4 และไม่ชัดเจนถึงอนุมูลกรดอะมิโนที่มีบทบาทในบริเวณเร่ง เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหมู่คาร์-บอกซิสมาก กว่า 1 หมู่ อยู่ในบริเวณเร่ง ตัวอย่างเอนไซม์ได้แก่ เรนนิน (rennin) และเปปซิน (pepsin) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 เรนนิน ชื่อสามัญ คือ ไคโมซิน (chymosin) และเรนนิน (EC 3.4.4.23) เคยมีผู้เสนอให้เรียกไคโมซินเพื่อป้องการสับสนกับเรนนิน เรนนินมีชื่อทางการค้าซึ่งเรียกกันทั่วไปจน หลายคนมักจะนำมาใช้เป็นชื่อสามัญ คือ เรนเนต (Rennet) เรนนินเป็นเอนไซม์ที่มีต้นกำเนิดมาจาก กระเพาะส่วนที่ 4 ของลูกวัวระยะไม่หย่านม (suckling calf) โดยจะปล่อยออกมาในรูปของไซโมเจน เรียกว่า โปรเรนนิน (prorennin) ที่พีเอช 2.47 มีมวลโมเลกุล 5,300 แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยทริปซินเป็นเรนนิน จะมีมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้นเป็น 31,000 ประกอบด้วยสารโพลีเปปไทด์หลายสายมาต่อกันด้วยพันธะเชื่อมขวางของพันธะไดซัลไฟด์ (-S-S-) การพัฒนาเอนไซม์จะเปลี่ยนไปตามธรรมชาติของการย่อยอาหารของสิ่งมีชีวิต เมื่อลูกวัวโตขึ้นอาหารจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากนมเป็นหญ้า เมล็ดข้าว กล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ เปลี่ยนแหล่งโปรตีนจากนมเป็นพืช ดังนั้นเรนนินจะหมดความจำเป็นในการใช้ย่อยอาหาร เรนนินจะค่อย ๆ ลดลง และมีเปปซินเพิ่มขึ้นมาแทนให้สอดคล้องกับชนิดของอาหารใหม่ที่มาแทน

สมบัติทั่วไปของเรนนิน

1. มีความเสถียรที่พีเอช 5.0 และพีเอชน้อยกว่า 3.5 จะเกิดออโตไลซิส (autolysis) ที่พีเอชมากกว่า 6.0 จะเริ่มเสียสภาพธรรมชาติ ดังนั้นช่วงพีเอชที่เหมาะสมกับการย่อยสลายคือพีเอช 3.5

2. มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ระหว่าง Phe_{105} — $Meth_{106}$ ของโปรตีนนม (เค-ซีน) ซึ่งเดิมแขวนลอยอย่างคงตัวในนมลักษณะคอลลอยด์ที่คงตัว เมื่อโปรตีนนมถูกตัดสายพันธะเปป ไทด์ทำให้คอลลอยด์ไม่เสถียร โปรตีนจะแยกตัวออกมาเป็นตะกอน ผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายคือ พารา-แคปปา-เคซีน (para-kappa-casein) หรือเคซีนสายสั้น(ดังรูปที่ 5) ไม่มีสมบัติคอลลอยด์ พร้อมที่จะจับกับอิออนของแคลเซียม(Ca^{2+}) ที่มีอยู่ในน้ำนม เกิดเป็นตะกอนลิ่มนมที่ไม่ละลายน้ำ ในอุตสาหกรรมเนยแข็งมีการนำส่วนของตะกอนลิ่มนมไปสู่กระบวนการผลิตเนยแข็งด้วยกรรมวิธีเฉพาะของผลิตภัณฑ์

2.4.2 เปปซิน (pepsin) พบทั่วไปในน้ำย่อย(gastric juice) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และประกอบด้วยสารพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว ซึ่งกรดอะมิโนจำนวน 321 กรดอะมิโน และมีมวลโมเลกุล 35,500

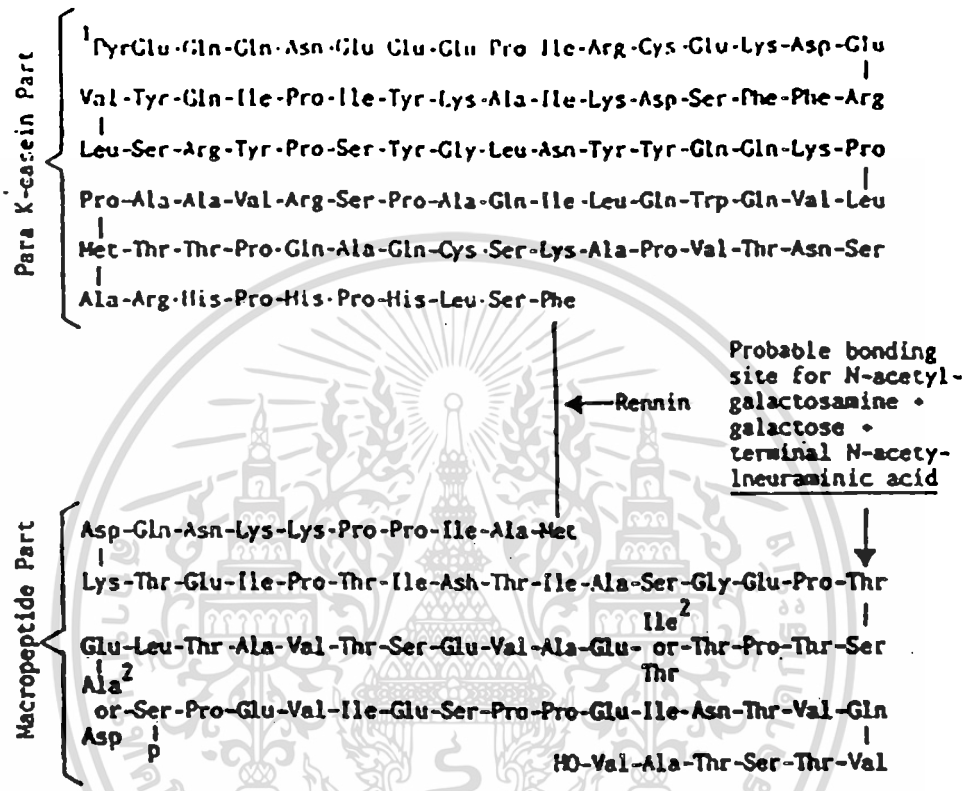
สมบัติทั่วไปของเปปซิน

1. มีความเสถียรที่พีเอช 2.5 ถ้าต่างไปกว่านี้กิจกรรมจะลดลงเนื่องจากเกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน และมีพีเอชที่เหมาะสมสำหรับโปรตีนทั่วไปเท่ากับ 2 และสำหรับสับสเตรทสังเคราะห์มีพีเอชที่เหมาะสมที่พีเอช 4

2. มีความจำเพาะต่ออนุมูลกรดอะมิโน ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโตเฟน(R_2) และพบว่ามีความชอบต่อการไฮโดรไลซ์อนุมูลกรดอะมิโนประเภทอะโรมาติกของสับสเตรท เมื่อเปรียบเทียบการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สลายโดยพันธะเปปไทด์ในอินซูลินด้วยเรนนินและเปปซิน ตามรูปที่ 6 สรุปว่าคล้ายกันมาก แต่เรนนินมีความจำเพาะค่อนข้างกว้างกว่าเปปซิน

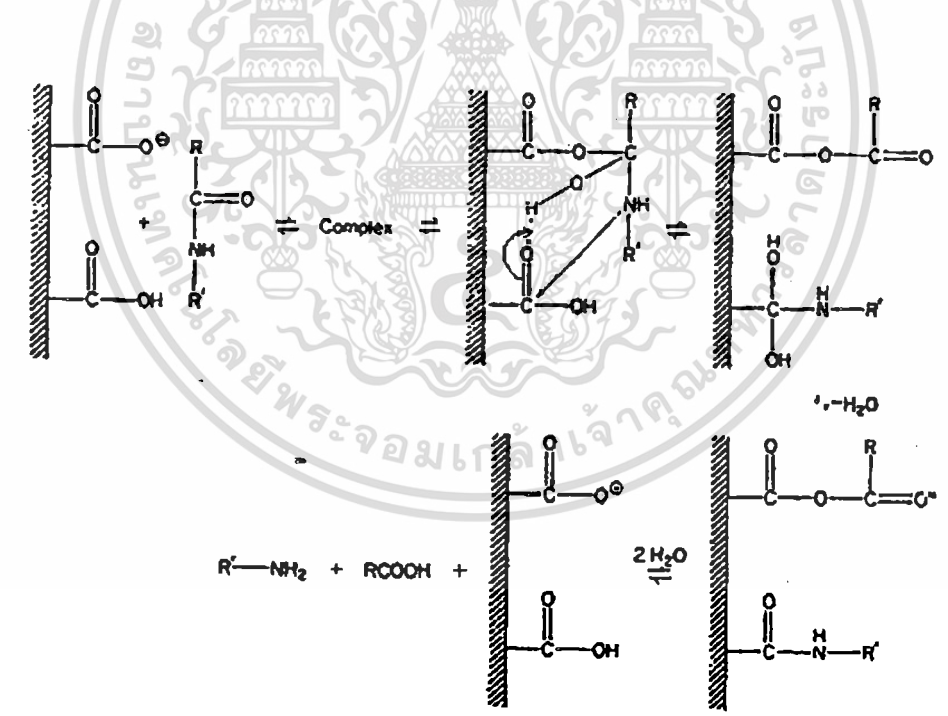


รูปที่ 5 ปฏิกิริยาของเรนนินกับแคปปาเคซีน

รูปที่ 6 ความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในอินซูลิน ด้วยเรนนิน(R,r) และเปปซิน(P,p) ตัวอักษรเล็กแสดงการย่อยสลายช้า ส่วนตัวอักษรใหญ่แสดงการย่อยสลายเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กลไกการทำปฏิกิริยาของเปปซิน (รูปที่ 7) ซึ่งเอนไซม์ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ ทำหน้าที่เป็นทั้งรูปแบบโปรโตเนท (protonated form) และรูปแบบอิออไนซ์ (ionized form) ในบริเวณเร่งหลังจากเกิดสารประกอบระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท (ES complex) แล้ว ตามด้วยการปะทะของหมู่คาร์บอกซิลของเอนไซม์กับหมู่คาร์บอนิล (-C-) ของสารประกอบระหว่างเอนไซม์และสับสเตรทแบบนิวคลีโอฟิลิกแอท-แทรค (nucleophillic attack) คือให้อิเลคตรอนคู่เกิดโควาเลนต์เตตระฮีดรอลอินเตอร์มิเดียท (covalent tetrahedral intermediate) คาร์บอนิลออกซิเจนของโปรโตคาร์บอกซิลกรุ๊ป จะเป็นตัวแยก H^+ (proton) จากการปะทะแบบอิเลคโตรฟิลิก (electrophillic) ของคาร์บอนิลคาร์บอนบนหมู่อะมิโน(-NH-) ของพันธะเปปไทด์เกิด อะมิโน-เอซิล-เอนไซม์ อินเตอร์มิเดียท หรือ อะมิโน-เอนไซม์ อินเตอร์มิเดียท และ เอซิล-เอนไซม์ อินเตอร์มิเดียท โดยที่อินเตอร์มิเดียททั้งคู่นี้จะทำปฏิกิริยากับน้ำได้ผลผลิต 2 หมู่ คือ R_1-NH_2 และ RCOOH ปรากฏการณ์นี้แสดงให้เห็นการเกิดอะมิโน-เอนไซม์ อินเตอร์มิเดียท มากกว่าการเกิด เอซิล-เอนไซม์ อินเตอร์มิเดียท ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะการมีความจำเพาะของเปปซินต่อ R_2 กล่าวคือ มีต่อปลายด้านอะมิโน



รูปที่ 7 กลไกการทำงานของเปปซิน
ที่มา : รุ่งรัตน์ และคณะ (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส

แบ่งวิธีวิเคราะห์ตามชนิดของสับสเตรท ดังนี้

3.1 โปรตีนเป็นสับสเตรท มีวิธีการแตกต่างกัน 2 วิธี คือ

3.1.1 ประเมินจากผลผลิตของการทำปฏิกิริยา เช่น ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น ไตรคลอโรอะซิติกแอซิด (trichloroacetic acid, TCA) เปอร์คลอริกแอซิด (perchloric acid) เป็นต้น ส่วนโปรตีนที่ใช้ได้แก่ เคซีน (caseine) ฮีโมโกลบิน (haemoglobin) ที่ผ่านการบำบัดด้วยกรดหรือยูเรีย วัดปริมาณ TCA-soluble peptides คือส่วนของสารประกอบอะโรมาติกที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นา-โนเมตร (OD_{280}) แล้วประเมินค่าด้วย ไทโรซีน (tyrosine) ในสารละลายปฏิกิริยา ปริมาณของไทโรซีนจะแปรผันตรงตามกิจกรรมของเอนไซม์ ค่าที่วิเคราะห์นี้ไม่สามารถบอกจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ได้

3.1.2 การประเมินจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ(free amino acid) ที่เป็นผลผลิตจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ โดยให้กรดอะมิโนทำปฏิกิริยากับนินไฮดรินรีเอเจนท์ (ninhydrin reagent) ให้สีที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (OD_{570}) เทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของลิวซีน ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนกับนินไฮเดรต ดังรูปที่ 8

รูปที่ 8 ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนอิสระกับนินไฮเดรต

ที่มา : Wang และ Hesseltine (1965)

3.2 สับสเตรทสังเคราะห์ ได้แก่สับสเตรทที่มีพันธะเอสเทอร์ (ester) เอไมท์ (amide) เปปไทด์ (peptide) ในตำแหน่งพันธะเปปไทด์เดิม ใช้เพื่อพิจารณาความจำเพาะและกลไกการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์มาก มีการใช้กันอย่างกว้างขวางในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่

4.1 การผลิตสารซักฟอก (detergent)

4.2 การฟอกหนัง

4.3 การทำเครื่องดื่ม

4.4 การสังเคราะห์แอสปาแตม (aspartame)

4.5 การผลิตขนมปัง

4.6 การทำความสะอาดแผล

4.7 ประโยชน์อื่น ๆ โปรติเอสสามารถใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ ได้อีกมากมายเช่นการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate) จากถั่วเหลือง เนื้อและปลาใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ป่วย การผลิตยาช่วยย่อยอาหาร การเตรียมเงินจากอิมัลชัน (emultion) ของการล้างฟิล์ม

5. จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส มีตัวอย่างดังนี้

5.1 *Aspergillus oryzae*

ในตะวันตกการผลิตเอนไซม์ในทางการค้าจะผลิตจากเชื้อราและแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว (submerge culture) ซึ่งจะมีการอนุญาตให้มีการควบคุมทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และพีเอช ในขณะนี้ได้มีความพยายามที่จะเลี้ยงในอาหารแข็ง (solid state fermentation, SSF) (Aidoo และคณะ, 1982; Hesseltine, 1987) การเลี้ยงในอาหารแข็ง จะมีความเป็นไปได้เมื่อใช้เชื้อรามีลักษณะต่างจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เนื่องจากความสามารถเจริญได้อย่างอิสระในสับสเตรทที่เป็นของแข็ง ดังนั้นการเลี้ยงในอาหารแข็งจึงได้ประโยชน์มากกว่าการเลี้ยงแบบอาหารเหลว และข้อดีของการใช้เชื้อรา คืออุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตไม่สลับซับซ้อน และใช้ความชื้นต่ำจึงป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย (Hesseltine, 1987)

