สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส
โดย Aspergillus oryzaeATCC 3088 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว

โดย นางสาว จันทิมา พัฒนไพจิตต์กุล รหัส 39054308
นาย สีหนาท ประสงค์สุข รหัส 39054354

T035865

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2542

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 35865
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2543

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Optimization of protease production By Aspergillus oryzae ATCC 3088 in the submerged culture fermentation

Name	Miss Junthima	Phatthanaphaijitkul	39054308
	Mr. Sehanat	Prasongsuk	39054354

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
For Degree Bachelor of Science Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut Institute of Technology Ladkrabang
Academic year 1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดย Aspergillus oryzae ATCC 3088 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว

โดย นางสาว จันทิมา พัฒนไพจิตต์กุล รหัส 39054308
นาย สีหนาท ประสงค์สุข รหัส 39054354

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

..... หัวหน้าภาควิชา
(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต)
คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ
(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต)

..... กรรมการ
(ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์)

..... กรรมการ
(อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดย Aspergillus oryzae ATCC 3088 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว

โดย นางสาว จันทิมา พัฒนไพจิตต์กุล รหัส 39054308

นาย สีหนาท ประสงค์สุข รหัส 39054354

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์

ปีการศึกษา 2542

.....

บทคัดย่อ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ Aspergillus oryzae ATCC 3088 โดยใช้รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และจมูกข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ความเข้มข้นของจมูกข้าวสาลี 2 เปอร์เซ็นต์จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด คือ 0.845 ยูนิต/มิลลิลิตร และการทดสอบแหล่งไนโตรเจน โดยใช้อาหาร 2 ชนิด คือ เคซีน และเคซีนร่วมกับยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.6, 0.8,1.0,1.2 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เคซีนร่วมกับยีสต์สกัดความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 1.22 ยูนิต/มิลลิลิตร และเมื่อทำการทดสอบพีเอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7 พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 0.907 ยูนิต/มิลลิลิตร เมื่อทำการศึกษาแหล่งเกลือแร่โดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ เชื้อจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 1.001 ยูนิต/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project title	Optimization of protease production by Aspergillus oryzae ATCC3088 in the submerged culture fermentation		
Name	Miss Junthima	Phatthanaphaijitkul	39054308
	Mr. Sehanat	Prasongsuk	39054354
Special Project Advisor	Assist.Prof. Aree	Rittiboon	
Department	Applied Biology		
Academic	1999		

.....

Abstract

From the study of optimization of protease production by Aspergillus oryzae ATCC 3088 by using rice bran , wheat bran and wheat germ as carbon sources varying at 1,2 and 3 percent, found that the concentration of 2 percent wheat germ gave a peak activity of 0.845 unit/ml when testing at the concentration of the 2 kinds of nitrogen sources (casein and casein plug yeast extract using 0.6,0.8,1.0,1.2 and 1.5 percent) , a peak activity of 1.22 unit/ml was obtained when using casein plus yeast extract at 1.5 percent. For the factor of pH (3,4,5,6 and 7) it was found that pH 4 gave good results for fungal growth and activity (0.907 unit/ml) Finally, mineral source $MgSO_4$ $7H_2O$ at 0.3,0.4,0.5 and 0.6percent, the fungus a peak activity 1.001 unit/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัย การทำวิจัย การเขียนโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์และการให้คำปรึกษาทุกๆปัญหาทุกๆอย่างตลอดการวิจัย

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต และอาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ คณะกรรมการโครงงานพิเศษที่ได้ช่วยทำการตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ด้วยความเคารพยิ่ง ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ ที่ได้ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือ รวมทั้งเป็นกำลังใจในการทำการศึกษาวิจัยมาโดยตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

จันทิมา พัฒนไพจิตต์กุล
สีหนาท ประสงค์สุข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	2
1. ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์โปรติเอส	2
2. ประเภทของเอนไซม์โปรติเอส	3
3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส	6
4. ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส	11
5. จุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส	12
6. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์	16
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และขั้นตอนดำเนินงาน	20
วัสดุ	20
อุปกรณ์	20
ขั้นตอนดำเนินงาน	21
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	27
ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากเชื้อ Aspergillus oryzae 3088	27
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	48
ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ	48
ข. สารเคมีและการเตรียมสารเคมี	49
ค. วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและกราฟมาตรฐาน	51
ง. การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์	3
2	ลักษณะโครงสร้างของกรดอะมิโนชนิดแอล (L-amino acid) และกรดอะมิโนชนิดดี(D-amino acid)	4
3	ปฏิกิริยาการทำเคมิคัลโมดิฟิเคชันของปาเปนด้วยไดโบรโมอะซิโตน	10
4	ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนอิสระกับนินไฮเดรต	11
5	ลักษณะของเชื้อ Aspergillus oryzae 3088 ในอาหาร PDA slant	23
6	ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ	24
7	ลักษณะของเครื่องเขย่า(shaker)	25
8	ลักษณะของเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง(spectrophotometer)	26
9	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้แหล่งคาร์บอนคือรำข้าวเจ้า	30
10	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้แหล่งคาร์บอนคือรำข้าวสาลี	31
11	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้แหล่งคาร์บอนคือจมูกข้าวสาลี	32
12	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่มีแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน	33 34
13	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ค่าพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกันเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน	35
14	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน	36
15	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนคือรำข้าวเจ้าแตกต่างกัน	37
16	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนคือรำข้าวสาลีแตกต่างกัน	38
17	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนคือจมูกข้าวสาลีแตกต่างกัน	39
18	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนคือเคซีนแตกต่างกัน	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
19	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนคือเคซีนและยีสต์สกัดแตกต่างกัน	40
20	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน	41
21	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่แตกต่างกัน	42
รูปผนวกที่		
1	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อ R_1 และ R_2	3
2	สมบัติและแหล่งของเอนไซม์โปรติเอส	6
3	ลำดับกรดอะมิโนรอบกรดอะมิโนจำเป็น (รอบซีสเตอีนและฮีสติดีน)	8
4	เอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆที่ผลิตโดยจุลินทรีย์	15
5	องค์ประกอบของรำข้าวเจ้า	17
6	องค์ประกอบของรำข้าวสาลี	17
7	องค์ประกอบของจมูกข้าวสาลี	17
ตารงภาคผนวกที่		
1	การเตรียมซิเตรต- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	50
2	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน	53
3	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	53
4	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน	54
5	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้ความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่แตกต่างกัน	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

โปรติเอสเป็นเอนไซม์กลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญที่มีการผลิตในทางการค้า (Singh และคณะ, 1990) มีการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก เป็นต้น (Ward, 1983; Lalisz, 1988) เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสำคัญในการทำลายโมเลกุลของโปรตีนโดยการไฮโดรไลซิส(hydrolysis)พันธะเปปไทด์(peptide bond) (Singh และคณะ, 1994)

เอนไซม์โปรติเอสมีหลายชนิด ซึ่งสามารถแบ่งตามกลไกการทำงานได้ 4 กลุ่ม คือ เซอรีน-โปรติเอส (serine protease) ซีสเตอีนโปรติเอส (cysteien protease) เมทัลโลโปรติเอส (mettallo protease) และ แอซิดโปรติเอส (acid protease) ผลสุดท้ายของการย่อยจะได้กรดอะมิโน โดยจัดเป็นไฮโดรไลติกเอนไซม์ซึ่งไฮโดรไลติกเอนไซม์ คือ เอนไซม์ที่กระตุ้นให้สับสเตรทรวมกับน้ำแล้วทำให้อณูของสับสเตรทนั้นสลายออกไป เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสขึ้น (Battaqlino และคณะ, 1991)

อุตสาหกรรมทั่วไปในประเทศไทยส่วนใหญ่มีการนำเข้าเอนไซม์ และผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต (protien hydrolysate) เพราะฉะนั้นถือเป็นสิ่งสำคัญในการพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตโปรติโอไลติกเอนไซม์(proteolytic enzyme) เพื่อให้คุ้มค่า และเหมาะสมทางด้านเศรษฐกิจ และเพื่อศึกษาคุณสมบัติและการนำไปใช้ประโยชน์ (Singh และคณะ, 1994)

การผลิตเอนไซม์โดยทั่วไป แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตคิดเป็นประมาณร้อยละ 50 ของต้นทุนทั้งหมด (Chahal, 1985) ได้มีความพยายามที่จะหาวัตถุดิบราคาถูกมาใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เช่น รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และจมูกข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส (Battaqlino และคณะ, 1991) และแต่ละประเทศจะมีวัตถุดิบราคาถูกที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ และใช้สายพันธุ์เชื้อราที่เก็บรักษาเป็นเชื้อพันธุ์ในประเทศที่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเชื้อรา Aspergillus oryzae 3088 ที่จะใช้ในการศึกษา
2.ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากสายพันธุ์เชื้อรา Aspergillus oryzae 3088 โดยการเพาะเลี้ยงในรำข้าวเจ้า รำข้าวสาลีและจมูกข้าวสาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เลือกเชื้อรา Aspergillus oryzae 3088 ที่เก็บรักษาที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ได้นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเชื้อรา จากนั้นจึงนำเชื้อรามาเลี้ยงในวัตถุดิบที่มีราคาถูก โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากผลของแหล่งและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ผลของพีเอชเริ่มต้นและผลของแหล่งเกลือแร่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.เพื่อให้ทราบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วๆไปของเชื้อที่จะใช้ในการศึกษา

2.เลือกใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีค่าและสามารถลดต้นทุนในการผลิตได้

3.สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นแนวทางในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

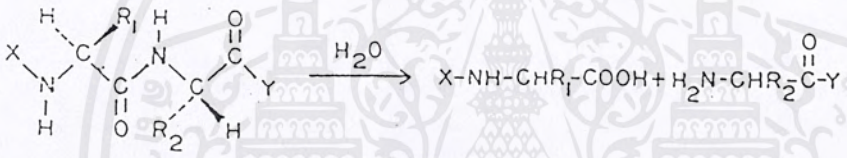
บทที่2

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสมีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เปปทิเดส โปรติเอส โปรติเนส เปปไทด์ไฮโดร-เลส และเอนไซม์โปรติโอไลติค มีลักษณะปฏิกริยา ดังนี้คือ สลายพันธะเปปไทด์ (-CO-NH) ด้วยน้ำ ดังรูปที่ 1

การเกิดปฏิกิริยาสามารถอธิบายได้ดังนี้



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ (Singh และคณะ, 1994)

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 ดังนั้น ถ้าโปรติเอสตัวใดมีความจำเพาะต่อ R_1 แสดงว่าเอนไซม์นั้นเข้าตัดพันธะเปปไทด์ โดยเข้าทางปลายอะมิโน (N – terminal) โดยที่ R_1 นั้นจะเป็นอะไรก็ได้ ดังแสดงในตารางที่ 1 และในกรณีที่โปรติเอสมีความจำเพาะต่อ R_2 ก็แสดงว่าเอนไซม์นั้นเข้าตัดพันธะเปปไทด์ในโปรตีน โดยเข้าทางปลายคาร์บอกซิล (C – terminal)

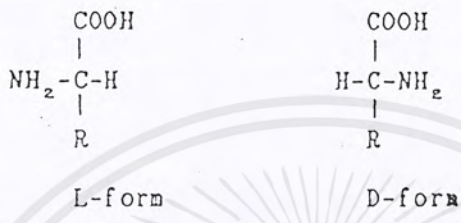
ตารางที่ 1 ตัวอย่างเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อ R_1 และ R_2 (Farley, 1992)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Try = Tryptophan phe = phenylalanine Lys = Lysine Arg = Arginine

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



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของ กรดอะมิโนชนิดแอลและกรดอะมิโนชนิดดี(Farley, 1992)

1.3 ขนาดของสารประกอบ ที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอส โดยทั่วไปไม่มีความจำเพาะต่อขนาดของสับสเตรท ยกเว้นโปรติเอสที่เป็นกรด (acid protease) ที่มีความจำเพาะต่อขนาดของสับสเตรท ตามรูปที่ 1 แสดงสับสเตรทของแอลฟาไคโมทริปซิน(α- chymotrypsin) และทริป-ซิน(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 และ หมู่ Y เปลี่ยนไป จะมีผลทำให้ความจำเพาะของเอนไซม์เปลี่ยนไป กล่าวคือ เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อหมู่ X และ Y จะบ่งชี้ลักษณะการตัดสายของโพลีเปปไทด์ คือ

1.4.1 เอนโดเปปติเดส(endopeptidase) เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระ (rancleanly) ภายในสายโปรตีน ทั้งนี้ต้องให้จำเพาะโดยตรงต่อ R_1 และ R_2 ด้วยจึงจะตัดพันธะเปปไทด์ได้ ถ้า R_1 และ R_2 ไม่สอดคล้องกับความจำเพาะของเอนไซม์นั้น การตัดพันธะเปปไทด์จะไม่เกิดขึ้น และจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์(activity)สูงสุด ถ้า X และ Y เป็นหมู่อนุพันธ์ไม่ใช่ 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 residuse)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 เปปติโดอะมิโนแอซิดไฮโดรเลส(peptido amino acid hydrolase) ลักษณะที่สำคัญมีดังนี้คือ มีความเจาะจงสับสเตรทที่มี R_2 และ $Y = OH^-$ และ $X =$ อะไรก็ได้ คือ H^+ หรืออนุพันธ์ และจะตัดพันธะเปปไทด์โดยเข้าจากปลายคาร์บอกซิล ($Y = OH^-$) 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 ($X = H^+$) ไปเรื่อย ๆ ตามความเจาะจง R_1 เพื่อให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด พบว่า Y ไม่ควรเป็น OH^- แต่ควรจะเป็นอนุพันธ์อื่น ๆ 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 สามารถตัดพันธะเปปไทด์ ได้ทั้งในสับสเตรทที่เป็นไดเปปไทด์ (dipeptide)(A–A) และไตรเปปไทด์(tripeptide) (A-A-A)[A=amino acid]

1.4.2.4 ไตรเปปติเดส(tripeptidase)มีความจำเพาะเจาะจงเหมือนไดเปปติเดส แต่การย่อยสลายพันธะเปปไทด์จะเกิดในสับสเตรทที่เป็นไตรเปปไทด์เท่านั้น

1.5 ความต้องการพันธะเปปไทด์ เอนไซม์โปรติเอสส่วนใหญ่จะย่อยสลายพันธะอื่น ๆ ที่มาแทนพันธะเปปไทด์ได้ดีกว่าพันธะเปปไทด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธะเปปไทด์ที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่ต่าง ๆ เช่น หมู่เอไมด์ ($-NH_2$) เอสเทอร์ (-COOR) ไทโอเอสเตอร์ (-COSR) หรือไฮดรอกซีซาเมท (-CONHOH) แสดงว่า เอนไซม์เหล่านี้มีความจำเพาะต่ออนุมูล R_1 มากกว่า R_2 นั้น พบว่าถ้าพันธะเปปไทด์ ถูกแทนที่ด้วยพันธะอื่น ๆดังกล่าวมาแล้ว สับสเตรทนั้นก็จะไม่เป็นสับสเตรทของเปปซิน (pepsin)และแอซิดโปรติเอส มีรายงานว่าไคโมทริปซินสามารถเร่งปฏิกริยาการย่อยสลายพันธะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปปไทด์ได้เป็น 200 – 1000 เท่า ถ้าพันธะเอไมด์ในแอลฟาเอนอะเซติล – แอล – ไทโรซินาไมด์ (α - N – acetyl – L – tyrosinamide) เปลี่ยนเป็นพันธะจากหมู่เอสเทอร์ (- COOR)

