การผลิตและการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อ *Metarhizium anisopliae* DOA FC 2156

PRODUCTION AND STUDY OF SOME PROPERTIES OF PROTEASE FROM *Metarhizium anisopliae* DOA FC 2156

นาฏฤดี มีศิลป์

NATRUEDEE MEESILP

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2543

ISBN 974-622-975-3

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตและการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Metarhizium anisopliae* DOA FC 2156

PRODUCTION AND STUDY OF SOME PROPERTIES OF PROTEASE FROM *Metarhizium anisopliae* DOA FC 2156

นาฏฤดี มีศิลป์
NATRUEDEE MEESILP

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2543

ISBN 974-622-975-3

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 38535
วัน, เดือน, ปี 5 ม.ค. 2544

PRODUCTION AND STUDY OF SOME PROPERTIES OF PROTEASE FROM *Metarhizium anisopliae* DOA FC 2156

NATRUEDEE MEESILP

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT"S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2000

ISBN 974-622-975-3

COPYRIGHT 2000
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Metarhizium anisopliae* DOA FC 2156
นักศึกษา	นางสาวนาฏฤดี มีศิลป์
รหัสประจำตัว	40065202
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2543
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ.ระนอง

บทคัดย่อ

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *Metarhizium anisopliae* DOA FC 2156 พบว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) แป้งถั่วเหลือง 20 แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) 3.0 โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1.0 โพแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.5 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($MgSO_4 7H_2O$) 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท ($CaCl_2 2H_2O$) 0.1 ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ในการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์เขย่า พบว่าเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 จะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในเวลา 168 ชั่วโมง โดยจะให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 459 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และในการเพาะเลี้ยงระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าจะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในเวลา 144 ชั่วโมง โดยจะให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 429.88 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที จากการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ พบว่าค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 11 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยจะคงตัวที่ช่วงพีเอช 5-11 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส และพบว่า Cu^{2+} Mn^{2+} และ Co^{2+} ช่วยส่งเสริมให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น ในขณะที่ Hg^{2+} และ Ag^{+} จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ เมื่อทำการทดสอบโดยการใช้สารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส พบว่าสารฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF) สารพารา-คลอโรเมอร์คิวรีเบนโซอิกแอซิด (PCMB) และสารเอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์เช่นกัน ดังนั้นจึงจัดเอนไซม์นี้อยู่ในกลุ่มซีรีนอัลคาไลน์โปรติเอสที่ต้องการอิออนของโลหะ เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 จะมีค่า K_m และค่า V_{max} เท่ากับ 2.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเทรต

Thesis Title	Production and Study of Some Properties of Protease from *Metarhizium anisopliae* DOA FC 2156
Student	Miss Natruedee Meesilp
Student ID.	40065202
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2000
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Nuanphan Naranong

ABSTACT

An optimized medium for protease production by *Metarhizium anisopliae* DOA FC 2156 contained (g/l) soybean flour 20, NH_4NO_3 3.0, KH_2PO_4 1.0, KCl 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 and initial pH of 6.0. In the shake flask culture, the maximum activity of 459 U/ml was obtained at the 168 hrs with the shaking speed of 200 rpm at 30 °C. In the fermentor, the protease with activity of 429.88 U/ml was also obtained at the 144 hrs with the agitation speed of 400 rpm and the aeration rate of 1.0 vvm at 30 °C. Some properties of the crude enzyme were studied. The optimal pH and temperature for protease activity were 11 and 50 °C, respectively. The enzyme was stable at pH range between 5 and 11 and at temperature below 40 °C. The enzyme was activated by Cu^{2+}, Mn^{2+} and Co^{2+} while it was completely inhibited by Hg^{2+} and Ag^{+}. Moreover, PMSF, PCMB and EDTA at the concentration of 10 mM completely inhibited the activity. It was classified as serine alkaline protease which required some metal ion. The K_m and V_{max} values of the protease with casein as substrate were 2.18 mg/ml and 53 µg/ml/min, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ แก้ไขข้อบกพร่องและให้กำลังใจจากอาจารย์ที่ปรึกษาคือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี ฐิตาพิชิต ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรไท สุขเจริญ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ที่กรุณาเสนอแนะ เพิ่มเติมแก้ไข ให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ อาจารย์ เอก แสงวิเชียร ที่กรุณาช่วยเหลืออนุเคราะห์ข้อมูลและคำแนะนำในการทำวิจัยอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณ ราชกรีฑาสโมสรที่ได้มอบทุนสนับสนุนการศึกษาแก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณพี่ โดยเฉพาะคุณแม่และพี่วิภา มีศิลป์ ผู้ที่เป็นกำลังใจให้สามารถผ่านพ้นอุปสรรคต่างๆมาได้ ด้วยดี

นาฏฤดี มีศิลป์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VI

สารบัญภาพ VII

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา 2

1.3 ขอบเขตการศึกษาวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 เอนไซม์โปรติเอส 3

2.2 แหล่งของเอนไซม์โปรติเอส 7

2.3 ปัจจัยที่อิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์..... 13

2.4 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 14

2.5 ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส 17

2.6 เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* 22

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย 25

3.1 การเก็บรักษาตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ 28

3.2 การทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสบนอาหารแข็ง 28

3.3 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 28

3.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส 29

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5 การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับฟลาสก์เขย่ากับระดับถังหมัก 5 ลิตร 31

3.6 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอส 31

3.7 การศึกษาจลนพลศาสตร์ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์โปรติเอส 34

3.8 วิธีการวิเคราะห์ 34

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 35

4.1 ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสบนอาหารแข็งของเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 35

4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 35

4.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับฟลาสก์เขย่ากับระดับถังหมัก 5 ลิตร 51

4.4 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอส 54

4.5 ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์โปรติเอส 63

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 66

บรรณานุกรม 68

ภาคผนวก 75

ประวัติผู้เขียน 102

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงกลุ่มของโปรติโอไลติคเอนไซม์ 8

2.2 แสดงผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส 16

2.3 แสดงผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 18

2.4 แสดงผลของอิออนของโลหะและสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์..... 19

4.1 แสดงผลการตกตะกอนเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่างๆกัน 55

4.2 แสดงผลของอิออนของโลหะและเกลือบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 62

4.3 แสดงผลของสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 64

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

4.1 แสดงการเจริญและการสร้างบริเวณใสของเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 บนอาหาร casein hydrolysis medium..... 36

4.2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในอาหารที่เติมสารอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ..... 38

4.3 แสดงอิทธิพลของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156..... 40

4.4 แสดงผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โปรติเอสโดยเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156..... 42

4.5 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในอาหาร เลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆกัน..... 43

4.6 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอส การเปลี่ยนแปลงของพีเอช และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในอาหารที่ไม่เติมกลูโคส..... 46

4.7 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอส การเปลี่ยนแปลงของพีเอช และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในอาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร..... 47

4.8 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอส การเปลี่ยนแปลงของพีเอช และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในอาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร..... 48

4.9 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอส การเปลี่ยนแปลงของพีเอช และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในอาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร..... 49

4.10 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอส การเปลี่ยนแปลงของพีเอช และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในอาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร..... 50

4.11 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และการเจริญของเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในสูตรอาหารที่เหมาะสมระดับฟลาสก์เขย่า..... 52

4.12 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และการเจริญของเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในสูตรอาหารที่เหมาะสมระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 53

4.13 แสดงผลของพีเอชต่างๆต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156..... 56

4.14 แสดงผลของอุณหภูมิต่างๆต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156..... 58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.15 แสดงความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ที่อุณหภูมิต่างๆ 59

4.16 แสดงความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ที่พีเอชต่างๆ..... 61

4.17 แสดงการเขียนกราฟ Lineweaver-Bark ระหว่าง 1/[S] กับ 1/*V* เพื่อคำนวณหาค่า K_m และ V_{max}..... 65

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

เอนไซม์โปรติเอส (protease) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนด้วยน้ำแล้วได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆหรือกรดอะมิโนอิสระ เอนไซม์โปรติเอสสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ เอ็กโซเปปติเดส (exopeptidases) และเอนโดเปปติเดส (endopeptidases) โดยที่เอ็กโซเปปติเดสเป็นเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์จากปลายด้านอะมิโนหรือปลายด้านคาร์บอกซีของสับสเทรต ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ อะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) และคาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidase) สำหรับเอนโดเปปติเดสเป็นเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ที่ตำแหน่งภายในสายพอลิเปปไทด์ทางปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซี ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย คือ ซีรีนโปรติเอส (serine protease) แอซิดโปรติเอส (acid protease) ซีสเตอีนโปรติเอส (cystein protease) และ เมทิลโลโปรติเอส (metallo protease) เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิดได้แก่ อุตสาหกรรมอาหารเช่น ใช้ในการผลิตเนยแข็ง ขนมปัง การทำให้เนื้ออ่อนนุ่ม อุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมการผลิตยาใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทเพื่อใช้รักษาผู้ป่วยที่ขาดสารอาหารโปรตีน (Rao *et al.*, 1998) รวมทั้งใช้ประโยชน์ในการกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีทางชีวภาพอีกด้วย เอนไซม์โปรติเอสสามารถพบได้จากแหล่งต่างๆ เช่น ปาเปน (papain) จากยางของผลมะละกอ ฟิซิน (ficin) จากผลมะเดื่อ ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) จากตับอ่อนของสัตว์ เปปซิน (pepsin) ในกระเพาะของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Rao *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังสามารถพบเอนไซม์โปรติเอสได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Streptomyces megasporus* (Patke and Dey, 1998), *Bacillus amylosacchariticus* (Wong, 1995), *Clostridium difficile* (Poilane *et al.*, 1998), *Beauverria bassiana* (Bidochka and Khachatourians, 1987) เป็นต้น

Metarhizium anisopliae เป็นราในชั้น Deuteromycetes ที่เป็นออบลิเกตพาโทเจน (obligate pathogen) ต่อแมลงโดยจะสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ย่อยคิวติเคล (cuticle) ของแมลงเพื่อเจาะเข้าไปทำลายแมลง (Charnley, 1984 อ้างถึงใน Paterson *et al.*, 1994) *M. anisopliae* สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ 2 ชนิดคือ เอนโดโปรติเอสและเอ็กโซโปรติเอส โดยเอนโดโปรติเอสที่สร้างนี้จะมี 3 ชนิด คือ Pr 1 Pr 2 ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็นด่างคือพีเอช 8 และ 9 ตามลำดับ และ Pr 3 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 5-5.5 (St. Leger *et al.*, 1987) สำหรับเอ็กโซโปรติเอสที่สร้างจะเป็นอะมิโนเปปติเดส 2 ชนิดคือ

อะมิโนเปปติเดส เอ็ม (aminopeptidase M) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 7-8 และโพส-โพรลินไดเปปติดิลอะมิโนเปปติเดส (post-proline dipeptidylaminopeptidase) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 8 (Charnley and St. Leger, 1991) *M. anisopliae* มีประโยชน์ในการใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพต่อแมลงที่เป็นศัตรูพืชหลายชนิดที่สำคัญคือ ด้วงมะพร้าว

จากความสำคัญของเอนไซม์โปรติเอสและเชื้อ *M. anisopliae* ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นจึงมีความจำเป็นในการศึกษาการผลิตและสมบัติของเอนไซม์เพื่อจะได้นำมาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *M. anisopliae* DOA FC 2156และศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

1.2.2 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *M. anisoliae* DOA FC 2156 ในระดับฟลาสก์เขย่ากับระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.2.3 เพื่อศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อรา *M. anisopliae* DOA FC 2156

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *M. anisopliae* DOA FC 2156

1.3.2 ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *M. anisopliae* DOA FC 2156

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงสูตรอาหารรวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์และสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *M. anisopliae* DOA FC 2156 เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาต่อไป

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอส คือเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนด้วยน้ำ เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มย่อยที่ 4 ของเอนไซม์ในกลุ่มที่ 3 (hydrolases; EC. 3.4) ปัจจุบันเอนไซม์โปรติเอสถูกจำแนกโดยเกณฑ์หลัก 3 ข้อคือ รูปแบบของการเร่งปฏิกิริยา ลักษณะทางเคมีของบริเวณที่เกิดการเร่งปฏิกิริยา และความเกี่ยวข้องที่ส่งผลต่อโครงสร้าง โดยทั่วไปเอนไซม์โปรติเอสแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยา คือเอ็กโซเปปติเดส และเอนโดเปปติเดส

2.1.1 เอ็กโซเปปติเดส คือเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์จากปลายด้านอะมิโนหรือปลายด้านคาร์บอกซีของสับสเทรต จากตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาที่ปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซีทำให้สามารถแบ่งเอ็กโซเปปติเดสได้เป็นอะมิโนเปปติเดสและคาร์บอกซีเปปติเดส (Rao *et al.*, 1998)

