



ปัญหาพิเศษ

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR3258 ในสภาวะอาหารแข็ง
(Utilization of Rice Bran as Substrate for Protease Production from *Aspergillus*
oryzae TISTR3258 by Solid-state Fermentation)

จัดทำโดย

นายชนาพัฒน์ ไกรกระโทก

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

Faculty of Agricultural Industry

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพฯ 10520

King Mongkut's Institute of Technology
Ladkrabang
Bangkok 10520 Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR3258 ในสภาวะอาหารแข็ง

(Utilization of Rice Bran as Substrate for Protease Production

from *Aspergillus oryzae* TISTR3258 by Solid-state Fermentation)

โดย

นายชนาพัฒน์ ไคร์กระโทก รหัส 43040643

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก

(ดร. บุญเทียม พันธุ์เฟื่อง)

26 ธ.ค. ๒๕๖๗

..... อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR3258 ในสภาวะอาหารแข็ง

(Utilization of Rice Bran as Substrate for Protease Production

from *Aspergillus oryzae* TISTR3258 by Solid-state Fermentation)



T096840



นายชนาพัฒน์ ไคร์กระโทก รหัสประจำตัว 43040643

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2546

รฟ.

ธ135ก

2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์

เลขหมู่..... 96840

เลขทะเบียน.....

วัน,เดือน,ปี.....

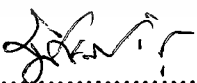
นายชนาพัฒน์ ไกรกระโทก : การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR3258 ในสภาวะอาหารแข็ง (Utilization of Rice Bran as Substrate for Protease Production from *Aspergillus oryzae* TISTR3258 by Solid-state Fermentation) โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง : กรรมการ: ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์, ผศ.ดร.ประภาพร ขอไพบุลย์ 35 หน้า

บทคัดย่อ

ปัญหาพิเศษเรื่องนี้เป็นการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในสภาวะอาหารแข็ง จากผลการศึกษาปริมาณสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสพบว่ารำข้าวเจ้าร้อยละ 0.05 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 509 หน่วย/กรัม ผลการศึกษาแหล่งสารอินทรีย์ใน ไตรเจนที่เหมาะสมพบว่าเปปโตินจากเคซีนให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 573.78 หน่วย/กรัม ผลการศึกษาแหล่งสารอินทรีย์ใน ไตรเจนที่เหมาะสมพบว่าแอมโมเนียมไนเตรท ความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 883.35 หน่วย/กรัม ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมพบว่าพีเอชที่ 4 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 1,033.98 หน่วย/กรัม และผลการศึกษาแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมพบว่าโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 696.11 หน่วย/กรัม

จึงวางใจมอบนี้ ไกรกระโทก.

ลายมือนักศึกษา



ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

๒๖ ธ.ค. ๒๕๕๗

วัน/เดือน/ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์บุญเทียมที่กรุณาสละเวลาให้ความรอบรู้ ความเข้าใจ กำลังใจที่ท่านคอยเติมเต็มพลังอยู่เสมอ ท่านเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาที่รับรู้ความรู้สึกของลูกศิษย์คนนี้เสมอ รวมถึงคำปรึกษาที่ล้ำค่าที่ยังคงอยู่ในใจข้าพเจ้าตลอดเวลา ข้าพเจ้าสัญญาว่าจะนำสิ่งที่ท่านพร่ำสอนมาปรับปรุงและพัฒนาตนเอง และเป็นคนดีทั้งกายและใจในสังคมนี้ให้ดีขึ้นเรื่อย ๆ

ขอขอบคุณตัวเองที่มีความอดทน พยายาม ที่เคยท้อแท้แต่ไม่เคยถอย

ขอบคุณเพื่อนกลุ่มที่เป็นกำลังใจและเป็นห่วงให้ไม่เคยห่างไกล

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบูรพาจารย์คนแรกของคุณก็คือคุณพ่อคุณแม่ที่มีแต่ความรัก ความเข้าใจ คอยช่วยเหลือด้านทุนทรัพย์ และกำลังใจที่ดีตลอดมา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 เอนไซม์โปรติเอส	3
2.2 การจำแนกเอนไซม์โปรติเอส	5
2.3 แหล่งที่พบเอนไซม์โปรติเอส	7
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	10
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	12
3.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์	13
3.2 การทำสปอร์แขวนลอย	13
3.3 การสกัดเอนไซม์	14
3.4 ศึกษาสภาวะต่างๆในการผลิตเอนไซม์	14
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	16
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน	16
4.2 ผลการศึกษาแหล่งอินทรีย์ใน โดโรเจน	17
4.3 ผลการศึกษาแหล่งแหล่งอินทรีย์ใน โดโรเจน	18
4.4 ผลการศึกษาแหล่งพีเอชเริ่มต้น	20
4.5 ผลการศึกษาแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสม	21
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	22
เอกสารอ้างอิง	23
ภาคผนวก	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติเอส	4
ตารางภาคผนวกที่	
ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงผลการศึกษาปริมาณสับสเตรทที่เหมาะสม	28
ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการศึกษาแหล่งของสารอินทรีย์ในโตรเจน เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	29
ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการศึกษาแหล่งของสารอินทรีย์ในโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	30
ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อ การผลิตเอนไซม์โปรติเอส	31
ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการศึกษาแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อ การผลิตเอนไซม์โปรติเอส	35
ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	33
ตารางภาคผนวกที่ 7 การศึกษาปริมาณสับสเตรท	33
ตารางภาคผนวกที่ 8 การศึกษาแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนที่เหมาะสม	33
ตารางภาคผนวกที่ 9 การศึกษาแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน	34
ตารางภาคผนวกที่ 10 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม	34
ตารางภาคผนวกที่ 11 การศึกษาแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1 ภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>A.oryzay</i> TISTR 3258	12
ภาพที่ 2 แสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ <i>Aspergillus oryzae</i> TISTR 3258 ในปริมาณสับสเตรตต่าง ๆ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน	13
ภาพที่ 3 แสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ <i>Aspergillus oryzae</i> TISTR 3258 ในอาหารที่เติมสารอินทรีย์ในโตรเจน ชนิดต่าง ๆ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน	14
ภาพที่ 4 แสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ <i>Aspergillus oryzae</i> TISTR 3258 ในอาหารที่เติมสารอนินทรีย์ในโตรเจน ชนิดต่าง ๆ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน	15
ภาพที่ 5 แสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ <i>Aspergillus oryzae</i> TISTR 3258 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างกัน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน	16
ภาพที่ 6 แสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ <i>Aspergillus oryzae</i> TISTR 3258 ในอาหารที่มีแหล่งเกลือแร่ต่างกัน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน	17

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

เอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ด้วยน้ำ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ เอ็กโซเพปติเดส (exopeptidase) และเอนโดเพปติเดส (endopeptidase) โดยเอ็กโซเพปติเดส คือเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะจากปลายด้านอะมิโนหรือปลายด้านคาร์บอกซีของสับสเตรท จากตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาที่ปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซี ทำให้สามารถแบ่งเอ็กโซเพปติเดสได้เป็นอะมิโนเพปติเดส (aminopeptidase) และคาร์บอกซีเพปติเดส (carboxypeptidase) ส่วนเอนโดเพปติเดส คือเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ภายในสายของคพลิเพปไทด์ทางปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซี ซึ่งกลุ่มของอะมิโน และคาร์บอกซีอิสระจะมีผลกระทบในทางลบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เอนโดเพปติเดสสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อยตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยา คือซีรีนโปรติเอส หรืออัลคาไลน์โปรติเอส (serine protease หรือ alkaline protease) แอสปาติกโปรติเอสหรือแอซิดโปรติเอส (aspartic protease หรือ acid protease) ซีสเตอีนโปรติเอสหรือไทออลโปรติเอส (cystein protease หรือ thiol protease) และเมทัลโลโปรติเอส (metalloprotease) (Reo *et.al.*,1998)