นอกจากนี้ยังใช้ปริมาณของสารละลายต่ำในการสกัดเอนไซม์ออกมา ซึ่งเป็นการลดพลังงานและไม่สร้างปัญหามลพิษอีกด้วย ประโยชน์ของการเลี้ยงในอาหารแข็งจึงมีความน่าสนใจที่จะใช้ในประเทศโลกที่สาม (Carrizales และ Jaffe, 1986) อุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการเหมาะสมกับการผลิตขนาดเล็ก (small scale production) ซึ่งเหมาะกับผู้ที่มีทุนต่ำและมีแรงงานสูง (Battaglino และคณะ, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43064

5.2 *Mucor miehei*

เชื้อรา *M. miehei* จะผลิตเอนไซม์โปรติเอส (acid protease) E.C. 3.4.23.10 ซึ่งได้มีการนำมาใช้อย่างมากมายในการทำให้น้ำนมตกตะกอน เนื่องจากมีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์เรนเนท (rennet) ในวัว (E.C. 3.4.23.4) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะไม่เสถียรเมื่อพีเอชสูงกว่า 6.5 และการที่จุลินทรีย์จะไม่ทนต่อแรงเฉือนเมื่อมีการกวนสูงขึ้นมีผลให้การผลิตเอนไซม์ลดลง โดยเอนไซม์ที่เกิดขึ้นสามารถดูได้จากปริมาณเคซีน การผลิตเอนไซม์ลดลงเมื่อการเกิดการสะสมผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็นผลจากการควบคุมย้อนกลับ (feedback repression) (Escobar และ Barnett, 1995)

Lasure(1980) ได้รายงานว่าการเติมกรดอะมิโนจะทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์หยุดชะงัก ซึ่งข้อเท็จจริงนี้ยังไม่ชัดเจนว่าเกี่ยวข้องกับการควบคุมย้อนกลับหรือความผิดพลาดในการชักนำ

5.3 *Rhizopus sp.*

Sakamoto และ Shuzui (1957) พบว่า *Rhizopus tonkinensis* , *Rhizopus peka* และ *Rhizopus javanicus* ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอซิดโปรติเอสโดยใช้ข้าว ข้าวสาลี หรือข้าวบาร์เล่ย์มีการผลิตทั้งแอซิดโปรติเอสและนิวทรอลโปรติเอสได้ดีจากข้าวสาลี Puskas และ Elodi(1961) รายงานว่าโปรติโอไลติกเอนไซม์ของ *Rhizopus nigricans* โดยเลี้ยงในอาหารแข็งโดยการใช้ข้าวสาลีจะเกิดกิจกรรมสูงสุดที่พีเอชเป็นด่าง ซึ่งเชื้อสายพันธุ์นี้มีลักษณะคล้าย *Rhizopus stolonifer*

Hesseltine และคณะ(1963) ได้รายงานการสาธิตผลของโปรติโอไลติกเอนไซม์จากเชื้อราสายพันธุ์ *Rhizopus oligosporus* และพบว่าเชื้อให้ค่ากิจกรรมไม่เหมือนกับสายพันธุ์ *Rhizopus stolonifer*

5.4 *Pseudomonas aeruginosa*

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์กลุ่มที่มีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยาและผงฟอกขาว (ward, 1983; Kalize, 1988) เอนไซม์โปรติโอไลติกที่ผลิตที่อุณหภูมิสูงจะมีประโยชน์ในด้านเทคโนโลยีทางวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นที่น่าสังเกตว่า *Bacillus thermoproteolyticus* จะใช้เทอร์โมไลซีน (thermolysine) ในการผลิตแอสปาแทมและสารทดแทนความหวาน และนิวทรอลโปรติเอสจาก *P. aeruginosa* IFO 3544 (Paten และคณะ, 1993) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการใช้เทอร์โมไลซีนเพื่อการสังเคราะห์แอสปาแทมและใช้สารตัวนี้เป็นสับสเตรทในการสังเคราะห์เอ็น-เบนซิลอกซี-คาร์บอนิล-แอสปาร์ติก-แอซิด (N-benzyloxy-carbonyl-aspartic acid) และฟีนิลอะลานีน เมทิล เอสเทอร์ (phenylalanine methyl ester) (Lee และคณะ, 1992,1993) ซึ่งจากรายงานแสดงให้เห็นว่า *P. aeruginosa* สามารถผลิตเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5 *Bacillus sp.*

ได้มีรายงานการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ที่ทนด่างคือ *Bacillus* sp. No. 221 อย่างแพร่หลาย(Horikoshi, 1971a) จึงได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติของอัลคาไลน์โปรติเอสจากสายพันธุ์อื่น ๆ อีกมากมาย และพบว่าสายพันธุ์ *Steptomyces* sp. ก็สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้ (Nakanishi และ Yamamoto, 1974) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะมีกิจกรรมและเสถียรในสภาวะเป็นด่างสูง พีเอช 13 และเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้จะนำไปใช้เกี่ยวกับเคมีและเสื้อผ้าได้ (Aunstrup และคณะ, 1972)

5.6 *Bacillus licheniformis* MIR2

โปรติโอไลติกเอนไซม์จากแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* sp. เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญในระดับการค้า ซึ่งการประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่จะใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ (Kalize, 1988) *Bacillus* sp. ที่สังเคราะห์โปรติเอสออกมาได้แก่ *B. subtilis* ซึ่งกระบวนการการสังเคราะห์ทางชีวภาพของอัลคาไลน์โปรติเอส ขึ้นอยู่กับการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นของคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหาร (Giesecke และคณะ, 1991) และนอกจากนี้ปริมาณของกลูโคสและแอมโมเนียมีผลต่อการสังเคราะห์อัลคาไลน์โปรติเอส เมื่อใช้ *B. licheniformis* ในการผลิตและเลี้ยงแบบกะ(batch culture) (Heineken และ O'coner, 1972)

ยังมีเชื้อจุลินทรีย์อีกหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดก็ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่างชนิดกัน ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์

กลุ่ม	ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์
Serine protease	
Trypsinlike	*Streptomyces griseus*
	S. tradia
	S. erytrhecus
Alkaline	*Bacillus subtilis*
	Saccharomyces cerevisiae
	S. griseus
	S. rectus
	Aspergillus oryzae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม	ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์
Myxobacter-Y-lytic	*Sporangium* sp.
Staphylococcal	*Staphylococcus aureus*
Thiol protease	
Clostripain	*Clostridium histolyticum*
Streptococcal	Group A streptococci
Metal containing protease	
Neutral	*Bacillus subtilis*
	B. thermoproteolyticus
Alkaline protease	*B. cereus*
Myxobacter protease 1	*B. megaterium*
Myxobacter protease 2	*S. griseus*
Acid protease	*B. cereus*
	B. megaterium
	S. griseus
	A. oryzae
	Pseudomonas aeruginosa
	C. hystolyticum
	B. amyloliquefaciens
	Serratia sp.
	Sporangium sp.
	Myxobacter AL-1
	A. oryzae
	A. niger
	Penicillium notatum
	Rhizopus chinensis
	Mucor pusillus
	M. miehei

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม	ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์
	Endothia parasitica *Candida albicans* *S. cerevisiae* *Rhodotorulus glutinis*

ที่มา : จันทิมาและสีหนาท (1999)

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา

6.1 แหล่งคาร์บอน

Sakamoto (1957) พบว่า การผลิตเอนไซม์เอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus sogo* มักใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์ และปกติมักผลิตด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวหรืออาหารแข็ง อย่างไรก็ตามทั้ง 2 ระบบ ก็ยังเกิดปัญหาบางประการ ยกตัวอย่างเช่นการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะเกิดการปนเปื้อนโดยเชื้อแบคทีเรียและจะให้ผลผลิตต่ำมาก อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนของแบคทีเรียเกิดขึ้นได้บ่อยครั้ง และได้พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบคีโมสแตท (chemostat) จะไม่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตโดยเชื้อราภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

Fukushima และคณะ(1989) ได้รายงานการผลิตเอนไซม์แบบต่อเนื่อง โดยใช้สายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบคีโมสแตทโดยจำกัดปริมาณคาร์บอนใน NaCL 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของแบคทีเรีย

Drucker (1972) รายงานว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Neurospora crassa* จะขึ้นอยู่กับการชักนำและการยับยั้งของกลูโคสในอาหาร แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์มีหลายชนิดและที่สำคัญในการลดต้นทุนการผลิต จะต้องหาแหล่งคาร์บอนที่หาง่าย ราคาถูก ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ได้แก่ ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด และปัจจุบันยังมีการหันมาใช้ รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และจมูกข้าวสาลี ซึ่งองค์ประกอบของรำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และจมูกข้าวสาลี แสดงได้ดังตารางที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของรำข้าวเจ้า

ส่วนประกอบ	ข้าวเปลือก (เปอร์เซ็นต์)	ข้าวซ้อมมือ (เปอร์เซ็นต์)	ข้าวที่สีแล้ว (เปอร์เซ็นต์)	รำข้าว (เปอร์เซ็นต์)
คาร์โบไฮเดรต	87.2	91.5	66.8	46.6
โปรตีน	8.3	7.6	13.2	14.6
เถ้า	1.7	0.5	7.1	10.6
ไขมัน	2.0	0.3	10.7	13.4
เส้นใย	1.1	0.4	3.3	12.7
ไนโตรเจนสกัด	82.4	88.8	62.5	45.0

ที่มา : อรอนงค์ (2542)

ตาราง**ที่ 6** องค์ประกอบของรำข้าวสาลี

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์
คาร์โบไฮเดรต	48.0
โปรตีน	14.2
เถ้า	8.6
ไขมัน	12.0
เส้นใย	13.3
ไนโตรเจนสกัด	43.5

ที่มา : อรอนงค์ (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของจมูกข้าวสาลี(อรอนงค์, 2542)

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์
คาร์โบไฮเดรต	45.7
โปรตีน	18
เถ้า	5
ไขมัน	8.6
เส้นใย	12
ไนโตรเจนสกัด	40.9

ที่มา : อรอนงค์ (2542)

6.2 แหล่งไนโตรเจน

Heineken และ O'coner (1972) และ Ferreo และคณะ (1996) พบว่าในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือ เคซีน ในขณะที่ กลูโคส กลีเซอรอล ซูโครส มอลโตส และไซโลส จะยับยั้งการสร้างเอนไซม์ ถึงแม้ว่าจะมีการเจริญของเชื้ออยู่ก็ตาม และพบว่าการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจะเกิดขึ้นในระยะการเจริญเอกโปเนนเชียล (exponential) ช่วงท้าย และช่วงที่มีการเจริญคงที่

Farley และIkasari (1992) เลี้ยงเชื้อ *Rhizopus oligosporus* ในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิลโปรติเอส(carboxyl proteinase) พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน และมีการเติมกลูโคส 295 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 10.5 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า

6.3 พีเอช

พีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การหมักในระยะแรก พีเอชของการเลี้ยงเชื้อเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงอาจเกิดการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่น ๆ ออกมาหรือมีการย่อยสลาย สารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์ขึ้นเป็นผลให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมให้ค่าพีเอชในอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ บัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่าง ป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา(Wang และ Hesseltine, 1965) อิทธิพลของพีเอช ต่อการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์โปรติเอสมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุดสูงสุดที่พีเอช 3 และสูงรองลงมาที่พีเอช 5.5 และกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำลงที่พีเอช 4-5 เนื่องจากข้อกัดในการละลายได้ของเคซีน (Heineken และO'coner, 1972)

Shinmyo และคณะ(1968) ได้รายงานว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรดิเอสในสภาพที่เป็นกรดคือ 4.6 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ Morimura และคณะ (1994) ได้เลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้ง พบว่าค่าพีเอชระหว่าง 3.5-5.0 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นและที่ อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะเป็น 15 เปอร์เซ็นต์และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Battaglino และคณะ(1991) พบว่าการให้ความชื้นของสับสเตรทด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 4 เปอร์เซ็นต์(ความเข้มข้นสุดท้าย) เมื่อ พีเอชเริ่มต้นเพิ่มขึ้นถึง 6.9-7.2 พบว่าผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสจากรำข้าวสาลี เปลือกข้าวสาลี และรำข้าวโพด จะเพิ่มขึ้นถึง 4000 , 7000 และ 4000 โปรติเอสยูนิต/กรัม ตามลำดับ

6.4 จำนวนสปอร์เริ่มต้น

Battaglino และคณะ(1991) ได้ทำการทดสอบจำนวนสปอร์เริ่มต้นของเชื้อในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (10^4 , 10^5 และ 10^6 สปอร์/กรัมสับสเตรท) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ 10^6 สปอร์/กรัมสับสเตรท

6.5 แหล่งแร่ธาตุ

Wang (1967) รายงานว่าอิออนของเกลือจะช่วยเพิ่มเอนไซม์โปรติโอไลติกในอาหารเหลว เพราะอิออนของเกลือจะไปทำลายพันธะระหว่างเอนไซม์กับผิวหน้าของไมซีเลียมทำให้เอนไซม์ถูกปลดปล่อยออกมาเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบรายงานของ Oleniacz และ Pisano (1968) พบว่า*Cephalosporium* sp. ไม่ต้องการแหล่งเกลือแร่ใดๆ ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และยังพบว่าอิออนของโลหะ Zn^{2+} และ Cu^{2+} จะมีผลไปลดการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และขั้นตอนการดำเนินงาน

วัสดุ

วัตถุดิบ

- รำข้าวเจ้า
- รำข้าวสาลี
- จมูกข้าวสาลี
- *Aspergillus usamii* ATCC14341

ซึ่งได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย นำมาเลี้ยงในอาหารวุ้นPDA (Potato dextrose agar) 5-7 วัน เพื่อให้เกิดสปอร์เต็มที่ จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็นเพื่อนำสปอร์ของเชื้อรามาใช้ประโยชน์ต่อไป และทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 2 เดือน โดยลักษณะของเชื้อ *A. usamii* ATCC 14341 แสดงดังรูปที่ 9

อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (Singh และคณะ, 1994)

อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารเหลว ประกอบด้วย

- เปปโตน	10	กรัม/ลิตร
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม/ลิตร
- ยีสต์สกัด (yeast extract)	3	กรัม/ลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชให้ได้ 4.0 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อจะแสดงดังรูปที่ 10

อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
3. กล้องจุลทรรศน์
4. ตู้เขี่ยเชื้อ (larmina air flow)
5. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
6. อุปกรณ์นับจำนวนจุลินทรีย์ (haemacytometer)
7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
8. เครื่องผสมสาร (vortex mixer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. เครื่องเขย่า (shaker)

10. เครื่องคนสาร (stirrer)