2. ประเภทของเอนไซม์โปรติเอส

ถ้าแบ่งเอนไซม์โปรติเอสตามค่าพีเอชสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ แอซิดโปรติเอส (acid protease) นิวทรอลโปรติเอส (neutral protease) อัลคาไลน์โปรติเอส(alkaline protease) ซึ่งสามารถแสดงถึงสมบัติและแหล่งของเอนไซม์โปรติเอสทั้ง 3 กลุ่มได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สมบัติและแหล่งของเอนไซม์โปรติเอส (Escobar และ Barnett, 1995)

Type	Source	Properties	PHRange		Mol.Wt. (approx.)	Inhibitor
			Max Activity	Max Stability		
Acid protease (Carboxypeptidase)	Fungi	Pepsin-like Rennin-like (Milk-clotting)	2-5	2-6	35000	DAN[a]
Neutral protease (Metalloprotease)	Bacteria Fungi	Zinc containingstabilize by Ca^{2+}	7-8	7-9	45000	EDTA[b]
Alkaline protease	Bacteria Fungi	Trypsin-lierin serine rescue At the active center	9-11(12)	5-10(12)	27500 (17000)	PMSF[c] DFP[d]

(a) diazoacetylnorleucinemethyleste

(b) ethylenediaminetetraacetic acid

(c) phenylmethanesulfonylfluoride

(d) diisopropylphosphofluoridate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าแบ่งตามกลไกการทำงาน สามารถแบ่งเอนไซม์โปรติเอสได้ 4 กลุ่ม คือ

2.1 เซอรีนโปรติเอส (อัลคาไลน์โปรติเอส พีเอช 6.7-9) 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) ซึ่งทำปฏิกริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (OH)ของอนุมูลเซริล (seryl residue) ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ มีอนุมูลเซริลอยู่ที่บริเวณเร่ง เอนไซม์ที่อยู่ที่บริเวณเร่งที่ไม่ใช่โปรติเอสก็มี เช่น ฟอสโฟกลูโคมิวเตส(phosphoglucomutase) อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkalinephosphatase) เป็นต้น

2. มีหมู่ อิมิดาโซล (imidazole group) อยู่ที่บริเวณเร่ง

3. เอนไซม์ทั้งหมดเป็นพวกเอนโดเปปติเดส

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

5.โดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่อนุมูลกรดอะมิโนเป็นR_1

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

6.1 ตับอ่อนของควาย (bovine pancreas) ผลิตโปรตีนหรือไซโมเจน(zymogen)

6.2 ตับอ่อนของหมู (porcine pancrease) ผลิตไคโมทริปซิโนเจน เอ บี และ ซี

2.2 ซัลไฟดริลโปรติเอส (sulfydrylprotease, - SH group) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน และจะถูกยับยั้งโดยสารที่เรียกว่า ซัลไฟดริลรีเอเจนท์ (sulfydryl reagent) ซัลไฟดริลกรุ๊ป (sulfydryl group) หรือกลุ่มไธออล (thiol group) ทำให้หมู่อนุมูลซัลไฟดริล (sulfydryl residue) ที่บริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือน อาจสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไปในที่สุด จึงเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า ซัลไฟดริลโปรติเอส เอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากพืชชั้นสูง และจุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ ปาเปน (papain) จากมะละกอ ฟิซิน (ficin) จากมะเดื่อ โบรมิเลน (bromilain) จากสับปะรดและโปรติเอสจาก Streptococcus sp.(Streptococcus protease)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด แตกต่างกันตามลำดับกรดอะมิโนรอบอนุมูลกรดอะมิโนจำเป็นในบริเวณเร่ง คือ ซิสเตอีน(cysteiene)และฮิสติดีน(histedine) ดังแสดงในตารางที่ 3

สมบัติของซัลไฟดริลโปรติเอส

1. เป็นนิวทรอลโปรติเอส (neutral protease) มี พีเอช ที่เหมาะสมอยู่ที่ พีเอช 6-7.5
2. ถูกยับยั้งด้วยซัลไฟดริลเอเจนท์ (sulfydryl agent) หรืออีกนัยหนึ่งมีกลุ่มซัลไฟดริล (–SH) ในบริเวณเร่ง
3. เป็นเอนโดเปปติเดส
4. ปาเปนและฟีซินจะไฮโดรไลซ์สับสเตรทที่มีแอล – อาร์จินิน (L-arginine)แอล – ไลซีน (L-lysine) ไกลซีน (glycine) และ แอล-ซิตรูลิน (L-citrulline) ด้วยประสิทธิภาพเท่ากัน แต่ประจุบวกในอนุมูลอาร์จินินและไลซีนไม่จำเป็นต้องเชื่อมที่บริเวณเร่งของเอนไซม์เพราะสับเสตรทที่มีอนุมูลไกลซีน และซิตรูลินสามารถเชื่อมกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้อย่างแน่นพอดีอยู่แล้ว

ตารางที่ 3 แสดงลำดับกรดอะมิโนรอบอนุมูลกรดอะมิโนจำเป็น (รอบซีสเตอีนและฮีสติดีน) ในบริเวณเร่งของซัลไฟดริลโปรติเอส (Singh และคณะ, 1994)

ชนิดของซัลไฟดริลโปรติเอส	ลำดับกรดอะมิโน
โบรมิเลน, steam	-Asn-Gln-Asp-Pro-Cys-Gly-Ala-Cys*-Trp-
ปาเปน	-Pro-Val-Lys-Asn-Gln-Gly-Ser-Cys-Gly-Ser-Cys*-Trp-
ฟีซิน	-Pro- Ile-Arg-Gln-Gln-Gly-Gln-Cys-Gly-Ser-Cys*-Trp-
โปรติเอส, Streptococcal	-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys*- Val-
โบรมิเลน, steam	-His*-Ala-Val-Thr-Ala- Ile-Gly-Tyr-
ปาเปน	-Val-Gly-Pro-Cys-Gly-Asn-Lys-Val-Asp-His*-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Gly-Tyr-
ฟีซิน	-Thr-Gly-Pro-Cys-Gly-Thr-Ser-Leu-Asp-His*-Ala-Val-Ala-Leu-
โปรติเอส, Streptococcal	-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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ปาเปนเป็นซัลไฟดริลโปรติเอส ที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ประกอบด้วยกรดอะมิโน 212 กรดอะมิโนและมีมวลโมเลกุล 23,900 ที่บริเวณเร่งมีอนุมูลซิสเต-อีน ฮิสติดีน (histidine) หรือ แอสปาราจีน ลักษณะที่สำคัญของปาเปน คือ

5.1 กลุ่มซัลไฟดริลมีบทบาทสำคัญต่อบริเวณเร่ง ดังนี้

5.1.1 เอนไซม์สูญเสียกิจกรรม เมื่อหมู่ซัลไฟดริลเปลี่ยนแปลง

5.1.2 ผลจากสเปกโตรโฟโตเมทรี (spectrophotometry) พบว่า เอซิลเอนไซม์อิน-เตอร์มิเดียท (acyl enzyme intermediate) เป็นไฮโดรเลสเตอร์หรืออีกนัยหนึ่งคือ มีกลุ่มซัลไฟดริล (–SH) ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์

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

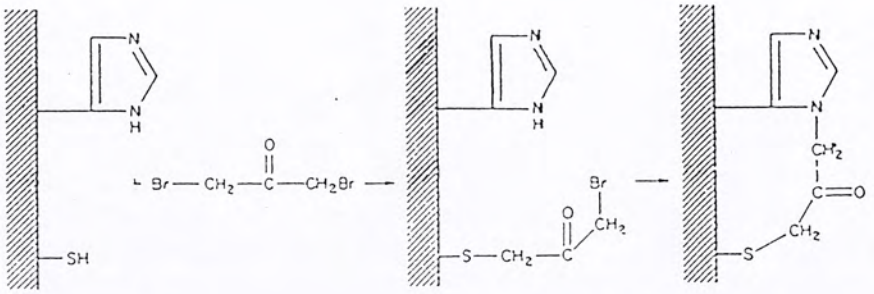
5.2 คาร์โนซิเนส (amino – acyl – L – histidine hydrolase) ย่อยสลายสับสเตรทพวก เบ-ต้าอะลานิล(β-alanine)แอลฮิสติดีน(L-histidine) เป็นพวกไดเปปติเดส ต้องการ Zn^{2+} โครงร่าง 3 มิติในระหว่างการเชื่อมจับกับโมเลกุลของสับสเตรท ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

5.2.1 วิเคราะห์ค่า pK = 4 และค่าความแตกต่างของไฮโดรเจนไอออนเท่ากับ 0 กิโลแคลรี/โมล แสดงว่าควรเป็นหมู่คาร์บอกซิล

5.2.2 พิจารณาจากผลการทดลองด้านเอกซ์เรย์ดิฟแฟรคชั่น (X-ray diffraction) พบว่า หมู่คาร์บอกซิลที่ใกล้ที่สุด (แอสปาราจีน 152) จะห่างจากหมู่ซัลไฟดริล (ซิสเตดีน) ประมาณ 7.5 อังสตรอม ระยะห่างดังกล่าวอาจจะยาวเกินไปที่จะทำหน้าที่ร่วมกับซิสเตอีน ส่วนหมู่อิมิดาโซล (อิสติดีน 159) ห่างจากหมู่ซัลไฟดริล ประมาณ 4.5 อังสตรอม ดังนั้น อิสติดีน 159 ควรเป็นกลุ่มที่มีบทบาทร่วมกับซิสเตอีนได้มากกว่า แอสปาราจีน 158 เพราะระยะต่างกันถึง 3 อังสตรอม (7.5 – 4.5 = 3 A°) เว้นไว้แต่ว่ามีการเปลี่ยนบริเวณเร่งที่เกาะกับสับสเตรท

5.2.3 พิจารณาผลการทำเคมิคัลโมดิฟิเคชั่น (chemical modification) ของเอนไซม์ใช้ไบฟังก์ชันนอล -เอเจนท์ (bifunctional agent) ซึ่งมีอยู่ 2 หมู่ทำหน้าที่เดียวกันได้แก่ ไดโบรโมอะซิโตน (dibromoacetone) ดังรูปที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 ปฏิกิริยาการทำเคมิคัลโมดิฟีเคชันของปาเปนด้วยไดโบรโมอะซิโตน (Shimyo และคณะ,1968)

2.3 เมทัลคอนเทนนิ่งโปรติเอส

หมายถึง โปรติเอสที่มีอิออนของโลหะรวมในโมเลกุลของเอนไซม์ หรือร่วมในปฏิกริยาการย่อยสลาย กล่าวคืออยู่ในลักษณะของโคแฟคเตอร์ (cofactor) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ คือ

1. คาร์บอกซิเปปติเดส เอ (peptidyl L-amino acid hydrolase) คาร์บอกซิเปปติเดส บี (เปปติดิลแอลไลซีนไฮโดรเลส) เป็นเอกโซเปปติเดสตัดสายด้านปลายหมู่คาร์บอกซิล ต้องการอิออนของโลหะ คือ Zn^{2+}

2. ไกลซิล – ไกลซีน ไดเปปติเดส (เป็นเอนไซม์จากกล้ามเนื้อหนู ต้องการ Zn^{2+} เป็นโคแฟคเตอร์)

3. ลิวซิวอะมิโนเปปติเดส (L – leucyl – peptide hydrolase) ต้องการ Zn^{2+} เป็นพวกอะมิโนเอซิลเปปไทด์ไฮโดรเลส ได้ผลผลิตเป็นแอลลิวซีน(L-leucine)

4. โปรติเอส (amino – acyl – L – proline hydrolase) เป็นไดเปปติเดส ซึ่งไฮโดรไลซ์ไดเปปไทด์ซึ่งมีโปรลีน (proline) หรือ ไฮดรอกซีโปรลีน (hydroxyproline) ต้องการ Mn^{2+} ได้ผลผลิตที่มีอนุมูลของปลายคาร์บอกซิล

5. อะมิโนไดเปปติเดส (L – prolyl – amino acid hydrolase) เป็นไดเปปติเดส ซึ่งไฮโดรไลซ์ไดเปปไทด์ มีโปรลีนหรือไฮดรอกซีโปรลีน ต้องการ Mn^{2+} เหมือนโปรติเอส แต่มีความจำเพาะต่างกัน ผลผลิตที่ได้เป็นอนุมูลของปลายอะมิโน

สมบัติทั่วไปของเมทัลคอนเทนนิ่งโปรติเอส

1. เป็นเอกโซเปปติเดสเกือบทั้งหมด

2. เป็นเอนไซม์ที่มีช่วงการทำปฏิกริยาที่พีเอช เป็นกลาง (พีเอช 6.5-7.5)

3. เนื่องจากมีอิออนของโลหะร่วมในปฏิกริยาอาจถูกยับยั้งด้วยสารจับอิออนของโลหะ (metal – chelating agents) เช่น 1, 10 – ฟีแนนโทรลีน(1,10-phenanthroline), ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มเมทัลคอนเทนนิ่งโปรติเอสได้แก่

คาร์บอกซิเปปติเดส เอ, บี (carboxypeptidase A,B) แหล่งที่พบคือตับอ่อน (pancreas) จะผลิตโปรคาร์บอกซิเปปติเดส (procarboxypepidase)ซึ่งมีมวลโมเลกุล 80,000 ประกอบด้วยโพลิเปป-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไทด์ (polypeptide) 8 สาย ซึ่งสารโปรเอนไซม์ (proenzyme) นี้จะถูกกระตุ้นด้วยทริปซินทำให้เกิดเป็นคาร์บอกซิเปปติเดส เอ มีมวลโมเลกุลเหลืองเพียง 84,500 นอกจากนั้นแล้วในตับอ่อนยังผลิตโปรเอนไซม์อื่นที่เปลี่ยนเป็นคาร์บอกซิเปปติเดส บี โดยทั้ง เอ และ บี มีกลไกปฏิกริยาคล้ายกัน

2.4 แอซิดโปรติเอส (Acid protease) หมายถึง โปรติเอสที่มีช่วงพีเอชของการทำปฏิกิริยาย่อยสลายอยู่ในช่วงพีเอชเป็นกรด โดยทั่วไปเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมระหว่างพีเอช 2-4 และไม่แสดงชัดเจนถึงอนุมูลกรดอะมิโนที่มีบทบาทในบริเวณเร่ง เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหมู่คาร์-บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ อยู่ในบริเวณเร่ง ตัวอย่างเอนไซม์ได้แก่ เรนนิน (rennin) และ เปปซิน (pepsin) เป็นต้น

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

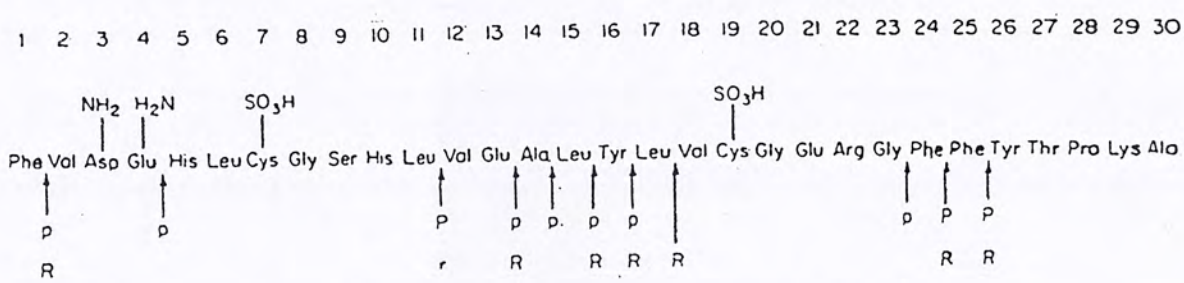
แบ่งวิธีวิเคราะห์ตามชนิดของสับสเตรท ดังนี้