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมผงซักฟอก และอุตสาหกรรมผลิตยา นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์ในการกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีชีวภาพอีกด้วย เอนไซม์โปรติเอสสามารถพบได้จากแหล่งต่าง ๆ หลายแหล่งคือ พืช เช่น ปาเปน (papain) จากยางของผลมะละกอหรือโบรมิเลน(bromelain) จากสับปะรด จากสัตว์ เช่น ทริปซิน (trypsin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารหรือเพปซิน(pepsin) ในกระเพาะสัตว์มีกระดูกสันหลัง และจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น *Aspergillus niger* F 2078 (Singh and Ghosh,1994),*Bacillus* sp.PS 719(Santinanalert *et.al.*,1998) *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541 (Lu and Chang , 1996) *Streptomyces megasporus* (Patke and Dey,1998) เป็นต้น เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากระยะเวลาการผลิตสั้น ผลิตได้ปริมาณมาก และราคาถูก ซึ่งการหมักในอาหารแข็งโดยใช้เชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์มีข้อดีหลายประการ ตัวอย่างเช่น ทำการสกัดทำได้ง่าย เก็บเกี่ยวผลผลิตได้เร็ว และมีอันตรายต่ำ

จากความสำคัญ และประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอสดังกล่าวจึงมีความจำเป็นในการศึกษาการผลิต และคุณสมบัติของเอนไซม์เพื่อนำมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์สูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง

1.2.2 ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3258

1.3 ขอบเขตของการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง โดยศึกษาถึงสภาวะต่าง ๆ เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อดังกล่าว ได้แก่ สับสเตรท แหล่งไนโตรเจนทั้งชนิดที่เป็นอินทรีย์ และอนินทรีย์ในโตรเจน พีเอช เริ่มต้น และเกลือแร่ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษา และพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์โปรติเอส (Protease)

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายโปรตีน มีการค้นพบเอนไซม์นี้มากกว่าร้อยปี (Mihalnyi, 1972) โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ระบบการย่อยในกระเพาะอาหารสัตว์ คือ Spallazani (1973) ได้นำน้ำย่อยจากกระเพาะอาหารสัตว์ออกมาศึกษาทดลองการย่อยอาหารภายนอกสัตว์เป็นครั้งแรก และ Schwann (1836) ได้สกัดสารจากเมือกของกระเพาะอาหารสัตว์มาศึกษา และให้ชื่อว่าเพปซิน (Pepsin) ซึ่งมาจากภาษากรีกแปลว่าการย่อย (Digestion) เพปซินนี้เป็นเอนไซม์ชนิดที่สองในโลกที่พบหลังจากเอนไซม์อะมัยเลส

หลังจากมีการค้นพบเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากระบบทางเดินอาหารสัตว์แล้วยังพบในเนื้อเยื่ออื่น ๆ รวมทั้งมีการค้นพบในพืชและจุลินทรีย์ จำพวกราและแบคทีเรียต่าง ๆ อีกด้วย (Matsubara and Feder, 1971) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากพืชชนิดแรกคือ ปาเปน (papain) ในยางมะละกอ (Wurtx and Bouchut, 1879) และเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (Guntelberg and Ottesen, 1954)

การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ มีลักษณะมาใช้งานและแหล่งเอนไซม์ที่ใช้ต่าง กัน ตัวอย่างเช่น Rhom (1905) ได้นำเอนไซม์ pancreatic protease มาใช้ในการฟอกหนัง และกำจัดขนที่ติดอยู่กับหนัง และได้เริ่มนำมาใช้เป็นสารซักล้าง (detergents) เป็นครั้งแรกเมื่อ ค. ศ. 1913 แต่ความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์ และความคงทนต่อสภาวะที่เป็นด่างยังไม่ดี จนกระทั่ง ปี 1959 บริษัทในประเทศสวีเดนได้ผลิตเอนไซม์ โปรติเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นผลิตภัณฑ์ภายใต้ชื่อทางการค้าภายใต้ชื่อทางการค้า Bi0-40 ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีกว่า pancreatic protease และบริษัท NOVO ได้ผลิตเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* โดยเอนไซม์มีชื่อเรียกกันทั่วไปว่า Subtilin Carlsberg

เอนไซม์โปรติเอสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เพปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนเป็นกรดอะมิโนในระบบการย่อยอาหารของคน และยังมีความสำคัญต่อการแข็งตัวของเลือดด้วย นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในไฟโกโซติกเซลล์ของเลือดที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนจากภายนอก นอกจากนี้ยังมีไลโซโซม (lysosome) ของเซลล์ที่มีปริมาณเอนไซม์โปรติเอสจำนวนมากได้แก่ คาพิซินซึ่งย่อยสลายโปรตีนที่ระดับเซลล์และมีผลต่อมะเร็ง เอนไซม์ชนิดนี้พบในเนื้อเยื่อสัตว์ทั่วไป ได้มีการนำเอาเอนไซม์โปรติเอสไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น รัญพืช ชุป สารปรุงรส โปรตีนไฮโดรไลเซต และอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหรณรอาหารสัตว์ (ปรานี อ่านเปรื่อง , 2533) และการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติเอส (กัลยกร วงศ์กาฬสินธุ์ (2540)

ชนิดของอุตสาหกรรม	ตัวอย่างการนำไปใช้
การซักล้าง ทำความสะอาด	สารเติมต่างในการผลิตสารซักฟอก
การฟอกหนัง	การทำให้ขนน้อยลง
การย่อยสลาย	ใช้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซต จากถั่วเหลือง เนื้อหรือปลา ซึ่งใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ป่วย การทำให้เนื้อนุ่ม
การสังเคราะห์สารอินทรีย์	ใช้สังเคราะห์แอสปาร์แทม (aspartame)
การทำโรงสี	ใช้สังเคราะห์กลูเตน (gluten)
เภสัชกรรม	ใช้ผลิตยาช่วยย่อยอาหาร การบำบัดรักษาแผลไฟไหม้เป็นหนอง
ผลิตภัณฑ์นม	ใช้เพื่อการทำความสะอาดระบบกรอง ในกระบวนการผลิต
อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง	การทำให้ไวน์และเบียร์มีความใสเมื่อเย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจำแนกเอนไซม์โปรติเอส

การจำแนกเอนไซม์โปรติเอสตามลักษณะของสับสเตรทมี 2 ชนิดคือ โปรติเนส (protease) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์ของสายโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ออกเป็นสายสั้น ๆ และ เพปติเดส (peptidase) ทำหน้าที่ย่อยสลายเพปไทด์สายสั้น ๆ ให้มีขนาดเล็กลง หรือเป็นกรดอะมิโน (Dalling, 1972)

การจำแนกเอนไซม์โปรติเอสตามลักษณะการเกิดปฏิกิริยามี 2 ชนิด คือ

1. เอ็กโซเพปติเดส (Exopeptidase) คือเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะจากปลายด้านอะมิโนหรือปลายด้านคาร์บอกซี ของสับสเตรท จากตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาที่สามารถแบ่งเอ็กโซเพปติเดสได้เป็นอะมิโนเพปติเดสและคาร์บอกซีเพปติเดส (Reo *et. al.*, 1998)

1.1 อะมิโนเพปติเดส (Aminopeptidase) เกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งปลายอะมิโนอิสระ (N-terminal) ของสายโพลีเพปไทด์ได้กรดอะมิโน โมเลกุลเดี่ยว ไคเพปไทด์และไตรเพปไทด์ อะมิโนเพปติเดสสามารถพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย และรา โดยทั่วไปอะมิโนเพปติเดสจะเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) แต่มีรายงานว่า พบอะมิโนเพปติเดสผลิตออกมาภายนอกเซลล์จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* (Labble *et. al.*, 1974)

1.2 คาร์บอกซีเพปติเดส (Carboxypeptidase) เกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งปลายคาร์บอกซี (C-terminal) ของสายโพลีเพปไทด์แล้วให้กรดอะมิโน โมเลกุลเดี่ยวหรือไคเพปไทด์ คาร์บอกซีเพปติเดสสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามลักษณะของกรดอะมิโนบริเวณเร่งของเอนไซม์คือ ซีรีนคาร์บอกซีเพปติเดส (serinecarboxy peptidase) เมทัลโลคาร์บอกซีเพปติเดส (metallo carboxypeptidase) และซิสเตอีนคาร์บอกซีเพปติเดส (cystein carboxypeptidase)