11. เครื่องแก้ว

12. อุปกรณ์ให้ความร้อน (hot plate)

13. เครื่องชั่งละเอียด

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. นำเชื้อรา *Aspergillus usamii* ATCC 14341 มาทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเชื้อโดยวิธีการย้อมสีด้วยแลคโตฟีนอลบลู (lactophenol blue) ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. เตรียมอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานประกอบด้วยเปปโตน 10 กรัม/ลิตร โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 กรัม/ลิตร ยีสต์สกัด 3 กรัม/ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.0 แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 70 มิลลิลิตร เติมแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. เตรียมสารละลายสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา โดยละลายสปอร์ในน้ำกลั่นที่เติม tween 80 1-2 หยดหรือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ผสมให้สปอร์กระจายอยู่ทั่วถึง นับจำนวนสปอร์ให้ได้ปริมาณ 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร เติมสปอร์สปอร์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละฟลาสก์ วางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ทำการสุ่มตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวัดพีเอช และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งดัดแปลงวิธีของWang และ Hessentine (1965)

4. ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอซิดโปรติเอส ดังนี้

4.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ศึกษาแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และจมูกข้าวสาลี โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ1 และทำการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด จากนั้นนำมาทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกเป็นร้อยละ 0 , 3 , 6 , 9, 12, 15 และ 18

4.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ศึกษาแหล่งไนโตรเจน คือ แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนใช้ยูเรีย เคซีน บีพเอคแทค (beef extract)และคอร์นสตีป ลิเคอร์ (corn steep liquor)โดยใช้ความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร (Singh และคณะ,1994) และแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนคือ แอมโมเนียซัลเฟต และโปแตสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร แทนเปปโตนในสูตรอาหารพื้นฐาน โดยมีแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานซึ่งมีเปปโตน 1 กรัม/ลิตร ร่วมกับยีสต์สกัด 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุม เลือกแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด นำมาศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกเป็นร้อยละ 0 , 1 ,2 , 3 , 4 และ 5

4.3 ผลของพีเอชเริ่มต้น

ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้น โดยการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อที่เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกเป็น 3.0 4.0 5.0 และ 6.0

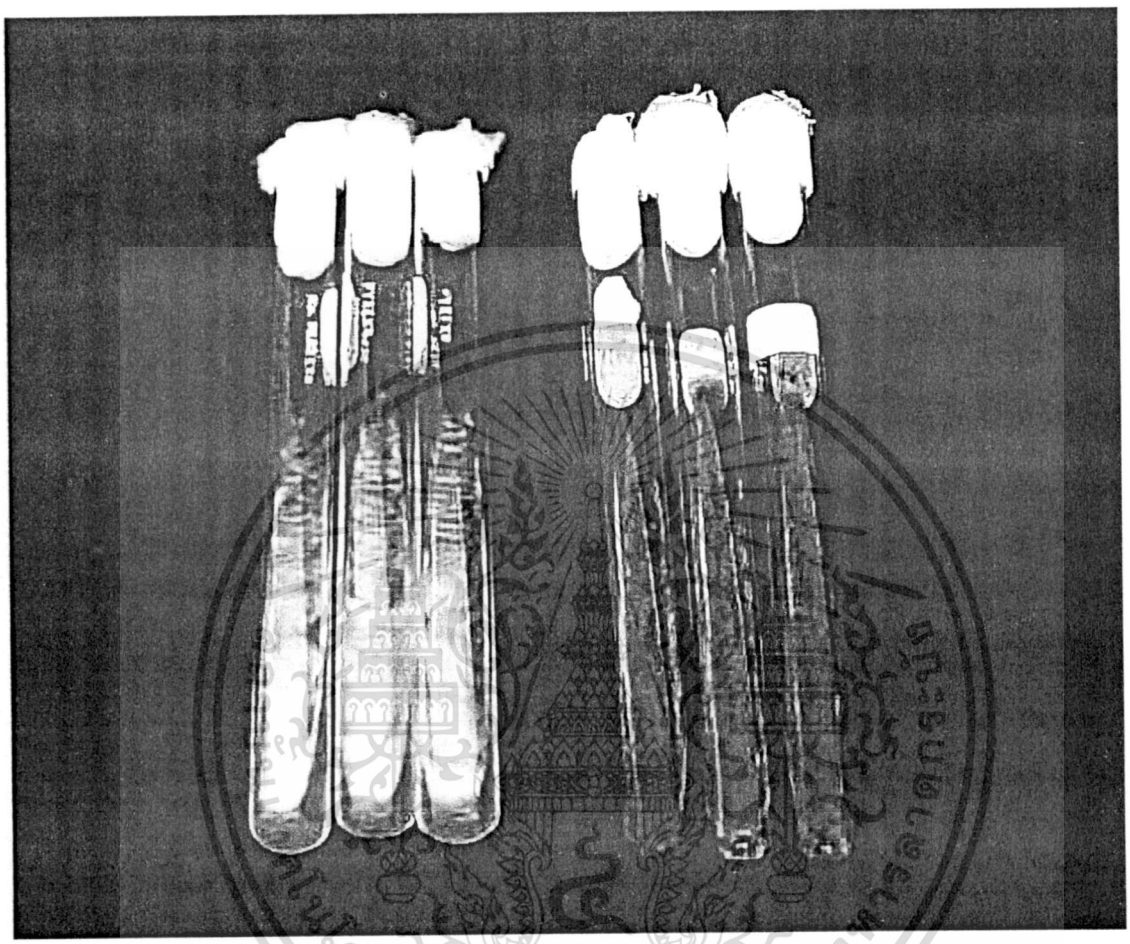
4.4 ผลของสารลดแรงตึงผิว

ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว คือ Tween80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.2 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.1

4.5 ผลของแหล่งแร่ธาตุ

ศึกษาแหล่งเกลือแร่ (Oleniacz and Pisano,1968) ได้แก่ โพแทสเซียม (KCl) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร ฟอสฟอรัส ($NaH_2PO_4.H_2O$) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร ซัลเฟอร์ (Na_2SO_4) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร แมกนีเซียม ($MgCl_2.6H_2O$) ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร เหล็ก ($FeSO_4.5H_2O$) ความเข้มข้น 4.5 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร และทองแดง ($CuSO_4.5H_2O$) ความเข้มข้น 0.08 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมแหล่งเกลือแร่ชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 แสดงลักษณะของ *Aspergillus usamii* ATCC 14341 ในอาหารวุ้นเอียง PDA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 10 แสดงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อวันที่ 1 - 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

จากการย้อมสีเชื้อ *A. usamii* ATCC 14341 ด้วยแลคโตฟีนอลคอททอลบลูและนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่า *A. usamii* ATCC 14341 มีสัณฐานวิทยาเป็นหลายเซลล์แต่ละเซลล์เรียงตัวในแนวเดียวกันเป็นเส้นใยหรือไฮฟา (hypha) เส้นใยจะมีการเพิ่มจำนวนและรวมตัวกันเป็นกลุ่มจนมีขนาดใหญ่เป็นไมซีเลียม (mycelium) มีสีขาว การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของ *A. usamii* ATCC 14341 จะสร้างสปอร์แบบโคนิเดีย (conidia) เป็นสปอร์ที่เกิดขึ้นที่ปลายของเส้นใย ซึ่งปลายเส้นใยนี้เรียกว่าโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) โดย สปอร์จะเรียงตัวต่อกันแบบลูกโซ่ สปอร์มีรูปร่างกลมสีดำ ซึ่งแสดงในรูปที่ 11

2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีสภาพเป็นกรดโดยเชื้อ *A. usamii* ATCC 14341

2.1 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่ทำการศึกษาได้แก่ รำข้าวเจ้า จมูกข้าวสาลีและรำข้าวสาลี พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะสูงสุดในวันที่ 2 ของการทดลอง โดยเมื่อรำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสคือ 9.490 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาได้แก่จมูกข้าวสาลีและรำข้าวสาลีตามลำดับโดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 9.346 และ 9.249 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถแสดงผลในรูปที่ 12 แต่จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 2) พบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อคำนึงถึงต้นทุนพบว่ารำข้าวสาลีมีต้นทุนต่ำสุด ดังนั้นจึงใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อศึกษาต่อไป ในการศึกษาถึงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนพบว่าที่ความเข้มข้น 18 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอสสูงสุดคือ 49.084 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 15 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 44.913 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งทุกความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 3) แต่เนื่องจากที่ความเข้มข้น 18 เปอร์เซ็นต์ อาหารจะมีความหนืดสูงทำให้ยากต่อการเก็บ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่าง เมื่อสังเกตแนวโน้มจะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะมีค่าสูงตามด้วย ซึ่งอาจเป็นเพราะแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ รำข้าวสาลี สามารถอมน้ำได้ดีทำให้เอนไซม์ที่เชื้อผลิตและปลดปล่อยลงในอาหารมีความเข้มข้นสูงในขณะที่น้ำในอาหารเหลือน้อยลงเนื่องจากถูกรำข้าวสาลีดูดซึมไว้ ซึ่งแสดงผลทั้งหมดในรูปที่ 13

2.2 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

แหล่งของไนโตรเจนที่ทำการศึกษาได้แก่ ยูเรีย เคซีน บีพ แอคแทรค คอร์น สตีป ลิเคอร์ แอมโมเนียมซัลเฟต และโปแตสเซียมไนเตรท โดยมีชุดควบคุม พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะสูงสุดในวันที่ 3- 4 ของการทดลอง โดยชุดควบคุมให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 51.135 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ เคซีน คอร์น สตีป ลิเคอร์ โปแตสเซียมไนเตรท บีพ แอคแทรค แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย ตามลำดับ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 48.220, 45.693, 45.253, 43.286, 39.572 และ 20.753 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังที่แสดงในรูปที่ 14 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติที่แสดงไว้ในตารางภาคผนวกที่ 4 พบว่ายูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ซึ่งจากการทดลองของ Heineken และ O'coner (1972) พบว่าในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือ เคซีน และต่อมามีการทดลองเกี่ยงกับการผลิตเอนไซม์เอซิดโปรติเอสโดยเชื้อ *A. niger* พบว่าคอร์น สตีป ลิเคอร์ (17.3 ยูนิต/มิลลิลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีกว่าเคซีน (22.7 ยูนิต/มิลลิลิตร) (Singh และคณะ,1994) จากการทดลองนี้ถึงแม้ว่าชุดควบคุมและเคซีนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าคอร์น สตีป ลิเคอร์ แต่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นเมื่อคำนึงถึงต้นทุน คอร์น สตีป ลิเคอร์จะมีราคาต่ำสุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่น ดังนั้นจึงใช้คอร์น สตีป ลิเคอร์ในขั้นต่อไปในการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตของเอนไซม์โปรติเอสของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมี 0 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุม ดังที่แสดงผลในรูปที่ 15 พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 45.626 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งเป็น 1.5 เท่าของชุดควบคุม ถึงแม้ว่าที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมากกว่า คือ 47.185 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 5)

2.3 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้น

จากนั้นศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหาร พีเอชที่ทดสอบคือ 3, 4, 5 และ 6 พีเอชที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดคือที่พีเอช 4 ได้ค่าคือ 46.015 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาคือพีเอช 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 6) พบว่าที่พีเอช 4 และ 6 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจากพีเอชอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Singh และคณะ (1994) ซึ่งรายงานว่าช่วงพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เอซิดโปรติเอสโดย *A. niger* คือช่วง 3.5 – 4 นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Shinmyo และคณะ (1968) รายงานว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสคือ 4..6 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่มีบางการทดลองที่ให้ผลขัดแย้งคือ Karuna และAyyanna พบว่า *A. oryzae* จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 6 – 8 นอกจากนี้ *A. usamii* mut. Shirousami IFO 6082 จะมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Morimura และคณะ,1994) ดังนั้นที่สภาวะพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็นกรดเชื้อราให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด แต่จะสูงขนาดไหนขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการผลิต ซึ่งผลการทดลองได้แสดงในรูปที่ 16 ดังนั้นจึงใช้พีเอช 4 เพราะนอกจากให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดแล้วยังเป็นพีเอชใกล้เคียงพีเอชของอาหารด้วย

2.4 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวบางชนิด

การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวบางชนิดซึ่งได้แก่ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ tween80 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวใด ๆ จากการทดลองชุดควบคุมจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 7) ดังนั้นการเติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ tween80 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ จะไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งผลการทดลองแสดงไว้ที่รูปที่ 17

2.5 ผลการศึกษาแหล่งเกลือแร่

การศึกษาผลของเกลือแร่บางชนิด โดยใช้แหล่งเกลือแร่ต่าง ๆ ดังนี้ โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมซัลเฟต โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรท เฟอรัสซัลเฟต และคอปเปอร์ซัลเฟต มีชุดควบคุมคือ อาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งเกลือแร่ใด ๆ พบว่าโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรทให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด คือ 55.887 ยูนิต/มิลลิลิตร (รูปที่ 18) และพบว่าแหล่งเกลือแร่ทุกชนิดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางภาคผนวกที่ 8) ซึ่งมีการทดลองของ Oleniacz และ Pisano (1968) พบว่า *Cephalosporium* sp. ไม่ต้องการแหล่งเกลือแร่ใด ๆ ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและยังพบว่าอิออนของโลหะ Zn และ Cu จะมีผลไปลดการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 6) พบว่าที่พีเอช 4 และ 6 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจากพีเอชอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Singh และคณะ (1994) ซึ่งรายงานว่าช่วงพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เอซิดโปรติเอสโดย *A. niger* คือช่วง 3.5 – 4 นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Shinmyo และคณะ (1968) รายงานว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสคือ 4..6 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่มีบางการทดลองที่ให้ผลขัดแย้งคือ Karuna และAyyanna พบว่า *A. oryzae* จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 6 – 8 นอกจากนี้ *A. usamii* mut. Shirousami IFO 6082 จะมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Morimura และคณะ,1994) ดังนั้นที่สภาวะพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็นกรดเชื้อราให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด แต่จะสูงขนาดไหนขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการผลิต ซึ่งผลการทดลองได้แสดงในรูปที่ 16 ดังนั้นจึงใช้พีเอช 4 เพราะนอกจากให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดแล้วยังเป็นพีเอชใกล้เคียงพีเอชของอาหารด้วย

2.4 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวบางชนิด

การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวบางชนิดซึ่งได้แก่ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ tween80 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวใด ๆ จากการทดลองชุดควบคุมจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 7) ดังนั้นการเติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ tween80 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ จะไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งผลการทดลองแสดงไว้ที่รูปที่ 17