3.1 โปรตีนเป็นสับสเตรท มีวิธีการแตกต่างกัน 2 วิธี คือ

3.1.1 ประเมินจากผลผลิตของการทำปฏิกริยา เช่น ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น ไตรคลอโรอะซิติกแอซิด (trichloroacetic acid , TCA) เปอร์คลอริกแอซิด (perchloric acid) เป็นต้น ส่วนโปรตีนที่ใช้ได้แก่ เคซีน(casine) ฮีโมโกลบิน(haemoglobin)ที่ผ่านการบำบัดด้วยกรดหรือยูเรีย วัดปริมาณ TCA–soluble peptides คือส่วนของสารประกอบอะโรมาติกที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (OD_{280}) แล้วประเมินค่าด้วย ไทโรซีน (tyrosine) ในสารละลายปฏิกริยา ปริมาณของไทโรซีนจะแปรผันตรงตามกิจกรรมของเอนไซม์ ค่าที่วิเคราะห์นี้ไม่สามารถบอกจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ได้

3.1.2 การประเมินจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์

ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) ที่เป็นผลผลิต จะแปรผันโดยตรงกับจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ โดยให้กรดอะมิโนทำปฏิกริยากับนินไฮดริน รีเอ-เจนท์ (ninhydrin reagent) ให้สีที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (OD_{570}) เทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตราฐานของลิวซีน ปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันอิสระกับนินไฮเดรต ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนอิสระกับนินไฮเดรต (Wang และ Hesseltine, 1965)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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 ประโยชน์อื่นๆโปรติเอสสามารถใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆได้อีกมากมายเช่นการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate) จากถั่วเหลือง เนื้อและปลาใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ป่วย การผลิตยาช่วยย่อยอาหาร การเตรียมสารเงินจากอิมัลชัน (emultion) ของการล้างฟิล์ม

5. จุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส มีตัวอย่างดังนี้

5.1 Aspergillus oryzae

ในตะวันตกการผลิตเอนไซม์ในทางการค้าจะผลิตจากเชื้อราและแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว (submerge culture) ซึ่งจะมีการอนุญาตให้มีการควบคุมทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และ พีเอชในขณะนี้ได้มีความพยายามที่จะเลี้ยงในอาหารแข็ง (solid state fermentation, SSF) (Aidoo และคณะ, 1982; Hesseltine, 1987)

การเลี้ยงในอาหารแข็ง จะมีความเป็นไปได้เมื่อใช้เชื้อราเพราะเชื้อรามีลักษณะต่างจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เนื่องจากความสามารถเจริญได้อย่างอิสระในสับสเตรทที่เป็นของแข็ง ดังนั้นการเลี้ยงในอาหารแข็งจึงได้ประโยชน์มากกว่าการเลี้ยงแบบอาหารเหลวและข้อดีของการใช้เชื้อรามีดังนี้

ก. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตไม่สลับซับซ้อน

ข. ใช้ความชื้นต่ำจึงป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย (Hesseltine, 1987)

นอกจากนี้ยังใช้ปริมาณของสารละลายต่ำในการสกัดเอนไซม์ออกมา ซึ่งเป็นการลดพลังงานและไม่สร้างปัญหามลพิษอีกด้วย ประโยชน์ของการเลี้ยงในอาหารแข็งนี้จึงมีความน่าสนใจที่จะใช้ในประเทศโลกที่สาม (Carrizales และ Jaffe, 1986) อุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการเหมาะสมกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตขนาดเล็ก (small scale production) ซึ่งเหมาะกับผู้ที่มีทุนต่ำและมีแรงงานสูง (Ba taglino และคณะ, 1991)

5.2 Mucor miehei

เชื้อรา Mucor miehei จะผลิตแอซิดโปรติเอส(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.

Sakomoto และ Shuzui (1957) พบว่า Rhizopus tonkinensis , Rhizopus peka และ Rhizopus javanicus ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอซิดโปรติเอสโดยใช้ข้าว ข้าวสาลี หรือ ข้าวบาร์เล่ย์มีการผลิตทั้งแอซิดโปรติเอสและนิวทรอลโปรติเอสได้ดีจากข้าวสาลี 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 Pseudomonas aeruginosa IFO 3544 (Paten และคณะ, 1993) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการใช้เทอร์โมไลซีนเพื่อการสังเคราะห์แอสปาแทมและใช้สารตัวนี้เป็นสับสเตรทในการสังเคราะห์เอน-เบนซิลอกซี-คาร์บอนิล-แอสปาร์ติ-ติกแอซิด(N-benzyloxy – carbonyl – aspartic acid) และ ฟีนิลอลานีน เมทิล เอสเทอร์(phenylalanine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

methyl ester) (Lee และคณะ, 1992,1993) ซึ่งจากรายงานแสดงให้เห็นว่า Pseudomonas aeruginosa สามารถผลิตเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิสูง

5.5 Bacillus sp.

ได้มีรายงานการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ที่ทนด่างคือ Bacillus sp. No 221 อย่างแพร่หลาย (Horikoshi, 1971a) จึงได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติของอัลคาไลน์โปรติเอสจากสายพันธุ์อื่นอีกมากมาย และพบว่าสายพันธุ์ Streptomyces 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 ซึ่งกระบวนการการสังเคราะห์ทางชีวภาพของอัลคาไลน์โปรตีเอส ขึ้นอยู่กับการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นของคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหาร (Giesecke และคณะ, 1991) และนอกจากนี้ปริมาณของกลูโคสและแอมโมเนียมีผลต่อการสังเคราะห์อัลคาไลน์โปรติเอส เมื่อใช้ B. licheniformis ในการผลิตและเลี้ยงแบบกะ (batch culture) (Heineken และ O' coner, 1972)

ยังมีเชื้อจุลินทรีย์อีกหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดก็ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่างชนิดกัน ดังตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆที่ผลิตโดยจุลินทรีย์

กลุ่ม	ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์
Serine protease	
Trypsinlike	Streptomyces griseus
	S. tradia
	S. erytrhecus
Alkaline	Bacillus subtilis
	Saccharomyces cerevisiae
	S. griseus
	S. rectus
	Aspergillus oryzae
Myxobacter-Y-lytic	Sporangium sp.
Staphylococcal	Staphylococcus aurous
Thiol protease	
Clostripain	Clostridium hystolyticum
Streptococcal	Group A streptococci
Metal containing protease	
Neutral	Bacillus subtilis
	B. thermoproteolyticus
	B. cereus
	B. megaterium
	S. griseus
	B. cereus
	B. megaterium
	S. griseus
	A. oryzae
	Puedomonas aeruginosa
	C. hystolyticum
	B. amyloliquefaciens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม	ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์
Alkaline protease	Serratia sp.
Myxobacter protease 1	Sporngium sp.
Myxobacter protease 2	Myxobacter AL-1
Acid protease	A. oryzae
	A. niger
	Penicillium notatum
	Rhizopus chinensis
	Mucor pusillus
	M. miehei
	Endothia parasitica
	Candida albicans
	S. cerevisiae
	Rhodotorulus glutinis

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา

6.1 แหล่งคาร์บอน

Sakamoto (1957) พบว่า การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก Aspergillus oryzae และ Aspergillus sogo มักใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์ และปกติมักผลิตด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวหรืออาหารแข็ง อย่างไรก็ตามทั้ง 2 ระบบ ก็ยังเกิดปัญหาบางประการ ยกตัวอย่างเช่น การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะเกิดการปนเปื้อนโดยเชื้อแบคทีเรีย และจะให้ผลผลิตต่ำมาก อย่างไรก็ตาม การปนเปื้อนของแบคทีเรียเกิดขึ้นได้บ่อยครั้ง และได้พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบคีโมสแตท (chemostat) จะไม่ใช้นิยมในอุตสาหกรรมการผลิตโดยเชื้อราภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

Fukushima และคณะ (1989) ได้รายงานการผลิตเอนไซม์แบบต่อเนื่อง โดยใช้สายพันธุ์ Aspergillus oryzae ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบคีโมสแตทโดยจำกัดปริมาณคาร์บอนใน NaCl 10% เพื่อหลักเลี่ยงการปนเปื้อนของแบคทีเรีย

Drucker (1972) รายงานว่า การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ Neurospora crassa จะขึ้นอยู่กับการชักนำและการยับยั้งของกลูโคสในอาหาร

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์มีหลายชนิดและที่สำคัญในการลดต้นทุนการผลิต จะต้องหาแหล่งคาร์บอนที่หาง่าย ราคาถูก ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ได้แก่ ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

และปัจจุบันยังมีการหันมาใช้ รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และจมูกข้าวสาลี ซึ่งองค์ประกอบของรำข้าวเจ้า รำข้าวสาลีและจมูกข้าวสาลี แสดงได้ดังตารางที่ 5 ,6 และ 7 ตามลำดับ ดังนี้

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของรำข้าวเจ้า (อรอนงค์, 2542)

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

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของรำข้าวสาลี (อรอนงค์, 2542)

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

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของจมูกข้าวสาลี (อรอนงค์, 2542)

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์
คาร์โบไฮเดรต	45.7
โปรตีน	18
เถ้า	5
ไขมัน	8.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35865

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์
เส้นใย	12
ไนโตรเจนสกัด	40.9

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 และ Ikasari (1992) เลี้ยงเชื้อ Rhizopus oligosporus ในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิลโปรติเอส (carboxyl proteinase) พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน และมีการเติมกลูโคส 295 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 10.5 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า

3. พีเอช

พีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การหมักในระยะแรก พีเอชของการเลี้ยงเชื้อเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงอาจเกิดการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่น ๆ ออกมาหรือมีการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์ขึ้นเป็นผลให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมให้ค่าพีเอชในอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ บัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่าง ป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา (Wang และ Hesseltine, 1965) อิทธิพลของพีเอช ต่อการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์โปรติเอสมีจุดสูงสุดที่พีเอช 3 และสูงรองลงมาที่พีเอช 5.5 และกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำลงที่พีเอช 4 – 5 เนื่องจากข้อจำกัดในการละลายได้ของเคซีน (Heineken และ O'coner, 1972)

Shinmyo และคณะ (1968) ได้รายงานว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในสภาพที่เป็นกรดคือ 4.6 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ Morimura และคณะ (1994) ได้เลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้ง พบว่าค่าพีเอชระหว่าง 3.5 – 5.0 กิจกรรมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นและที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะเป็น 15 เปอร์เซ็นต์และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Battaglino และคณะ (1991) พบว่าการให้ความชื้นของสับสเตรทด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 4% (ความเข้มข้นสุดท้าย) เมื่อ พีเอช เริ่มต้นเพิ่มขึ้นถึง 6.9 – 7.2 พบว่าผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสจากรำข้าวสาลี เปลือกข้าวสาลี และรำข้าวโพด จะเพิ่มขึ้นถึง 4000 , 7000 และ 4000 โปรติเอสยูนิต / กรัม ตามลำดับ

4. จำนวนสปอร์เริ่มต้น

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และขั้นตอนดำเนินงาน

วัสดุ

วัตถุดิบ

-รำข้าวเจ้า

-รำข้าวสาลี

-จมูกข้าวสาลี

เชื้อจุลินทรีย์

-Aspergillus oryzae 3088

เชื้อราสายพันธุ์นี้ ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯที่เก็บรักษาโดยวิธีไลโอฟิไลเซชั่น (lyophilization) นำมาเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Broth แล้วนำไปหยดใน Potato Dextrose Agar จากนั้นเลี้ยงจนเชื้อราสร้างเส้นใยและสปอร์เต็มที่ จึงเก็บรักษาในตู้เย็น เพื่อนำสปอร์มาใช้ประโยชน์และทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 2 เดือน ลักษณะของเชื้อ Aspergillus oryzae 3088 แสดงได้ดังรูปที่ 5

อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน

อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารเหลว ประกอบด้วย

-เปปโตน	10	กรัม/ลิตร
-โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม/ลิตร
-ยีสต์สกัด(yeast extract)	3	กรัม/ลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชให้ได้ 4 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงได้ดังรูปที่ 6

อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
3. กล้องจุลทรรศน์
4. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow)
5. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
6. อุปกรณ์นับจำนวนจุลินทรีย์ (haemacytometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
8. เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
9. เครื่องเขย่า (shaker)
10. เครื่องคนสาร (stirrer)
11. เครื่องแก้ว
12. อุปกรณ์ให้ความร้อน (hot plate)

ลักษณะของเครื่องเขย่าและเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแสดงได้ดังรูปที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

ขั้นตอนดำเนินงาน

1. นำเชื้อรา A. oryzae 3088 มาทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยทั่ว ๆ ไปของเชื้อโดยวิธีการย้อมสีด้วยแลคโตฟีนอลคอททอลบลู (lactophenol cottonblue) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
2. เตรียมอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง อาหารเลี้ยงพื้นฐานประกอบด้วยเปปโตน 10 กรัม / ลิตร โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 กรัม / ลิตร, ยีสต์สกัด (yeast extract) 3 กรัม / ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.0 (Singh และคณะ, 1994) แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 70 มิลลิลิตร เติมแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 $^{\circ}C$ 15 นาที
3. เตรียมสารละลายสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา โดยละลายสปอร์ในน้ำกลั่นที่เติม tween 80 1– 2 หยด ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ผสมให้สปอร์กระจายอยู่ทั่วถึง นับจำนวนสปอร์ให้ได้ปริมาณ 10^7 สปอร์ / มิลลิลิตร เติมสปอร์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละฟลาสก์ วางบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบ / นาที (รูปที่ 7) ทำการสุ่มตัวอย่าง 6 มิลลิลิตร ทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ / นาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสไปวัดพีเอช และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (รูปที่ 8) ซึ่งดัดแปลงวิธีของ Wang และ Hesseltine (1965)
4. ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดังนี้

4.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ศึกษาแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และจมูกข้าวสาลี โดยใช้ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ ความเข้มข้น 1 , 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์

4.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาแหล่งไนโตรเจน คือ เคซีนและเคซีนร่วมกับยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.5 , 0.6 , 0.7 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานซึ่งมีเปปโตน 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับยีสต์สกัด 3เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุม

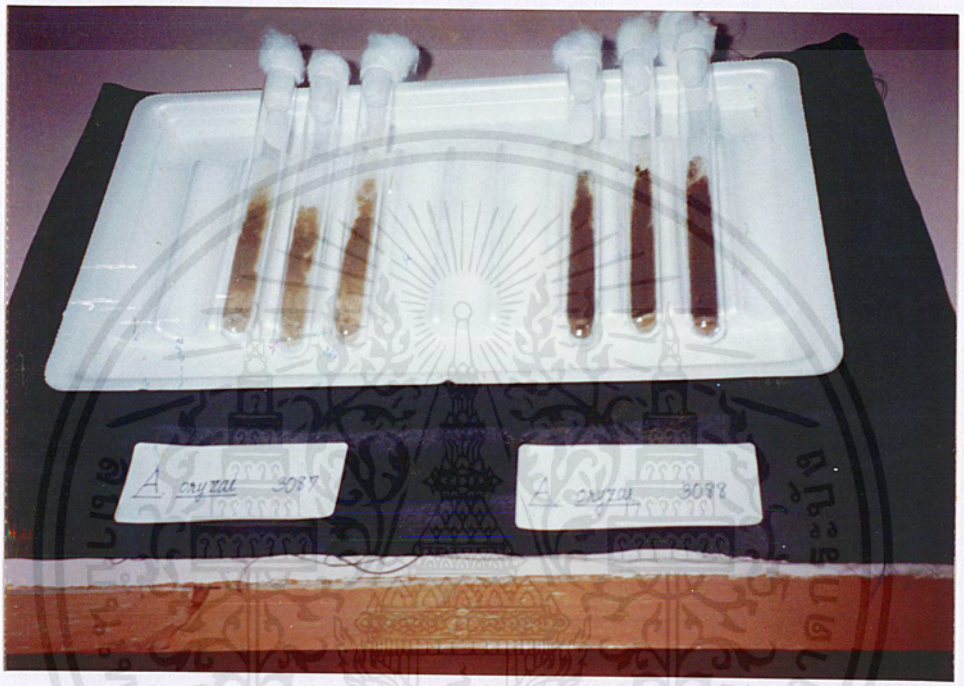
4.3 ผลของพีเอชเริ่มต้น

ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้น โดยการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อที่เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกเป็น 3.0 , 4.0 , 5.0 , 6.0 และ 7.0

4.4 ผลของแหล่งเกลือแร่

ศึกษาผลของแหล่งเกลือแร่ คือ $MgSO_4 . 7H_2O$ ความเข้มข้น 0.3 , 0.4 , 0.5 , และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่ทำการคัดเลือกข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่5 แสดงลักษณะของเชื้อ Aspergillus oryzae 3088 ในอาหารวุ้นเอียง PDA

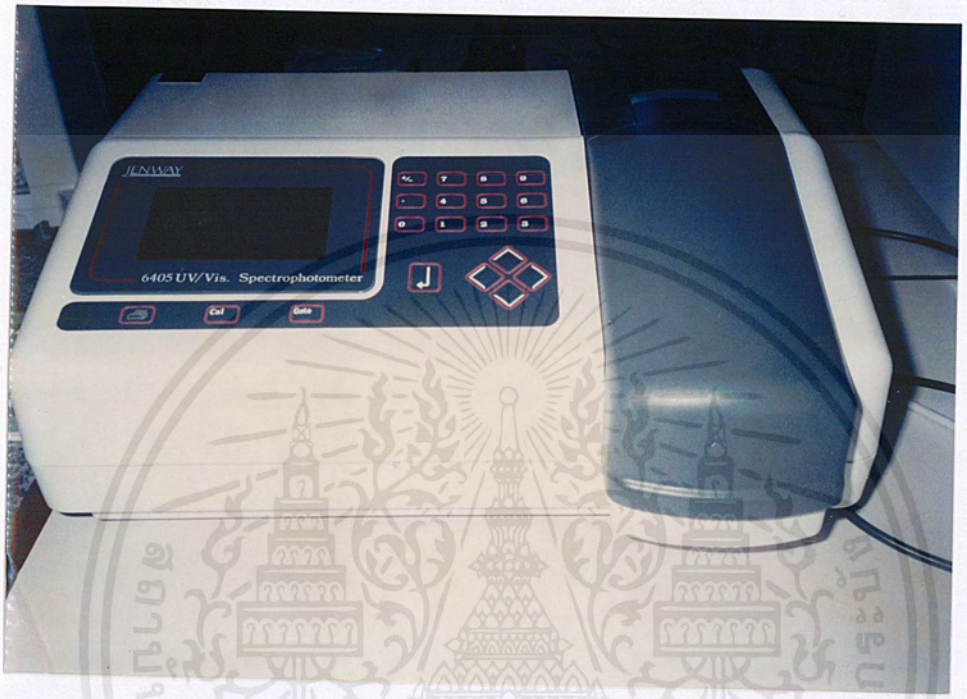
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่6 แสดงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่7 แสดงลักษณะของเครื่องเขย่า (shaker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่8 แสดงลักษณะเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง(spectrophotometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4
ผลการทดลอง

ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ Aspergillus oryzae 3088 พบว่าในการทดสอบเกี่ยวกับแหล่งคาร์บอนซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และจมูกข้าวสาลี พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เกิดขึ้นจะสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยเมื่อใช้รำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของรำข้าวเจ้า 3 เปอร์เซ็นต์ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสคือ 0.713 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาคือที่ความเข้มข้นของรำข้าวเจ้า 2 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 0.695 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถแสดงผลได้ดังรูปที่ 9 ส่วนในกรณีที่ใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติ-เอสได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของรำข้าวสาลี 3 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 0.844 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาคือที่ความเข้มข้นของรำข้าวสาลี 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 0.760 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถแสดงผลได้ดังรูปที่ 10 และเมื่อใช้จมูกข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อเจริญเติบโตและสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของจมูกข้าวสาลี 2 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสคือ 0.845 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาคือที่ความเข้มข้นของจมูกข้าวสาลี 1 เปอร์เซ็นต์โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 0.832 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถแสดงผลได้ดังรูปที่ 11 ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดพบว่า จมูกข้าวสาลี 2 เปอร์เซ็นต์เป็นชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดซึ่งให้ค่าของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูง เนื่องจากว่าจมูกข้าวสาลีมีสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบอยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะวิตามินต่างๆเช่น วิตามินบี กรดโฟลิก ไรโบฟลาวิน ไนอาซีน เป็นต้น รวมทั้งโปรตีนโดยเฉพาะกรดอะมิโนกลุ่มกลูตามิก ซึ่งวิตามินบีนั้นจะเป็นองค์ประกอบของโคแฟกเตอร์ในการเจริญของเชื้อ และโปรตีนที่มีอยู่ในจมูกข้าวจะเป็นตัวช่วยในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ โดยใช้ในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ (อรอนงค์, 2542) จึงทำให้เชื้อที่ใช้จมูกข้าวสาลีเป็นสับสเตรท มีอัตราการเจริญที่สูง และมีอัตราในการสร้างเอนไซม์ที่สูงแต่จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าการใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทก็ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันกับการใช้จมูกข้าวสาลี ดังตารางภาคผนวกที่ 2 ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

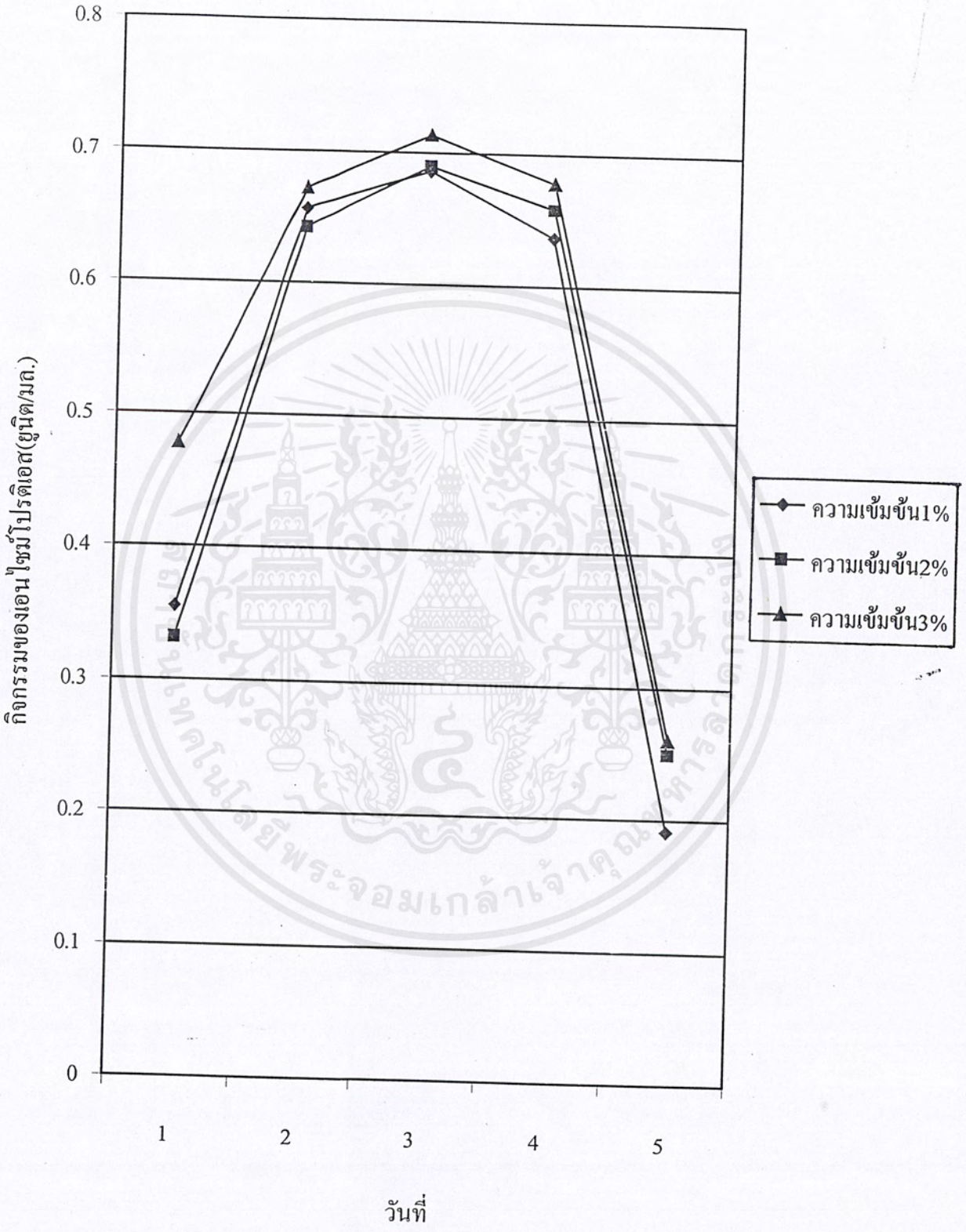
เลือกใช้จมูกข้าวสาลีนี้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับทดสอบการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ จากนั้นได้ทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่นำมาทดสอบมี 2 ชนิด คือ เคซีน และ เคซีนรวมกับยีสต์สกัด โดยทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในวันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะสูงสุดเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนคือเคซีนรวมกับยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 1.218 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยได้มีการทดลองเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสพบว่าเคซีนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการเจริญของเชื้อ (Heineken และ O' coner, 1972) และยังมีการทดลองเกี่ยวกับการเลี้ยงเชื้อรา Rhizopus oligosporus โดยไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนแต่มีการเพิ่มปริมาณกลูโคสและเกลือแร่เพิ่มขึ้นพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงขึ้นประมาณ 2 เท่า (Farley และ Ikasari, 1992) แต่จากผลการทดลอง กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนคือเคซีนรวมกับยีสต์สกัดซึ่งเป็นผลมาจากเคซีนที่เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีและมีปริมาณไนโตรเจนอยู่สูง อีกทั้งยังใช้ร่วมกับยีสต์สกัดซึ่งมีปริมาณของไนโตรเจนอยู่สูงเช่นกัน ซึ่งสามารถแสดงผลได้ดังรูปที่ 11 และเมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติพบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ในการใช้เคซีนรวมกับยีสต์สกัดความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ กับการใช้เคซีนที่ 0.6 เปอร์เซ็นต์ มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติดังตารางภาคผนวกที่ 3 จากนั้นจึงทำการทดสอบผลของค่าพีเอชเริ่มต้น โดยผลของการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารมีการทดสอบโดยใช้พีเอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7 ซึ่งมีพีเอช 4 เป็นตัวควบคุมพบว่าที่พีเอชเริ่มต้น 4 เชื้อมีการเจริญเติบโตและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดคือ 0.907 ยูนิต/มิลลิลิตร เนื่องจากพีเอชเริ่มต้นที่ 4 เป็นพีเอชที่เหมาะสมสอดคล้องกับผลการทดลองอื่นที่ว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสคืออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดที่พีเอช 4.6 (Shinmyo และคณะ, 1968) และยังสอดคล้องกับผลการทดลองที่ว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะมีค่าสูงที่พีเอชระหว่าง 3.5 – 5.0 (Morimura และคณะ, 1994) แต่จะขัดแย้งกับผลการทดลองที่ว่าพีเอชเริ่มต้นที่ 6.9 – 7.2 ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะให้ค่าที่สูง ดังนั้น ที่สภาวะเป็นกรดการเจริญของเชื้อราที่เลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะเจริญได้ดีและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซโปรติเอสม์สูงสุด แต่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะสูงสุดที่เท่าไหร่นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วย ซึ่งผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 13 จากนั้นจึงทำการทดสอบความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่โดยใช้ แมกนีเซียมซัลเฟต เป็นแหล่งเกลือแร่และใช้พีเอช 4 เป็นตัวควบคุมพบว่าเชื้อมีการเจริญและมีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ความเข้นข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 เปอร์เซ็นต์และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 1.001 ยูนิต/มิลลิลิตร เนื่องจากว่า แมกนีเซียมซัลเฟตเป็นเกลือแร่ที่สำคัญโดยมีธาตุแมกนีเซียมและซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบซึ่งธาตุทั้งสองเป็นธาตุที่มีความสำคัญใช้ในการสร้างองค์ประกอบของโปรตีนไนเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมทั้งเป็นโคเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ นอกจากนี้แมกนีเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งเกลือแร่ที่หาง่ายและช่วยส่งเสริมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ว่า เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ Rhizopus oligosporus เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส มีการเติมกลูโคสและแมกนีเซียมซัลเฟตเพิ่มขึ้นจากเดิม โดยเติมกลูโคส 295 มิลลิโมลาร์ และเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 10.5 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า (Farley และ Ikasari, 1992) ซึ่งสามารถแสดงผลได้ดังรูปที่ 14