2. เอนโดเพปติเดส (Endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ภายในสายของโพลีเพปไทด์ทางปลายอะมิโน และปลายคาร์บอกซี ซึ่งกลุ่มของอะมิโนและคาร์บอกซีอิสระจะมีผลกระทบในทางลบต่อกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดเพปติเดส สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อยตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยาคือ ซีรีนโปรติเอสหรืออัลคาไลน์โปรติเอส แอสปาร์ติก โปรติเอส หรือ แอสพาติกโปรติเอสหรือแอซิดโปรติเอส ซีสเทอีนโปรติเอสหรือไทออลโปรติเอส และเมทัลโปรติเอส (Rao *et. al.*, 1998)

2.1 ซีรีนโปรติเอส (serine protease) หรืออัลคาไลน์ เป็นโปรติเอส (alkaline protease) จะมีซีรีนเรซิดิว (serine residue) อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์สามารถยับยั้งการทำงานด้วยการเติมสาร di-isopropyl fluorophosphate (DEP) และ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) แต่จะทนต่อภาวะที่มี ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) (Priest, 1977) และ Sloma *et. al.* (1988) พบว่า PMSF เข้มข้นเพียง 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสได้ แคลเซียม อีออน ช่วยให้อะมิโนโปรติเอสมีความเสถียรมากขึ้น เอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้มีความเสถียรในช่วงพีเอช 5.0-9.0 พบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั่วไปทั้งในแบคทีเรีย และรา เป็นเอนไซม์โปรติเอสที่มีคุณสมบัติคล้ายกับทริปซินและโคโมทริปซินในสัตว์ มักพบอับคาไลน์โปรติเอสในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* เป็นส่วนใหญ่ อัลคาไลน์โปรติเอสเป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดี และนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารชักฟอก การฟอกหนัง และอุตสาหกรรมอาหารที่มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจมากที่สุด (กัลยากร วงศ์กาฬสิน, 2540)

ตัวอย่างแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสเช่น *Bacillus* spp. No 221 *Bacillus* spp. GX6638, *Bacillus* spp AH 101 (Horikoshi, 1971; Don, 187 และ Hideto, 1990)

2.2 เมทัลโลโปรติเอส (metallo protease) หรือนิวทรัลโปรติเอส เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมโลหะสังกะสี อยู่ภายใต้โครงสร้าง สามารถถูกยับยั้งการทำงานโดยการเติมสารจำพวก chelating agent เช่น EDTA และ Sloma *et al.*(1988) พบว่า EDTA เข้มข้นเพียง 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของโปรติเอสชนิดนี้ได้ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35,000-45,000 คาลตัน มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ของโปรตีนที่พีเอชประมาณ 7.0 แต่จะเสถียรในช่วงพีเอช 5.0-10.0 และจะเสถียรมากขึ้นเมื่อมีแคลเซียมไอออน เมทัลโลโปรติเอสจะรวมถึงเอนไซม์จากแหล่งต่าง ๆ เช่น คอลลาจีเนส(collagenases) จากสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เป็นต้น

2.3 แอซิดโปรติเอส (acid protease) จำทำปฏิกิริยาจำเพาะกับกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นวงอะโรมาติก เช่น ไทโรซีน ทริปโตเฟน ฟีนิลอะลานิน ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารจำพวกไดอะโซลิโคน แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารจำพวก EDTA และ DFP เอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 3.0-4.0 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000-40,000 คาลตัน มีค่า isoelectric point ต่ำ และโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์เพปซินและเรนินในสัตว์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การหมักถั่วเหลือง ข้าว และธัญพืช เพื่อเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมผลิตซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว รวมไปถึงอุตสาหกรรมขนมอบ และเนยแข็ง

2.4 ซิสเตอินโปรติเอส (cystein protease) สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชเป็นกลาง ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารจำพวก sulphydryl reagent ได้แก่ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) หรือกรดอะมิโนซิสเตอินร่วมอยู่ด้วย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 -50,000 คาลตัน

แหล่งที่พบเอนไซม์โปรติเอส

1. เอนไซม์โปรติเอสจากพืช สามารถพบได้ในพืชหลายชนิดได้แก่ ปาเปน (papain) เป็นเอนไซม์โปรติเอสจากพืชที่เป็นที่รู้จัก และมีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นเวลานาน สามารถสกัดได้จากยางของผลมะละกอ (*Carica papaya*) ปาเปนจัดอยู่ในกลุ่มของซิสเตอีน โปรติเอส มีน้ำหนักโมเลกุล 21 กิโลดาลตัน พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 5.5-7 มีค่า พีไอคือ 9.6 เสียสภาพธรรมชาติที่พีเอชต่ำกว่า 4 สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส ถูกยับยั้งกิจกรรมโดย H_2O_2 , O_2 โลหะหนักบางชนิด เช่น Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} (Rao *et. al* 1998)

โบรมิเลน (bromelain) สามารถเตรียมได้จากต้นและน้ำของสับปะรด จัดเป็นซิสเตอีนโปรติเอสมีน้ำหนักโมเลกุล 33 กิโลดาลตัน พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 5-9 และ 50-55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Rao *et. al* 1998)

ฟิคซิน (ficin) พบมากในผลมะเดื่อ มีน้ำหนักโมเลกุล 26 กิโลดาลตัน พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 6.7 แต่สามารถทนต่อพีเอชได้ 3.5-9 ได้สูง และจะเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ฟิคซินจะถูกยับยั้งการทำงานโดยโลหะหนัก และกรดซอร์บิกที่มีความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ (Linsmaier-Bednar, 1998)

นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์โปรติเอสอื่น ๆ ในพืชชนิดต่าง ๆ เช่น แอคตินิไดน (actinidin) พบใน chinese hoosberry ที่มีความใกล้เคียงกับปาเปน คิวเคอร์บิท พบใน *Cucumis utilisissimus* ในระยะผลสุกงอม พบในวงศ์ป่านศรนารายณ์ (Dalling, 1972)

2. เอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์ สามารถพบได้มากมาย และคุ้นเคยกัน ได้แก่

ทริปซิน (trypsin) เป็นเอนไซม์หลักของระบบการย่อยอาหารในลำไส้ ทำหน้าที่ย่อยอาหารที่เป็นโปรตีน จัดเป็นซีรีน โปรติเอส ทริปซินถูกสร้างโดยตับอ่อนในรูปทริปซิโนเจน แล้วถูกเปลี่ยนให้เป็นทริปซิน มีน้ำหนักโมเลกุล 23.3 กิโลดาลตัน พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 7-9 และเสถียรที่พีเอช 3.0 ถูกยับยั้งการทำงานโดยอับคาไลนดีจรีเอเจนท์ เช่น DEP หรือ PMSF (Rao *et. al.*, 1998)

ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) พบได้จากการสกัดตับอ่อนของสัตว์ จัดเป็นซีรีนโปรติเอส และคล้ายกับทริปซิน มีน้ำหนักโมเลกุล 23.8 กิโลดาลตัน เสถียรที่พีเอชช่วง 2.5-6 ที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง และที่ 40 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ถูกยับยั้งกิจกรรมโดยโลหะหนัก DFP PMSF (Linsmaier-Bednar, 1998)

เพปซิน (pepsin) เป็นแอซิดโปรติเอสที่พบในกระเพาะของสัตว์มีกระดูกสันหลังทุกชนิดมีน้ำหนักโมเลกุล 34.5 กิโลดาลตัน พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 1-2 และเสถียรที่พีเอช 2.5 และปฏิกิริยาจะหยุดชะงักที่พีเอชเท่ากับ 6 (ปราณี อานเป็รื่อง, 2535)

เรนินหรือเรนเนท (rennin rennet, chymosin) คือเอนไซม์ที่คล้ายกับเพปซิน พบในกระเพาะของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มี 4 กระเพาะ มีน้ำหนักโมเลกุล 30.7 กิโลดาลตัน พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 และจะสลายตัวที่พีเอชต่ำกว่า 3.5 หรือ สูงกว่า 6.0 จะเริ่มเสถียรภาพ เรนินจะเสถียรมากขึ้นเมื่ออยู่ในกลีเซอรอล ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมนม (ปราณี อำนเป็รื่อง, 2535)

3. เอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ พบทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดังนี้

3.1 เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย มีหลายชนิดด้วยกันที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดังที่มีการรายงานไว้เช่น Lu and Chang (1996) รายงานว่าจากการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541 พบว่าเป็นเอนไซม์ชนิดที่มีความทนต่อความร้อนได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมคือ 7.0 และถูกยับยั้งกิจกรรมโดย EDTA

Patke and Dey (1998) รายงานว่าผลของการศึกษาการสร้างโปรติโพลิดิกเอนไซม์จาก *Streptomyces megasporus* SDF 4 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซิสที่ทนต่ออุณหภูมิและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีกิจกรรมในแต่ละช่วงพีเอช และอุณหภูมิที่กว้าง คือที่พีเอช 6-12 และ 25-85 องศาเซลเซียส ตามลำดับแต่จะมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 8 หรือ 10 และ 55 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งขึ้นอยู่กับแคลเซียมไอออน โดยเอนไซม์จะมีความเสถียรต่อความร้อนเพิ่มขึ้นเมื่อเติมแคลเซียมไอออน 0.01 โมล/ลิตร เอนไซม์นี้ถูกยับยั้งด้วย EDTA และ PMSF สรุปได้ว่าเป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดซีรีน โปรติเอสและต้องการไอออนของโลหะ

Santinanalert et. Al. (1998) รายงานการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. PS 791 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณน้ำพุร้อน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่พีเอช 9-11 และอุณหภูมิเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ที่ผลิตนี้ มีความจำเพาะต่อเคซีนมากที่สุด และถูกยับยั้งด้วย 3, 4 ไดคลอโรโรไอโซคูมาริน 10 มิลลิโมลาร์

3.2 เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา มีหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้เช่น Li et. al. (1997) ศึกษาการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจาก *Thermomyces langinosus* ซึ่งเชื้อราที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงพบว่าทั้ง 500 สายพันธุ์ของเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยเอนไซม์ที่ถูกสร้างเป็นชนิดซีรีน โปรติเอส ที่สามารถคงตัวต่ออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสได้ร้อยละ 100 และมี $t_{1/2}$ ที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส 160 และ 60 นาทีตามลำดับ มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 70 องศาเซลเซียสและพีเอชเท่ากับ 5 และ 9 มีความเสถียรต่อพีเอชในช่วงพีเอช 4-11

Bidochka and Khachatourians (1987) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Beauverria bassiana* GK 2016 ซึ่งเจริญในอาหารที่มีเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน โดยเอนไซม์ที่สร้างขึ้นมีมวลโมเลกุล 35000 คาลตัน มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 8.8 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะเสถียรภาพธรรมชาติที่ 50 องศาเซลเซียส และถูกยับยั้งกิจกรรมด้วย PMSF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aleksieva and Peeva (2000) รายงานผลการศึกษากาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยเชื้อรา *Humicola lutea* 120-5 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ และแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบแอร์ลิฟท์เปรียบเทียบการผลิตระหว่างเซลล์ของเชื้อรา และหัวเชื้อในถังหมัก พบว่าเอนไซม์แอซิดโปรติเอสให้ผลผลิตอย่างต่อเนื่องนาน 14 วัน มีอัตราการเจือจางที่เหมาะสมคือ 0.05 ต่อชั่วโมง มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุดคือ 90 หน่วยต่อมิลลิกรัม และผลผลิตของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 38 หน่วยต่อมิลลิกรัมกลูโคส

Pekkarinen *et. al* (2000) รายงานการศึกษากาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดย *Fusarium culmorum* พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือแร่ และกลูเตน และ *F. poae* สามารถผลิตเอนไซม์แอซิดโปรติเอสได้ในพีเอชที่เหมาะสมคือ 3.0 และ 3.5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูเตน

3.3 เอนไซม์โปรติเอสจากไวรัส ไวรัสมิมีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างโปรตีนซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเอดส์ มะเร็ง โดยจะพบชนิด ซีรีน แอสปาร์ติก และซีเตอินเพปติเดส ได้ในไวรัสหลายชนิดซึ่งเอนไซม์เพปติเดสที่สร้างจากไวรัสเป็นเอนโคเพปติเดสแอสปาร์ทิลโปรติเอส มีความจำเพาะต่อการรวมตัวและการลอกแบบ ของไวรัส โดยในปัจจุบันมีการค้นคว้าวิจัยเพื่อมุ่งเน้นไปยังโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โปรติเอสของไวรัส และการมีปฏิกิริยาต่อตัวยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อการออกแบบตัวยับยั้งที่สามารถต่อต้านและทำลายโรคเอดส์ (Rao *et. al* 1998)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

แหล่งคาร์บอน

เชื้อราทุกชนิดต้องการแหล่งคาร์บอนเพื่อให้ได้พลังงานในการดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ แหล่งคาร์บอนได้แก่ น้ำตาล พอลิแซคคาไรด์ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน Zcarlile and Watkinson, (1994) แหล่งคาร์บอน โดยเฉพาะกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อ จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย กลูโคสในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญที่พอเหมาะไม่มากเกินไป การสร้างเอนไซม์ของเชื้อก็ดำเนินไปตามปกติ (สุพจน์ ไร่เทียมวงศ์, 2530) แต่เมื่อปริมาณของกลูโคสสูงเกินไปทำให้เกิดการยับยั้งแบบอะตาบอไลต์โดยกลูโคส

Saakkamoto and shuzui (1975) พบว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *A. oryzae* และ *A. sogo* เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์ มักผลิตด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวหรืออาหารแข็งแต่อย่างไรก็ตามทั้ง 2 ระบบก่อให้เกิดปัญหาบางประการ เช่น การเพาะเลี้ยงอาหารเหลวเกิดการปนเปื้อนโดยเชื้อแบคทีเรีย และให้ผลผลิตต่ำมาก ซึ่งการปนเปื้อนสามารถเกิดขึ้นได้ง่ายและบ่อยครั้ง และพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบคิโมสแตท ไม่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตโดยเชื้อราภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

Heineken and O coner (1972) และ Ferreo et. al. (1996) พบว่าการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดคือเคซีน ในขณะที่กลูโคส กลีเซอรอล ซูโครส มอลโทส และไซโลสจะยังการสร้างเอนไซม์ถึงแม้ว่าจะมีการเจริญของเชื้ออยู่ก็ตามและพบว่าการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจะเกิดขึ้นในระยะการเจริญช่วงเอ็กโปเนนเชียลช่วงท้าย และช่วงที่มีการเจริญคงที่

Germermia et. al., (1993) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Trichoderma hazianum* ในอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันพบว่าในอาหารที่เติมมมเบรนนของ *T. varide* จะสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด 56.23 หน่วยต่อมิลลิลิตร และยังพบว่าอาหารที่เติมกลูโคสหรือพอร์ติเมอร์ของกลูโคสจะไม่มีการชักนำให้สร้างเอนไซม์โปรติเอส

Paterson et. al (1994) ได้ศึกษาการชักนำการสร้างเอนไซม์คโปรติเอสจากเชื้อรา *Metarizium anisopliae* ในอาหาร basal salt ที่เติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ได้แก่ กิวติเคิล อีลาสติน คอลลาเจน อัลบลูมิน เจลาติน เซลลูโลส และไซแลน พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ โปรติเอสสูงสุดในอาหารที่มีกิวติเคิลได้ 146.45 หน่วยต่อมิลลิลิตร

แหล่งไนโตรเจน

การสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนมีความสัมพันธ์กับแหล่งไนโตรเจนโดยการสร้างเอนไซม์จะถูกยับยั้ง เมื่อมีกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ในอาหาร โดยที่กรดอะมิโนแต่ละชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ได้แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนของเชื้อด้วย กรดอะมิโนหลายชนิดอยู่รวมกันมีผลต่อการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ได้มากกว่ากรดอะมิโนชนิดเดียว นอกจากนี้บทบาทในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งการสร้างเอนไซม์แล้วยังพบว่าแหล่งไนโตรเจนมีส่วนในการกระตุ้นช่วยให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วยในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ (Doi, 1973)