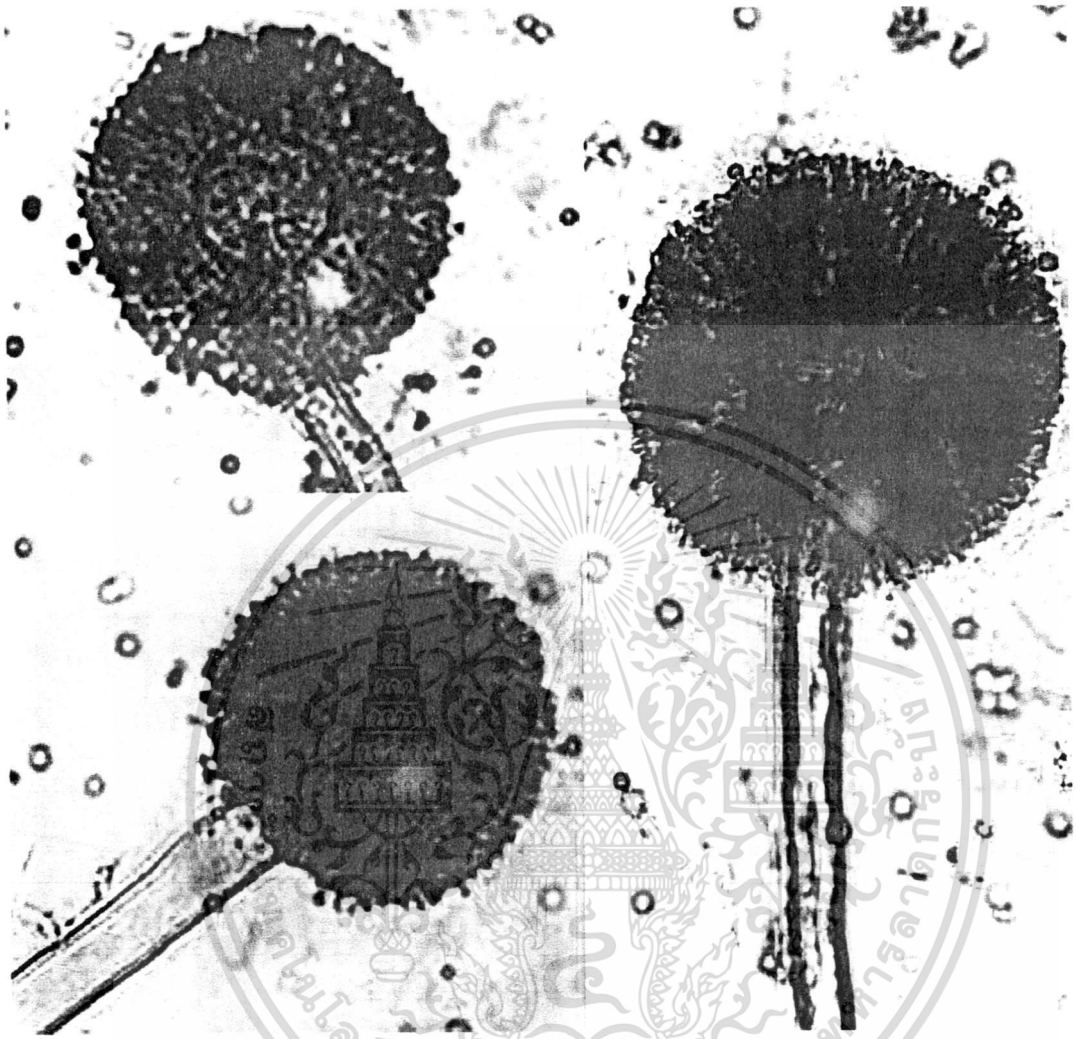
2.5 ผลการศึกษาแหล่งเกลือแร่

การศึกษาผลของเกลือแร่บางชนิด โดยใช้แหล่งเกลือแร่ต่าง ๆ ดังนี้ โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมซัลเฟต โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรท เฟอรัสซัลเฟต และคอปเปอร์ซัลเฟต มีชุดควบคุมคือ อาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งเกลือแร่ใด ๆ พบว่าโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรทให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด คือ 55.887 ยูนิต/มิลลิลิตร (รูปที่ 18) และพบว่าแหล่งเกลือแร่ทุกชนิดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางภาคผนวกที่ 8) ซึ่งมีการทดลองของ Oleniacz และ Pisano (1968) พบว่า *Cephalosporium* sp. ไม่ต้องการแหล่งเกลือแร่ใด ๆ ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและยังพบว่าอิออนของโลหะ Zn และ Cu จะมีผลไปลดการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

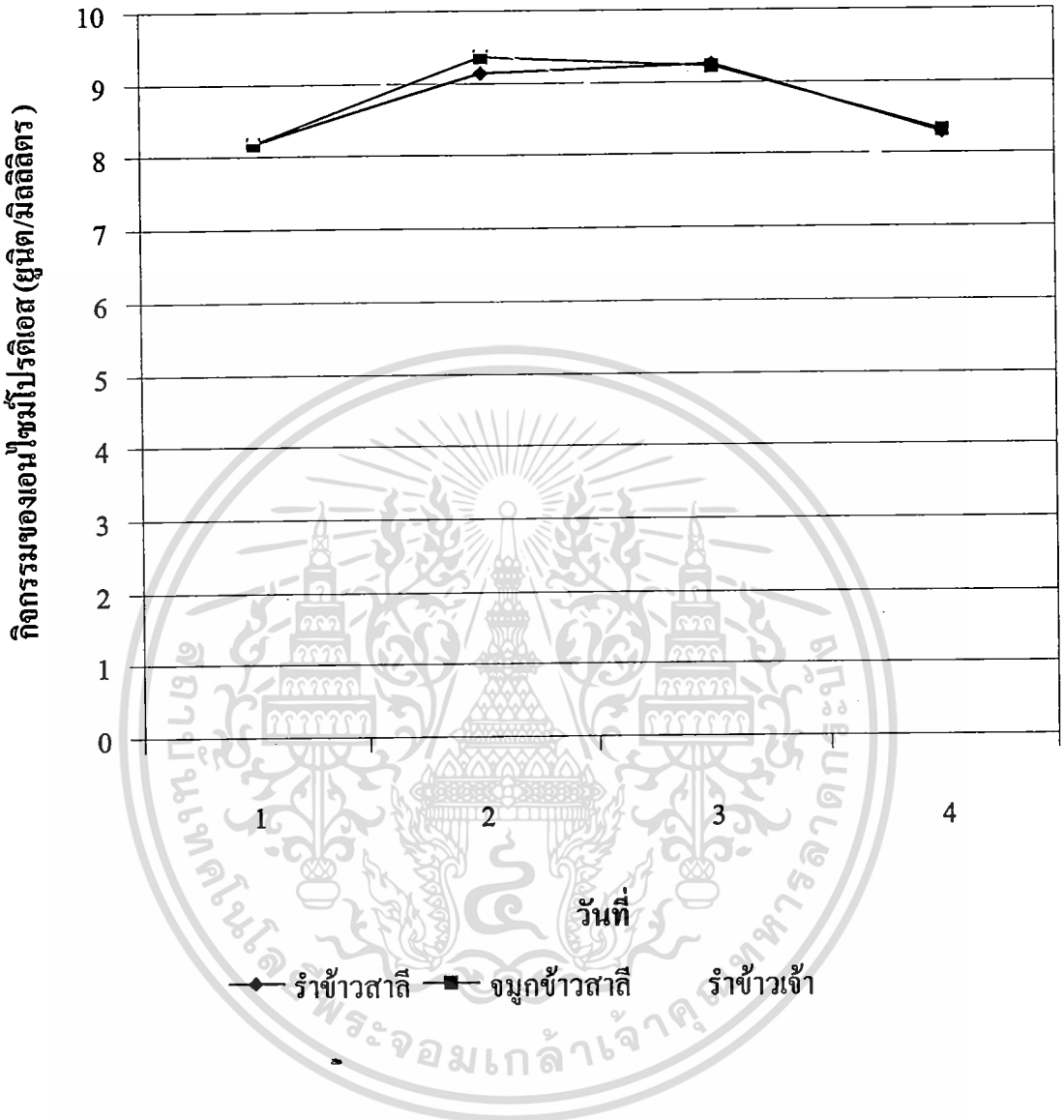
จากการทดลองได้ทำการวัดค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์จากเชื้อ *A. usamii* ATCC 14341 ตลอด 4 วัน ซึ่งจากการทดลองพบว่าพีเอชจะลดลงเรื่อย ๆ โดยจะลดลงต่ำสุดในวันที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ซึ่งจะอยู่ในช่วง 3 - 6 เนื่องมาจากในระยะแรกเชื้อจะมีการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรทเกิดเป็นกรดอินทรีย์ขึ้นเป็นผลให้พีเอชลดต่ำลง (Wang และ Hesseltine,1965) และยังเป็นการแสดงประเภทของเอนไซม์โปรติเอสที่เชื้อ *A. usamii* ATCC 14341 ผลิตขึ้นเป็นเอซิดโปรติเอส ซึ่งผลการวัดพีเอชได้แสดงไว้ในรูปที่ 19-25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



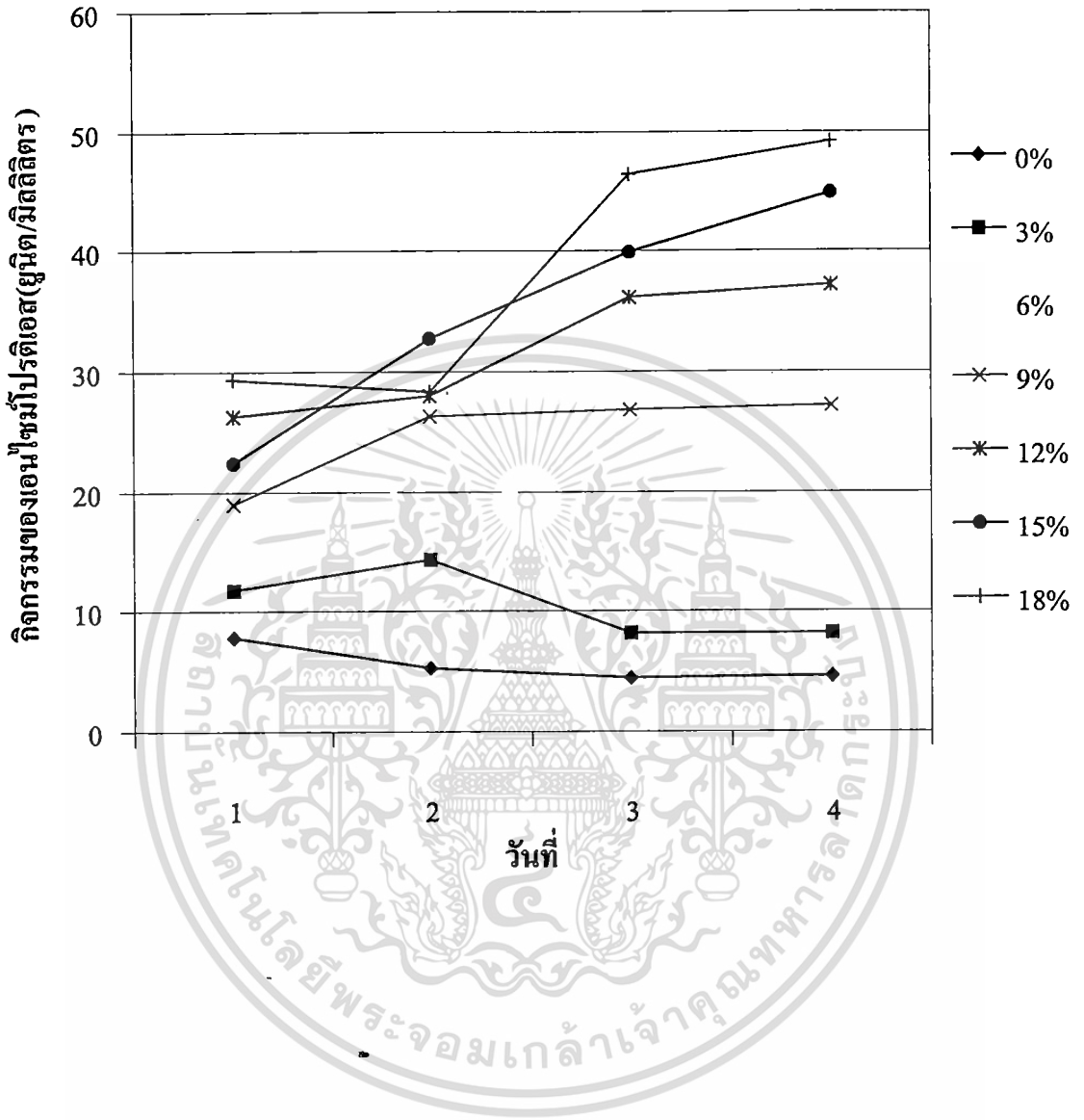
รูปที่ 11 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *Aspergillus usamii* ATCC 14341

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



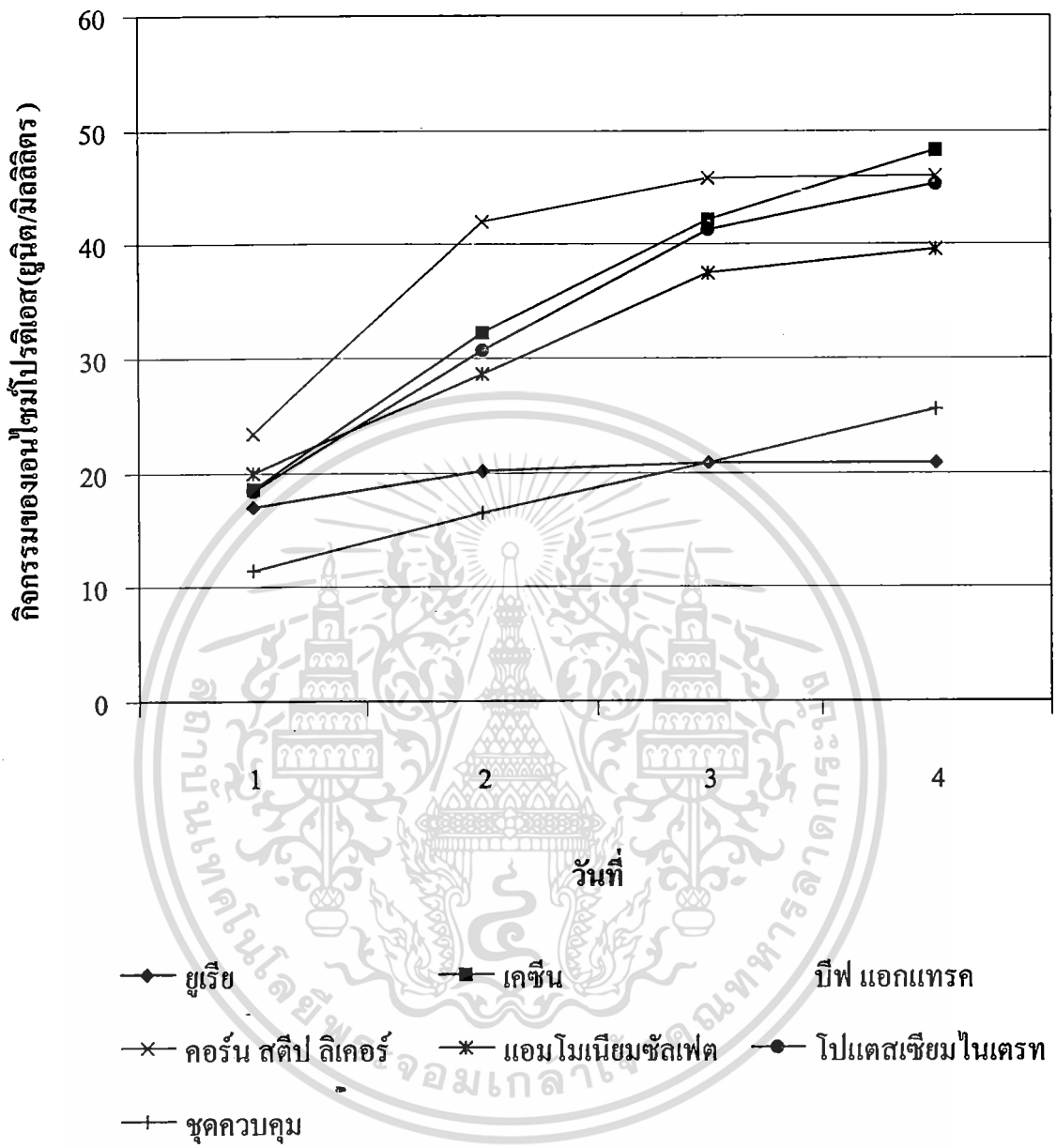
รูปที่ 12 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