2.1.1.1 อะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase; EC. 3.4.11) คือเอนไซม์ที่มีปฏิกิริยาที่ตำแหน่งปลายอะมิโนอิสระ (N-terminal) ของสายพอลิเปปไทด์ แล้วทำให้เกิดกรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยว ไดเปปไทด์ และไตรเปปไทด์ อะมิโนเปปติเดสสามารถพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียและรา ซึ่งโดยทั่วไปอะมิโนเปปติเดสจะพบอยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) แต่ Labbe *et al.*, (1974) ได้รายงานว่าพบอะมิโนเปปติเดสภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* ความจำเพาะต่อสับสเทรตของเอนไซม์จากแบคทีเรียและราจะมีความแตกต่างกันชัดเจน ซึ่งทำให้สิ่งมีชีวิตทั้งสองมีความแตกต่างกันเนื่องจากโครงสร้างพื้นฐานของผลผลิตที่ได้จากกระบวนการย่อยมีความแตกต่างกัน อะมิโนเปปติเดส I จาก *Escherichia coli* เป็นโปรติเอสขนาดใหญ่ (400,000 ดาลตัน) มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมที่ 7.5-10.5 และต้องการ Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} สำหรับการเกิดปฏิกิริยา สำหรับ *Bacillus lichaniformis* จะสร้างอะมิโนเปปติเดสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 34,000 ดาลตัน ที่ประกอบด้วย 1 กรัมอะตอมของ Zn^{2+}_ต่อโมล และจะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อมีอิออนของ Co^{2+} อะมิโนเปปติเดส II จาก *B. stearothermophilus* เป็นไดเมอร์โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 80,000-100,000 ดาลตัน และจะมีกิจกรรมเมื่อมีอิออนของ Zn^{2+}, Mn^{2+} และ Co^{2+} อยู่ด้วย

2.1.1.2 คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidase; EC. 3.4.16-18) คือเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งปลายคาร์บอกซี (C-terminal) ของสายพอลิเปปไทด์แล้วให้กรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวหรือไดเปปไทด์ คาร์บอกซีเปปติเดสสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ตามลักษณะของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ คือซีรีนคาร์บอกซีเปปติเดส (serine carboxypeptidase; EC. 3.4.16) เมทิลโลคาร์บอกซีเปปติเดส (metallo carboxypeptidase; EC. 3.4.17) และ ซีสเตอีนคาร์บอกซีเปปติเดส (cystein carboxypeptidase; EC.3.4.18) ซีรีนคาร์บอกซีเปปติเดสสามารถพบได้ใน *Penicillium* spp., *Saccharomyces* spp. และ *Aspergillus* spp. ซึ่งทั้งหมดนี้จะมีความคล้ายคลึงกันในความจำเพาะต่อสับสเทรต แต่จะมีความแตกต่างกันในสมบัติบางประการ เช่น พีเอช (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ความคงตัวของเอนไซม์ น้ำหนักโมเลกุล และผลของตัวยับยั้งเอนไซม์ เมทิลโลคาร์บอกซีเปปติเดส จะพบได้จาก *Saccharomyces* spp. (Felix *et al.*, 1966 อ้างถึงใน Rao *et al.*, 1998) และ *Pseudomonas* spp. (Lu *et al.*, 1969 อ้างถึงใน Rao *et al.*, 1998) เอนไซม์นี้ต้องการอิออนของ Zn^{2+} หรือ Co^{2+} สำหรับการเกิดปฏิกิริยา

2.1.2 เอนโดเปปติเดส คือเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ภายในสายของพอลิเปปไทด์ทางปลายด้านอะมิโนและปลายคาร์บอกซี ดังนั้นการที่มีหมู่อะมิโนหรือคาร์บอกซีอิสระจะมีผลกระทบในทางลบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เอนโดเปปติเดสสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ตามลักษณะกลไกการเร่งปฏิกิริยาคือ ซีรีนโปรติเอส แอสปาร์ติกโปรติเอส ซีสเตอีน โปรติเอส และ เมทิลโลโปรติเอส (Rao *et al.*, 1998)

2.1.2.1 ซีรีนโปรติเอส (serine protease; EC. 3.4.21) มีลักษณะที่สำคัญคือจะพบหมู่ซีรีนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ชนิดนี้ ซีรีนโปรติเอสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ไวรัส แบคทีเรีย และพวกยูคารีโอต ซีรีนโปรติเอสสามารถพบได้ทั้งที่เป็นเอ็กโซเปปติเดส เอนโดเปปติเดส โอลิโกเปปติเดส และโอเมกาเปปติเดส ซีรีนโปรติเอสจะถูกจดจำได้โดยตัวยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ เช่น 3,4 ไดคลอโรไอโซคูมาริน (3,4-dichloroisocoumarin 3,4-DCI) แอล-3-คาร์บอกซีทราน-2,3-อีพอกซีโพรพิล-ลูไซลามิโด (4-กัวนิดิน) บิวเทน (L-3-carboxytran-2,3-epoxypropyl-luecylamido (4-guenidine) butane; E.64) ไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (diisopropylfluorophosphate; DFP) ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (phenylmethylsulfonyl fluoride; PMSF) และ โทซิล-แอล-ไลซีนคลอโรเมทิลคีโตน (tosyl-L-lysine chloromethyl ketone ; TLCK) และมีซีรีนโปรติเอสบางชนิดถูกยับยั้งโดยไทออลรีเอเจนท์ เช่น พารา-คลอโรเมอร์คิวรีเบนโซเอส (p-chloromercuribenzoate; PCMB) เนื่องจากมีอนุมูลของซีสเตอีนอยู่ใกล้กับบริเวณเร่งซีรีนโปรติเอสโดยทั่วไปจะมีกิจกรรมที่พีเอชเป็นกลางและด่าง โดยจะมีพีเอชที่เหมาะสมอยู่

ระหว่างพีเอช 7 และ 11 และจะมีความจำเพาะต่อสับสเทรตที่กว้างรวมทั้งกิจกรรมของเอสเทอร์โรไลติกและอะมิเดส สำหรับมวลโมเลกุลจะอยู่ในช่วงระหว่าง 18 และ 35 กิโลดาลตัน ซีรีนโปรติเอสสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่มคือ

1. ซีรีนอัลคาไลน์โปรติเอส (serine alkaline protease) สร้างโดยสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา กิจกรรมของเอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งโดย DFP หรือสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสจากมันฝรั่ง (potato protease inhibitor) แต่จะไม่ถูกยับยั้งด้วยโทซิล-แอล-ฟีนิลอะลานินคลอโรเมทิลคีโตน (tosyl-L-phenyllanine chloromethyl ketone TPCK) หรือโทซิล-แอล-ไลซีนคลอโรเมทิลคีโตน (TLCK) ซีรีนอัลคาไลน์โปรติเอสจะสลายพันธะเปปไทด์ซึ่งมีไทโรซีน ฟีนิลอะลานีน หรือไลซีน ที่ตำแหน่งคาร์บอกซีลของพันธะที่กำลังตัด พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของซีรีนอัลคาไลน์โปรติเอสจะอยู่ที่พีเอช 10 มีมวลโมเลกุลในช่วง 15-30 กิโลดาลตัน ซีรีนอัลคาไลน์โปรติเอสสามารถสร้างโดยแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Desulfurococcus mucosus* (Cowan *et al*., 1987), *Streptomyces megasporus* (Patke and Dey, 1998) และเชื้อราที่สร้างซีรีนอัลคาไลน์โปรติเอส เช่น *Arthrobotry oligisporus* (Tunlid and Janhson, 1991), *Neurospora crassa* (Lindberg *et al*., 1981), *Verticillum dahalia* (Dobinson *et. al*., 1997), *Metarhizium anisopliae* (St. Lager *et al*., 1989), *Entomophthora* spp. (Josson, 1986) เป็นต้น

2. ซับติลิซิน (subtilisins) สร้างโดย *Bacillus* พบมากเป็นอันดับสองของ ซีรีนโปรติเอส ซับติลิซินสามารถแบ่งได้เป็น 5 ชนิดคือ ซับติลิซินคาร์ลสเบอร์ก (subtilisin carlsberg; EC. 3.4.21.14) ผลิตโดย *B. licheniformis* พบเมื่อปี ค.ศ. 1947 โดย Linderstrom, Lang และ Ottesen ณ. ห้องปฏิบัติการคาร์ลสเบอร์ก ซับติลิซินโนโว (subtilisin novo) หรือแบคทีเรียโปรติเอสนาแกส (bacteria protease nagase; BPN) ผลิตโดย *B. amyloliqeufacians* ทั้งซับติลิซินคาร์ลสเบอร์กและซับติลิซินโนโวจะมีสมบัติคล้ายคลึงกันโดยมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 10 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซับติลิซินอี (subtilisin E) และ ซับติลิซินดีวาย (subtilisin DY) ผลิตโดย *B. subtilis* และซับติลิซินอะไมโลแซคคาริติกัส (subtilisin amylosacchariticus) สร้างโดย *B. amylosacchariticus* (Rao *et al*., 1998; Wong, 1995)

2.1.2.2 ซีสเตอีนหรือไทออลโปรติเอส (thiol protease; EC. 3.4.22) สามารถพบได้ทั้งพวกโปรคารีโอต และยูคารีโอต ซีสเตอีนโปรติเอสที่เป็นที่รู้จักกันมีทั้งหมด 20 ชนิด โดยที่กิจกรรมของซีสเตอีนโปรติเอสทั้งหมดจะขึ้นอยู่กับคู่ของแคตาไลติกที่ประกอบด้วยซีสเตอีนและฮีสติ

ดีน ซึ่งลำดับของอนุมูลซีสเตอีนและฮีสติดีน (Cys-Hisหรือ His-Cys) จะแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม โดยทั่วไปซีสเตอีนโปรติเอสจะเกิดปฏิกิริยาเมื่อมีตัวรีดิวซ์ (reducing agent) เช่น ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) หรือ ซีสเตอีน จากพื้นฐานความจำเพาะต่อตำแหน่งของสายเปปไทด์ทำให้สามารถแบ่งซีสเตอีนโปรติเอสได้เป็น 4 กลุ่มกว้างๆ คือ papain-like, trypsin-like โดยมักจะเกิดการตัดที่อนุมูลของอาร์จินิน (arginine), กลุ่มที่จำเพาะต่อกรดกลูตามิก และอื่นๆ ซีสเตอีนโปรติเอสมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชเป็นกลาง และมีเพียงเล็กน้อยที่มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอชเป็นกรดคือไลโซโซเมลโปรติเอส (lysosomal protease) เอนไซม์นี้จะไวต่อซัลฟไฮดริลเอเจนท์ (sulfhydryl agent) เช่น พารา-คลอโรเมอร์คิวรีเบนโซเอส (PCMB) แต่ไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (DFP) และ เมทิลคีเลติงเอเจนท์ (metal-chelating agent) จะไม่มีผลต่อเอนไซม์นี้ คลอสทริเปน (clostripain) เป็นซีสเตอีนโปรติเอสที่สร้างโดยแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน เช่น *Clostridium histolyticum* ซึ่งจะแสดงความจำเพาะต่ออนุมูลของอาร์จินิลที่ตำแหน่งคาร์บอกซิลของพันธะที่จะตัดซึ่งจะแตกต่างจากปาเปนซึ่งมีความต้องการแคลเซียม สเตรปโตเปน (streptopain) เป็นซีสเตอีนโปรติเอสที่สร้างโดย *Streptococcus* spp. ซึ่งจะแสดงความจำเพาะที่กว้างรวมทั้งออกซิไดซ์สายอินซูลินบี (insulin B) และสับสเทรตสังเคราะห์อื่นๆ

2.1.2.3 แอสปาร์ติกโปรติเอส (aspartic protease; EC. 3.4.23) หรือที่เป็นที่รู้จักกันในชื่อแอซิดโปรติเอส ซึ่งเป็นเอนโดเปปติเดสที่การเร่งปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับอนุมูลของกรดแอสปาร์ติก แอซิดโปรติเอสมีอยู่ 3 กลุ่มคือ เปปซิน (pepsin: A1) รีโทรเปปซิน (retropepsin: A2) และเอนไซม์จากพาราริโทรไวรัส (pararetroviruses: A3) (Barett, 1995) โดยที่ทั้งหมดจะมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่พีเอชต่ำ (ช่วงพีเอช 3-4) มีมวลโมเลกุลในช่วง 30-40 กิโลดาลตัน กิจกรรมของแอสปาร์ติกโปรติเอสจะถูกยับยั้งโดยเปปสตาติน (pepstatin) (Beynon and Salvesen, 1990) และไวต่อสารประกอบไดอะโซคีโตน (diazoketone) เช่น ไดอะโซอะซีทิล-ดีแอล-นอร์ลิวซีนเมทิลเอสเทอร์ (diazoacetyl-DL-norluecine methylester; DAN) และ 1,2-อีพอกซี-3-พาราไนโตรฟีนอกซิลโพรเพน (1,2-epoxy-3-p-nitrophenoxylpropane; EPNP) ที่มีอิออนของคอปเปอร์อยู่ (Rao et al., 1998) แอสปาร์ติกโปรติเอสจากจุลินทรีย์จะแสดงความจำเพาะต่ออนุมูลของกรด อะมิโนชนิดอะโรมาติกหรือกลุ่มของกรดอะมิโนบนตำแหน่งทั้งหมดของพันธะเปปไทด์ซึ่งจะคล้ายกับเปปซินแต่ปฏิกิริยาจะจำเพาะน้อยกว่าเปปซิน แอสปาร์ติกโปรติเอสจากจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มกว้างๆ คือ pepsin-like enzyme ที่สร้างโดย *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus* และ *Neurospora* (Rao *et al.*, 1998) และ rennin-like enzyme ที่ผลิตโดย *Mucor* spp. (Yamashita *et al.*, 1987), *Endothia* (Priest, 1985) และ *Rhizomucor miechei* (Preetha and Boopathy, 1997)