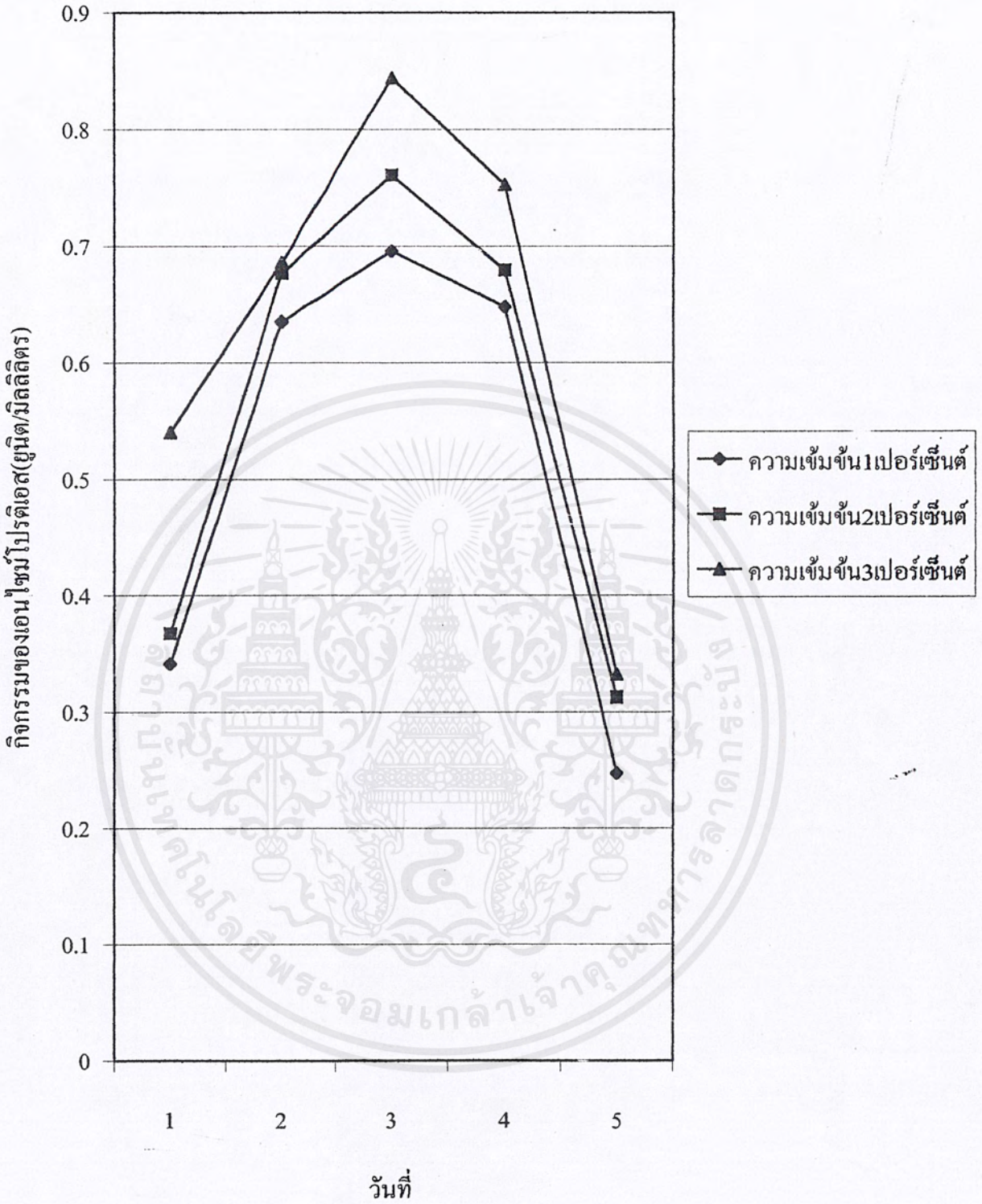
จากการทดลองได้ทำการวัดค่าพีเอชของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ Aspergillus oryzae 3088 ตลอด 5 วัน ของการทดลองพบว่า ค่าพีเอชของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับวันที่เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด คือในวันที่ 3 พบว่าในวันที่ 3 ของการทดลอง ค่าพีเอชของเอนไซม์โปรติเอสอยู่ในช่วง 8 – 9 ซึ่งสอดคล้องกับการผลทดลองที่ว่าในระยะแรกค่าพีเอชของเอนไซม์โปรติเอสจะอยู่ในช่วงที่เหมาะสมคือประมาณ 4 และจะสูงขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากเกิดการย่อยสลายของโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่นๆ (Wang และ Hesseltine, 1965) ซึ่งค่าพีเอชของเอนไซม์โปรติเอสที่วัดได้นี้ แสดงถึงชนิดของเอนไซม์โปรติเอสว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้เป็นอัลคาไลน์โปรติเอส ซึ่งสามารถแสดงผลพีเอชของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้สภาวะการเลี้ยงเชื้อต่างๆกันได้ดังรูปที่15-21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



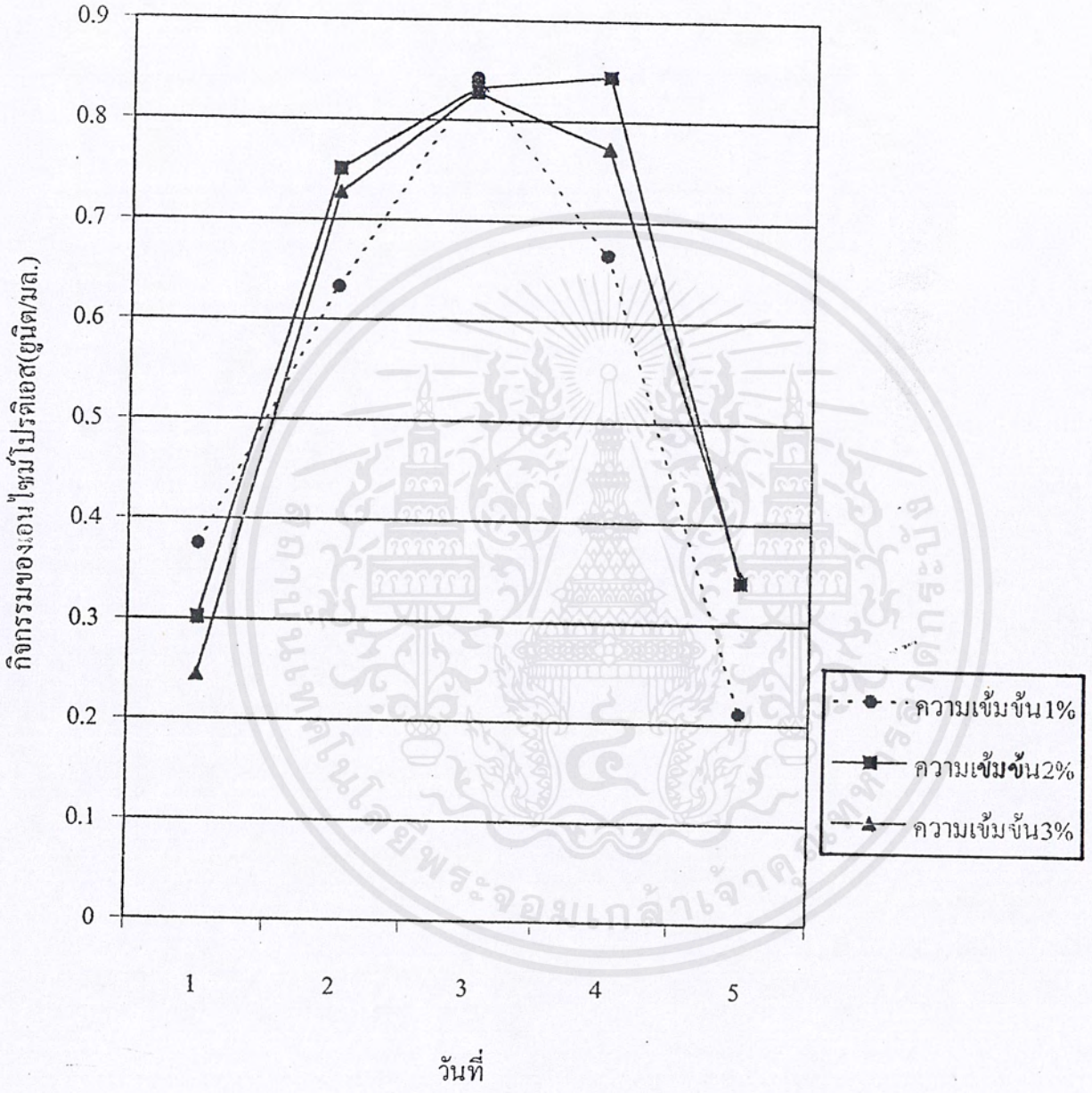
รูปที่ 9 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้แหล่งคาร์บอนคือรำข้าวเจ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



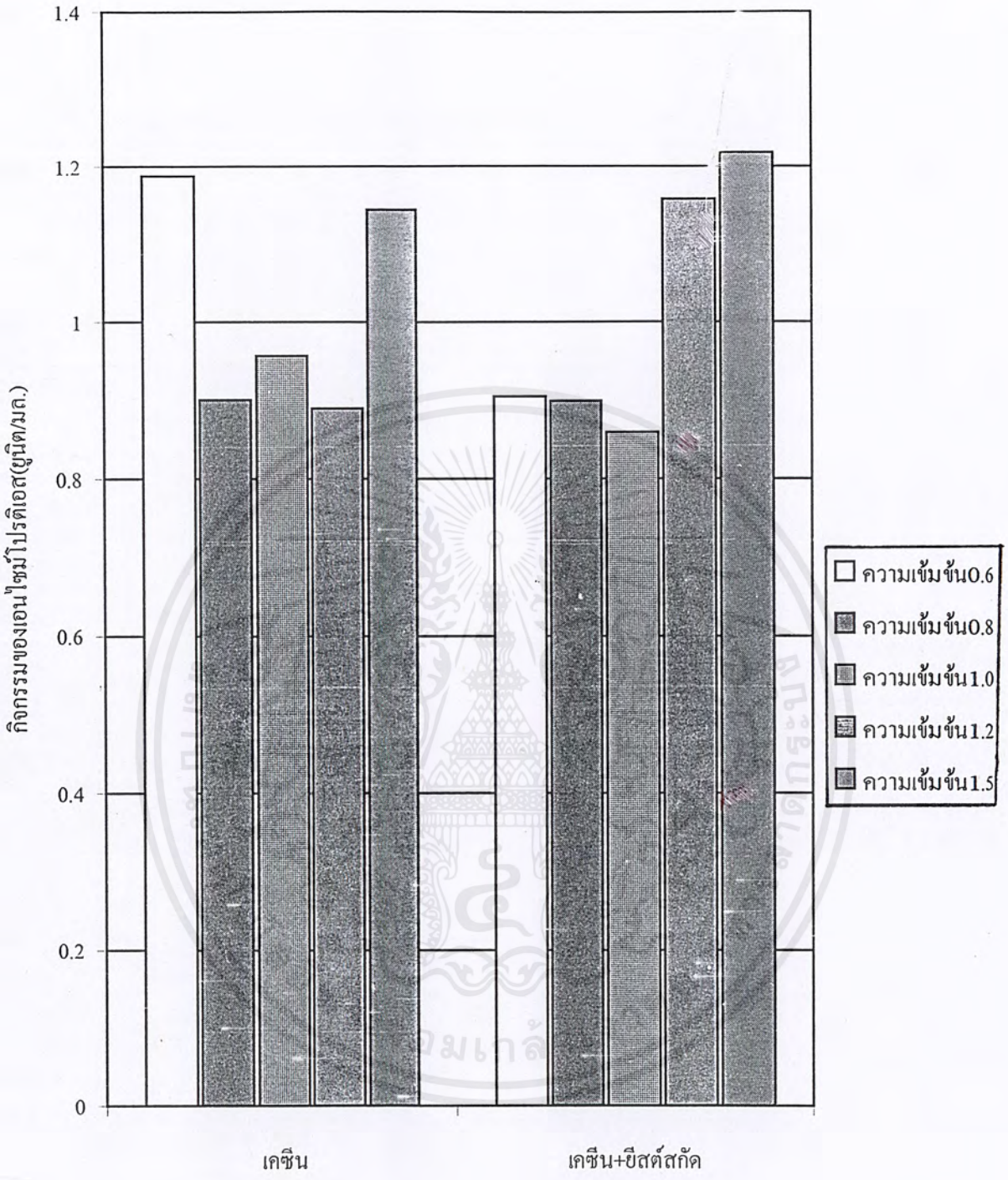
รูปที่ 10 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้แหล่งคาร์บอนคือรำข้าวสาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



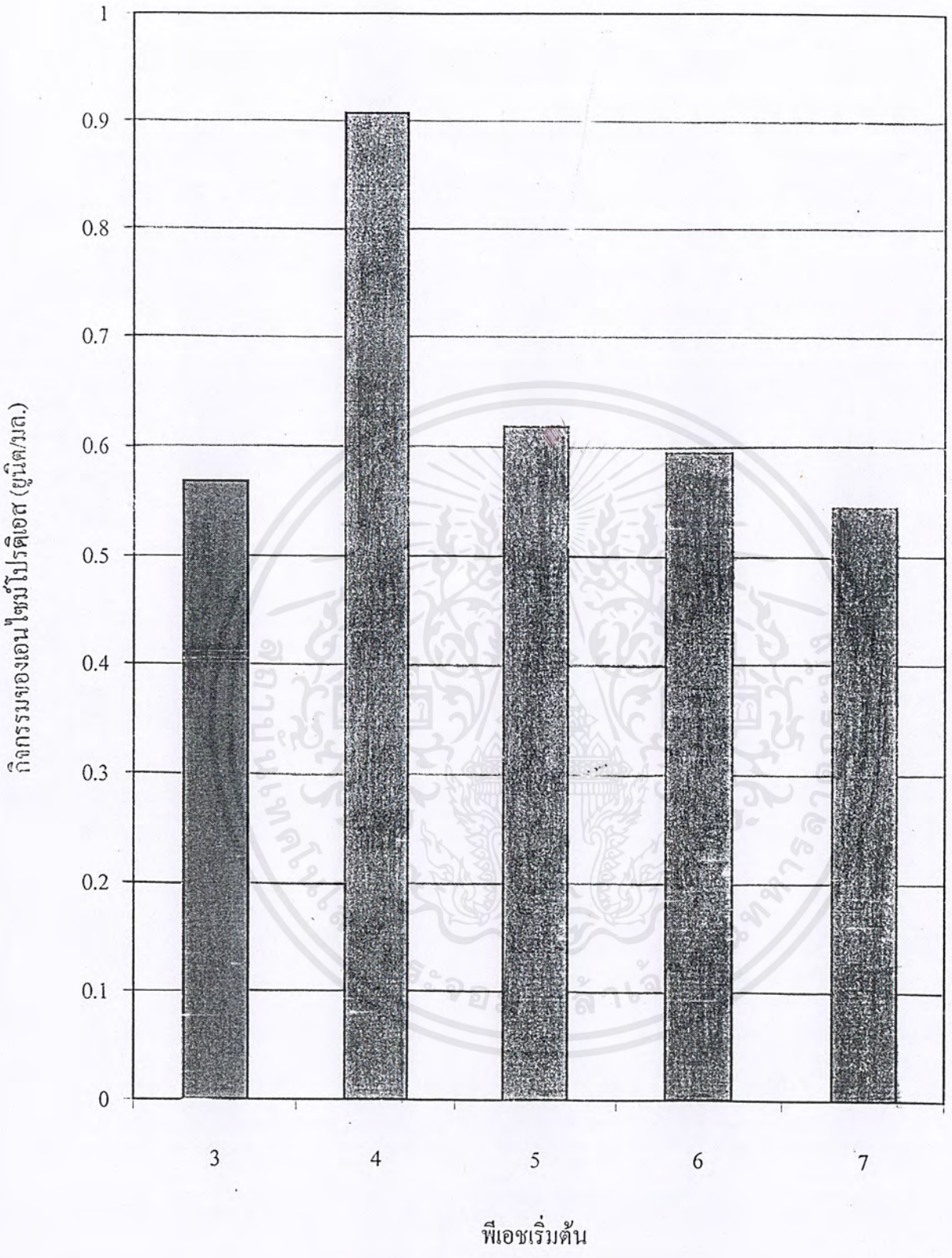
รูปที่ 11 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้แหล่งคาร์บอนคือจมูกข้าวสาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