Farley and Ikasari (1992) เลี้ยงเชื้อ *Rhizopus oligosporus* เพื่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิลโปรดิวเนส พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน และเติมกลูโคส 295 มิลลิโมลลาร์ และแมกนีเซียม 10.5 มิลลิโมลลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าจาก 45.9 หน่วยต่อมิลลิลิตรเป็น 95.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร

พีเอช

พีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การหมักในระยะแรกพีเอชของการเลี้ยงเชื้อจะเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงอาจเกิดมาจากการย่อยสลายโปรตีน และสารประกอบไนโตรเจน ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นต่างอื่น ๆ ออกมา หรือมีการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์ขึ้นเป็นผลให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมให้ค่าพีเอชในอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ บัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา (Wang and Hesseltime, 1965)

อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์โปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน เช่น เอนไซม์โปรตีนเอสจาก *A. oryzae* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นต้น

แหล่งแร่ธาตุ

Wang (1967) พบว่าอ็อกซิจินจะช่วยให้เอนไซม์โปรตีนเอสในอาหารเหลว เพราะอ็อกซิจินของเกลือจะไปทำลายพันธะระหว่างเอนไซม์กับผิวหน้าของไมซีเลียม ทำให้เอนไซม์ถูกปลดปล่อยออกมาเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

สารเคมี

สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. โปเตโตเด็กโตรสอาการ์ (PDA)
2. โปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
3. โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
4. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
5. โซเดียมไนเตรท (NaNO_3)
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
7. โปแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)
8. แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)
9. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
11. ผงวุ้น (Agar)
12. เปปโตนจากเคซีน (peptone from casein)
13. เคซีน (casein)
14. ยีสต์สกัด (yeast extract)

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

1. เคซีน (casein)
2. ไตรคลอโรอะซิติกเอซิด (TCA)
3. กรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosin)
4. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
3. ตู้เย็น
4. ตู้อบความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เครื่องเขย่า
6. เครื่องวัดพีเอช
7. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
8. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
9. เครื่องหมุนเหวี่ยง
10. หม้อนึ่งความดัน
11. ปิเปต
12. Haemocytometer
13. หลอดทดลอง
14. ขวดรูปหมผู้
15. ปิกเกอร์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Aspergillus oryzae TISTR 3258 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

วิธีการทดลอง

3.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เลี้ยง *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 บนอาหารวุ้นแป้ง Potáto Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเกิดสปอร์เต็มก็นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258

ถ่ายเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 จากอาหารวุ้นแป้ง PDA ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเกิดสปอร์เต็มก็จึงเติมน้ำกลั่น (ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที) แล้วขูดสปอร์ให้หลุดออกจากเส้นใยด้วยลูป(loop) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กรองเส้นใยออกโดยผ่านสำลี นับจำนวนสปอร์ด้วยที่นับเม็ดเลือด(haemocytometer) ให้สปอร์มีปริมาณเท่ากับ 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การสกัดเอนไซม์

เก็บตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน เพื่อนำมาสกัดเอนไซม์โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ) ลงในพลาสติกที่ทำกรหมัก นำพลาสติกไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที นำน้ำหมักที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวีเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมสีเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ด้วยสีย้อมแลคโตเฟินอลคอตตอนบลู (Lactophenol cotton blue stain) ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

3.5.1 การศึกษาปริมาณสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ปริมาณสับสเตรทที่ใช้มี 3 ระดับ คือ ร้อยละ 0.05 , 0.03 และ 0.02 เติมน้ำกลั่นในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมอาหารสูตรพื้นฐาน (ภาคผนวก ก) โดยมีน้ำกลั่นพีเอช 4 เป็นชุดควบคุม เพื่อปรับความชื้นอาหารให้เป็นร้อยละ 70 ینگม่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เติมน้ำกลั่นจากข้อ 3.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในพลาสติก ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน ทำการวัดพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.5.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

3.5.2.1 การศึกษาแหล่งของสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากข้อ 3.5.1 เมื่อทราบปริมาณสับสเตรทที่เหมาะสมแล้ว นำมาศึกษาแหล่งของสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ต่าง ๆ กัน ได้แก่ เปปโตนจากเคซีน (peptone from casein) เคซีน (casein) และยีสต์สกัด (yeast extract) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมีแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานเป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน ทำการวัดพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.2 ศึกษาแหล่งของสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากข้อ 3.5.2.1 เมื่อทราบแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมแล้ว นำมาศึกษาแหล่งของสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยการเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ต่าง ๆ กัน ได้แก่ โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) และ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมีแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานเป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน ทำการวัดพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.5.3 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากข้อ 3.5.2 เมื่อทราบแหล่งอินทรีย์ และแหล่งอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสแล้ว นำมาศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมโดยปรับพีเอชของอาหารเป็น 2,3 และ 4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เติมสปอร์แขวนลอยจากข้อ 3.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในพลาสติก ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน ทำการวัดพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.5.4 การศึกษาผลของเกลือแร่ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากข้อ 3.5.2 และ 3.5.3 เมื่อทราบแหล่งอินทรีย์ และแหล่งอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสแล้ว และพีเอชที่เหมาะสมแล้ว นำมาศึกษาแหล่งเกลือแร่ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ทำโดยเติม โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เติมสปอร์แขวนลอยจากข้อ 3.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในพลาสติก ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน ทำการวัดพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์

1. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258

จากการย้อมสี *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ด้วยสีข้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลูแล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่า เส้นใย (hypha) และกระจุกใยรา (mycerium) มีลักษณะเป็นแบบเชพเทต และแตกแขนง ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบโคนีเดีย (conidia) ที่ปลายของเส้นใย สปอร์เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ มีรูปร่างกลมสีดำ (ภาพที่ 1)

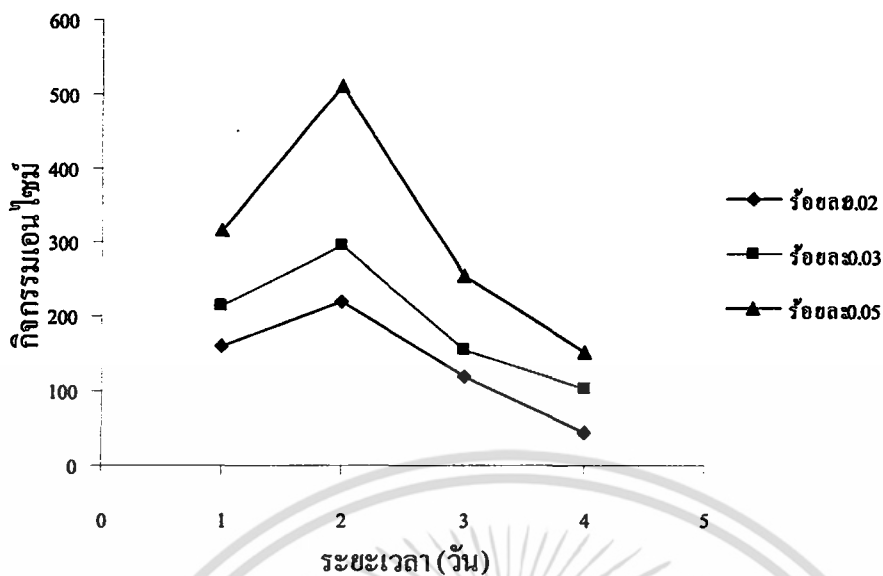
2. ผลการศึกษาสัณฐานที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในปริมาณสัณฐานที่ต่างกัน คือ รำข้าวเจ้าร้อยละ 0.05, ร้อยละ 0.03 และร้อยละ 0.02 จากการทดลองพบว่าปริมาณรำข้าวเจ้าร้อยละ 0.05 ในสัณฐานที่ให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด คือ 509.7 หน่วย/กรัม รองลงมาคือรำข้าวเจ้าร้อยละ 0.03 และรำข้าวเจ้าร้อยละ 0.02 โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 294.17 และ 218.44 หน่วย/กรัม ดังแสดงในภาพที่ 2 และพบว่ารำข้าวเจ้าร้อยละ 0.05 เป็นสัณฐานที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งจากปริมาณสัณฐานอื่น ๆ ดังนั้นจึงใช้รำข้าวเจ้าร้อยละ 0.05 เป็นสัณฐานในการทดลองเพื่อหาสภาวะอื่น ๆ ต่อไป