2.1.2.4 เมทิลโลโปรติเอส (metallo protease; EC. 3.4.24) คือเอนไซม์โปรติเอสที่มีอิออนของโลหะรวมในโมเลกุลหรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลาย กล่าวคืออยู่ในลักษณะของโคแฟคเตอร์หรือโคเอนไซม์ (ปราณี อ่านเปรื่อง 2535) เมทิลโลโปรติเอสจะรวมเอนไซม์จากแหล่งต่างๆ เช่น คอลลาจีเนส (collagenases) จากสิ่งมีชีวิตชั้นสูง สารพิษฮีมอร์ราจิก (hemorrhagic toxins) จากพิษงู และเทอร์โมไลซิน (thermolysin) จากแบคทีเรีย เมทิลโลโปรติเอสที่เป็นที่รู้จักกันทั้งหมดมี 30 ชนิด โดยที่เป็นเอนโดเปปติเดส 17 ชนิด เอ็กโซเปปติเดส 12 ชนิด และอีก 1 ชนิดเป็นทั้งเอนโดและเอ็กโซเปปติเดส จากความจำเพาะของปฏิกิริยาทำให้สามารถแบ่งเมทิลโลโปรติเอสได้เป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีพีเอชที่เหมาะสมเป็นกลาง (neutral) กลุ่มที่มีพีเอชที่เหมาะสมเป็นด่าง (alkaline) กลุ่มไมโซแบคเทอร์ I (myxobacter I) และ กลุ่มไมโซแบคเทอร์ II (myxobacter II) โดยที่กลุ่มของเมทิลโลโปรติเอสที่มีพีเอชที่เหมาะสมเป็นกลางจะมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) กลุ่มเมทิลโลโปรติเอสที่มีพีเอชที่เหมาะสมเป็นด่างจะมีความจำเพาะในช่วงกว้าง กลุ่มไมโซแบคเทอร์โปรติเอส I มีความจำเพาะต่ออนุมูลของกรดอะมิโนเล็กๆในบริเวณที่มีการตัดพันธะ และสำหรับกลุ่มไมโซแบคเทอร์โปรติเอส II จะจำเพาะต่ออนุมูลของกรดอะมิโนไลซีนบนตำแหน่งอะมิโนของพันธะเปปไทด์ เมทิลโลโปรติเอสทั้งหมดจะถูกยับยั้งโดยคีเลติงเอเจนท์ เช่น เอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) แต่จะไม่ถูกยับยั้งด้วยซัลฟไฮดริลเอเจนท์ หรือ ไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (DFP) (Rao *et al.*, 1998) เมทิลโลโปรติเอสสามารถสร้างโดยจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Uromyces viciae-fabae* (Rauscher *et al.*, 1995), *B. amyloliquefacien, B. cereus, B. megaterium, B. subtilis* (Priest, 1985)

2.2 แหล่งของเอนไซม์โปรติเอส

2.2.1 เอนไซม์โปรติเอสจากพืช

เอนไซม์โปรติเอสที่พบในพืชมีหลายชนิดเช่น

2.2.1.1 ปาเปน (papain; EC. 3.4.22.2) เป็นเอนไซม์โปรติเอสจากพืชซึ่งเป็นที่รู้จักและมีการใช้ประโยชน์มายาวนาน ปาเปนสกัดได้จากยางของผลมะละกอ (*Carica papaya*) จัดอยู่ในกลุ่มของซีสเตอีนโปรติเอสโดยมีน้ำหนักโมเลกุล 21 กิโลดาลตัน มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 5.5-7 มีค่าพีไอ (pI) เท่ากับ 9.6 และจะเสียสภาพธรรมชาติที่พีเอชต่ำกว่า 4 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 หรือ 90 องศาเซลเซียส ปาเปนจะถูกยับยั้งกิจกรรมโดย H_2O_2, O_2, โลหะหนักบางชนิด เช่น Hg^{2+}, Fe^{3+} และCu^{2+} (Rao *et al.*, 1998; Linsmaier-Bednar, 1998; Wong, 1995)

ตารางที่ 2.1 แสดงกลุ่มของโปรติโอไลติกเอนไซม์

ตระกูล	ตัวอย่างของเอนไซม์โปรติเอส	ลักษณะของอนุมูลของบริเวณเร่ง
ซีรีนโปรติเอส I	ไคโมทริปซิน ทริปซิน อีลาสเตส แพนครีติก แคลลิคเรียน	Asp^{102}, Ser^{195}, His^{57}
ซีรีนโปรติเอส II	ซับติลิซิน	Asp^{32}, Ser^{221}, His^{64}
ซีสเตอีนโปรติเอส	ปาเปน แอกตินิดิน แรท ลิเวอร์ คาเทปซิน บีและเอช	Cys^{25}, His^{159}, Asp^{158}
แอสปาร์ติกโปรติเอส	เพนนิซิลโลเปปซิน *Rhizopus chineses* และ *Endothia parasitica* แอซิด โปรติเอส เรนนิน	Asp^{33}, Asp^{213}
เมทิลโลโปรติเอส I	โบไวน์คาร์บอกซีเปปติเดส เอ	Zn, Glu^{270}, Try^{248}
เมทิลโลโปรติเอส II	เทอร์โมไลซีน	Zn, Glu^{143}, His^{231}

ที่มา: Neurath (1990)

2.2.1.2 โบรมิเลน (bromelain; EC. 3.4.22.4) จัดเป็นซีสเตอีนโปรติเอสสามารถเตรียมได้จากต้นและน้ำของสับปะรด โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 33 กิโลดาลตัน มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 5-9 และ 50-55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์จะหยุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Rao *et al.*, 1998; Linsmaeir-Bednar, 1998)

2.2.1.3 ผลมะเดื่อมีน้ำหนักโมเลกุล 26 กิโลดาลตัน มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 6.7 สามารถทนต่อพีเอช 3.5-9 ได้สูง จะเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ฟีซินถูกยับยั้งการทำงานได้โดยโลหะหนักและกรดซอบิกที่ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ (Linsmaeir-Bednar, 1998)

2.2.1.4 คาราติเนส (karatinase) เป็นเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากพืชบางกลุ่มที่สามารถย่อยเส้นผมได้ ซึ่งการย่อยเส้นผมและขนนั้นจะมีความสำคัญต่อการผลิตกรดอะมิโนที่จำเป็นเช่น ไลซีน และสามารถช่วยป้องกันการขัดขวางระบบการบำบัดน้ำเสีย (Rao *et al.*, 1998)

นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์โปรติเอสจากพืชอื่นๆเช่น แอคตินิดิน (actinidin) จากผลกีวี (Wong, 1995) ไคโมปาเปน (chymopapain) จากมะละกอ (Linsmaeir-Bednar, 1998)

2.2.2 เอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์

เอนไซม์โปรติเอสบางชนิดสามารถพบได้จากสัตว์มีดังต่อไปนี้

2.2.2.1 ทริปซิน (trypsin; EC. 3.4.21.4) เป็นเอนไซม์หลักในระบบย่อยอาหารในลำไส้ ซึ่งทำหน้าที่ย่อยอาหารที่เป็นโปรตีน ทริปซินจัดเป็นซีรีนโปรติเอสซึ่งย่อยพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำโดยมีหมู่คาร์บอกซีเป็นตัวช่วย ทริปซินจะถูกสร้างโดยตับอ่อนในรูปของทริปซิโนเจนแล้วถูกเปลี่ยนให้เป็นทริปซินที่สามารถมีกิจกรรมได้โดยมิวคัซเมมเบรน (mucus membrane) ทริปซินมีน้ำหนักโมเลกุล 23.3 กิโลดาลตัน มีพีเอชที่เหมาะต่อการทำงานระหว่าง 7-9 และจะเสถียรที่พีเอช 3 เอนไซม์จะถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยอัลคาไลติงรีเอเจนท์ เช่น DFP หรือ PMSF (Rao *et al.*, 1998; Linsmaeir-Bednar, 1998)

2.2.2.2 ไคโมทริปซิน (chymotrypsin; EC. 3.4.21.1) จัดเป็นซีรีนโปรติเอสและคล้ายกับทริปซิน ไคโมทริปซินจะสร้างโดยตับอ่อนในรูปของโปรเอนไซม์ไคโมทริปซิโนเจนซึ่งไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้แล้วถูกเปลี่ยนให้เป็นไคโมทริปซินที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้โดยทริปซิน ไคโมทริปซินมีน้ำหนักโมเลกุล 23.8 กิโลดาลตัน เสถียรที่พีเอชช่วง 2.5-6 ที่ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งกิจกรรมโดยโลหะหนัก ไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (DFP) ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF)

ไคโมทริปซินบริสุทธิ์จะถูกนำมาใช้สำหรับการวินิจฉัยโรคและใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ต่างๆ (Rao *et al.*, 1998; Linsmaeir-Bednar, 1998)

2.2.2.3 เปปซิน (pepsin; EC. 3.4.23.1-3) จัดเป็นแอซิดโปรติเอสพบในกระเพาะอาหารของสัตว์มีกระดูกสันหลังทุกชนิด โดยครั้งแรกจะถูกสร้างขึ้นมาในรูปโปรเอนไซม์เปปซิโนเจน แล้วเกิดการเร่งปฏิกิริยาโดยตัวของมันเองในสภาพที่มีกรดไฮโดรคลอริก เปปซินเป็นแอสปาร์ติกโปรติเอสซึ่งจะมีลักษณะเหมือนกับโปรติเอสที่สร้างจากไวรัส ชนิด 1 (type 1) ซึ่งทำให้เกิดภูมิคุ้มกันบกพร่องในคนโดยโปรติเอสเอชไอวี 1 จะมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการเจริญและแบ่งตัวของไวรัส เปปซินมีน้ำหนักโมเลกุล 34.5 กิโลดาลตัน มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานระหว่าง 1 และ 2 เสถียรที่พีเอช 2.5 และปฏิกิริยาจะหยุดที่พีเอช 6 (ปราณี อ่านเปรื่อง 2535; Rao *et al.*, 1998)

2.2.2.4 เรนนินหรือเรนเนท (rennin, rennet, chymosin; EC. 3.4.23.4) เป็นเอนไซม์ที่คล้ายกับเปปซินสามารถพบได้ในกระเพาะของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่มี 4 กระเพาะ โดยจะถูกสร้างจากตัวตั้งต้นที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาซึ่งได้แก่โปรเรนนิน โปรเรนนินจะถูกเปลี่ยนเป็นเรนนินโดยการกระตุ้นของเปปซินหรือเกิดจากการกระตุ้นภายในตัวของมันเอง เรนนินมีน้ำหนักโมเลกุล 30.7 กิโลดาลตัน มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 3.5 และจะเกิดการสลายตัวที่พีเอชต่ำกว่า 3.5 ที่พีเอชสูงกว่า 6 จะเริ่มเสียสภาพธรรมชาติ เอนไซม์นี้จะเสถียรที่พีเอช 5 และจะเสถียรยิ่งขึ้นเมื่ออยู่ในกลีเซอรอล มีความจำเพาะต่อการสลายพันธะเปปไทด์ระหว่าง Phe105-Met106 ของโปรตีนนม (เคซีน) เรนนินจะถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมนมสำหรับผลิตเนยแข็ง (ปราณี อ่านเปรื่อง 2535; Rao *et al.*, 1998; Wong, 1995)

2.2.3 เอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์

2.2.3.1 เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มีมากมายหลายชนิดดังที่ได้เคยมีการรายงานไว้เช่น

Cowan *et al.* (1987) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Desulfurococcus mucosus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 88 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จัดเป็นซีรีนโปรติเอสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 52 กิโลดาลตัน มีค่าพีไอ 8.7 และถูกยับยั้งด้วยไดไอโซโพรพิลฟอสโฟโรฟลูออริเดท (di-isopropyl phosphorofluoridate) ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF) และไคโมสตาติน (chymostatin) เอนไซม์นี้สามารถทนต่อความ

ร้อนได้สูงกว่าเอนไซม์โปรติเอสอื่นๆที่เคยมีการรายงายไว้คือมีค่า $t_{1/2}$ ที่ 95 องศาเซลเซียส 70-90 นาที และ $t_{1/2}$ ที่ 105 องศาเซลเซียส 8-9 นาที

Lu and Chang (1996) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541 โดยพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตนั้นเป็นชนิดที่ทนต่อความร้อนได้สูง 60 องศาเซลเซียส มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 7 และถูกยับยั้งกิจกรรมได้ด้วยเอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA)

Santinanalert *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ PS 719 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณน้ำพุร้อน ปรากฏว่าแบคทีเรียนี้สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่พีเอช 9-11.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์นี้จะมีความจำเพาะต่อเคซีนมากที่สุด และถูกยับยั้งด้วย 3,4 ไดคลอโรไอโซคูมาริน (3,4-DCI) ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

Patke and Dey (1998) รายงานผลการศึกษาการผลิตโปรติโอไลติกเอนไซม์จากแอคติโนมายเซทที่ทนความร้อนได้สูง (themophilic actinomycete) *Streptomyces megasporus* SDF 4 ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีกิจกรรมในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่กว้างคือที่พีเอช 6-12 และ 25-85 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่จะมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 8 และ 10 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งขึ้นอยู่กับอิออนของแคลเซียมโดยเอนไซม์จะสามารถทนต่อความร้อนเพิ่มขึ้นเมื่อมีอิออนของแคลเซียม 0.01 โมลต่อลิตร เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งโดยเอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA) และฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF) จึงสามารถสรุปได้ว่าเป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดซีรีนโปรติเอสที่ต้องการอิออนของโลหะ

2.2.3.2 เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา

เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มีเป็นจำนวนมากตามที่เคยมีการรายงานไว้ เช่น