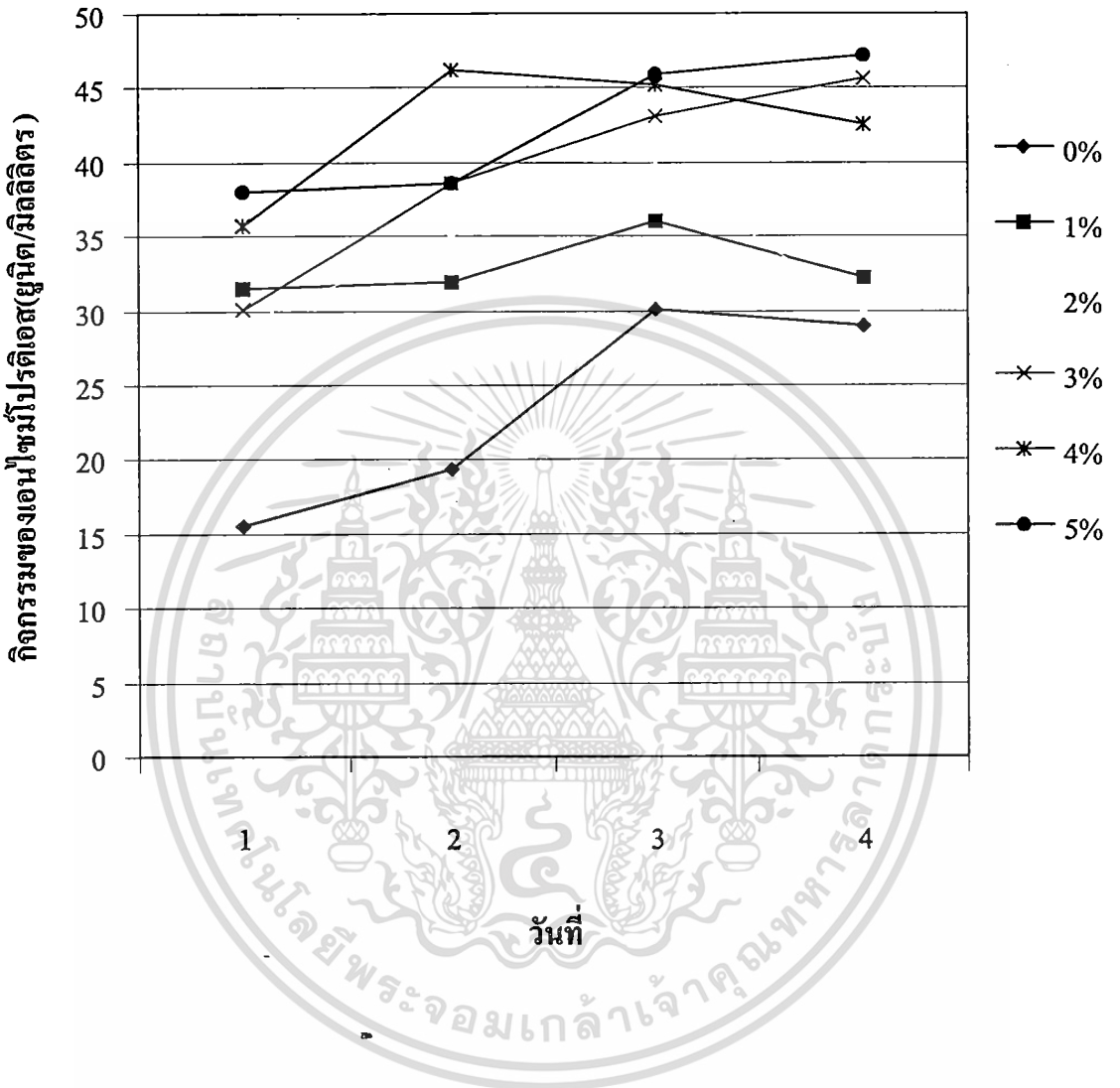
รูปที่ 13 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้ความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



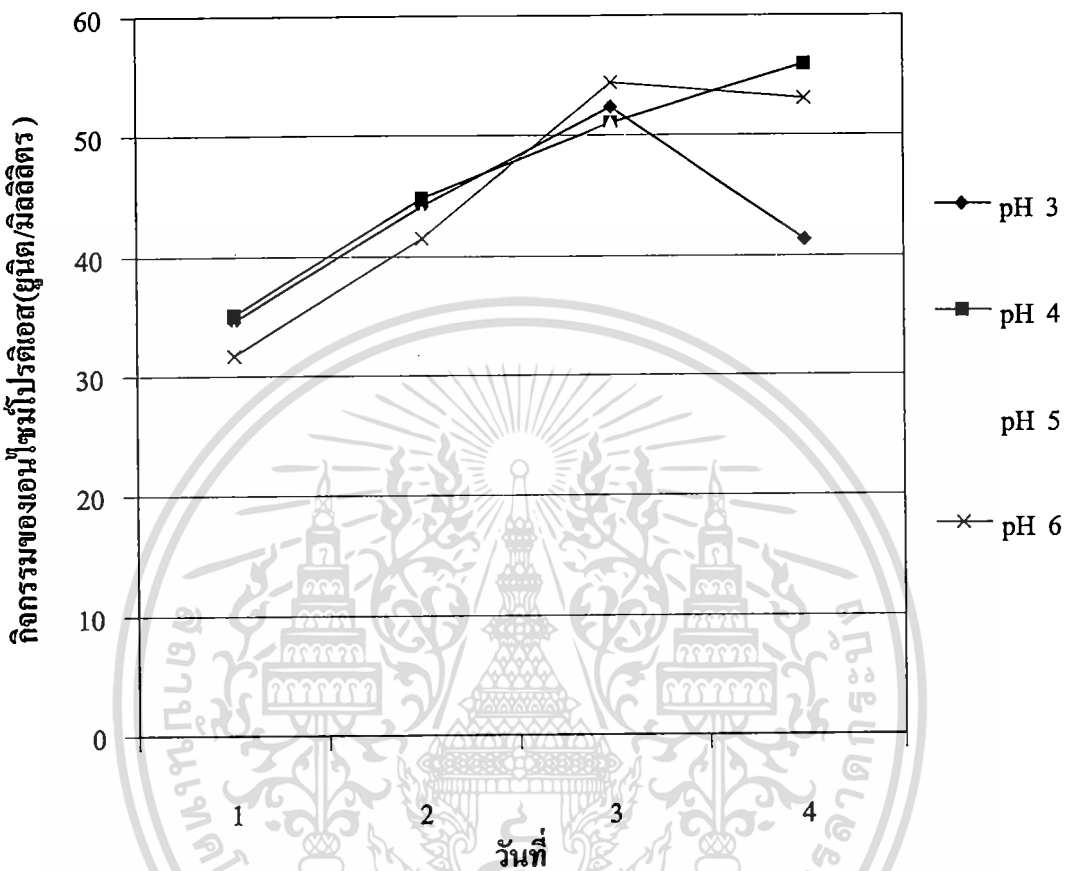
รูปที่ 14 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



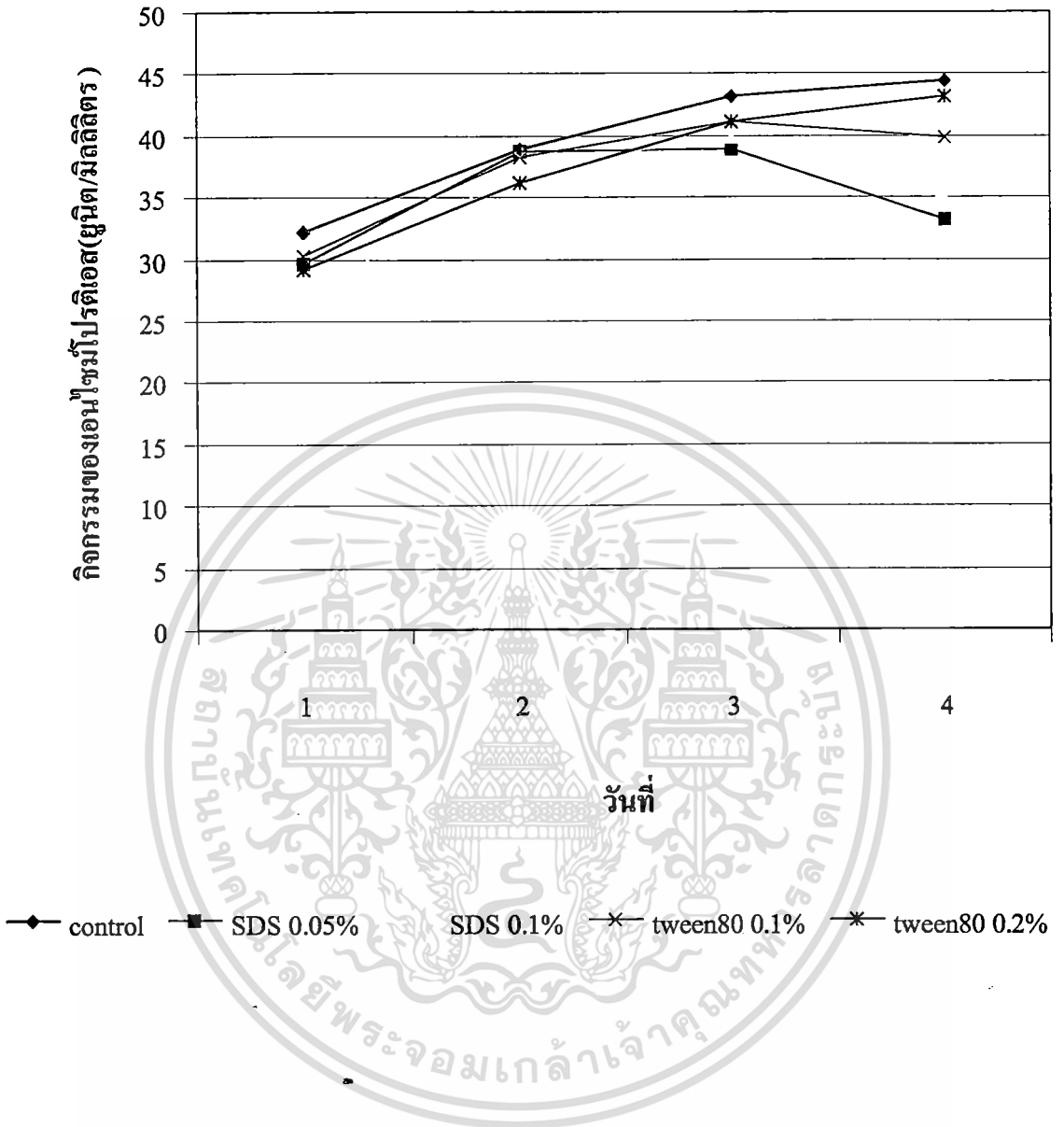
รูปที่ 15 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



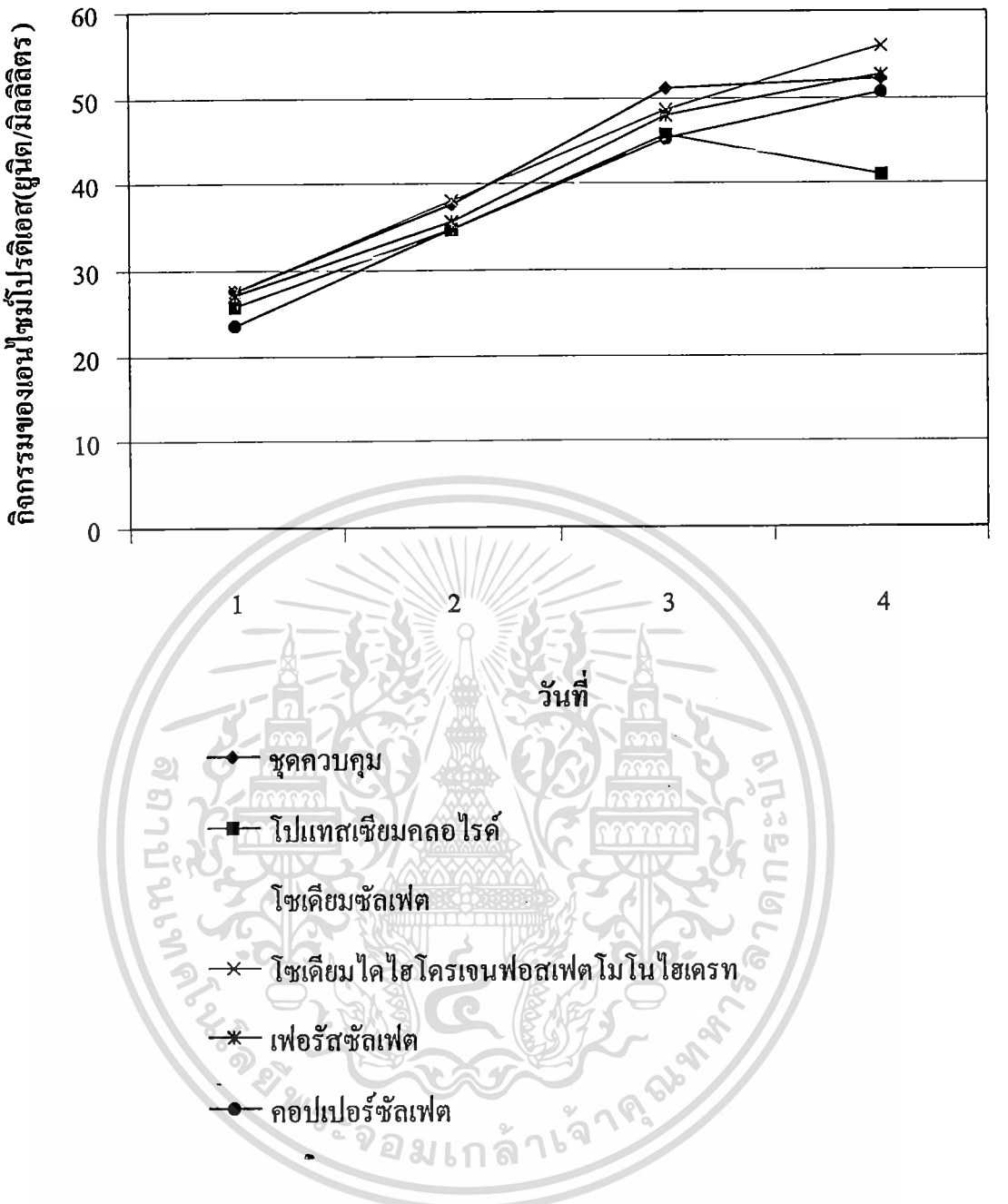
รูปที่ 16 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