ภาพที่ 1 ภาพแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 แสดงกิกกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในปริมาณสับสเตรทต่าง ๆ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน

3. ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

3.1 ผลการศึกษาแหล่งของสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

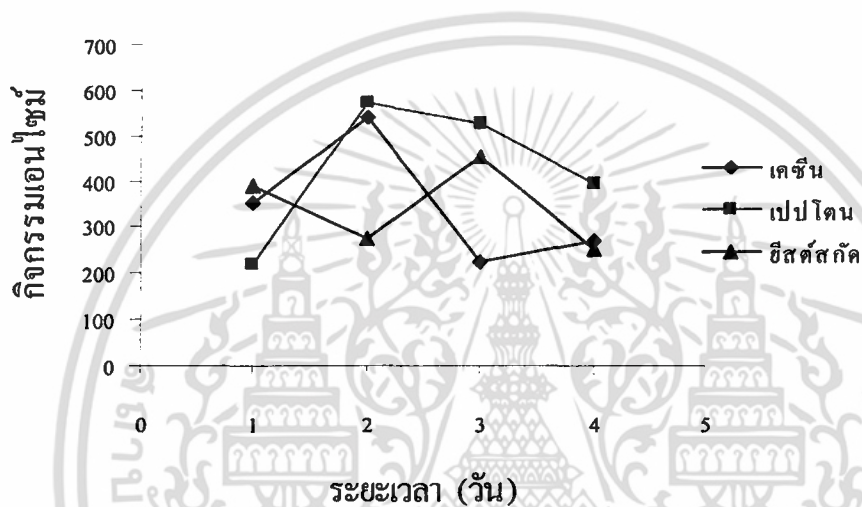
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในรำข้าวเจ้าเป็นสับสเตรท และปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเป็นร้อยละ 70 ที่เติมสารอินทรีย์ไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ได้แก่ เคซีน เปปโตน จากเคซีน และยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 พบว่า เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดในอาหารที่เติมเปปโตนจากเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยให้กิกกรรมเอนไซม์โปรติเอส 573.78 หน่วย/กรัม รองลงมาคือ เคซีน และยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยให้กิกกรรมเอนไซม์ 538.83 และ 451.46 หน่วย/กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 และพบว่าเปปโตนจากเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้กิกกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งจากสารอินทรีย์ไนโตรเจนอื่น ๆ

ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้ไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Singh et.al.(1994) รายงานถึงการเติมแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (ร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร) คือ เคซีน เนื้อสกัด เปปโตน และคอร์น สตีฟ ลิเคอร์ เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus niger* F 2078 พบว่าให้ผลกิกกรรมเอนไซม์เอนไซม์โปรติเอสดี (17.3-24.2 หน่วย/มิลลิลิตร) และพบว่าเปปโตนให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือคอร์น สตีฟ ลิเคอร์ (22.7 หน่วย/มิลลิลิตร) รวมทั้ง Phutakul and Kanasawud (1996) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่ในอาหารที่มีโปรตีนต่าง ๆ กัน ได้แก่ เคซีน ฮีโมโกลบิน เจลาติน และถั่วเหลือง พบว่าแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๑๖๘๔๐

สุดในอาหารที่เติมเคซีน โดยให้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 69.9 หน่วย/มิลลิลิตร และ Li *et al* (1997) รายงานผลการศึกษากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในอาหารที่มีเคซีนร้อยละ 4 กลูโคสร้อยละ 0.4 และยีสต์สกัดร้อยละ 0.4 และให้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 58.1 หน่วย/มิลลิลิตร เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจนได้แตกต่างกัน การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึงขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจน (สมใจ สิริโชค, 2001)



ภาพที่ 3 แสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในอาหารที่เติมสารอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน

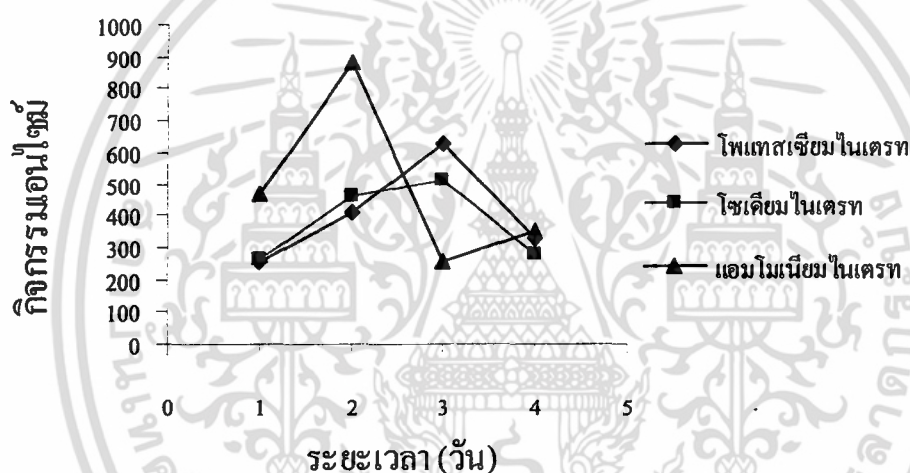
3.2 ผลการศึกษาแหล่งของอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในอาหารที่มีรำข้าวเจ้าเป็นสับสเตรทที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 และสารไนโตรเจนที่ใช้ เปปโตนจากเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเป็นร้อยละ 70 และเติมสารอินทรีย์ที่แตกต่างกัน คือ โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท และแอมโมเนียมไนเตรท ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 พบว่า *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 จะผลิตเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักในอาหารที่เติมแอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 883.35 หน่วย/กรัม รองลงมาคือ โพแทสเซียมไนเตรทร้อยละ 1 และ โซเดียมไนเตรทร้อยละ 1 โดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 626.21 และ 509.71 หน่วย/กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4 และพบว่าแอมโมเนียมไนเตรทให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งจากสูตรอาหารอื่น ๆ ดังนั้นจึงแอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 1 ในการทดลองเพื่อสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับนาฏฤดี มีศิลป์ (2543) ที่พบว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *M.anisopliae* DOA Fc 2156 เมื่อเติมแอมโมเนียมไนเตรท 3 กรัม/ลิตร ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

Abraham *et.al* (1993) รายงานผลการผลิตเอนไซม์โปรติโอไลติกเอนไซม์โดยเชื้อ *Ophiostoma piceae* ในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนและเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ และสารอินทรีย์ต่างชนิดกัน ได้แก่ โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ อัลบูมิน คอลลาเจน ยูเรีย อาร์จินิน แอสปาราจिन กลูตามีน และโปรตีน พบว่าเชื้อจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้น้อยในอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ง่าย เช่น แอมโมเนียม ยูเรีย และกรดอะมิโน และมักจะมีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่อแอมโมเนียมถูกใช้หมด และพบว่าเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในอาหารที่เติมโซเดียมไนเตรท