Hislop *et al.* (1982) รายงานผลการศึกษาการผลิตแอซิดโปรติเอสจากเชื้อ *Monilinia fractigena* ในห้องปฏิบัติการ และที่ติดเชื้อในผลแอปเปิล พบว่าเอนไซม์จากทั้ง 2 แหล่งมีสมบัติที่เหมือนกันคือ มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะต่อการทำงานที่ 3.4 และ 47 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เสถียรที่พีเอช 5 เอนไซม์นี้ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเปปสตาตินและไดอะโซอะซีทิล-ดีแอล-นอร์ลิวซีนเมทิลเอสเทอร์ (DAN) ที่มีอิออนของคอปเปอร์อยู่ด้วย แต่พาราไฮโดรซีเมอร์

คิวรีเบนโซเอส (p-hydroxymercuribenzoat) เอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA) หรือตัวยับยั้งทริปซิน (trypsin inhibitor) จะไม่มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์นี้

Bidochka and khachaturians (1987a) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Beauverria bassiana* GK 2016 ที่เจริญในอาหารที่มีเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน โดยเอนไซม์ที่สร้างมีมวลโมเลกุล 35 กิโลดาลตัน มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 8.5 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์จะหยุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และถูกยับยั้งกิจกรรมโดยฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF)

Dalton and Heffernan (1989) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Fasciola hepatica* เมื่อทำการตรวจสอบด้วย SDS-PAGE ที่มีเจลาตินเป็นสับสเทรต ผลปรากฏว่าพบเอนไซม์โปรติเอสทั้งหมด 11 ชนิด โดยเอนไซม์โปรติเอสที่มีมวลโมเลกุล 46 44 42 40 28 และ 27.5 กิโลดาลตัน จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ช่วงพีเอช 4.5-8.0 และเอนไซม์โปรติเอสที่มีมวลโมเลกุล 88 83 80 76 และ 60 กิโลดาลตัน จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ช่วงพีเอช 3-4.5 เอนไซม์ทั้งหมดนี้จะถูกยับยั้งด้วยลูเปปติน (leupeptin) และแอล-3-คาร์บอกซีทราน-2,3-อีพอกซีโพรพิล-ลูไซลามิโด (4-กัวนิดิน) บิวเทน (E-64) จึงสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *F. hepatica* เป็นชนิดไทออลโปรติเอส

Segers *et al.* (1994) ได้รายงานผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Verticillium chlamydosporium* ในอาหารที่มีเปปโตนจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ผลปรากฏว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้หลายชนิด ซึ่งหนึ่งในเอนไซม์โปรติเอสนั้นคือ VCP 1 (มีมวลโมเลกุล 33,000 ดาลตัน พีไอ 10.2) ซึ่งจะไวต่อ PMSF และ TPCK มาก แต่ไม่ตอบสนองต่อตัวยับยั้งชนิดไข่ขาวของไก่และ soya bean trypsin และ VCP 1 จะสามารถย่อยสลายสับสเทรตที่เป็นพอลิเมอร์ได้หลายชนิดรวมทั้ง Azocoll hide protein, อีลาสติน (elastin) , เคซีน (casein) และ อัลบูมิน (albumin)

2.2.3.3 เอนไซม์โปรติเอสในไวรัส

เอนไซม์โปรติเอสจากไวรัสมีความสำคัญมากต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของไวรัสจนกระทั่งกลายเป็นสาเหตุของโรคเช่น เอดส์ และมะเร็ง โดยพบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ไวรัสสร้างขึ้นจะเป็นชนิด ซีรีนเปปติเดส แอสปาร์ติกเปปติเดส และซีสเตอีนเปปติเดส โดยเอนไซม์เปปติเดสที่สร้างจากไวรัสเป็นชนิดเอนโดเปปติเดส ซึ่งแอสปาร์ติกเปปติเดสมีความจำเป็นต่อกระบวนการรวมตัว (assembly) และกระบวนการลอกแบบ (replication) ของไวรัส ในปัจจุบันได้มีการค้นคว้าวิจัยเพื่อมุ่งเน้นไปยังโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โปรติเอสจากไวรัส และการมี

ปฏิกิริยาต่อตัวยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ ด้วยความมุ่งหมายเพื่อการออกแบบตัวยับยั้งที่สามารถต่อต้านและทำลายโรคเอดส์ (Rao *et al.*, 1998)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์นั้นมีปัจจัยหลายอย่างได้แก่ แหล่งของคาร์บอน ไนโตรเจน พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทั้งสิ้น ดังที่ได้มีผู้รายงานไว้ เช่น

Abraham *et al.* (1993) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Ophiostoma piceae* ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่างๆกันคือ 3.2, 5.1, 6.1, 7.1, 8.3 และ 8.9 ปรากฏว่าเชื้อ *O. piceae* สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.1

Germemia *et al.* (1993) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma hazianum* ในอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน พบว่าในอาหารที่เติมแมมเบรนของ *T. viride* จะสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด และยังพบว่าในอาหารที่เติมกลูโคสหรือพอลิเมอร์ของกลูโคสจะไม่มีการชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์โปรติเนส

St. Leger *et al.* (1993) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *M. anisopliae* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆกันคือ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 0.4 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ คิวติเคิลจากตั๊กแตนหนวดสั้น 1 เปอร์เซ็นต์ อีเลสติน 1 เปอร์เซ็นต์ เคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะมิโนอะลานิน 1 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะมิโนลูซีน 1 เปอร์เซ็นต์ ผลปรากฏว่าเชื้อ *M. anisopliae* สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส Pr1 ได้สูงที่สุดในอาหารที่เติมคิวติเคิล สำหรับเอนไซม์อะมิโนเปปติเดสสามารถสร้างได้สูงสุดในอาหารที่เติมอีลาส ติน และสามารถสร้างเอนไซม์ไดเปปติดิลเปปติเดสได้สูงที่สุดในอาหารที่เติมคิวติเคิล และพบว่าเชื้อจะสร้างเอนไซม์ได้น้อยมากในอาหารที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ

Paterson *et al.* (1994) ศึกษาการชักนำการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarizium anisopliae* ในอาหาร basal salts ที่เติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆกัน ได้แก่ คิวติเคิล อีลาสติน คอลลาเจน อัลบูมิน เจลาติน เซลลูโลส และไซแลน ผลปรากฏว่า *M. anisopliae* ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดในอาหารที่มีคิวติเคิลเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

Bonants *et al.* (1995) ได้ศึกษาการผลิตซีรีนโปรติเอสจากเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ในอาหาร mineral salts ที่เติมคอลลอยดอลไคติน (colloidal chitin), เวอร์ทิลลิน (vertillin) และไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogene hapla* เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน ผลปรากฏว่าเชื้อรานี้ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดในอาหารที่เติมเวอร์ทิลลิน

Phutakul and Kanasawud (1996) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่ ในอาหารที่มีโปรตีนต่างๆกันเป็นสับสเทรต ได้แก่ เคซีน ฮีโมโกลบิน เจลาติน และถั่วเหลือง ปรากฏว่าแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดในอาหารที่เติมเคซีน

Dobinson *et al.* (1997) รายงานผลการศึกษาการผลิต Trypsin-like protease โดยเชื้อรา *Verticillium dahliae* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆกัน ผลปรากฏว่า *V. dahliae* จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับสูงในอาหารที่เติมโปรตีนจากพืชและสัตว์เป็นแหล่งไนโตรเจน และพบว่าในอาหารที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับหางนมจะผลิตเอนไซม์น้อยกว่าในอาหารที่เติมกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์

Li *et al.* (1997) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแตกต่างกัน พบว่าเชื้อรา *T. lanuginosus* ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุดในอาหารที่มีเคซีน 4 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 0.4 เปอร์เซ็นต์ และ ยีสต์สกัด 0.4 เปอร์เซ็นต์

Channe and Shewale (1998) รายงานผลการศึกษาสภาวะในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *Aspergillus niger* MC 4 พบว่าเชื้อ *A. niger* MC 4 จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสชนิดมิลค์คลอทติงโปรติเอส (milk clotting protease) ในอาหารที่มีพีเอช 5.6-5.8 อุณหภูมิ 55-60°ซ และผลิตแอสปาร์ติกโปรติเอสในอาหารที่มีพีเอช 3 อุณหภูมิ 55°ซ

2.4 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ หลายประการ เช่น พีเอช อุณหภูมิ ความคงตัวของเอนไซม์ รวมทั้งอิออนและสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ ผลของปัจจัยเหล่านี้ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 2.3

2.4.1 อิทธิพลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

พีเอชเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์มาก โดยเอนไซม์จะมีพีเอชช่วงหนึ่งที่ให้อัตราเร็วเริ่มต้นสูงสุดซึ่งจะเรียกว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน (optimum pH) เอนไซม์โปรติเอสบางชนิดจะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็นกลาง บางพวกทำงานได้ดีช่วงพีเอชที่ต่ำลงไปค่อนไปทางกรด บางพวกทำงานได้ดีที่ช่วงพีเอชเป็นกรดมาก นอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอสบางชนิดก็สามารถทำงานได้ดีที่ช่วงพีเอชเป็นด่าง ดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 2.2

2.4.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน เช่น เอนไซม์โปรติเอสจาก *Paecilomyces lilacinus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 60 องศาเซลเซียส (Bonants *et al.*, 1995) เอนไซม์โปรติเอสจาก *A. oryzae* มีอุณหภูมิที่เมาะสมต่อการทำงานที่ 50 องศาเซลเซียส (Nakadia *et al.*, 1973) เอนไซม์โปรติเอสจาก *A. usami* mut. shirousami IFO 6082 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ระหว่าง 55-60 องศาเซลเซียส (Morimura *et al.*, 1994)

2.4.3 อิทธิพลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส

พีเอชนอกจากจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แล้วยังมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ด้วย โดยความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆนั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการเช่น อุณหภูมิ อุณหภูมิ ชนิดของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของกลีเซอร์รอล และสารซัลฟไฮดริล ความเข้มข้นของอิออนของโลหะที่เจือปนอยู่และความเข้มข้นของสับสเทรตและโคแฟคเตอร์ สำหรับเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะคงตัวที่พีเอชต่างๆกันเช่น เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Aspergillua ustus* จะคงตัวที่พีเอช 6-6.3 (Takahashi and Kikuchi, 1993), เอนไซม์โปรติเอสจาก *Endothia parasitica* จะมีความคงตัวที่พีเอช 4-4.5 (Whitaker, 1970 อ้างถึงใน Linsmaier-Bednar, 1998), เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Rhizopus chinensis* มีความคงตัวที่พีเอช ระหว่าง 3-6 (Matsubara and Feder, 1971 อ้างถึงใน Linsmaier-Bednar, 1998)

2.4.4 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส

อุณหภูมินอกจากจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แล้วยังมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ สำหรับอิทธิพลต่อความคงตัวของเอนไซม์นั้น จะขึ้นอยู่ปัจจัยหลายประการได้แก่ พีเอช หรือการมีลิเกนจับอยู่ด้วยหรือไม่ สำหรับเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดอาจจะมีความคงตัวต่ออุณหภูมิแตกต่างกัน เช่น *Streptomyces pactum* DSM 40530 จะผลิตเอนไซม์

ตารางที่ 2.2 แสดงอิทธิพลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

แหล่งของเอนไซม์โปรติเอส	พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน	อ้างอิง
พวกที่ทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง		
Trypanosoma brucei	7	Okenu *et al.*, 1999
Phytolacca americana	7.5-8	Uchikoba *et al.*, 1998
Pseudomonase aeruginosa S3	7.5	Saleh and Zahran, 1998
พวกที่ทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกรด		
potato tuber	4-5	Guevara *et al.*, 1999
Actinidia eriantha Benth	3.8	ChuSi *et al.*, 1999
พวกที่ทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นด่าง		
Aurebasidium pullulans	9.5-10.5	Donaghy and McKay, 1993
Gelleria mellonella	11	Spiridonov *et al.*, 1992

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

โปรติเอสที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Böckle *et al.*, 1995), *Neurospora crassa* ผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Lindberg *et al.*, 1981)

2.4.3 อิทธิพลของอิออนโลหะและสารประกอบอินทรีย์บางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

อิออนและสารเคมีต่างๆมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส เช่น เอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดสจาก *Metarhizium anisopliae* สามารถถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยฟีแนนโทรลีน (phenanthroline) แต่จะไม่ถูกยับยั้งด้วย Cd^{2-} Co^{2+} Zn^{2+} (St. Leger, *et al.*, 1994) เอนไซม์โปรติเอสจาก *Verticillium dahliae* จะถูกยับยั้งกิจกรรมด้วย Hg^{2+} (Lambert and Pujarniscle, 1984) เอนไซม์โปรติเอสจาก *Beauveria bassiana* ต้องการ Ca^{2+}และสารไดไทโอธรีทอล (Dithiothreitol) ในการกระตุ้นให้การทำงานดีขึ้น (Bidochka and Khachatourians, 1987)

2.5 ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส (Rao *et al.*, 1998)

เอนไซม์โปรติเอสสามารถใช้ประโยชน์ได้หลายประการที่สำคัญได้แก่การใช้ในอุตสาหกรรมสารทำความสะอาด อุตสาหกรรมอาหาร และเนื่องจากแนวโน้มการพัฒนาเทคโนโลยีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการส่งเสริมให้มีการใช้โปรติเอสในอุตสาหกรรมเครื่องหนังและในกระบวนการการผลิตทางชีวภาพอื่นๆอย่างกว้างขวาง