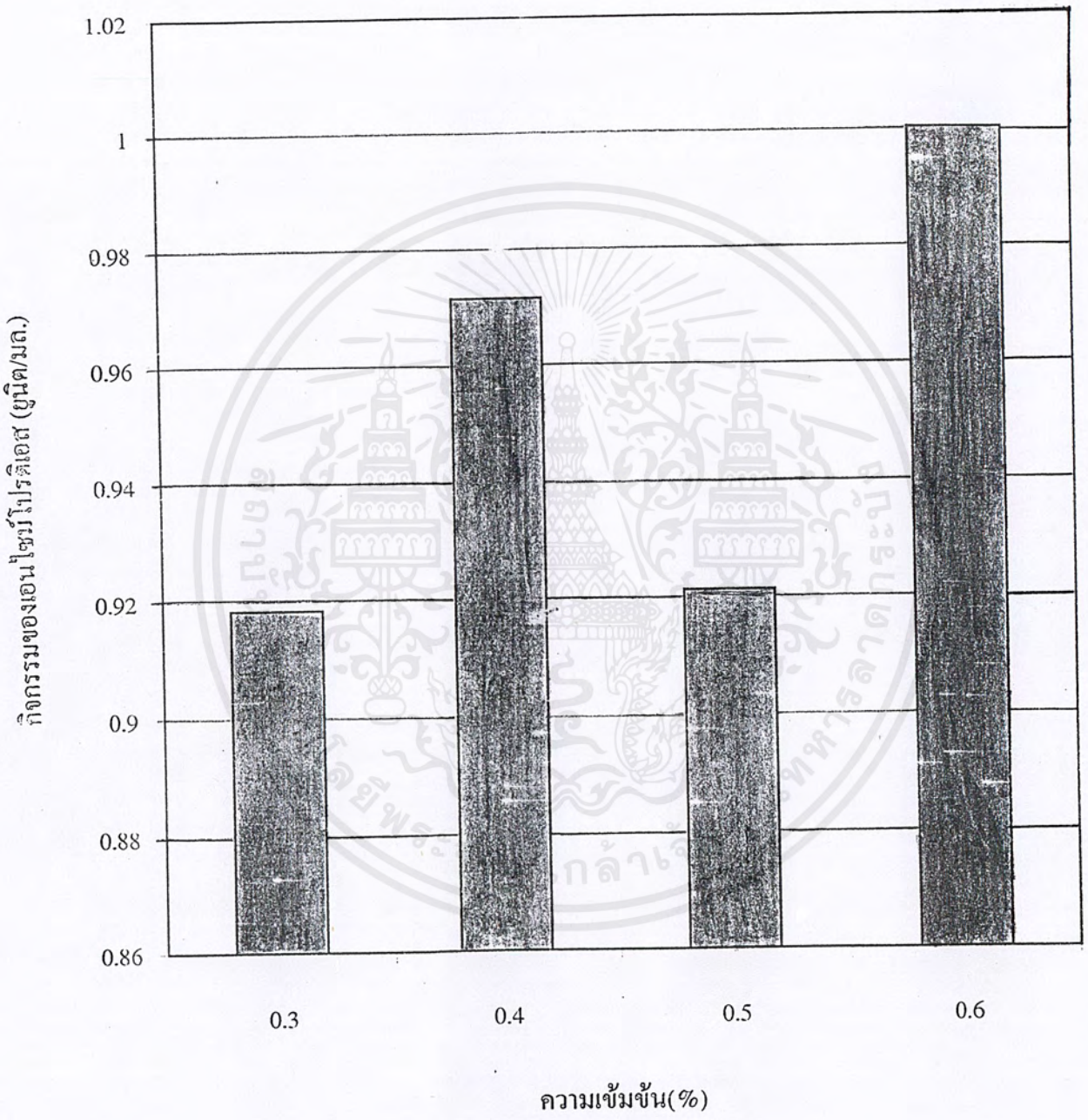
รูปที่ 12 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่มีแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



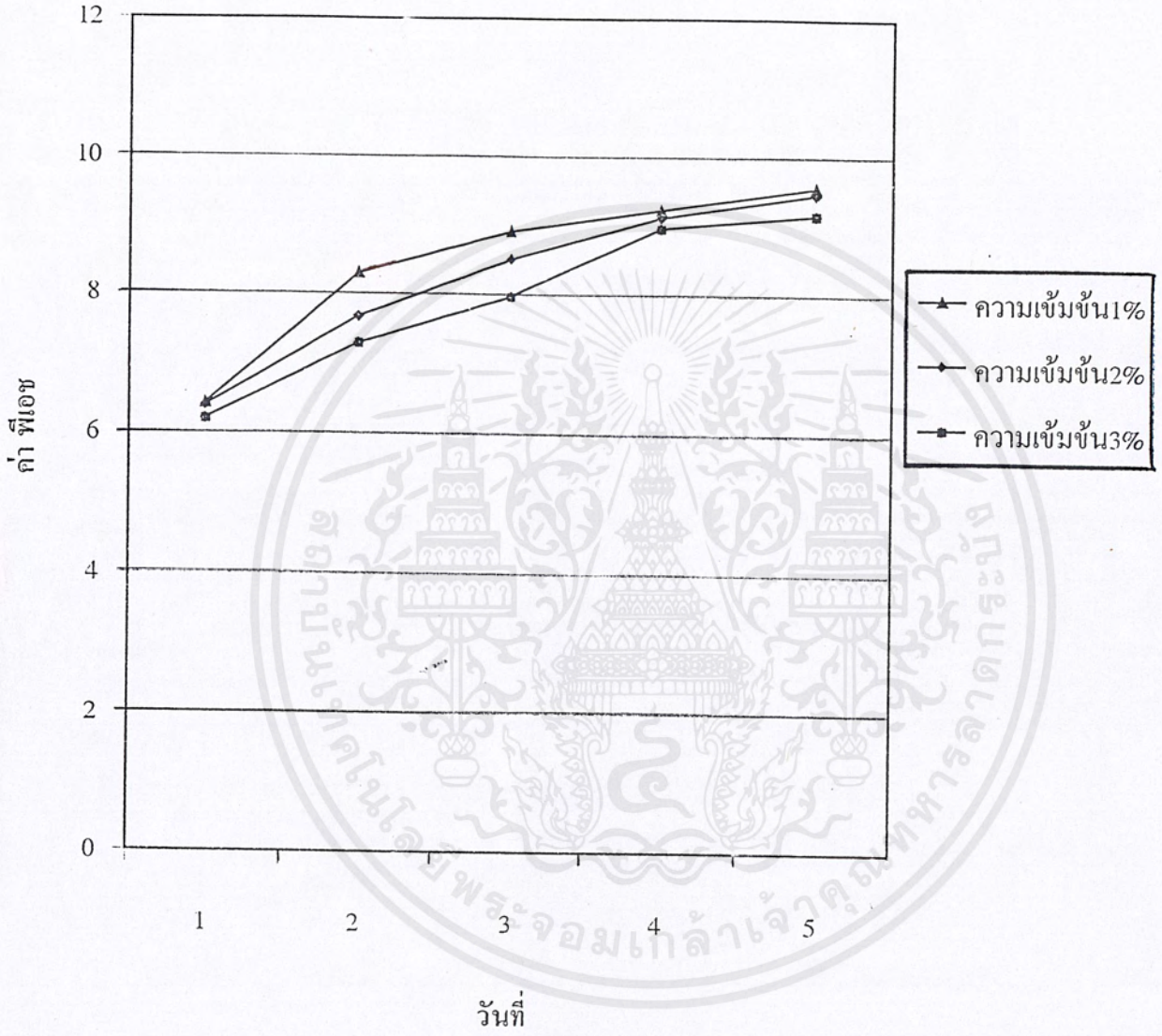
รูปที่ 13 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอช ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกันเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



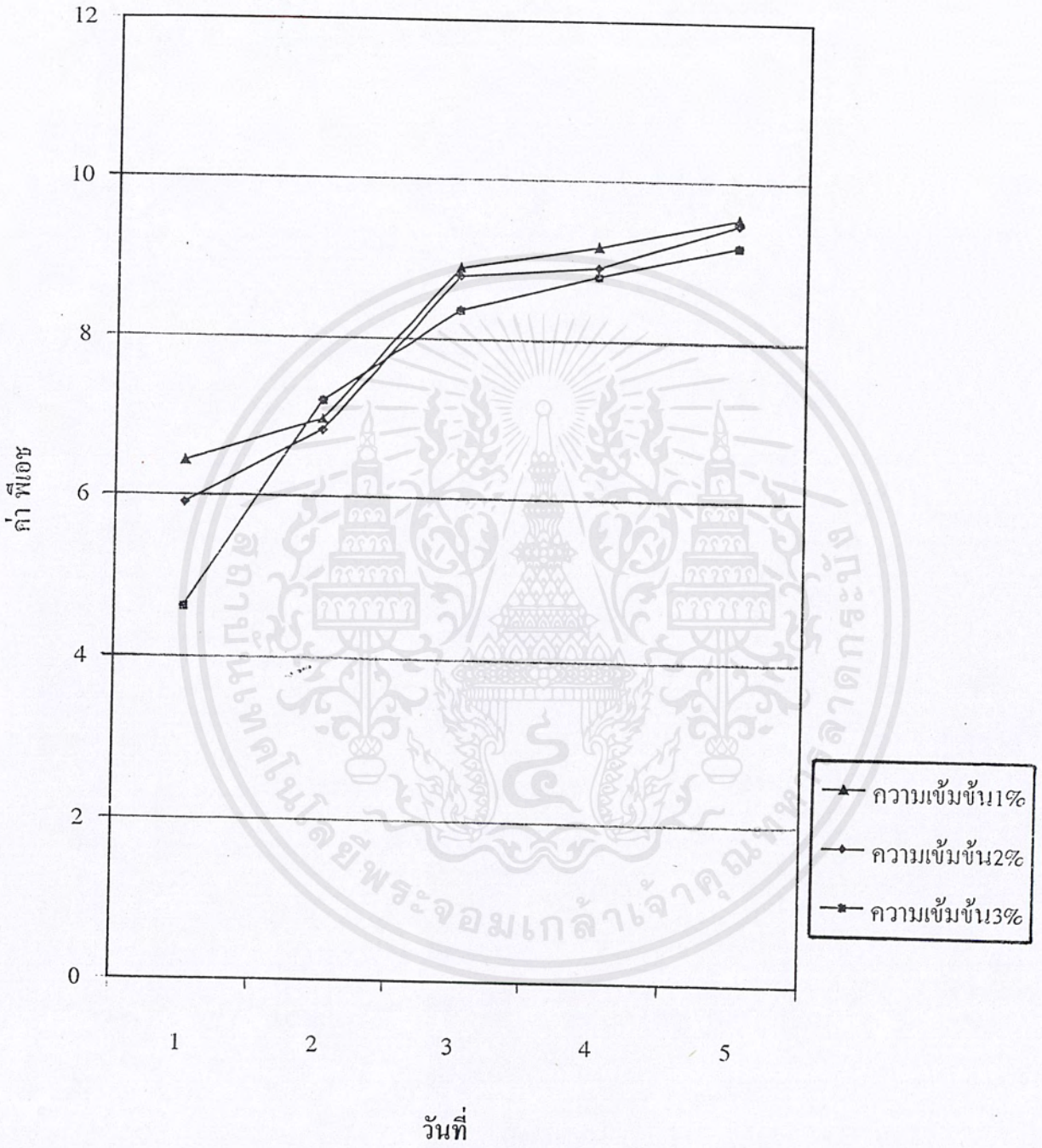
รูปที่ 14 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ที่ความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่แตกต่างกันเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



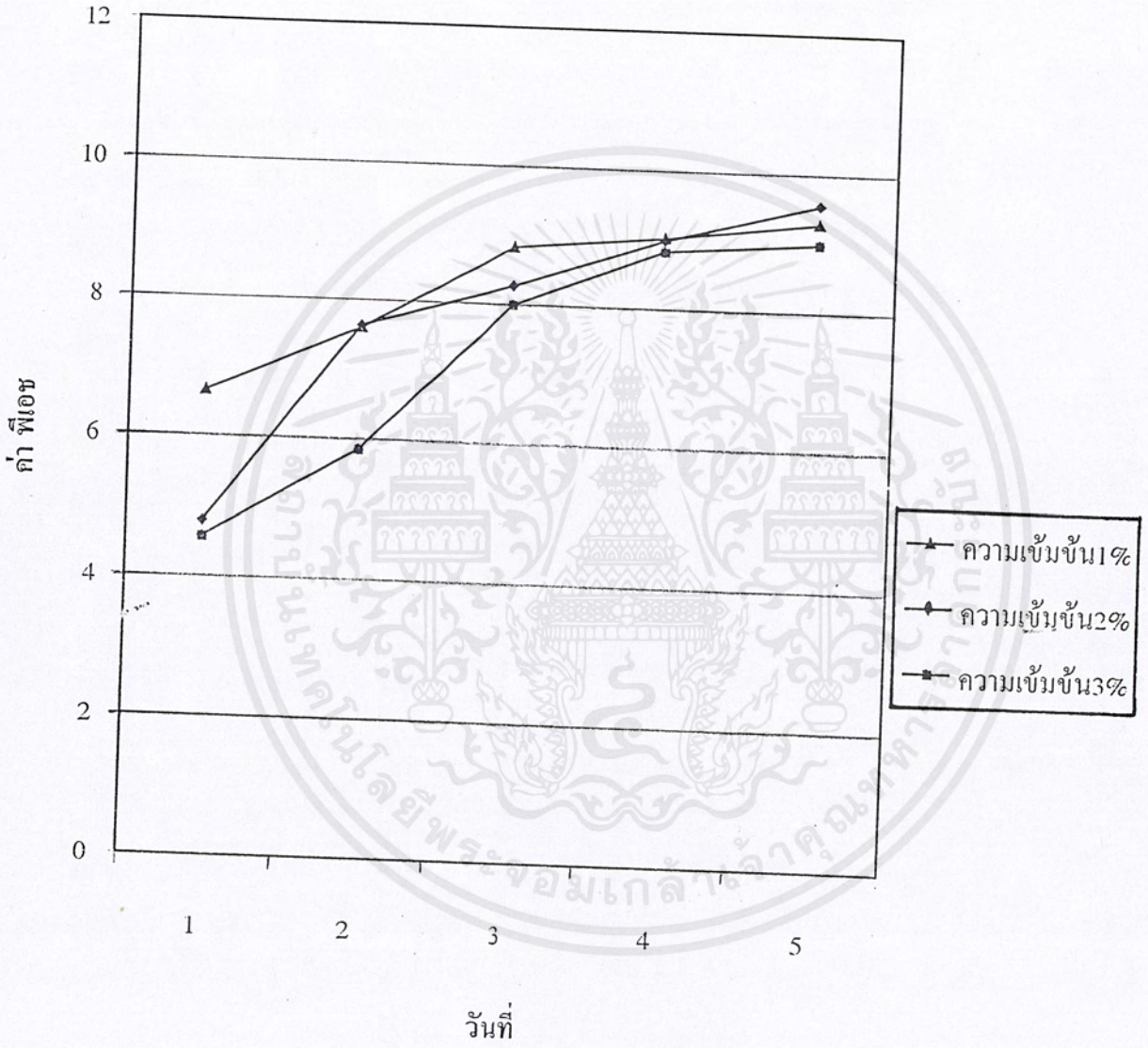
รูปที่ 15 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน คือ รำข้าวเจ้าแตกต่างกันเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