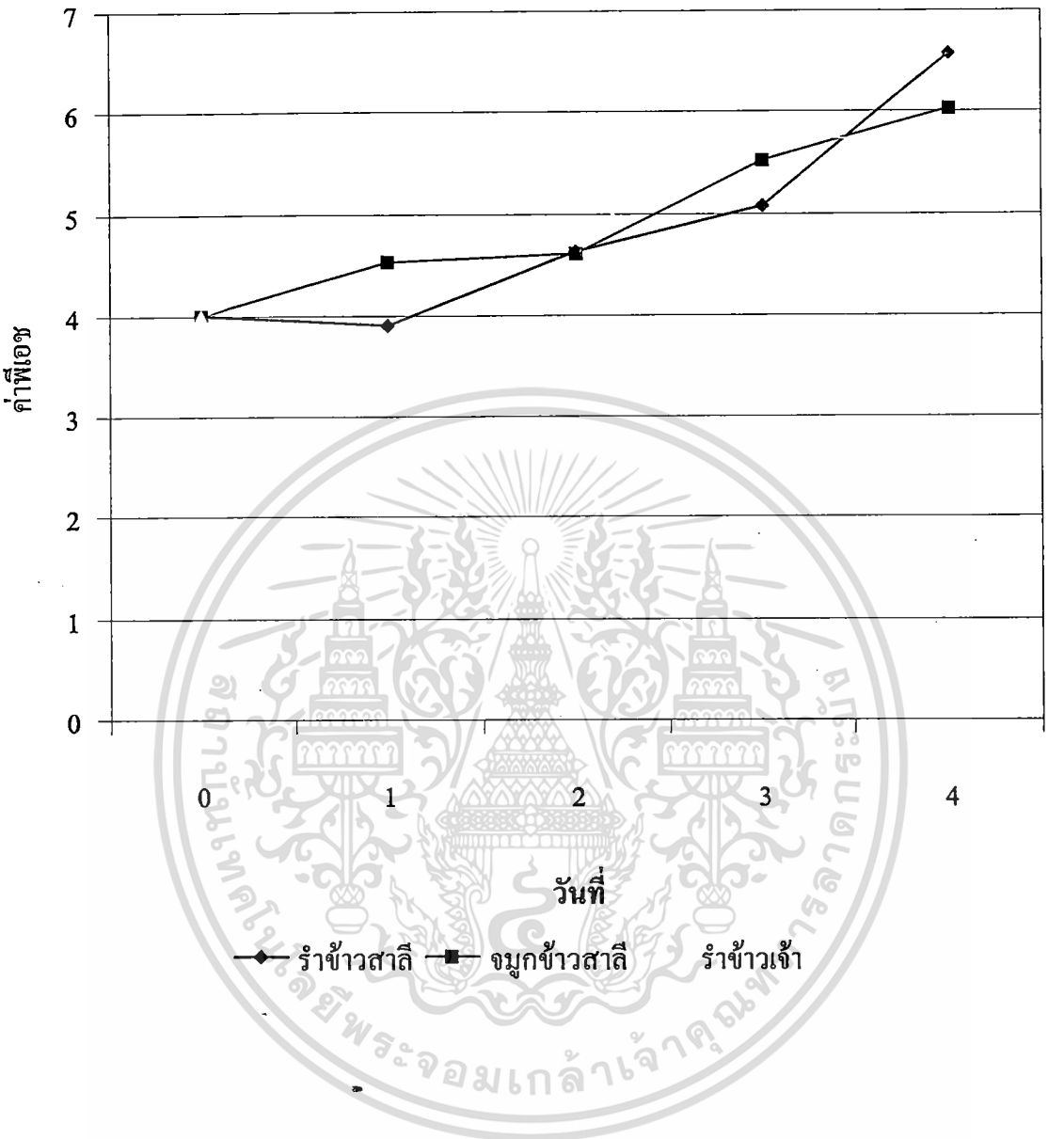
รูปที่ 17 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



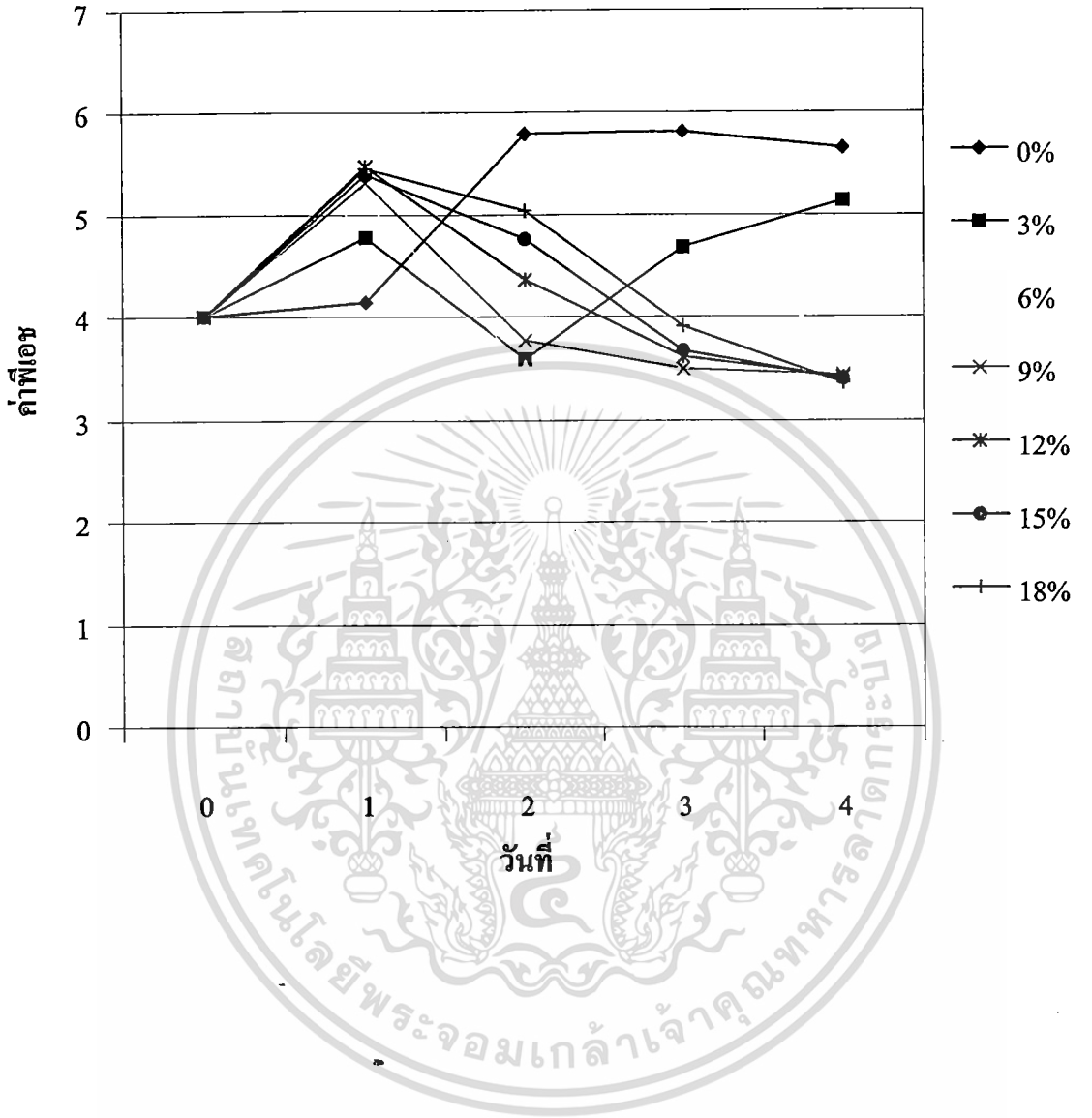
รูปที่ 18 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้แหล่งเกลือแร่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



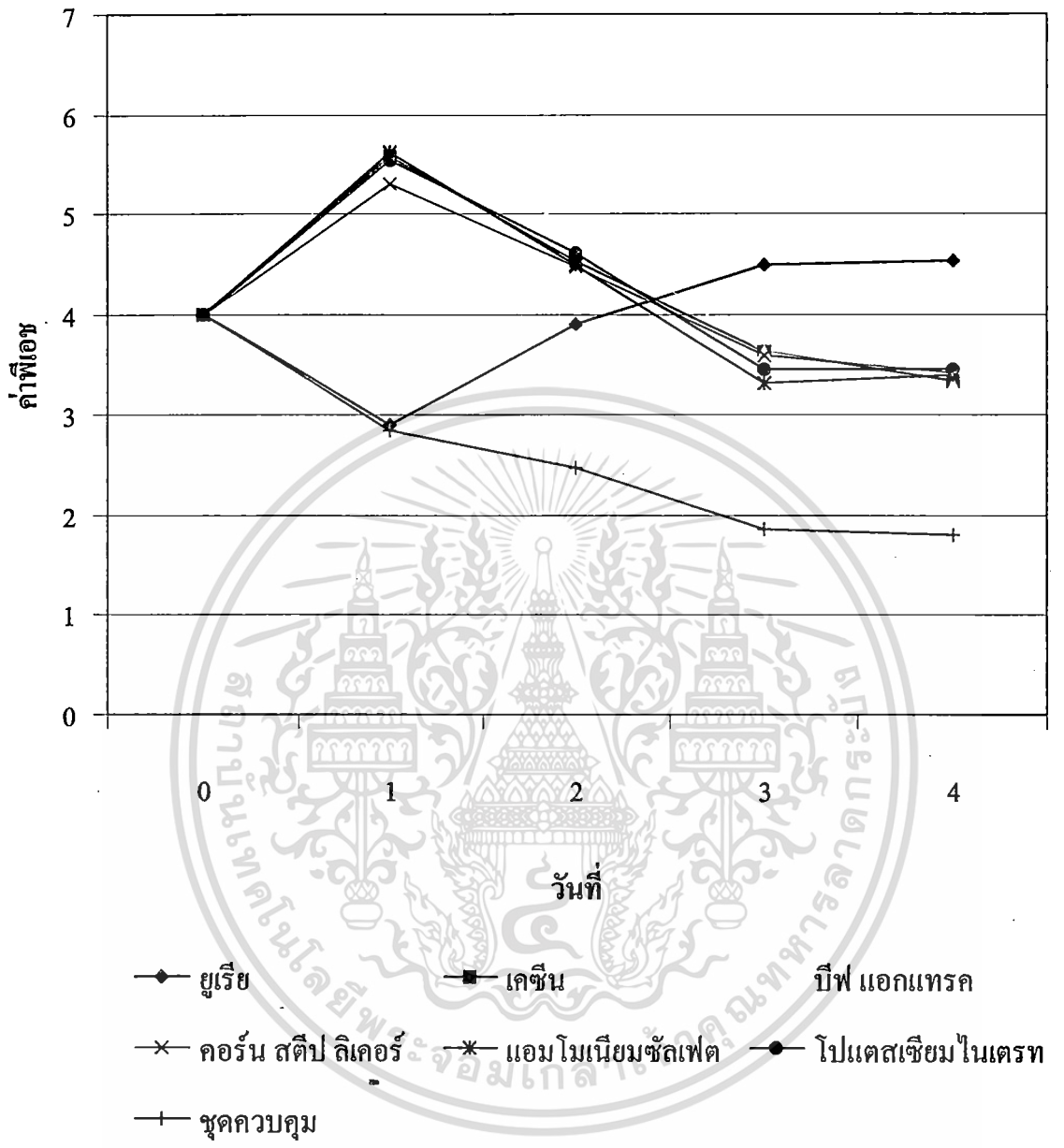
รูปที่ 19 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



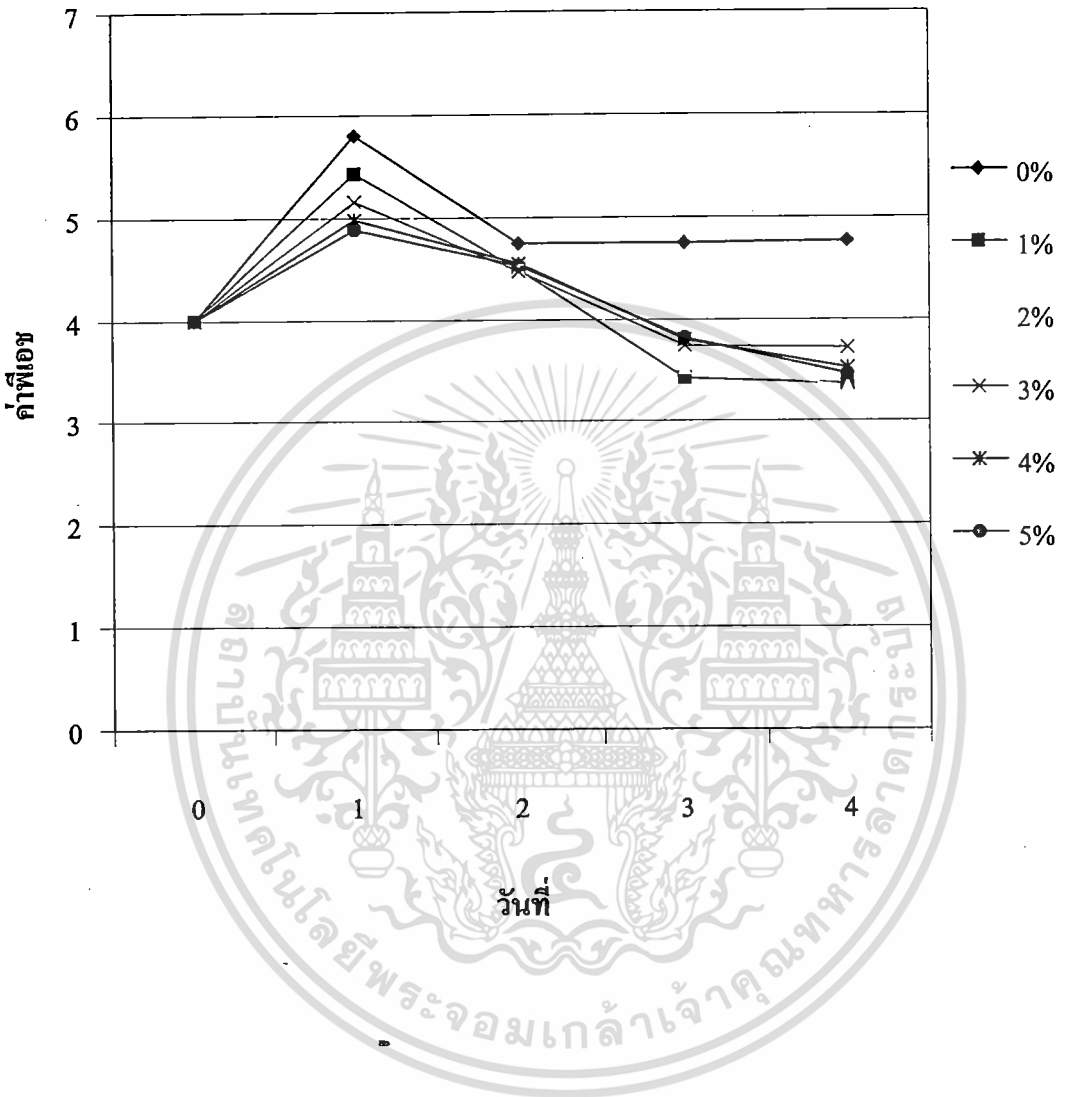
รูปที่ 20 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชเมื่อใช้ความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