2.5.1 การผลิตสารซักฟอก

เอนไซม์โปรติเอสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารทำความสะอาดทั้งชนิดที่เป็นส่วนประกอบในผงซักฟอกที่ใช้กันในบ้านเรือนทั่วไปจนถึงเป็นสารทำความสะอาดคอนเทคเลนส์หรือฟันปลอม ในอุตสาหกรรมผลิตสารทำความสะอาดได้มีการผลิตสารทำความสะอาดที่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1913 โดยให้ชื่อว่า "Burnus" ซึ่งเป็นสารประกอบของโซเดียมคาร์บอเนตและเอนไซม์ที่สกัดจากตับอ่อน สารทำความสะอาดที่มีส่วนประกอบของเอนไซม์จากแบคทีเรียถูกผลิตขึ้นครั้งแรกเมื่อปีค.ศ. 1956 ภายใต้ชื่อ BIO-40 และในปีค.ศ. 1960 บริษัทโนโว อินดัสทรี ผลิตเอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) จาก *Bacillus licheniformis* ภายใต้ชื่อทางการค้า BIOTEX ซึ่งนำมาเป็นส่วนประกอบในการผลิตสารทำความสะอาด สำหรับเอนไซม์ที่เป็นส่วนประกอบของสารทำความสะอาดในปัจจุบันที่มีอยู่ในท้องตลาดเป็นชนิดซีรีนโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus*

38535

ตารางที่ 2.3 แสดงผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

แหล่งของเอนไซม์โปรติเอส	pH		Temperature (°C)		อ้างอิง
	Optimum	Stable	Optimum	Stable	
Dieffenbachia maculata	8.0	-	50	-	Chitre *et al.*, 1998
maize pollen	4.8	-	45-50	-	Radlowski, 1994
Haliotis discus hannai Ino	2.6, 5.0	-	50	-	HuiPing *et al.*, 1997
Sardinops melanastictus	5.0	-	60	-	Bakar and Hashim, 1996
Streptomyces pactum DSM 40530	8.0	7-10	60-65	40-75	Böckle *et al.*, 1995
Thermoactinomyces sp.	11.0	5-12	85	-	JungKee *et al.*, 1996
Thermus caldophilus strain GK24	7.2-7.8	5-11	90	70	Taguchi *et al.*, 1982
Aspergillus oryzae	8.5	6.5-9	60	70	Nakadai *et al.*, 1973
Thermomyces lanuginosus	5.0, 9.0	4-11	70	50	Li *et al.*, 1997
Candida albicans	6.0	-	42	-	Vazquez *et al.*, 1993

ตารางที่ 2.4 แสดงผลของอิออนโลหะและตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์

Sources	Ion		Inhibitor	อ้างอิง
	Activated	Inactivated		
Pseudomonas aeruginosa CCRC 15541	Fe^{2+}, Fe^{3+}	Zn^{2+}, Ni^{2+}, Hg^{2+},Cu^{2+}	EDTA	Lu and Chang, 1996
Porphyromonas gingivalis	Mg^{2+}, Mn^{2+}	-	TLCK, leupeptin	Fletcher et al., 1994
Streptomyces megasporus strain SPD4	Co^{2+}, Cu^{2+},	Fe^{3+}, Hg^{2+}	EDTA, PMSF	Patke and Day, 1997
Vibrio mimicus	Zn^{2+}, Mn^{2+}	Cu^{2+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}	EDTA , phospho -ramidon	Chowdhury et al., 1990
Aspergillus oryzae	Co^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}	Fe^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}	EDTA, o-phe nanthroline, mer-captoethanol	Nakadai et al., 1973
Metarhizium anisopliae	-	-	DFP, PCPI	St. Leger et al., 1994
Monilinia fructigena	-	Fe^{3+}	SDS, pepstatin, DAN	Hislop et al., 1982
Mucor racemosus	-	-	DCI, DFP, PCMB	Disanto et al., 1992
Mucor pusillus	Ca^{2+}	-	EGTA	Yamashita et al., 1987
Verticillium suchlasporium	Ca^{2+}	Hg^{2+}	PMSF, aprotinin, leupeptin, PCMB	Lopez-Llorca, 1990
Uromyces viciae-fabae	Ca^{2+}	-	PMSF	Rauscher et al., 1995

EGTA คือ ethyleneglycol bis (2-aminoethylether) tetraacetic acid

PCPI คือ potato carboxypeptidase inhibitor

2.5.2 อุตสาหกรรมเครื่องหนัง

อุตสาหกรรมเครื่องหนังประกอบด้วยกระบวนการหลายขั้นตอนได้แก่ การล้าง การเอาขนออก การฟอก และการย้อม เนื่องจากองค์ประกอบหลักของเส้นขนและผิวหนังของสัตว์เป็นโปรตีนซึ่งในอดีตอุตสาหกรรมเครื่องหนังมีการใช้สารเคมีอันตราย เช่น โซเดียมซัลเฟตในกระบวนการผลิต ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมและการกำจัดของเสีย ดังนั้นการใช้เอนไซม์ในกระบวนการฟอกหนังทดแทนการใช้สารเคมีถือได้ว่าเป็นทางเลือกที่ดี เนื่องจากสามารถลดปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อมได้ ในอุตสาหกรรมเครื่องหนังได้มีการชักนำเอนไซม์โปรติเอสมาใช้สำหรับการย่อยส่วนประกอบที่ไม่ใช่คอลลาเจนของหนังและเพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่อยู่ในรูปของไฟเบอร์ เช่น อัลบูลมิน และโกลบิลิน

2.5.3 อุตสาหกรรมอาหาร

อุตสาหกรรมอาหารได้มีการใช้เอนไซม์โปรติเอสมาเป็นเวลานานแล้วเช่น ใช้ในการทำเนยแข็ง การทำขนมปัง การทำซอสถั่วเหลือง และการหมักเนื้อให้นุ่ม

2.5.3.1 อุตสาหกรรมนม

การใช้เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรมนมส่วนใหญ่ใช้ในการทำเนยแข็ง โดยเอนไซม์ที่ใช้ทำให้เอนไซม์นมตกตะกอนสามารถแบ่งเป็น 3 พวกคือ เชื้อในกระเพาะวัวเพื่อทำให้นมจับตัวเป็นก้อน สารที่ทำให้นมตกตะกอนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ไคโมซิน (EC. 3.4.23.4) ที่ผลิตจากกระบวนการพันธุวิศวกรรม ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสที่ทำให้นมตกตะกอนทั้งที่ได้จากสัตว์และจุลินทรีย์จัดเป็นแอซิดแอสปาร์ราเตทโปรติเอส ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30,000-40,000 ดาลตัน โดยเชื้อในกระเพาะลูกวัวอายุน้อย (ยังไม่อย่านม) จะมีอัตราส่วนของไคโมซินต่อเปปซินสูงสุด แต่เนื่องจากเชื้อในกระเพาะลูกวัวมีจำนวนน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการในการผลิตชีสทำให้ต้องมีการศึกษาวิจัยในการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการผลิตชีสมากขึ้น เช่น การใช้เอนไซม์จาก *Mucor michii*, *B. subtilis* และ *Endothia parasitica*

2.5.3.2 อุตสาหกรรมการผลิตขนมปัง

แป้งสาลีเป็นองค์ประกอบหลักในกระบวนการผลิตขนมปังซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำที่เรียกว่า กลูเทน (gluten) ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดความนุ่มหรือความแข็งของขนมปัง ในกระบวนการผลิตขนมปังได้มีการใช้เอนโดโปรติเนสและเอ็กโซโปรติเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus orzyae* ในการย่อยโปรตีนกลูเทน การใช้เอนไซม์ทำให้ได้ความนุ่มที่แตกต่างกัน และการเติมโปรติเนสจะช่วยลดเวลาในการผสมแป้งและเพิ่มขนาดก้อนขนมปัง

2.5.3.3 **การผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง**

เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นอาหารที่มีโปรตีนคุณภาพดีอยู่สูงจึงมีการใช้เป็นอาหารกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งเดิมมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสในการทำซอสถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองอื่นๆมาเป็นเวลานาน โดยเอนไซม์โปรติเอสที่มีสภาพเป็นด่างและเป็นกลางจากเชื้อราเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการผลิตซอสถั่วเหลือง การดัดแปลงเอนไซม์จะช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น การใช้อัลคาเลสที่พีเอช 8 ทำให้ได้ผลผลิตโปรตีนที่มีคุณภาพดีและมีการเน่าเสียน้อย ผลผลิตที่ได้จากการย่อยจะถูกใช้ในการทำเครื่องดื่มโปรตีนและการผลิตอาหารสัตว์

2.5.3.4 **ใช้เป็นสารป้องกันการเปลี่ยนรสของสารสกัดโปรตีน**

สารสกัดโปรตีนสามารถใช้ประโยชน์ได้หลายประการ เช่น ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในอาหารทารก อาหารเสริมสุขภาพทางการแพทย์และสารปรุงแต่งรส แต่พบว่าจะมีปัญหาเกี่ยวกับรสที่เปลี่ยนของสารสกัดโปรตีนเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการใช้ในอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ การเปลี่ยนรสของสารสกัดโปรตีนจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของกรดอะมิโนที่ชอบน้ำที่อยู่ในสารสกัดโปรตีนนั้น นอกจากนี้การที่มีโพรลิน (proline) หลงเหลือในศูนย์กลางของเปปไทด์สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนรสมากขึ้นด้วย เอนไซม์เปปติเดสสามารถแก้ปัญหานี้ได้โดยการทำให้กรดอะมิโนที่ชอบน้ำและโพรลินแตกตัว ดังนั้นการใช้เอ็นโดโปรติเอสสำหรับการย่อยในขั้นต้นและการใช้อะมิโนเปปติเดสสำหรับขั้นตอนที่สองมีความจำเป็นในการผลิตสารสกัดโปรตีนเพื่อลดการเปลี่ยนรสที่จะเกิดขึ้น

2.5.3.5 **การสังเคราะห์แอสปาร์แทม (aspartame)**

การใช้แอสปาร์แทมเป็นสารให้ความหวานที่ปราศจากแคลอรี่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยา แอสปาร์แทมเป็นไดเปปไทด์ที่ประกอบด้วยแอล-แอสปาร์ติกแอซิด และเมทิลเอสเทอร์ของแอล-ฟีนิลอะลานิน ซึ่งโครงสร้างแบบแอลของกรดอะมิโน 2 ชนิดนี้เป็นตัวทำให้เกิดรสหวานของแอสปาร์แทม ซึ่งการให้คงสภาพเช่นนี้มีความสำคัญ แต่เป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตหากใช้วิธีการทางเคมี ดังนั้นการใช้เอนไซม์จึงเป็นผลดีมากกว่าถึงแม้ว่าทั่วไปการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจะขึ้นอยู่กับไฮโดรไลติกเอนไซม์ แต่สามารถกระตุ้นการทำงานย้อยกลับของปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่มีการควบคุมทางจลนศาสตร์ได้ ในการเตรียมแอสปาร์แทมจากการสังเคราะห์โดยการใช้เอนไซม์สามารถเตรียมได้จากเทอร์โมไลซีน (thermolysine) ซึ่งได้จาก *Bacillus thermoprotyolyticus* ซึ่ง Toya Soda และ DSM จากเนเธอร์แลนด์เป็นผู้ผลิตแอสปาร์แทมรายใหญ่ในปัจจุบัน

2.5.4 อุตสาหกรรมยา

มีการใช้โปรตีนอย่างหลากหลายและเจาะจงในการพัฒนายารักษาโรคอย่างมีประสิทธิภาพเช่น การให้ผู้ป่วยรับประทานยาโปรติเนสจาก *Aspergillus oryzae* (Uizym และ Nortase) เพื่อช่วยในการย่อยอาหารสำหรับผู้ป่วยที่ขาดไลติกเอนไซม์ นอกจากนี้ยังมีการใช้คอลลาจีเนส ที่ผลิตจาก *Clostridium* หรือ สับติลิซิน ร่วมกับยาปฏิชีวนะหลายชนิดในการรักษาบาดแผลและรอยที่เกิดจากการไหม้ของผิวหนัง และยังมีการใช้แอสปาร์จิเนสที่แยกได้จาก *E. coli* เพื่อกำจัดแอสปาราจินในกระแสเลือดที่เกิดเนื่องจากมะเร็งเม็ดเลือดขาว (lymphocytes leukemia) นอกจากนี้ยังพบว่าอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Conicliboly coronatus* สามารถใช้แทนทริปซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัตว์

2.5.5 การใช้ประโยชน์เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ

การใช้สารเคมีในการกำจัดและควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชนั้น พบว่ามีอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมอย่างมาก หากผู้ใช้ไม่มีความรู้และใช้อย่างไม่ถูกต้อง ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาค้นคว้าเพื่อที่จะนำสารชีวภาพมาใช้ในการกำจัดและควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชทดแทนสารเคมี เช่นการใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *Trichoderma hazianum* ในการควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคพืช (Elad and Kapat, 1999) การใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *Paecilomyces* sp. ในการกำจัดไส้เดือนฝอย (Bonants *et al.*, 1995) การใช้เอนไซม์จาก *Beauverria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Luz *et al.*, 1998) และ *Entomophthora* spp. ในการกำจัดและควบคุมแมลงศัตรูพืช เป็นต้น