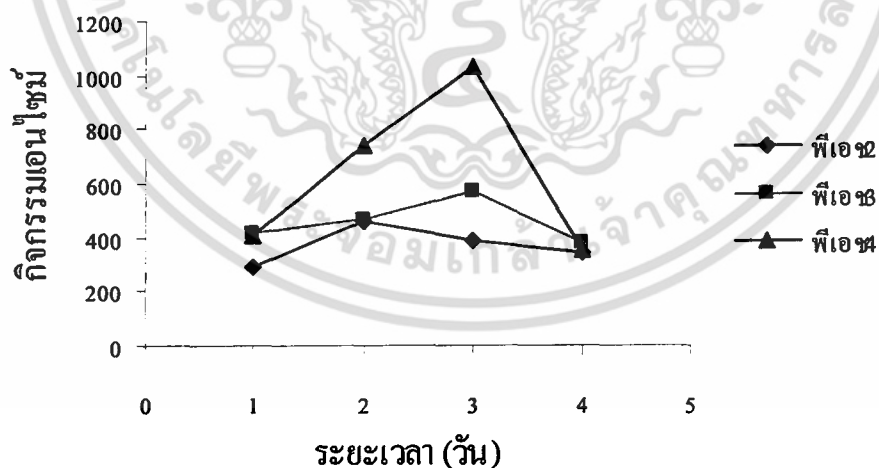
ภาพที่ 4 แสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในอาหารที่เติมสารอนินทรีย์ในโตรเจนชนิดต่าง ๆ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในอาหารใช้สับสเตรท ความเข้มข้นที่ 0.05 เดิมเปปโตินจากเคซีนร้อยละ 1 แอมโมเนียมไนเตรทร้อยละ 1 ปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเป็นร้อยละ 70 แล้วปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 2,3 และ 4 ตามลำดับพบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4 ในวันที่ 3 ของการหมักเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดโดยให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 1033.98 หน่วย/กรัม รองลงมาคือที่พีเอชเท่ากับ 3 โดยให้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 573.79 หน่วย/กรัม และพีเอชเท่ากับ 2 ให้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 457.28 หน่วย/กรัม ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 5 และพบว่าสูตรอาหารที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4 ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากพีเอชอื่น ๆ ดังนั้นจึงเลือกปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4 ในการทดลองเพื่อหาสภาวะอื่น ๆ ต่อไป

จากผลการทดลองแสดงว่าเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในอาหารที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Singh *et.al.* (1994) ที่พบว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *Aspergillus niger* F 2078 คือช่วง 3.5 – 4 และ Shinmyo *et.al.* (1968) รายงานว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอสิดโปรติเอสโดยเชื้อ *A.niger* คือ 4.6 และพีเอชเท่ากับ 5 มีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงมากอาจเนื่องมาจากการแตกตัวของอออนของผลผลิต ทำให้พีเอชไม่เหมาะสมมีผลทำให้ผลผลิตต่ำ (ปราณี อ่านเปรื่อง ,2543)

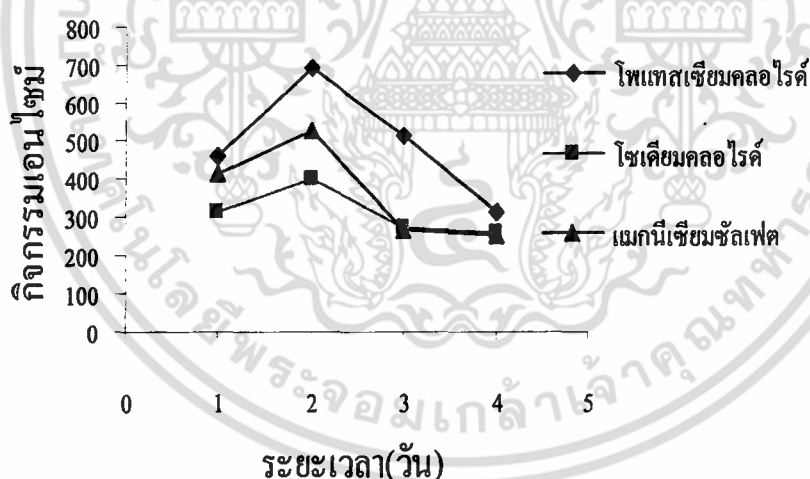


ภาพที่ 5 แสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างกัน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน

5. ผลการศึกษาผลของเกลือแร่ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในอาหารใช้สับสตรทความเข้มข้นที่ 0.05 เดิมเปปโตโนจากเคซีนร้อยละ 1 แอมโมเนียมไนเตรทร้อยละ 1 ปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเป็นร้อยละ 70 และเติมเกลือแร่ต่าง ๆ กันคือ โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ โดยปรับความเข้มข้นร้อยละ 1 พบว่าโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 691.11หน่วย/กรัม รองลงมาคือ แมกนีเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 527.18 และ 399.02 หน่วย/กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6 และพบว่าอาหารที่เติมโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งจากแหล่งเกลือแร่อื่น ๆ

ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Oleniacz and Pisano (1968) พบว่าเชื้อ *Cephalosporium* sp. ไม่ต้องการแหล่งเกลือแร่ใด ๆ ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และ Fira *et.al* (2001) พบว่าแคทไอออนของโพแทสเซียม(K^+) และโซเดียม (Na^+) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียชนิด *Thermophillic lactobacilli*



ภาพที่ 6 แสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 ในอาหารที่มีแหล่งเกลือแร่ต่างกัน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3258 สามารถสรุปสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสประกอบด้วยปริมาณสับสเตรทร้อยละ 0.05 เปปโตนจากเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 1 แอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 1 ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 และโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1

5.2 ข้อเสนอแนะ ผลจากการทดลองนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาและพัฒนาเพื่อจะนำเอนไซม์โปรติเอสไปใช้ในอุตสาหกรรมที่ต้องการเอนไซม์โปรติเอสที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดสูง เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้จากการทดลองครั้งนี้สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดสูง สำหรับการที่จะพัฒนาเพื่อจะนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมนั้นจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับภาคเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กัลยกร วงศ์กาฬสินธุ์.2540.การโคลนยีนโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 สู่ *Escherichia coli* ด้วยระบบหลอมกับจีเอสทีเอ็น.วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นาฏฤดีมีศิลป์.2543.การผลิตและการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Metarhizium anisopliae* DOA FC 2156.วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ปราณี อานเป็รื่อง.2533.เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1.พิมพ์ครั้งที่ 1.ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุมาลี เหลืองสกุล.2539.จุลชีววิทยาทางอาหาร.พิมพ์ครั้งที่ 3.ชัยเจริญ.กรุงเทพฯ.248 หน้า
- สมใจ ศิริโชค.2001.จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.บริษัทพิมพ์ดี จำกัด.กรุงเทพฯ.หน้า 7 .
- Abraham,L.D.,Roth,A.,Saddler,J.N. and Breuil,C.1993.Growth,nutrition and proteolytic Activity of sap-straining fungus *Ophiostoma piceae*.Can.J.Bot.71:1224-1230.
- Battaglino,R.A.,Huergo,M.,Pilosofo,A.M.R. and Bargholo mai,G.B.1991.Culture Requirement for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state Fermentation.Appl.Microbiol.Biotechnol.35:292-296.
- Fira,D.,Kojic,M.,Banina,A.spasojevic,i. And Topisirovic, L.2001. Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic Lactobacilli.J.Appl.Microbiol.2001 (90):123-130
- Narahara,H.,Koyama,Y.,Yoshida,T.,Pichagkura,S.,Ueda,R.and Taguchi,H.1982 Growth and enzyme production in a solid state culture of *Aspergillus oryzae*.J.Ferment.Technol.60:311:319.
- Nigam, P.1990.Investigation of some factors important for solid –state fermentation of Sugar can by gasse for animal feed production.Enzyme.Microbiol.Technol.12:805-811.
- Nishio,N.,Tai,K.and Nagai,S.1979.Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid- state cultivation .Eur.J.Appl.Microbiol.8:263-270.
- Oleniacz S,Waiter and Pisano A.Michael.1986.Protease Production by a Secies of Cephalosporium.Appl.Microbiol.16:90-96.
- Singh,A.,Ghosh,V.K.and Ghosh,P.1994.Production of Thermostable acid protease By *Aspergillus niger* .Lett.Appl.Microbiol.18:177-180.
- Wang,H.L.,Vespa.J.B and Hesseltine,C.W.1974.Acid protease production by fungi Used in soybean food fermentation. Appl.Microbiol.27:906-911.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zadrazil,F and Brunnert,H1981.Investigation on physical parameter important for SSF of straw by white rot fungi.Eur.J.Appl. Microbiol.11:183-188.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม/ลิตร
เต็ทโทรส	20	กรัม/ลิตร
ผงวุ้น	15	กรัม/ลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2. อาหารสูตรพื้นฐาน (Singh และคณะ, 1994)