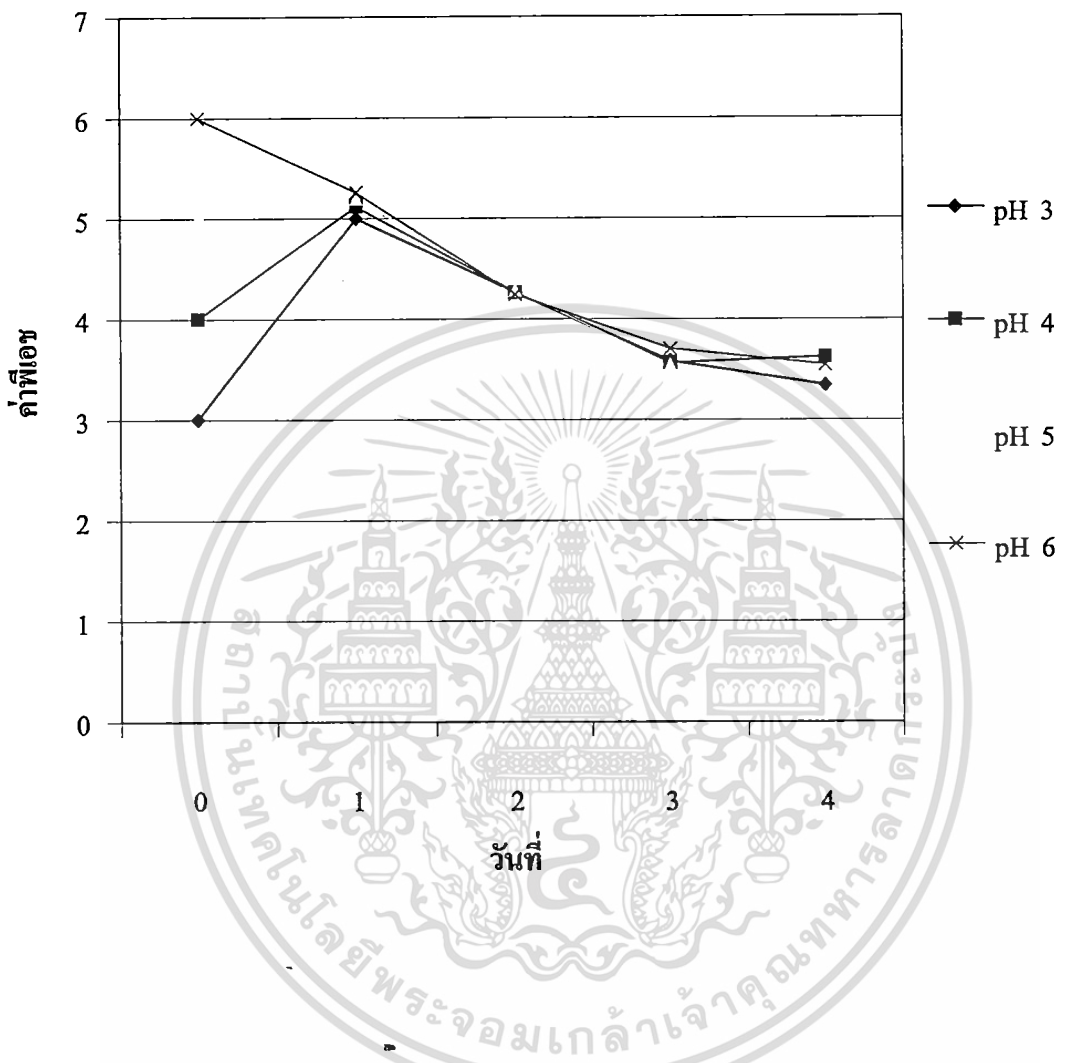
รูปที่ 21 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



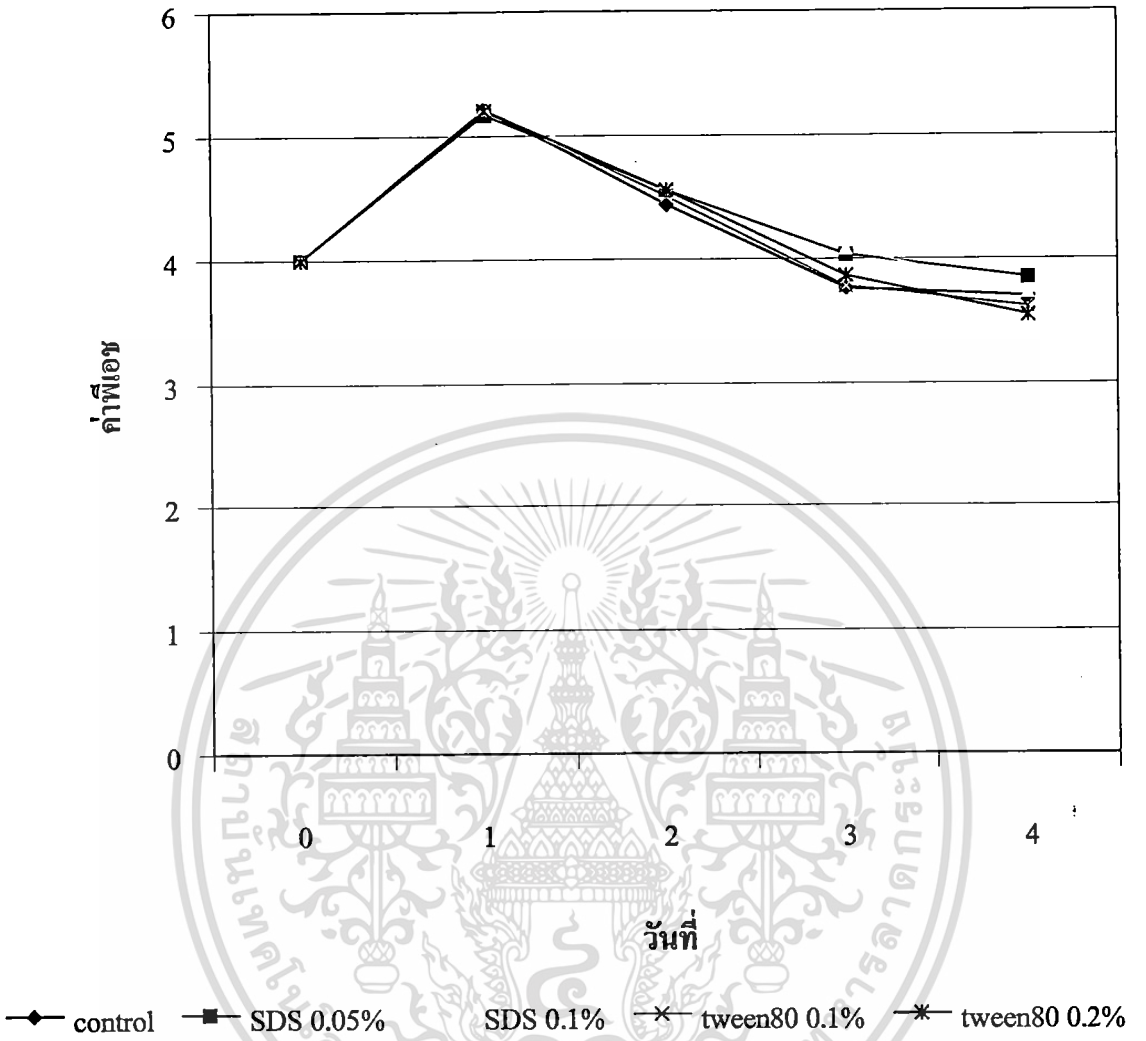
รูปที่ 22 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชเมื่อใช้ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



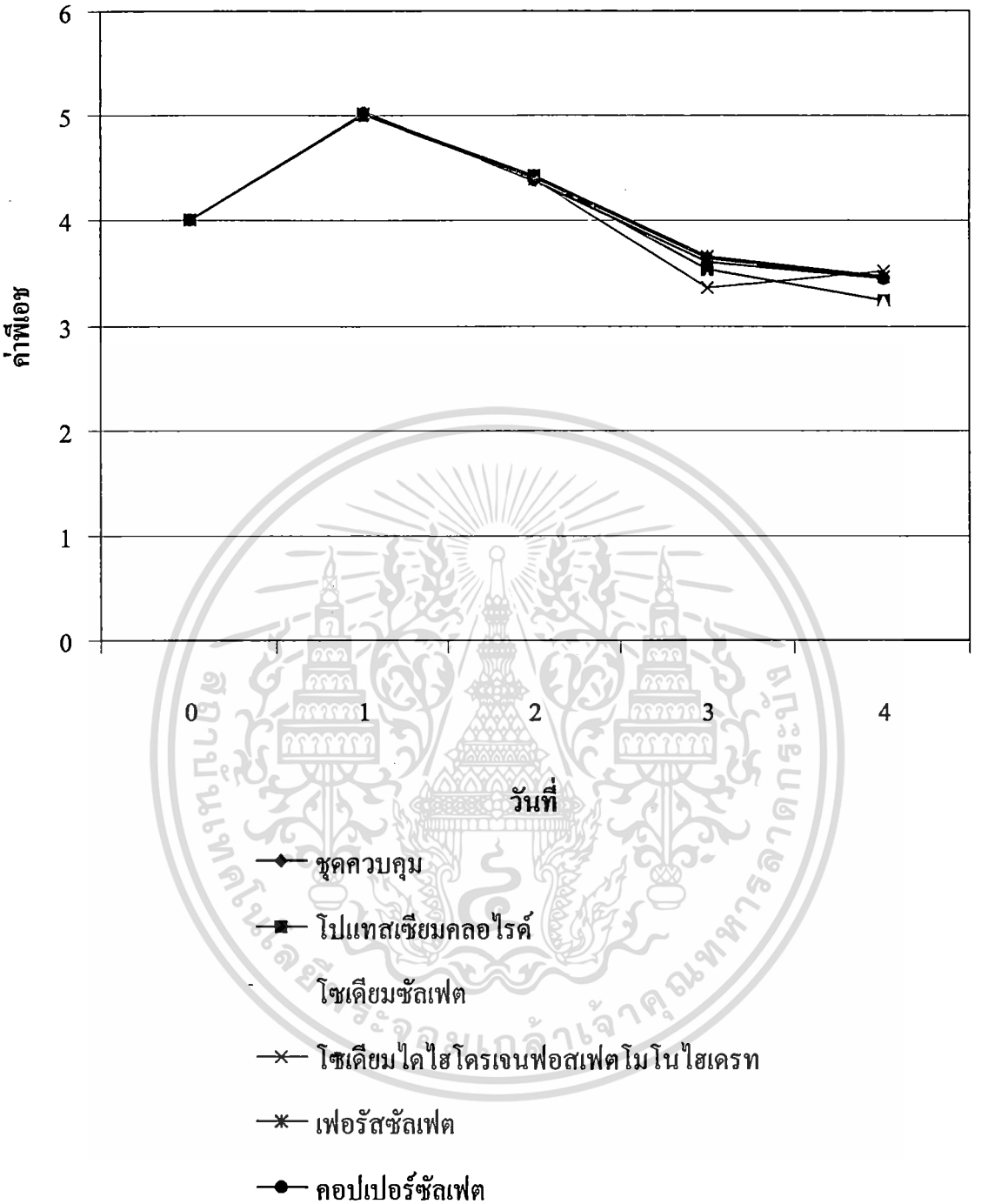
รูปที่ 23 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 24 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 25 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชเมื่อใช้แหล่งเกลือแร่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยทำการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน พบว่า ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส คือ รำข้าวสาลี เนื่องจากมีราคาต้นทุนต่อหน่วยต่ำที่สุดและให้ค่ากิจกรรมองเอนไซม์ที่ไม่แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ และยังพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส คือ คอร์น สตีป ลิเคอร์ ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด คือ ที่พีเอชเริ่มต้น 4.0 ส่วนผลของการใช้สารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จะพบว่า การไม่ใส่สารลดแรงตึงผิวจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่า การไม่ใส่แหล่งเกลือแร่จะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมแหล่งเกลือแร่ชนิดอื่นๆ โดยตลอดการทดลองทั้ง 4 วัน พบว่าทั้งแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น สารลดแรงตึงผิวและแหล่งเกลือแร่ จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง และจากการวัดค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ในวันที่ 1-4 นั้น ค่าพีเอชจะอยู่ในช่วง 3-7

ข้อเสนอแนะ

1. การเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสม ไม่ว่าจะเป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น สารลดแรงตึงผิว และแหล่งเกลือแร่ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะต้องคำนึงถึงค่าทางสถิติด้วย ซึ่งบางครั้งจะให้ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่แตกต่างกัน จึงควรเลือกใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่าเพื่อลดต้นทุนการผลิต

2. ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสยังมีจุลินทรีย์อีกมากมายที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้จึงน่าจะมีการศึกษาถึงเชื้ออื่น ๆ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. แหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสับสเตรทในประเทศไทยยังมีอีกมากมายที่ราคาถูกหาง่าย แต่ยังไม่นำมาทำการศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จึงน่าจะมีการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้อีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จันทิมา พัฒนไพจิตต์กุล.,สีหนาท.1999. โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รุ่งรัตน์ แซ่หย่าง.,ศศิพร โกมลเกษรักษ์.,อาริสา ตรีสัตยาเวทย์.1996.การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2542 ข้าว:วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.ภาควิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: หน้า25-26

Aidoo, KE., Mendry, R., Wood, JB. 1982. Solid substate fermentations. Adv. Appl. Microbiol. 28 : 201-237

Aunstrup, K. , Outtrup, H., Andersen, O., Dambmawn, C. 1972, Protease from alkaliophillic Bacillus species, Ferment Technol. Taday : 299-305

Battaglino, R.A., Huergo, M., Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. 1991. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. 35 :292-296.

Boing, J.T.P. 1982. Enzyme production. *In* Prescott and Dunn's Industrial Microbiology. (Reed, G., ed.) AVI. Connecticut.

Carrizales, V., Jaffe, W.1986. Solid state fermentation : an appropriate biotechnology for developing countries. Intersciencia 11 : 9-15

Chahal, D.S. 1985. Solid state fermentation with *Trichocerma reesei* for cellulase production. Appl. Environ. Microbiol. 49 :205-210.

Escobar, J. and Barnett, S. 1995. Synthesis of acid protease form *Mucor meihei :* integration of production and recovery. Process Biochem. 30 :695-700.