2.6 เชื้อรา *Metarhizium anisopliae*

เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* เป็นราในกลุ่ม Deuteromycetes สามารถแยกได้จากแมลงและดิน *M. anisopliae* สร้างสปอร์สีเขียวเข้ม มีรูปร่างทรงกระบอก เป็นสปอร์ชนิดที่มีนิวเคลียสเพียงหนึ่งอัน *M. anisopliae* สามารถจำแนกได้เป็น 2 วาไรตี้ (varites) ตามขนาดของคอนิเดีย (conidia) คือ วาไรตี้ majus ซึ่งจะมีขนาดของคอนิเดียยาว 10-14 ไมโครเมตร และวาไรตี้ anisopliae จะมีขนาดของคอนิเดียยาว 5-8 ไมโครเมตร วาไรตี้ anisopliae นั้นสามารถพบได้ทั่วไปและมีตัวที่ให้อาศัย (host) หลายชนิด สำหรับวาไรตี้ majus จะจำเพาะต่อด้วงมะพร้าว *M. anisopliae* เป็นเชื้อราชนิดที่ทนอุณหภูมิได้ปานกลาง (mesophylic fungus) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 25-30 องศาเซลเซียส ซึ่งจะพบน้อยมากที่จะเจริญที่อุณหภูมิเกิน 35 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า 12 องศาเซลเซียส การงอกของคอนิเดียจะต้องการความชื้นโดยเมื่อแช่น้ำเป็นเวลา 44 ชั่วโมงจะทำให้งอกเป็นจำนวนมากและรวดเร็ว สำหรับคอนิเดียสดที่เก็บเกี่ยวจาก

อาหารวุ้นในจานเพาะเชื้อจะงอก 90 เปอร์เซ็นต์หลังจาก 17-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิต่ำการงอกจะยืดเวลายาวขึ้น ระหว่างการงอกของคอนิเดียจะมีการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ไคติเนส และไลเปส ซึ่งจะทำให้ germ tube สามารถเจาะเข้าไปในตัวที่ให้อาศัยได้ ซึ่งเมื่อเจาะเข้าไปในตัวผู้ให้อาศัยได้แล้วจะเริ่มสร้างเส้นใยเจริญห่อหุ้มตัวแมลง นอกจากจะสร้างเอนไซม์ต่างๆแล้ว *M. anisopliae* ยังสร้างสารในกลุ่ม destruxin 5 ชนิด ซึ่ง 1 ใน 5 ชนิด (destruxin E) ของสาร destruxin จะเป็นพิษอย่างรุนแรงต่อแมลง เมื่อแมลงตายหากพื้นที่นั้นมีความชื้นสูงและอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส มันจะสร้างคอนิดิโอฟอร์ (conidiophores) สีขาวเจริญออกมาภายนอกคิวติเคิล (cuticle) ภายใน 24 ชั่วโมง และจะสร้างคอนิเดียสีเขียวขึ้นมาภายใน 1-2 วัน (Charnly and St. Leger, 1991)

2.6.1 เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *M. anisopliae*

2.6.1.1 เอนไซม์เอนโดโปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* ซึ่งถูกปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ Pr 1 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 8 Pr 2 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 9 และ Pr 3 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 5.5 (ต่อ hid protein azure) ในการศึกษาการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แสดงให้เห็นว่าทั้ง Pr 1 และ Pr 2 เป็นซีรีนเอนโดโปรติเอสและมีอนุมูลของฮีสติดีนที่บริเวณเร่ง ความเสถียรต่ออุณหภูมิพบว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่พีเอช 8 จะมีผลต่อกิจกรรมของ Pr 1 เพียงเล็กน้อย (ca 5 %) และจะไม่มีผลต่อกิจกรรมของ Pr 2 เอนไซม์ทั้งสองจะเสียสภาพธรรมชาติโดยความร้อนจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิเกิน 50 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสพบว่า Pr 1 และ Pr 2 มีกิจกรรมเริ่มต้นน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ Pr 1 และ Pr 2 จะแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ต่อเคซีนได้สูง ซึ่ง Pr 1 จะมีกิจกรรมต่อคิวติเคิลและซีรัมอัลบูลมินโซลูเบลโกลบูลาร์โปรตีน (serum albumin soluble globular protein) ได้พอสมควร สำหรับ Pr 2 จะมีกิจกรรมต่อซีรัม คิวติเคิล และคอลลาเจนที่ถูกทำให้เสียสภาพได้เพียงเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามทั้ง Pr 1 และ Pr 2 จะมีผลต่อ hid protein azure (เตรียมจากคอลลาเจนที่ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ) (St. Leger *et al.*, 1987)

2.6.1.2 เอนไซม์เอ็กโซโปรติเอส

เชื้อ *M. anisopliae* ที่เจริญบนคิวติเคิลจะผลิตเอนไซม์เอ็กโซโปรติเอสในกลุ่มอะมิโนเปปติเดส 2 ชนิดคือ อะมิโนเปปติเดสเอ็ม (aminopeptidase M) ซึ่งจะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานระหว่าง 7-8 มีน้ำหนักโมเลกุล 33 กิโลดาลตัน เอนไซม์นี้จะไวต่อตัวยับยั้งกิจกรรมของเมทิลโลเอนไซม์ เช่น เอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA) 1, 10-ฟีแนนโทลีน

(1,10–phenantholine) และโพส-โพรลินไดเปปทิดิวล์อะมิโนเปปติเดส (post-proline dipeptidylaminopeptidase) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 8 มีน้ำหนักโมเลกุล 74 กิโลดาลตัน เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งกิจกรรมโดย DFP แต่จะไม่ถูกยับยั้งโดย PMSF ซึ่งทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าเอนไซม์นี้เป็นชนิดซีรีนไฮโดรเลส เอนไซม์เปปติเดสทั้งสองชนิดไม่สามารถย่อยคิวติเคิลของแมลงได้แต่อย่างไรก็ตามเมื่อร่วมกับ Pr 1 จะมีผลส่งเสริมให้มีการปล่อยของกรดอะมิโน (Charnly and St. Leger, 1991)

2.6.2 ประโยชน์ของเชื้อ *M. anisopliae*

เชื้อ *M. anisopliae* เป็นราที่มีการใช้ประโยชน์ในการควบคุมทางชีวภาพต่อแมลงศัตรูพืชตามที่ได้มีผู้ทำการทดลองไว้เป็นจำนวนมากเช่น

Luz *et al.* (1998) รายงานผลการทดลองนำ *M. anisopliae* มาทดสอบกับตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ *Triatoma infustans* ซึ่งเป็นพาหะของโรค chagas ผลปรากฏว่าเมื่อใช้คอนิเดียความเข้มข้น 4.3 X 10^6 คอนิเดียต่อมล. สามารถฆ่าแมลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์

Zhioua *et al.* (1997) รายงานว่า *M. anisopliae* สามารถทำให้เกิดโรคในเห็บขาดำและ *loxdes scapularis* โดยที่ความเข้มข้นของสปอร์ 10^8 และ 10^7 สปอร์ต่อมล. จะมีผลให้ engorged larvae และ engored เพศเมีย ตายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นที่ฆ่าเห็บได้ 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 10^7 สปอร์ต่อมล. นอกจากนี้ *M. anisopliae* ยังแสดงความสำคัญในการเป็นจุลินทรีย์ที่ควบคุม *loxedes scapularis*

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

สารเคมี

สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

โพเตโตเด็กโตรสอาการ์ (PDA)	บริษัทผู้ผลิต	Diffco
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	"	BHD
โพแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	"	Merck
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	"	Fluka
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	"	Merck
โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	"	BHD
แอมโมเนียมซัลเฟต ($[NH_4]_2SO_4$)	"	Merck
โพแตสเซียมไนเตรท (KNO_3)	"	Merck
แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	"	Merck
กลูโคส (glucose)	"	-
หางนม (skim milk)	"	Diffco
แป้งถั่วเหลือง	"	ดอยคำ
พอลิเปปโตน (polypeptone)	"	Merck
เปปโตน (peptone from casein)	"	Merck
เคซีน (casein from bovine milk)	"	Fluka
เนื้อสกัด (meat extract)	"	Merck
นมสดพาสเจอร์ไรซ์	"	เมจิ
นมสดขาดมันเนยพาสเจอร์ไรซ์	"	เมจิ
นมผงขาดมันเนยเสริมแคลเซียม	"	มิสชั่น

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

เคซีน (casein)	บริษัทผู้ผลิต	B.J.T
ไตรคลอโรอะซีติคแอซิด (TCA)	"	Merck
ฟีนอล (Folin-Ciocalteu's phenol reagent)	"	Merck
กรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosin)	"	Merck
โซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$)	"	Merck

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

ฟีนอล (Folin-Ciocalteu's phenol reagent)	บริษัทผู้ผลิต	Merck
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	"	B.J.T
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	"	Merck
โซเดียมโพแตสเซียมทาร์เตรท (sodium potassium tartrate)	"	Merck
อัลบูมิน (bovine serum albumin)	"	Sigma

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กลูโคซามีน

อะเซทิลอะซีโตน (acetyl aceton)	บริษัทผู้ผลิต	Sigma
กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (glucosamine hydrochoride)	"	Sigma
ไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (4-dimethlamino-benzaldehyde)	"	Fluka
เอธานอล (absolute ethanol)	"	B.J.T
โซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$)	"	Merck
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	"	BHD

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	บริษัทผู้ผลิต	B.J.T
กลูโคส (glucose)	"	-
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนเบซิค (Na_2HPO_4)	"	Merck
โซเดียมโพแตสเซียมทาร์เตรท (sodium potassium tartrate)	"	Merck
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	"	Merck
โซเดียมซัลเฟต ($NaSO_4$)	"	Merck
แอมโมเนียมโมลิบเดต ($[NH_4]_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$)	"	Merck
โซเดียมอาร์ซีเนต ($Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$)	"	Merck

สารเคมีสำหรับศึกษาตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

เปปสตาติน (pepstatin)	บริษัทผู้ผลิต	Sigma
พาราคลอโรเมอร์คิวรีเบนโซอิค แอซิด (PCMB)	"	Sigma
เอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติคแอซิด (EDTA)	"	Sigma
ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF)	"	Sigma
เมทานอล (CH_3OH)	"	B.J.T

สารเคมีสำหรับศึกษาผลของอิออนของโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์

โคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2$)	บริษัทผู้ผลิต	Merck
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)	"	Merck
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	"	Fluka
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$)	"	Merck
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	"	Merck
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	"	Merck
โพแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	"	Merck
เมอร์คิวรีคลอไรด์ ($HgCl_2$)	"	Merck
ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	"	Merck
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$)	"	Merck
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	"	Fluka
ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$)	"	Merck
เลดอะซีเตด ($Pb[AcO]_2 \cdot 3H_2O$)	"	Merck
นิเคิลซัลเฟต ($NiSO_4 \cdot 6H_2O$)	"	Merck
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	"	Merck

อุปกรณ์

1 กล้องจุลทรรศน์ของ olympus รุ่น CHS 3

2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงช่วงแสงมองเห็นและแสงอัลตราไวโอเลตของ Shimasu รุ่น UV 1610

3 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4, 5 และ –20 องศาเซลเซียส

4 ตู้อบความร้อน (hot air oven) ของ Memmert รุ่น 600

5 เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ของ Gallenkamp รุ่น orbital incubator

6 เครื่องเขย่าหลอด (vortex mixer)

7 เครื่องวัดพีเอชของ Denver Instrument รุ่น 215

8 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่งของ Metter-Toledo รุ่น PG 5002 และรุ่น PG 803

9 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งของ Metter-Toledo รุ่น AG 204

10 เครื่องหมุนเหวี่ยงของ Hermle รุ่น z 383 k

11 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ของ Harvey รุ่น Hydroclave MC 10

12 เครื่องอังน้ำ (water bath) ของ Memmert

13 ไมโครปิเปต (micropipette)

14 ที่นับเม็ดเลือด (heamacytometer) ของ Boeco (Improved Neubauer) และที่นับ

15 คอร์กบอร์เรอร์ (cork borrer) เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร

16 หลอดทดลอง (test tube) ของ Pyrax

17 ถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น Biostat B ของ B. Braun Biotech International

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* DOA FC 2156 ที่แยกได้จากดินซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานวิทยาไมโคร กองโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

วิธีการวิจัย

3.1 การเก็บรักษาตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์

เลี้ยงเชื้อ *Metarhizium anisopliae* DOA FC 2156 บนอาหารวุ้นเอียง PDA ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสบนอาหารแข็ง

ถ่ายเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 จากอาหารวุ้นเอียง PDA ลงบนจานเพาะเชื้อซึ่งมีอาหาร PDA อยู่ ทำการบ่มเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตัดเส้นใยด้วยคอร์กบอร์เรอร์เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร วางบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร casein hydrolysis medium (Paterson and Bridge, 1994) ทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน วัดขนาดของโคโลนี และขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้น

3.3 เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156

เขี่ยเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ที่เจริญบนอาหารวุ้นเอียง PDA มาเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 50 มล. ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายสปอร์ออกจากฟลาสก์โดยเติมสารละลายทวีน 80 ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ แล้วขูดสปอร์ให้หลุดออกจากเส้นใยด้วยลูบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วกรองเส้นใยออกโดยผ่านสำลี

นำสปอร์แขวนลอยมานับจำนวนสปอร์ด้วยที่นับเม็ดเลือด (haemacytometer) แล้วทำให้สปอร์แขวนลอยมีความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมล.