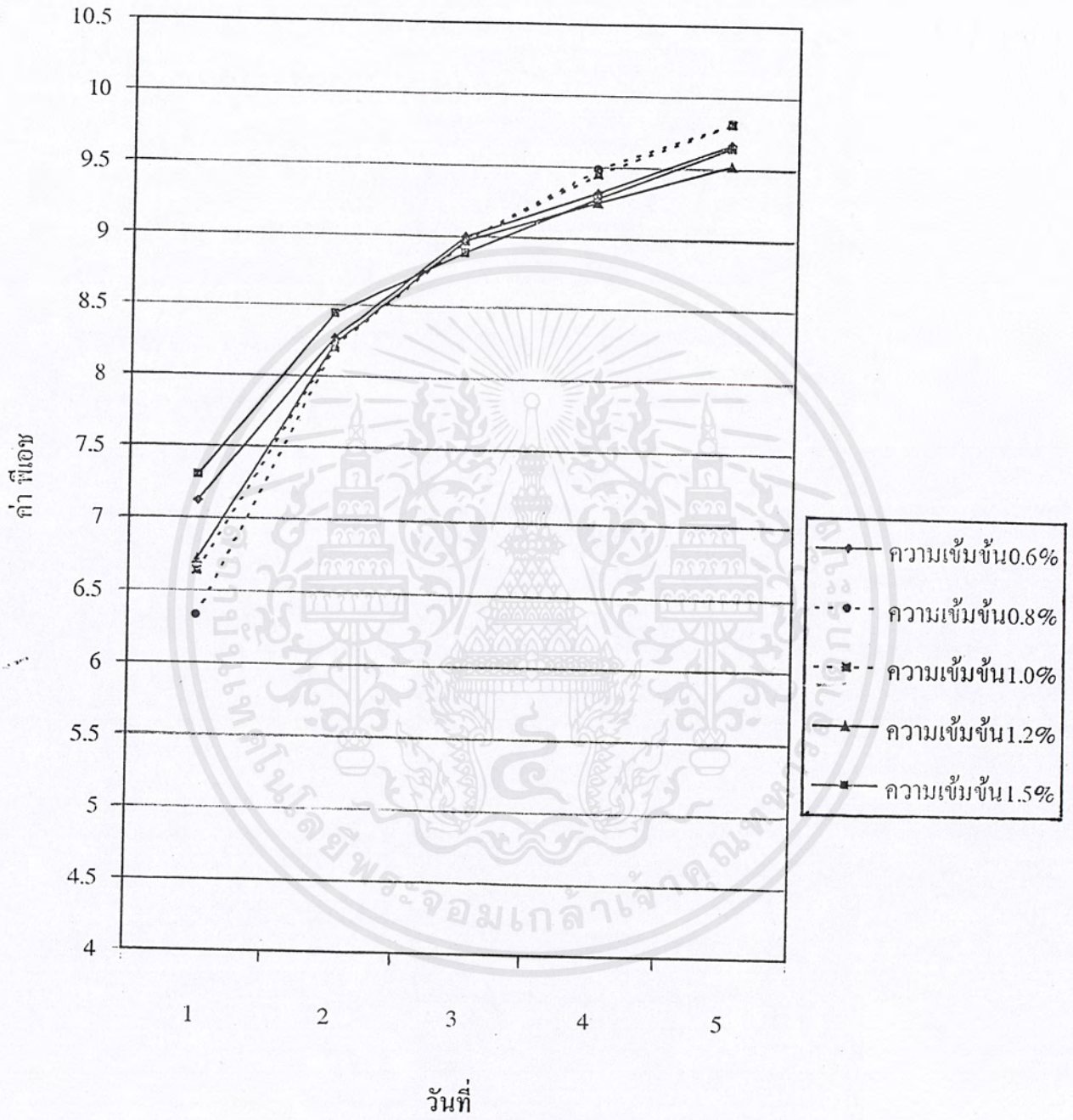
รูปที่ 16 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของคาร์บอน คือรำข้าวสาลีแตกต่างกันเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



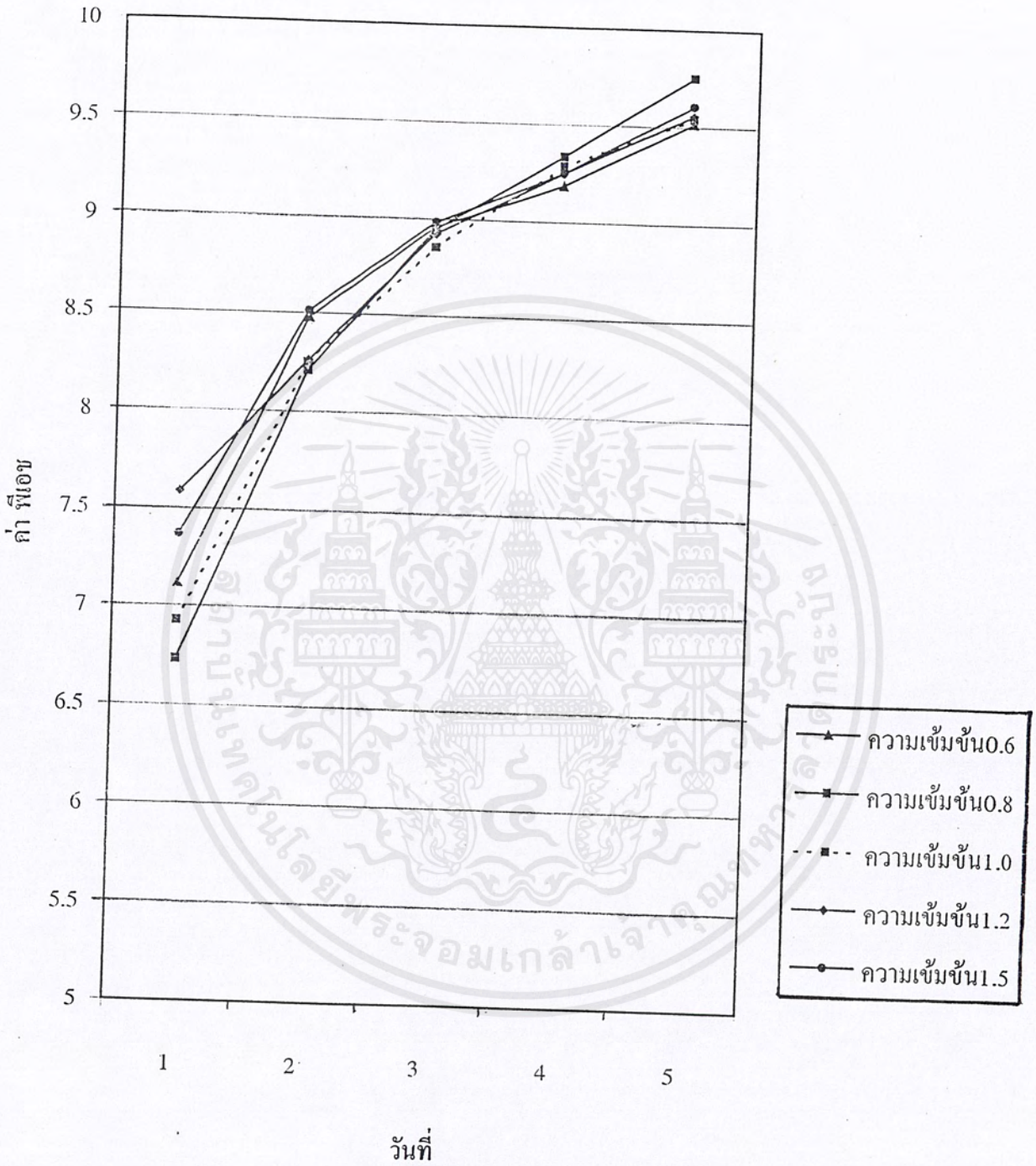
รูปที่ 17 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน คือ จมูกข้าวสาลีแตกต่างกันเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



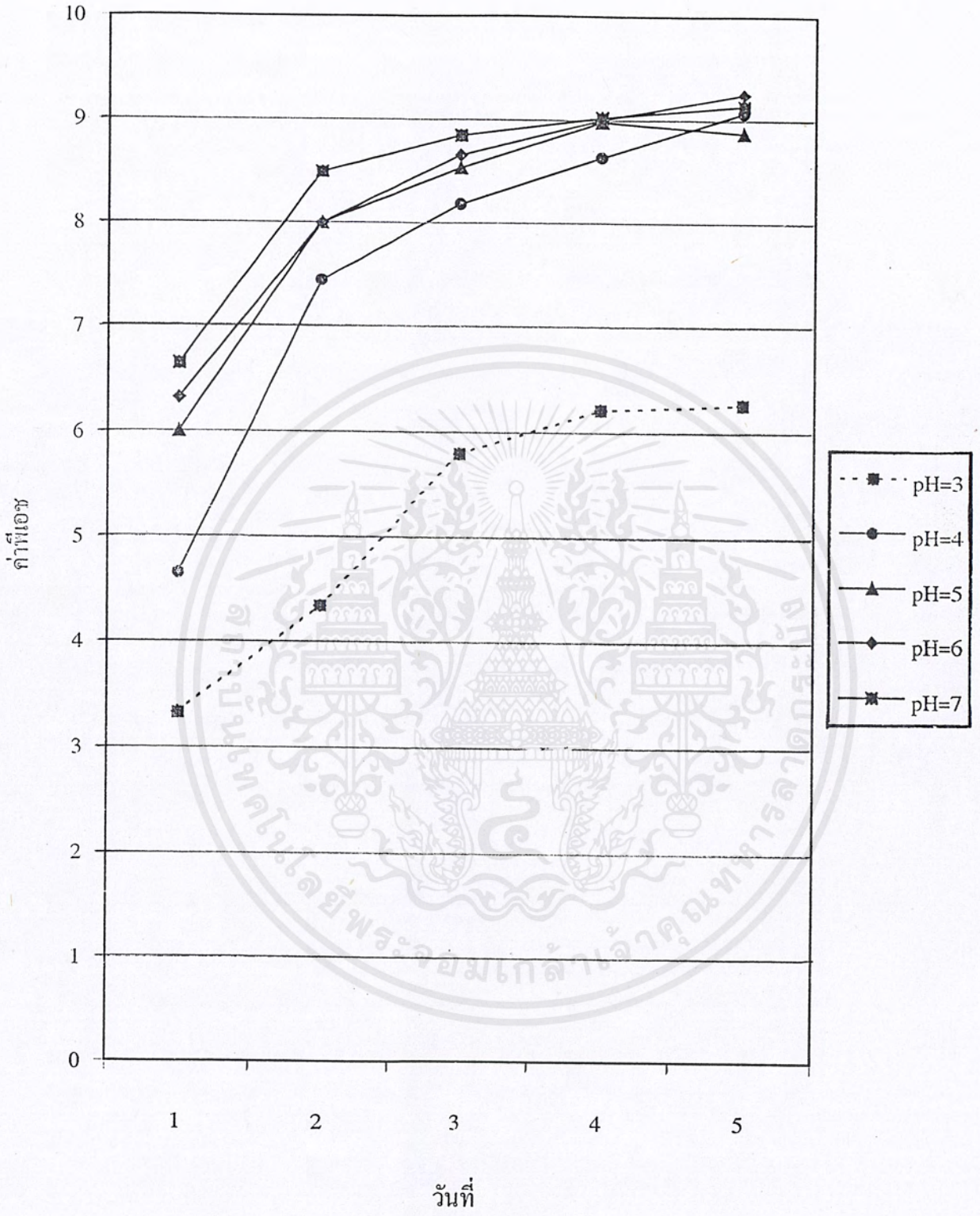
รูปที่ 18 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน คือเคซีนแตกต่างกันเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



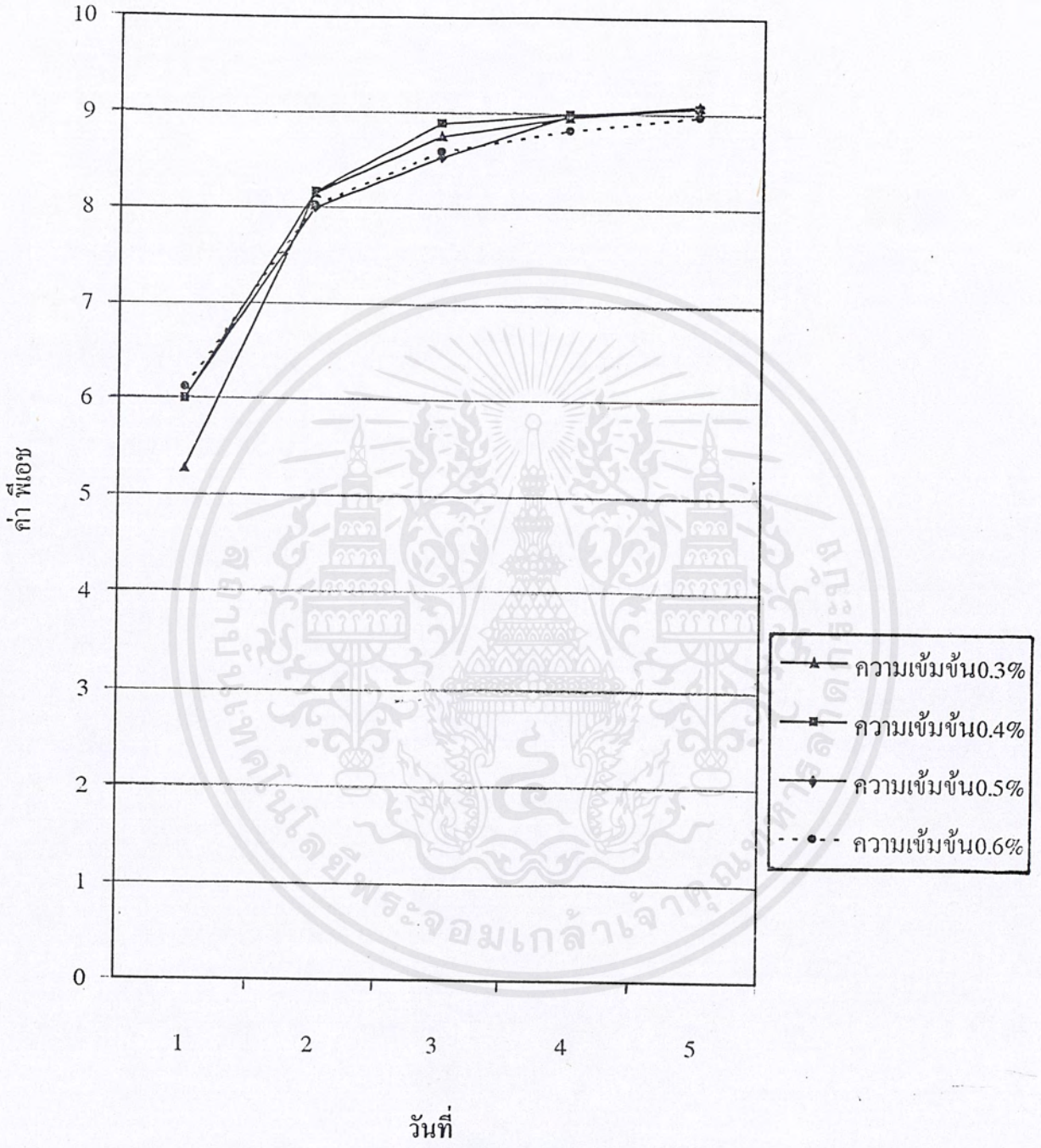
รูปที่ 19 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน คือเคซีนและยีสต์สกัดแตกต่างกันเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 21 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยทำการเปลี่ยนแปลงชนิดของแหล่งคาร์บอนและค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน พบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด คือ จมูกข้าวสาลี และพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส คือ เคซีนรวมกับยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อวิเคราะห์จากผลการทดลองแล้ว ถ้าคำนึงถึงค่าทางสถิติ จะพบว่าการใช้เคซีนความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่แตกต่างจากเคซีนร่วมกับยีสต์สกัด ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด คือ ที่พีเอชเริ่มต้นที่ 4 นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งเกลือแร่จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่น โดยตลอดการทดลองทั้ง 5 วันพบว่าทั้งแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ผลของพีเอชเริ่มต้นและแหล่งเกลือแร่จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง และจากการวัดค่าพีเอชของเอนไซม์ในวันที่ 3 นี้ ค่าพีเอชจะอยู่ในช่วง 8 – 9

ข้อเสนอแนะ

1.ในการจะเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมไม่ว่าจะเป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นและแหล่งเกลือแร่ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะต้องคำนึงถึงค่าทางสถิติด้วย ซึ่งบางครั้งใน 2 ความเข้มข้นให้ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน จึงควรเลือกใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่าเพื่อลดต้นทุนการผลิต

2.จากรูปที่ 14 แสดงถึงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้แหล่งเกลือแร่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าแนวโน้มของค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่เพิ่มขึ้นจึงสันนิษฐานได้ว่า ถ้าความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่เพิ่มขึ้นมากกว่าที่จะทำการทดลองค่ากิจกรรมของเอนไซม์น่าจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งการทดลองนี้อาจใช้เป็นพื้นฐานในการทำการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมได้ค่าเท่ากับ 1.001 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด เมื่อใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 1.21 ยูนิต/มิลลิลิตรซึ่งผิดจากความเป็นจริง แต่เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติแล้วพบว่าค่าทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

4.ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสยังมีเชื้ออีกมากมายที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้จึงน่าจะมีการศึกษาถึงเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

5.แหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสับสเตรทในประเทศไทยยังมีอีกมากที่ราคาถูกหาง่ายแต่ยังไม่การนำมาศึกษาในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จึงน่าจะมีการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้อีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2542. ข้าว:วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.ภาควิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์: 25-26.