Farley, P.C. and Lkasari, L. 1992. Regulation of the secretion of *Rhizopus oligosporus* extracellular carboxyl proteinase. Gen. Microbiol. 138 :2539-2544.

Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C., Bafgori, M.D. and Sineriz, F. 1996. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29 isolation, production and characterization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45 :327-332.

Fukashima, Y., Itoh, H., Fukase, T. and Motai, H. 1991. Stimulation of protease production by

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspergillus oryzae with oil in continusous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 :586-590.

Gehartz, W. 1990. Enzymes in industry production and application. Weinheim VNH. p.88

Giesecke, U.E., Bierbaum, G., Rudde, H., Spohn, U., Wandrey, C. 1991. Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-bafch process. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35 :720-724.

Heineken, F.G., 0' Coner, R.J. 1972. Contimuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and α-amylase by *Bacillus subtilis* NRRI-B3411. J. Gen. Microbiol. 73 :35-44.

Hesseltine, C.W. , Secamurgo, R., and Rackis, J.J. 1963. A mold inhibitor in Soybeans Nature. Appl.Biol.200 : 1226-1227

Hessentine, C.w. 1987. Solid state fermentation an overview, int Biodeterior 23 :79-89

Horihoshi, K. 1971. Production of alkaline protease in low-cost medium by alkalosphillic Microspanism. Past I. Alkaline protease produced by Bacillus no.221. Agric. Biol. Chem. 35 : 1407-1414.

Kalisz, H.M. 1988. Microbial proteases. In Advances in Biochemical engineering and Biotechnology (Fiechter, A., ed.) Springer Verlag. Berlin Heidelberg. pp 1-65.

Lee, K.M., Lee, P.M., Siaw, Y.S. and Morihara, K. 1992. Effects of methanol and synthesis of aspartame precursor catalysed by *Psuedomonas aeruginosa* elastase Biotechnol. Letter. 14 : 779-784

Lee, K.M., Lee, P.M., Siaw, Y.S. and Morihara, K. 1993. Kinetics of Aspartame precursor synthesis catalysed by *Psuedomonas aeruginosa* elastase Journal of Chemical and Technical Biotechnology. 56 : 375-381

Nakanishi, T., Yammamoto, T. 1974. Acoran and Specificity of a Streptomyces alkalophilic Proterirase. Agric. Biol. Chem. 38 : 2391-2397

Puskas, A. and Elodi, Z. 1961. Examination of mold proteases, Budapesti Muszaki Egyest. Mezogaza. Kemi. Technol. Tausz. Kozleman. 26:31

Shinmyo, A., Okasaki, M. and Terui, G. 1968. Kinetics studies on enzyme production by microbes. IV. some physiological basis for kinetic studies on acid protease production by *Aspergillus niger*. J. Ferment. Technol. 46 :733-742.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singh, A., Ghosh, V.K. and Ghosh, P. 1994. Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. Letters in Appl. Microbiol. 18 :177-180.

Singh., A., Kuhad, R.C. and Saxena, R.K. 1990. Microbial enzymes and food industry. Microbiol. Today 1 :19-27.

Wang, H.L. and Hesseltine, C.W. 1965. Studies on the extracellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oligosporus*. 11: 727-732.

Wang, H. L. 1967 Release of protease from mycelium of *Mucor hiemalis*. J. Bacteriol. 93 : 1794 – 1799.

Walter, S. Oleniacz and Michael A. Pisano 1968 Proteinase Production by a Species of *Cephalosporium* ,App. Micro. 16(1) : 90 -96.

Ward, O.P. 1983. Proteinases. *In* Microbial enzymes and Biotechnology (Fogarty, W.M., ed.) Applied Science Publishers. London. pp. 251-317.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารวุ้นเอียง PDA (Potato dextrose agar)

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเด็กซ์โทรส (dextrose)	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

วิธีการ

ต้มมันฝรั่งในน้ำเดือด กรองด้วยผ้าขางบาง นำส่วนของเหลวที่ได้มาจากน้ำตาลเด็กซ์โทรส และผงวุ้น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 16x150 มิลลิเมตร หลอดละ 5มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ขณะที่วุ้นยังไม่แข็งให้นำหลอดมาวางเอียงไว้จนกระทั่งวุ้นแข็งตัวดี หรือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูป โดยนำมาละลายในน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่ได้ระบุไว้ที่ข้างภาชนะ คนให้ละลายแล้วบรรจุในหลอดฝาเกลียว ทำเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน

ประกอบด้วย

เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	3	กรัมต่อลิตร

วิธีการ

นำสารทั้ง 3 ตัวมาผสมให้เข้ากันโดยละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ตามที่ต้องการ จากนั้นนำไปปรับพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.0 (Singh และคณะ, 1994) แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 70 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์

ละลายเคซีน 1.0 กรัมในบัฟเฟอร์ 0.1 โมล พีเอช 4.0 ปริมาตร 50.0 ต้มด้วยไฟอ่อนจนเคซีนละลาย เมื่อสารละลายเย็น ปรับความเป็นกรดด่างตามต้องการ จากนั้นปรับปริมาตรทั้งหมดให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์และควรเก็บในตู้เย็น

2. สารละลายไตรคลอโรอะเซติกแอซิด (TCA) 5 เปอร์เซ็นต์

ละลาย TCA 5.0 กรัมในน้ำกลั่น คนจนละลายหมด ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3. สารละบายโซเดียมคาร์บอเนต 0.4 โมล

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 42.396 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. Folin-Ciocalteu reagent 2 นอร์มอล

นำ Folin-Ciocalteu reagent 2 นอร์มอล มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 สารนี้ควรเตรียมเมื่อใช้เท่านั้น

5. สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนไทโรซีน

ละลายไทโรซีน 0.01 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร สารละลายนี้มีความเข้มข้นของไทโรซีน 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6. ซิเตรท – ฟอสเฟต บัฟเฟอร์

A : 0.1 โมล/ลิตร กรดซิตริก (ละลายกรดซิตริก 21.01 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.2 โมลต่อลิตร ไดเบสิกฟอเฟต (ละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ ละลาย $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

การเตรียมซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ สามารถเตรียมให้ได้พีเอชที่ต้องการโดยใช้อัตราส่วน A:B ดังตารางภาคผนวกที่1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางรางภาคผนวกที่ 1 แสดงการเตรียมซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์

ผสม X มิลลิลิตร(ของสารละลายA)กับ Y มิลลิลิตร (ของสารละลาย B) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร		
X มิลลิลิตร	Y มิลลิลิตร	พีเอช
44.6	5.4	2.6
42.2	7.8	2.8
39.8	10.2	3.0
37.7	12.3	3.2
35.9	14.1	3.4
33.9	16.1	3.6
32.3	17.7	3.8
30.7	19.3	4.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

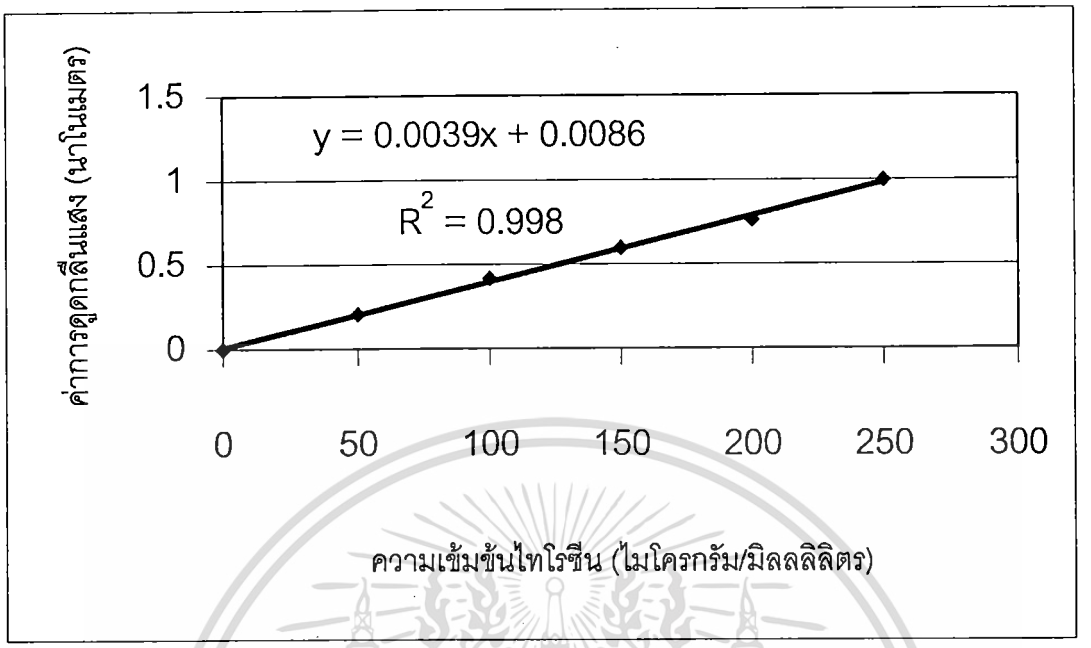
วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและกราฟมาตรฐาน

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสนี้ได้ทำการดัดแปลงวิธีการของWang และ Hessentine (1965) โดยมีวิธีการดังนี้

1. นำสารละลายเอนไซม์โปรติเอส 1 มิลลิลิตร รวมกับ 1 มิลลิลิตรของสารละลายเคซีน (พีเอช 4.0) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 15 นาที
2. จากนั้นนำไปหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมไตรคลอโรอะซิติกแอซิด 5 เปอร์เซ็นต์ 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
3. กรองนำส่วนใส 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.4 โมลต่อลิตร เติม Folin-Ciocalteu reagent 1 หรือ 2 นอร์มอล 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน
5. ทำหลอดควบคุม โดยเติมสารละลาย TCA 3.0 มิลลิลิตรก่อน จากนั้นเติมสารละลายเคซีน 1.0 มิลลิลิตร สำหรับแบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์
6. ทำกราฟมาตรฐานกรดอะมิโนไทโรซีน โดยใช้สารละลายไทโรซีน 0 , 20 , 40 , 60 , 80 และ100 ไมโครกรัมต่อลิตร นำสารละลายความเข้มข้นต่างๆมา 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3-4 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของไทโรซีน ดังรูปที่ 22
7. การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์} \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจาง} \times \text{ค่าการดูดกลืนแสง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐานไทโรซีน} \times \text{ระยะเวลาบ่ม}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผนวกที่1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การตรวจนับสปอร์ของเชื้อราโดยใช้ Haemacytometer (Improveed Neubrauer)

วิธีการตรวจนับสปอร์ของเชื้อรา

1. เตรียมตัวอย่างที่จะตรวจนับ ถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมานับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ทำละลายในน้ำกลั่นในปริมาตรที่ต้องการก่อน เช่น ชั่งตัวอย่าง 1 กรัมละลายในน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลิลิตร(จะได้ความเจือจางเป็น 1:10) หรืออาจต้องทำเจือจางมากขึ้นในกรณีที่มีสปอร์จำนวนมาก เช่น เจือจาง 1:100 หรือ 1:1000เท่า เป็นต้น

2. ปิเปตตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงใน Haemacytometer (ที่ปิดด้วย cover slip) โดยใช้ pasteur pipette ดูดตัวอย่างมา 1-2 หยด หยดลงด้านข้างของแผ่นcover slip

3. ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัว objective กำลังขยาย 40 เท่า

4. นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก หรือนับช่องใหญ่ให้ค่าเฉลี่ย และนำมาคูณด้วย 4×10^6 จะได้เป็นปริมาณสปอร์ต่อกรัม หรือมิลลิลิตร

วิธีคำนวณค่า 4×10^6

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในตารางใหญ่ มีค่า = 0.05×0.05 = 0.0025 ตารางมิลลิเมตร

ความลึกระหว่าง cover slip และตาราง = 0.1 มิลลิเมตร

ดังนั้นปริมาตร 1 ช่องเล็กจะมีค่า = 0.0025×0.1 = 0.00025 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ปริมาตร 0.00025 ลบ.ซม. จะมีจุลินทรีย์ Z สปอร์

ปริมาตร 1 ลบ.ซม. จะมีจุลินทรีย์ $Z \times 1000 / 0.00025$ สปอร์

$= Z \times 4 \times 10^6$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์แบบ DUNCAN

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

แหล่งคาร์บอน	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิต/มิลลิลิตร)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
รำข้าวสาลี	8.189[a]	9.139[a]	9.249[a]	8.290[a]
จมูกข้าวสาลี	8.189[a]	9.346[a]	9.215[a]	8.321[a]
รำข้าวเจ้า	8.282[a]	9.490[a]	8.410[a]	7.854[a]

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

ความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน (เปอร์เซ็นต์)	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	
	วันที่ 3	วันที่ 4
0	4.400[a]	4.680[a]
3	8.266[b]	8.223[b]
6	18.515[c]	17.226[c]
9	26.844[d]	27.124[d]
12	36.178[e]	37.080[e]
15	39.963[f]	44.913[g]
18	46.372[hg]	49.084[h]

*** ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรแบบเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	
	วันที่ 3	วันที่ 4
ยูเรีย	20.753 [a]	20.753 [a]
เคซีน	42.116 [bc]	48.220 [bc]
บีฟ แอคแทรก	45.693 [bc]	43.286 [bc]
คอร์น สตีป ลิเคอร์	45.710 [bc]	45.948 [bc]
แอมโมเนียมซัลเฟต	37.538 [b]	39.572 [bc]
โพแทสเซียมไนเตรท	41.285 [bc]	45.253 [bc]
ชุดควบคุม	41.537 [bc]	51.135 [c]

ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	
	วันที่ 3	วันที่ 4
0	30.112 [a]	28.891 [a]
1	35.961 [cb]	32.231 [ab]
2	39.674 [cd]	29.959 [a]
3	43.015 [de]	45.626 [de]
4	45.219 [de]	42.523 [de]
5	45.897 [e]	47.185 [e]

* ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรแบบเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

พีเอชเริ่มต้น	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	
	วันที่ 3	วันที่ 4
3	52.391[a]	41.370[b]
4	51.098[a]	56.015[a]
5	51.034[a]	38.063[b]
6	54.362[a]	53.132[a]

ตารางภาคผนวกที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวแตกต่างกัน

ชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	
	วันที่ 3	วันที่ 4
Control	43.150[c]	44.393[abc]
SDS 0.05%	38.847[abc]	33.146[ac]
SDS 0.1%	39.822[abc]	34.905[ab]
Tween80 0.1%	41.009[bc]	39.801[abc]
Tween80 0.2%	41.094[bc]	43.107[c]

* ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรแบบเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้แหล่งเกลือแร่แตกต่างกัน

แหล่งเกลือแร่	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	
	วันที่ 3	วันที่ 4
Control	50.949[a]	52.094[a]
KCl	45.651[a]	40.967[a]
$NaSO_4$	44.570[a]	42.451[a]
$NaH_2PO_4.H_2O$	48.570[a]	55.887[a]
$FeSO_4.7H_2O$	47.834[a]	52.517[a]
$CuSo_4.5H_2O$	45.312[a]	50.652[a]

* ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรแบบเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้