3.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

3.4.1 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

3.4.1.1 ศึกษาแหล่งของสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ โปรติเอส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร casein hydrolysis medium ของ Paterson และ Bridge (1994) โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ต่างๆกัน ได้แก่ หางนม แป้งถั่วเหลือง เคซีนจากนม พอลีเปปโตน เปปโตนจากเคซีน เนื้อสกัด นมผงขาดมันเนยเสริมแคลเซียม ชนิดละ 5 กรัมต่อลิตร นมสดพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดขาดมันเนยเสริมแคลเซียมพาสเจอร์ไรซ์ ชนิดละ 25 มล.ต่อลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตร 60 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสปอร์แขวนลอยจากข้อ 3.3 ให้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 1.66×10^6 สปอร์ต่อมล.ของอาหาร ทำการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำมาวัดพีเอชของอาหาร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และปริมาณโปรตีน

3.4.1.2 ศึกษาแหล่งของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์สูงสุดซึ่งทราบจากการทดลองข้อ 3.4.1.1 โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสาร อนินทรีย์ต่างๆกันได้แก่ โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) โพแตสเซียมไนเตรท (KNO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($[NH_4]_2SO_4$) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ชนิดละ 3 กรัมต่อลิตร และไม่เติมสารอนินทรีย์ บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตร 60 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสปอร์แขวนลอยจากข้อ 3.3 ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 1.66×10^6 สปอร์ต่อมล.ของอาหาร ทำการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำมาวัดพีเอชของอาหาร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ปริมาณโปรตีน และน้ำตาลรีดิวซ์

3.4.1.3 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งของสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากการทดลองข้อ 3.4.1.1 และ 3.4.1.2 เมื่อทราบแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดแล้ว จากนั้นนำมาศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารอินทรีย์ความเข้มข้นต่างๆกันคือ 5 7.5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตร 60 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสปอร์แขวนลอยจากข้อ 3.3 ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 1.66×10^6 สปอร์ต่อมล.ของอาหาร ทำการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำมาวัดพีเอชของอาหาร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ปริมาณโปรตีน และน้ำตาลรีดิวซ์

3.4.2 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โปรติเอส

จากการทดลองข้อ 3.4.1 เมื่อทราบถึงแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากนั้นนำผลที่ได้มาศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาปรับพีเอชก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อต่างๆกัน ได้แก่ 4 5 6 7 และ 8 ตามลำดับ บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตร 60 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมสปอร์แขวนลอยจากข้อ 3.3 ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 1.66×10^6 สปอร์ต่อมล.ของอาหาร ทำการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำมาวัดพีเอชของอาหาร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3.4.3 การศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากการทดลองข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 เมื่อทราบแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นที่เหมาะสม รวมทั้งพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดแล้ว จากนั้นนำมาศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคสความเข้มข้นต่างๆกันได้แก่ 0 2.5 5 7.5 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ บรรจุใน ฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตร 60 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสปอร์แขวนลอยจากข้อ 3.3 ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 1.66×10^6 สปอร์ต่อมล.ของอาหาร ทำการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ

ต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำมาวัดพีเอชของอาหาร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ปริมาณโปรตีน และน้ำตาลรีดิวซ์

3.5 การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับฟลาสก์เขย่ากับระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแหล่งไนโตรเจน คาร์บอนและแหล่งอื่นๆ ซึ่งทราบจากผลการทดลองในข้อ 3.4 มาศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับฟลาสก์เขย่ากับระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยในระดับฟลาสก์เขย่าจะเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตร 60 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสปอร์แขวนลอยจากข้อ 3.3 ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 1.66 X 10^6 สปอร์ต่อมล.ของอาหาร ทำการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน โดยในวันที่ 0-2 เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง จากนั้นในวันที่ 3-8 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดพีเอชของอาหาร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ปริมาณโปรตีน น้ำตาลรีดิวซ์ และการเจริญของเชื้อโดยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนตามวิธีการในภาคผนวก ข-4 สำหรับระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการทดลองโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีอายุ 24 ชั่วโมงปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดความเร็ว 400 รอบต่อนาที ให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน โดยในวันที่ 0-2 เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง จากนั้นในวันที่ 3-8 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดพีเอชของอาหาร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ปริมาณโปรตีน น้ำตาลรีดิวซ์ และการเจริญของเชื้อโดยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนตามวิธีการในภาคผนวก ข-4

3.6 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์

3.6.1 การเตรียมตัวอย่างเอนไซม์โปรติเอส

เลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งวางบนชุดกรองมิลลิพอร์ (millipore filter) จากนั้นนำน้ำหมักที่กรองได้มาทำการตกตะกอนเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่างๆกันคือ 0-40 40-60 และ 60-80 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณที่ใช้แสดงในภาคผนวก ค) โดยการตกตะกอนเอนไซม์ในแต่ละเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของเกลือ

แอมโมเนียมซัลเฟต จะทำโดยการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปช้าๆและกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเกลือละลายหมดแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนของเอนไซม์ออก นำตะกอนที่ได้ในแต่ละช่วงของการตกตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์พีเอช 7 แล้วนำสารละลายโปรตีนที่ได้ในแต่ช่วงมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์โปรติเอสที่ตกตะกอนได้มาทำการไดอะไลซีส (dialysis) ด้วยถุง ไดอะไลซีสที่มีโมเลกุลลาร์เวทคัทออฟ 12000 ดาลตัน ด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.6.1 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการหากิจกรรมของเอนไซม์แล้ววิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีการในภาคผนวก ข-1 ละลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ในบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆกันโดยใช้ 0.1 โมลาร์ ซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (citrate-phosphate buffer) พีเอช 3 4 5 6 7 และ 8 และ0.1 โมลาร์ ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (glycine-NaOH buffer) พีเอช 9 10 11และ 12 ตามลำดับ เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)

3.6.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

นำสารละลายเอนไซม์โปรติเอสจากข้อ 3.6.1 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการหากิจกรรมของเอนไซม์แล้ววิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีการในภาคผนวก ข-1 โดยในช่วงการบ่มของการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จะทำที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และใช้สารละลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ที่ละลายในบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ซึ่งทราบจากการทดลองข้อ 3.6.2 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)

3.6.4 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

นำเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากข้อ 3.6.1 มาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอสตามวิธีการในภาคผนวก ข-1 ที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมซึ่งทราบจากการทดลองข้อ 3.6.2 และ 3.6.3 เปรียบเทียบกิจกรรมที่ได้ในรูปกิจกรรมที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)

3.6.5 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่พีเอชต่าง ๆ

นำเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากข้อ 3.6.1 บ่มกับบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆกันโดยใช้ 0.1 โมลาร์ ซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (citrate-phosphate buffer) พีเอช 3 4 5 6 7 และ 8 และ 0.1 โมลาร์ ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (glycine-NaOH buffer) พีเอช 9 10 11 และ 12 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาปรับพีเอชให้เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (Bidochka และ Khachatourians, 1988) แล้วนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีการในภาคผนวก ข-1 ที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม เปรียบเทียบกิจกรรมที่ได้ในรูปกิจกรรมที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)

3.6.6 การศึกษาผลของอิออนของโลหะบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

นำสารละลายเอนไซม์โปรติเอสจากข้อ 3.6.1 ที่มีความเข้มข้นประมาณ 100 หน่วยต่อ มล. ผสมกับสารละลายของโลหะและเกลือชนิดต่างๆ ได้แก่ โคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2$) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โพแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) เมอร์คิวรีคลอไรด์ ($HgCl_2$) ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) เลดอะซีเตด ($Pb[AcO]_2 \cdot 3H_2O$) นิเคิลซัลเฟต ($NiSO_4 \cdot 6H_2O$) ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ที่มีความเข้มข้น 0.006 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายโลหะและเกลือต่างๆเป็น 0.003 โมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม เปรียบเทียบกิจกรรมที่ได้ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)

3.6.7 การศึกษาผลของตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติ เอสจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156

การทดลองนี้จะใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสดังนี้คือ ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (phenylmethylsulfonyl fluoride; PMSF) ละลายในเมทานอล พาราคลอโรเมอร์คิวรีเบนโซอิค แอซิด (p-chloromercuribenzoic acid; PCMB) ละลายในน้ำปราศจากอิออน เอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติคแอซิด (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) ละลายในน้ำพีเอช 8.5 และเปปสตาติน (pepstatin) ละลายในเมทานอล (Beynon และ Salvesen, 1990) โดยฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ พาราคลอโรเมอร์คิวรีเบนโซอิคแอซิด เอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติคแอซิด จะใช้ความเข้มข้นของสารละลายที่ 0 0.1 1.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ สำหรับเปปสตาตินจะใช้ที่ความเข้มข้น 0 1 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ นำสารละลายตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสทุกความ

เข้มข้นผสมกับสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 100 หน่วยต่อมล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม (Dann, 1990) เปรียบเทียบกิจกรรมที่ได้ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์

3.7 การศึกษาจลนพลศาสตร์ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์โปรติเอส

นำสารละลายเอนไซม์โปรติเอสจากข้อ 3.6.1 ที่มีความเข้มข้นประมาณ 20 หน่วยต่อมล. และสารละลายเคซีนที่ความเข้มข้นต่างๆกันได้แก่ 0.1 0.25 0.5 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสปริมาตร 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาผสมกันแล้วเก็บตัวอย่างสารละลายผสมที่เวลา 0 2 4 6 8 10 15 และ 20 นาที นำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลาโดยวิธีของ Lowry นำค่าปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลาของแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟระหว่างปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.) กับเวลา (นาที) คำนวณหาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (V) ของแต่ละเส้น จากนั้นนำไปเขียนกราฟตามวิธี Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/[S] กับ 1/V เพื่อคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} จากกราฟ

3.8 การวิเคราะห์

3.8.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสดัดแปลงจากวิธีการของ Wang and Hesseltin ดังแสดงในภาคผนวก ข-1

3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry' s method) ดังแสดงในภาคผนวก ข-2

3.8.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi Nelson's ดังแสดงในภาคผนวก ข-3

3.8.4 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Elson-Morgan ดังแสดงในภาคผนวก ข-4

3.8.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติในการทดลองที่ 3.4.1-3.4.3 จะวางแผนการทดลองแบบสุ่ม (CRD) และเปรียบเทียบผลโดยวิธี LSD และ DMRT ดังแสดงในภาคผนวก จ

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการสร้างเอนไซม์โปรติเอสบนอาหารแข็งของเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156

จากการศึกษาการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 บนอาหารแข็งสูตร casein hydrolysis medium เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 จะเจริญมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี 2.5 เซนติเมตร และสร้างบริเวณใส (clear zone) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.7 เซนติเมตร มีอัตราส่วนของขนาดของบริเวณใสต่อขนาดโคโลนีเท่ากับ 1.08 เท่า ดังแสดงในภาพที่ 4.1

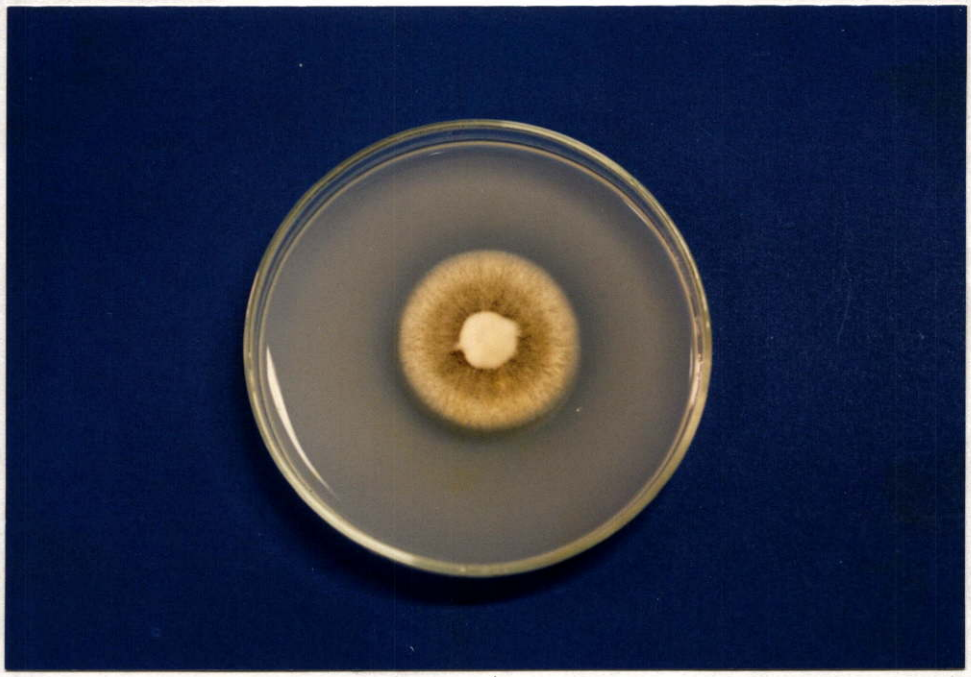
เมื่อนำสูตรอาหาร casein hydrolysis medium ที่เป็นอาหารเหลวมาเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 พบว่าเชื้อจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด 3 หน่วยต่อมล. โดยจะให้เอนไซม์สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้เหตุที่สร้างเอนไซม์เพียง 3 หน่วยต่อมล. อาจเนื่องมาจากในสูตรอาหารมีโปรตีนอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1 ภาคผนวก ง

4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156

4.2.1 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

4.2.1.1 ผลการศึกษาแหล่งของสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในอาหารที่ดัดแปลงจากสูตร casein hydrolysis medium ที่เติมสารอินทรีย์ไนโตรเจนแตกต่างกัน 9 ชนิด คือ หางนม แป้งถั่วเหลือง เคซีน พอลิเปปโตน เปปโตนจากเคซีน เนื้อสกัด นมผงขาดมันเนยเสริมแคลเซียม นมสดพาสเจอร์ไรซ์ และนมสดขาดมันเนยเสริมแคลเซียมพาสเจอร์ไรซ์ ปรากฏว่าเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในอาหารที่เติมแป้งถั่วเหลืองโดยจะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 54.5 หน่วยต่อมล. และนมผงขาดมันเนยเสริมแคลเซียมซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 53.7 หน่วยต่อมล. รองลงมาคือ หางนมจะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 50.2 หน่วยต่อมล. นมสดขาดมันเนยเสริมแคลเซียมพาสเจอร์ไรซ์ให้