สูตรอาหารพื้นฐานประกอบด้วย

เปปโตน	10.0	กรัม/ลิตร
KH ₂ PO ₄	1.0	กรัม/ลิตร
Yeast extract	3.0	กรัม/ลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นำอาหารที่เตรียมได้มาปรับพีเอชเป็น 4.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยการนำมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส คัดแปลงจากวิธีการของ Wang และ Hesselstine (Wang และ Hesselstine, 1965)

1.1 การเตรียมสารละลาย

1.1.1 สารละลายเคซีนร้อยละ 1

ละลายเคซีน 1 กรัมในซีเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.1.2 สารละลายไตรคลอโรอะซิติกเอซิด (TCA) ร้อยละ 5

ละลายไตรคลอโรอะซิติกเอซิด (TCA) 5 กรัม ในน้ำกลั่น คนจนละลายหมด ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.1.3 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 42.396 กรัม ในน้ำกลั่น คนจนละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.1.4 สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนไทโรซีน

ละลายกรดอะมิโนไทโรซีน 0.1 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร สารละลายนี้มีความเข้มข้นของกรดอะมิโนไทโรซีน เท่ากับ 1,000 ไมโครกรัม

1.2 วิธีการ

1.2.1 นำตัวอย่างที่มีความเจือจางเหมาะสม 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำ สารละลายเคซีนร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที

1.2.2 นำไปป่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2.3 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการเติมน้ำสารละลาย TCA ร้อยละ 5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที กรองตะกอนโปรตีนด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

1.2.4 นำน้ำส่วนใส 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

1.2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

1.2.6 หลอดควบคุมทำโดยเติมสารละลาย TCA ร้อยละ 5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตรก่อน จากนั้นเติมสารละลายเคซีน 1 มิลลิลิตร สำหรับแบล็คใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรแทนตัวอย่าง เอนไซม์

1.2.7 ทำกราฟมาตรฐานกรดอะมิโนไทโรซีน โดยใช้สารละลายความเข้มข้น 10,20,30,40,50,60,70,80,90 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ดำเนินเช่นเดียวกับข้อ 1.2.4-1.2.5 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดอะมิโนไทโรซีน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูล

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงผลการศึกษาระดับสัปดาห์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอโนไซม์

ปริมาณสัปดาห์	เวลา (วัน)	พีเอช	กิจกรรมเอโนไซม์โปรตีนเอส (หน่วย/กรัม)
ร้อยละ 0.02	1	3.98	160.19
	2	4.73	218.44
	3	4.01	119.41
	4	5.02	43.69
ร้อยละ 0.03	1	3.92	212.62
	2	4.42	294.17
	3	5.88	154.37
	4	6.22	101.94
ร้อยละ 0.05	1	4.44	317.47
	2	4.32	509.70
	3	5.59	253.70
	4	6.54	151.07

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก 2 ผลการศึกษาแหล่งของสารอินทรีย์ใน ไตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอโนไซม์
โปรติเอส

แหล่งอินทรีย์ใน ไตรเจน	เวลา (วัน)	พีเอช	กิจกรรมเอโนไซม์โปรติเอส (หน่วย/กรัม)
เคซีนร้อยละ 1	1	4.23	352.43
	2	5.77	538.83
	3	6.57	224.27
	4	6.24	270.87
เปปโตินจากเคซีน ร้อยละ1	1	6.39	218.44
	2	5.87	573.78
	3	6.13	527.18
	4	4.10	393.20
ยีสต์สกัดร้อยละ 1	1	5.78	387.38
	2	6.20	276.69
	3	6.41	451.48
	4	6.18	253.39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการศึกษาแหล่งของสารอินทรีย์ใน ไตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอโนไซม์
โปรติเอส

แหล่งอินทรีย์ในไตรเจน	เวลา (วัน)	พีเอช	กิจกรรมเอโนไซม์โปรติเอส (หน่วย/กรัม)
โพแทสเซียมไนเตรท ร้อยละ 1	1	6.22	253.39
	2	5.94	410.68
	3	6.15	626.21
	4	5.81	329.13
โซเดียมไนเตรท ร้อยละ 1	1	4.85	364.08
	2	5.79	457.28
	3	6.19	509.71
	4	6.15	276.69
แอมโมเนียมไนเตรท ร้อยละ 1	1	4.91	468.93
	2	6.17	883.35
	3	6.68	253.39
	4	6.16	352.43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

พีเอชเริ่มต้น	เวลา (วัน)	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วย/กรัม)
พีเอช 2	1	5.44	294.17
	2	4.38	457.28
	3	4.87	387.38
	4	5.80	346.60
พีเอช3	1	5.74	416.50
	2	4.63	468.93
	3	4.89	573.79
	4	5.60	375.73
พีเอช4	1	5.74	404.85
	2	4.63	736.89
	3	4.89	1033.98
	4	5.60	352.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการศึกษาแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

แหล่งเกลือแร่	เวลา (วัน)	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วย/กรัม)
โพแทสเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 1	1	5.79	457.28
	2	5.81	696.11
	3	6.71	515.53
	4	5.24	311.65
โซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 1	1	5.77	313.88
	2	5.82	399.02
	3	6.22	270.87
	4	5.78	259.22
แมกนีเซียมซัลเฟต ร้อยละ 1	1	5.58	416.50
	2	5.64	527.18
	3	5.24	265.04
	4	5.00	253.39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

1. การศึกษาปริมาณสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ตารางภาคผนวกที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ปริมาณสับสเตรท รท	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วย/กรัม)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
ร้อยละ 0.02	160.19a	218.44a	119.41a	43.69a
ร้อยละ 0.03	212.62b	294.17b	154.37b	101.94b
ร้อยละ 0.05	317.47c	509.70c	253.39c	151.07c

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงผลการเปรียบเทียบที่ไม่มีความแตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกันแสดงผลการเปรียบเทียบที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

2. การศึกษาแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ตารางภาคผนวกที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 99

อินทรีย์ในโตรเจน	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วย/กรัม)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
เคซีนร้อยละ 1	352.43b	538.83b	224.27a	270.87b
เปปโตินจากเคซีน ร้อยละ 1	218.44a	573.78c	527.18c	393.20c
ยีสต์สกัด ร้อยละ 1	387.38c	276.69a	481.48b	253.39a

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงผลการเปรียบเทียบที่ไม่มีความแตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกันแสดงผลการเปรียบเทียบที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอโนไซม์

ตารางภาคผนวกที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 99

อินทรีย์ในโตรเจน	กิจกรรมเอโนไซม์โปรติเอส (หน่วย/กรัม)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
โพแทสเซียมไนเตรทร้อยละ 1	253.39a	410.68a	626.21c	329.13b
โซเดียมไนเตรทร้อยละ 1	264.08b	457.28b	509.71b	276.69a
แอมโมเนียมไนเตรทร้อยละ 1	468.93c	883.35c	253.39a	352.43c

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงผลการเปรียบเทียบที่ไม่มีความแตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกันแสดงผลการเปรียบเทียบที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

4. การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอโนไซม์

ตารางภาคผนวกที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 99

พีเอชเริ่มต้น	กิจกรรมเอโนไซม์โปรติเอส (หน่วย/กรัม)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
2	294.17a	457.28a	387.38a	346.60a
3	416.50c	468.97b	573.75b	375.73c
4	404.85b	736.89c	1033.98c	352.42b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงผลการเปรียบเทียบที่ไม่มีความแตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกันแสดงผลการเปรียบเทียบที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การศึกษาแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ตารางภาคผนวกที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 99

แหล่งเกลือแร่	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วย/กรัม)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
โพแทสเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1	457.28c	696.11c	515.53c	311.65c
โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1	313.88a	399.02a	270.87b	259.22b
แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 1	416.50b	527.18b	265.04a	253.39a

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงผลการเปรียบเทียบที่ไม่มีความแตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกันแสดงผลการเปรียบเทียบที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้