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

Aunstrup, K., Outtrup, H., Andersen, O., Dambmawn, C. 1972, Protease from alkalophilic Bacillus species , Ferment Technol. Today : 299 – 305

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

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 Trichoderma reesei for enzyme production. Appl.Environ. Microbiol.49:205.Drucker, H. 1972. Regulation of exocellular protease in Neurospora crassa : Induction and repression of enzyme synthesis. J . Bacterial 110 : 1041 – 1049.

Escobar, J. and Barnett, S . 1995. Synthesis of acid protease from Mucor meihie. : integrational of product and recovery. Process Biochemistry. 30 : 695 – 700.

Farley, P.C. and ikasari, L. 1992. Regulation of the secretion of Rhizopus oligosporus extracellular carboxyl proteinase .J. of General Microbial.138 : 2539 – 2544.

Ferroro, M.A., Castro, G.R.,Abate,C.,Baigori,M.D. and Sineriz,F. 1996. Thermostable alkaline protease of Bacillus licheniformis MIR 29: isolation , production and characterization. Microbiol.Biotechnol. 45:327-332.

Frankena, J., Konigstein, G.M., Vesveld, H.W., Stouthame, A.H. 1986. Effect of different limitationIn chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by Bacillus licheniformis. Appl. Microbial. Biotechnol. 24 : 106 – 112.

Giesecke, UE., Bierbanm, G., Rudde, H., Spohn, V., Wandrey, C. 1991.Production of alkaline proteases with Bacillus licheniformis in a controlled fed-batch process. Appl.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Microbiol. Biotechnol. 35 : 720 - 724

Heineken, F.G. and O'corner, R.J. 1972. Continuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease , neutral protease and α- amylase by Bacillus subtilis NRRI-B3411.J. Gen . Microbial. 73 : 35 – 44.

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

Hesseltine, C.W. 1987. Solid state fermentation an overveiw , int Biodeterior 23 : 79 – 89.

Horihoshi, K. 1971a. Production of alkaline protease in low – cost medium by alkalosphilic Microspanism . past I . Alkaline protease produced by Bacillus no. 221. Agric. Biol. chem . 35 : 1407 – 1414.

Irie, T.Z.1954. Studies on soy brewing by enzymes obtains by submerged culture of molds.Nippon Nogei kagaku kaishi 28 : 550 – 555.

Kalisz, HM. 1988. Microbial proteinase *In : Fietcher A (cd) Advances in biochem. eng / biol* . vol36 (Enzyme Studies) . Sprigers , Berlin Heidelberge New York , pp 3 – 6.

Lee, K.M., Lee, P.M., Siaw, Y.S. and Morihara, K. 1992. Effects of methanol and synthesis of aspartame precursor catalysed by Pseudomonas 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 Pseu aeru elastase . Journal of Chemical and Technical Biotechnology. 56 : 375-381.

Morimura, S., Kilda, K. and Sonoda,Y. 1994. Production of protease using wastewater from the manufacture of shochu. J. of Ferment.and Bioeng. 77 : 183 – 187.

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

Pauchon, V., Besson, C., Saulnier, J. and Wallach, J. 1993. Peptide synthesis catalysed by Pseudomonas aeruginosa elastase . Biotech nol. and Appl. Biochem. 17 : 217 – 221.

Puskas, A. and Elodi, Z. 1961. Examination of mold proteases , Budapesti Muszaki Egyest.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mezogaza . Kemi . Technol . Tausz . kozleman .26 : 31.

Sakamoto, M. and Shuzui, K. 1987. Studies on the enzymes produced by microorganism and their utilization. Hakko Kogalku Zasshi. 35 : 238 – 242.

Shigeru, M., Kenjikida and Yorikazu, S. 1994. Production of protease using wastewater from the manufacture of Shochu. J . of Fermentation and Bioengineering.77: 183 – 187.

Shimyo, A., Okasaki, M. and Terui, G. 1968. Kinetics studies on enzyme protease production by microbes. IV . some physiological basis for Kinetics studies on enzyme productionBy microbes. IV: 46 : 733 – 742.

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

Takami, H., Akiba, T. and Horikashi, K. 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from Bacillus sp. Nov. AH-101. Appl. Microbial. And biotechnol. 30 : 120 – 124.

Wang, H.L. and Hesseltine, C.W. 1965. Studies on the extracellular proteolytic enzymes of Rhizopus oligosporus. Canadian journal of microbiology. 11 : 727 – 732.

Yaichi Fukashima, itoh, H., Fukase,T. and Motai, H 1991. Stimulation of protease production by Aspergillus oryzae with oil in continuous culture. Appl. Microbial. Technol. 34 : 586 – 590.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารวุ้นเอียง PDA (potato dextrose agar)

ประกอบด้วย

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

วิธีการ

ต้มมันฝรั่งในน้ำเดือด กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่ได้มาจากน้ำตาลเดกซ์โทรสและผงวุ้น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในหลอดผ่าเกลียวขนาด 16 x150 มิลลิเมตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที (ขณะที่วุ้นยังไม่แข็งตัวให้นำหลอดมาวางเอียงไว้จนกระทั่งวุ้นแข็งตัวดี) หรือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูป โดยนำมาละลายในน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่ได้ระบุไว้ที่ข้างภาชนะ คนให้ละลายแล้วบรรจุในหลอดฝาเกลียว ทำเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน

ประกอบด้วย

เปปโตน	10 กรัมต่อลิตร
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1 กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	3 กรัมต่อลิตร

วิธีการ

นำสารทั้ง 3 ตัวมาผสมให้เข้ากันโดยละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ตามต้องการ จากนั้นนำไปปรับพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.0 (Singh และคณะ, 1994) แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 70 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

1.สารละลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์

ละลายเคซีน 1.0 กรัมในบัฟเฟอร์ 0.1 โมล พีเอช 7.0 ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร ต้มด้วยไฟอ่อนจนเคซีนละลาย เมื่อสารละลายเย็น ปรับความเป็นกรดด่างตามต้องการ จากนั้นปรับปริมาตรทั้งหมดให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์และควรเก็บไว้ในตู้เย็น

2.สารละลายไตรคลอโรอะเซติกแอซิด (TCA) 5 เปอร์เซ็นต์

ละลาย TCA 5.0 กรัมในน้ำกลั่น คนจนละลายหมด ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.4 โมล

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 42.396 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.Folin-Ciocalteu reagent 1 นอร์มอล

นำ Folin-Ciocalteu reagent 2 นอร์มอล มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 (สารละลายนี้ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

5.สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโรไทโรซีน

ละลายไทโรซีน 0.01 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร สารละลายนี้มีความเข้มข้นของไทโรซีน 1000ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

6.เอนไซม์โปรติเอส

7.ซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์

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

B: 0.2 โมล / ลิตร ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต(ละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

การเตรียม ซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ สามารถเตรียมให้ได้พีเอชที่ต้องการโดยใช้อัตราส่วน A:B ดังตารางที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่1 แสดงการเตรียมซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์

ผสม X มิลลิลิตร(ของสารละลายA)กับY มิลลิลิตร(ของสารละลายB) 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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและกราฟมาตรฐาน

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสนี้ได้ทำการดัดแปลงวิธีการของWangและ Hesseltine(1965)โดยมีวิธีการดังนี้

1.นำสารละลายเอนไซม์โปรติเอส 1 มล. รวมกับ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายเคซีน(พีเอช 4) นำ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมไตรคลอโรอะเซติกแอซิด 5 เปอร์เซ็นต์ 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

3.กรองนำส่วนใส 1.0 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.4 โมล/ลิตร 5.0 มิลลิลิตร เติม Folin-Ciocalteu reagent 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

4.วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

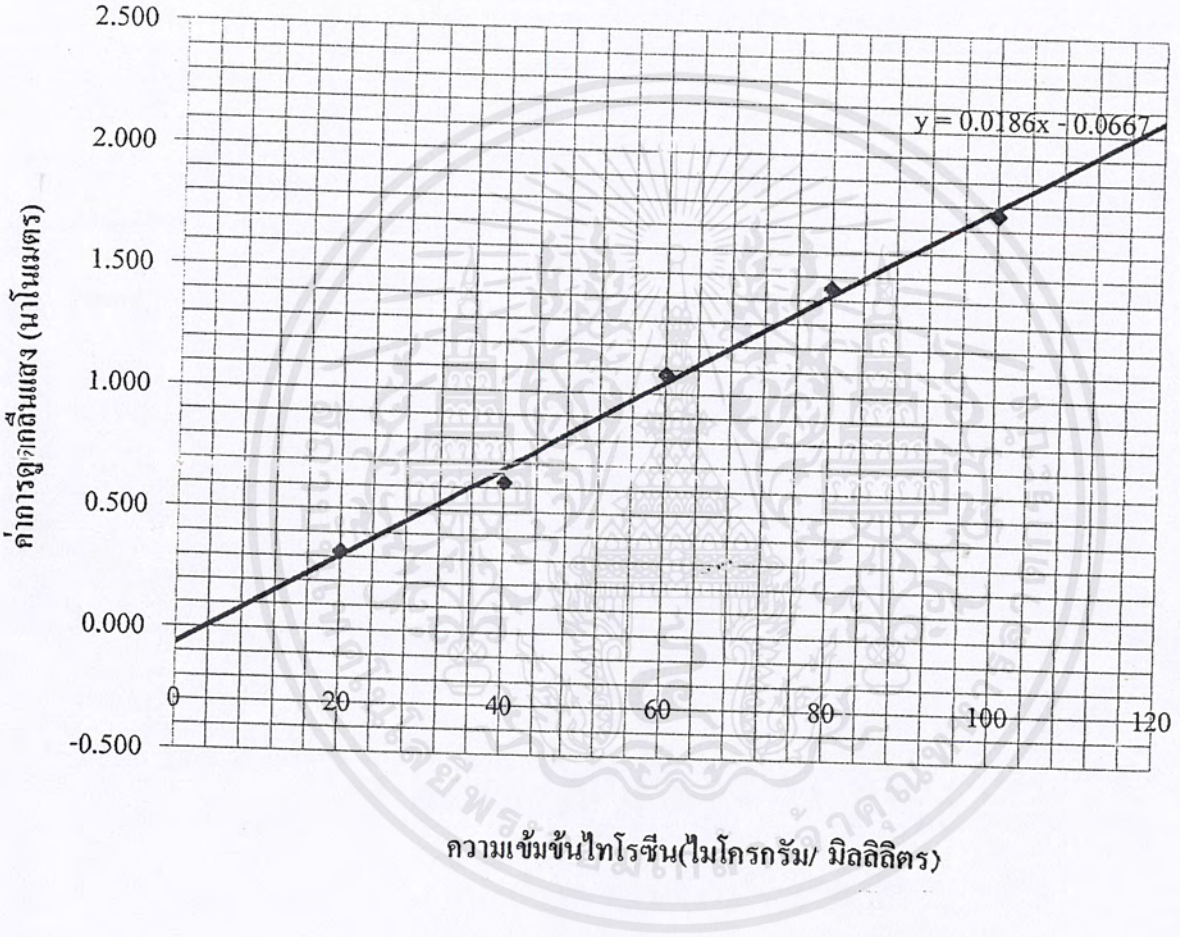
5.ทำหลอดคุม โดยเติมสารละลาย TCA 3.0 มิลลิลิตร ก่อน จากนั้นเติมสารละลายเคซีน 1.0 มิลลิลิตร สำหรับแบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

6.ทำกราฟมาตรฐานกรดอะมิโนไทโรซีน โดยใช้สารละลายไทโรซีนความเข้มข้น 0 , 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร นำสารละลายความเข้มข้นต่างๆมา 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3-4 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของไทโรซีนดังรูปที่ 22

7.การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิต/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{ไมโครกรัมของไทโรซีน X จำนวนเท่าของการเจือจาง}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลไทโรซีน X ระยะเวลาบ่ม X ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์แบบ DUNCAN

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส(ยูนิต/มิลลิลิตร)					
	วันที่ 2			วันที่ 3		
	รำข้าวเจ้า	รำข้าวสาลี	จมูกข้าวสาลี	รำข้าวเจ้า	รำข้าวสาลี	จมูกข้าวสาลี
1.0	0.656^{de}	0.635^{e}	0.633^{e}	0.686^{cde}	0.689^{cde}	0.842^{ab}
2.0	0.642^{de}	0.677^{cde}	0.751^{ab}	0.695^{abc}	0.760^{bcd}	0.832^{ab}
3.0	0.672^{cde}	0.686^{cde}	0.727^{a}	0.713^{cde}	0.844^{ab}	0.828^{de}

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส(ยูนิต/มิลลิลิตร)			
	วันที่ 2		วันที่ 3	
	เคซีน	เคซีน+ยีสต์สกัด	เคซีน	เคซีน+ยีสต์สกัด
0.6	0.403^{a}	0.446^{c}	1.188^{gh}	0.905^{gh}
0.8	0.423^{c}	0.421^{c}	0.901^{gh}	0.899^{gh}
1.0	0.392^{cde}	0.365^{cd}	0.956^{h}	0.860^{h}
1.2	0.433^{bc}	0.529^{ab}	0.889^{gh}	1.158^{egh}
1.5	0.649^{ab}	0.606^{a}	1.140^{defg}	1.210^{efgh}

* ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรแบบเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน

พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส(ยูนิต/มิลลิลิตร)	
	วันที่ 2	วันที่ 3
3.0	0.519^{c}	0.569^{de}
4.0	0.982^{ab}	0.907^{a}
5.0	0.658^{cd}	0.619^{bc}
6.0	0.596^{de}	0.595^{de}
7.0	0.591^{de}	0.545^{de}

ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อใช้ความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่แตกต่างกัน

ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส(ยูนิต/มิลลิลิตร)	
	วันที่ 2	วันที่ 3
0.3	0.764^{cd}	0.918^{ab}
0.4	0.813^{bc}	0.972^{a}
0.5	0.736^{cd}	0.921^{ab}
0.6	0.725^{d}	1.001^{a}

* ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรแบบเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้