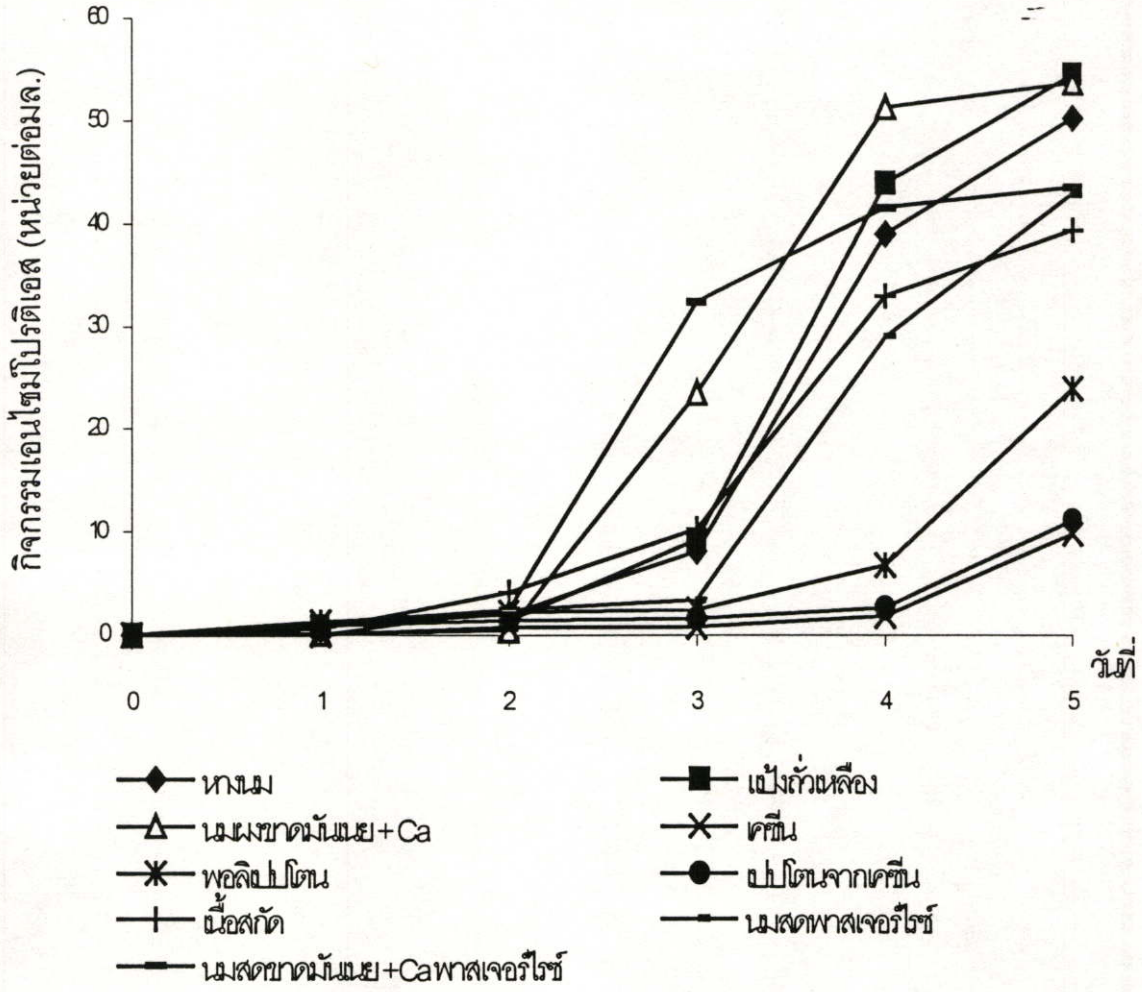


ภาพที่ 4.1 แสดงการเจริญและการสร้างบริเวณใสของเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 บนอาหาร casein hydrolysis medium

กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 43.5 หน่วยต่อมล. นมสดพาสเจอร์ไรซ์ให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 42.9 หน่วยต่อมล. เนื้อสกัดให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 39.3 หน่วยต่อมล. พอลิเปปโตนให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 23.9 หน่วยต่อมล. เปปโตนจากเคซีนจะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 11.0 หน่วยต่อมล. และ เคซีนจะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 9.7 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในภาพที่ 4.2 ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารที่เติมแป้งถั่วเหลืองและนมผงขาดมันเนยเสริมแคลเซียมนั้นไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (DMRT 0.05 ภาคผนวก จ) แต่เมื่อเปรียบเทียบราคาของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิดพบว่าแป้งถั่วเหลืองจะมีราคาถูกกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้แป้งถั่วเหลืองสำหรับการทดลองต่อไป สำหรับพีเอชของอาหาร และปริมาณโปรตีนของทุกสูตรอาหารจะเปลี่ยนแปลงไปในทางเดียวกันคือพีเอชของอาหารทุกสูตรค่อนข้างจะคงที่ในวันที่ 0-1 ของการเพาะเลี้ยงแล้วจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 2-5 โดยในวันที่ 5 จะมีพีเอชอยู่ในช่วง 6-8 ส่วนปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนวันที่ 2-5 จะมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 2 ภาคผนวก ง Dobinson *et al.* (1994) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Verticillium dahliae* ในอาหาร basal salts medium ที่ประกอบด้วยโพแตสเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมแหล่งไนโตรเจนต่างกันได้แก่ โซเดียมไนเตรท 71 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียมคลอไรด์ 71 มิลลิโมลาร์ เจลาติน 1 เปอร์เซ็นต์ เลือด 1 เปอร์เซ็นต์ นมถั่วเหลือง 1 เปอร์เซ็นต์ ผลปรากฏว่าเชื้อราจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีในอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่มาจากพืชและสัตว์ โดยที่ *V. dahliae* จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดในอาหารที่เติมเลือด รองลงมาคืออาหารที่เติมนมถั่วเหลืองโดยจะให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 130 และ 70 หน่วยต่อมล. ตามลำดับ

4.2.1.2 ผลการศึกษาแหล่งของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในอาหารที่มีแป้งถั่วเหลือง 5 กรัมต่อลิตรและเติมสารอนินทรีย์ไนโตรเจนต่างๆกันคือ โซเดียมไนเตรท โพแตสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรท เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมสารอนินทรีย์ไนโตรเจน ผลปรากฏว่าเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 จะผลิตเอนไซม์เอนไซม์เพิ่มขึ้นในอาหารที่เติมสารอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยจะมีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในอาหารที่เติมแอมโมเนียมไนเตรทเท่ากับ 172.98 หน่วยต่อมล. รองลงมาคือโซเดียมไนเตรท และโพแตสเซียมไนเตรทซึ่งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ใกล้เคียงกันคือ 157.6 และ 157.47 หน่วยต่อมล. ตามลำดับ สำหรับแอมโมเนียมซัลเฟตจะให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 146.12 หน่วย

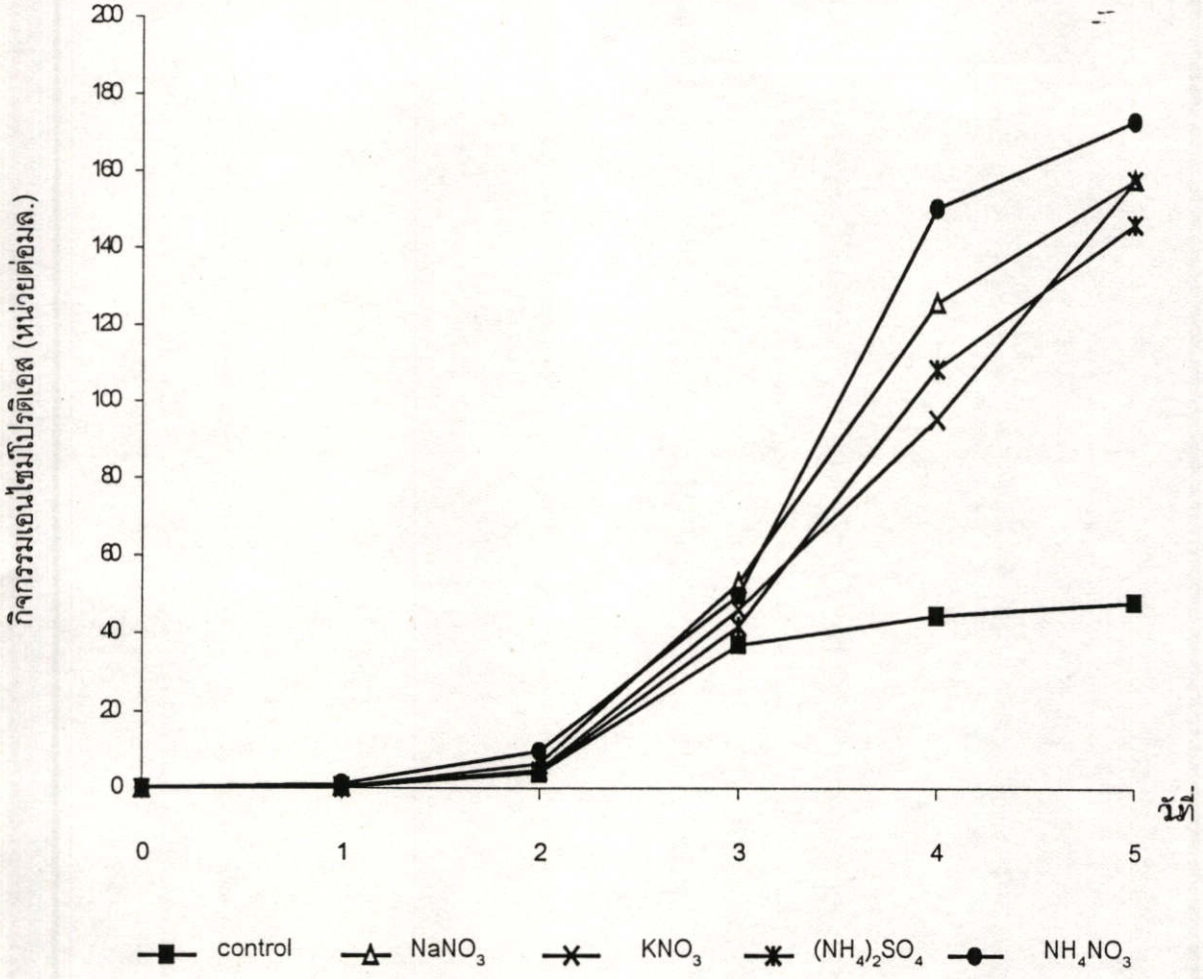


ภาพที่ 4.2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในอาหารที่เติมสารอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ

ต่อมล. และอาหารที่ไม่เติมสารอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยจะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ และ 47.78 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในภาพที่ 4.3 และเมื่อสังเกตการเจริญของเชื้อจะเห็นว่าในสูตรอาหารที่เติมสารอนินทรีย์ไนโตรเจนเชื้อจะเจริญได้ดีกว่าในสูตรอาหารที่ไม่เติมสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เมื่อนำผลการทดลองดังกล่าวมาเปรียบเทียบกันทางสถิติโดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอาหารเลี้ยงที่เติมแอมโมเนียมไนเตรทนั้นจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อสูตรอาหารที่เติมสารอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดอื่นๆ และอาหารที่ไม่เติมสารอนินทรีย์ไนโตรเจน (ภาคผนวก จ) สำหรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในสูตรที่เติมแอมโมเนียมไนเตรทและแอมโมเนียมซัลเฟตจะลดต่ำลงไปอยู่ในช่วงพีเอช 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารแต่ละสูตรอาหารมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงไปในทางเดียวกัน โดยในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงจะมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0.2-0.25 มิลลิกรัมต่อมล. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.03-0.035 มิลลิกรัมต่อมล. ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3 ภาคผนวก ง Bidochka and Khachatourias (1987) รายงานผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Beauveria bassiana* ในอาหารที่มีกลูโคส 1 หรือ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและมีโซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท หรือ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรากฏว่าเชื้อ *B. bassiana* จะสร้างเอนไซม์ได้ดีในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่แทบจะไม่มีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรท หรือแอมโมเนียมคลอไรด์อยู่ Abraham, *et al.* (1993) ได้รายงานผลการผลิตโปรติโอไลติกเอนไซม์โดยเชื้อ *Ophiostoma piceae* ในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนและเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ชนิดต่างกันได้แก่ โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ อัลบูมิน คอลลาเจน ยูเรีย อาร์จินิน แอสปาราจิน กลูตามิน และ โปรลิน ผลปรากฏว่าเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้น้อยในอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ง่าย เช่น แอมโมเนียม ยูเรีย และกรดอะมิโน แต่จะมีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่อแอมโมเนียมถูกใช้หมดและพบว่าเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้สูงในอาหารที่เติมโซเดียมไนเตรทและสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่อยู่ในลักษณะของโปรตีนเช่น อัลบูมิน คอลลาเจน

4.2.1.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ผลการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในอาหารที่เติมแอมโมเนียมไนเตรทและแป้งถั่วเหลืองความเข้มข้นต่างๆกันคือ 5 7.5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ผลปรากฏว่าเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 จะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งถั่วเหลืองปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร โดยจะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ

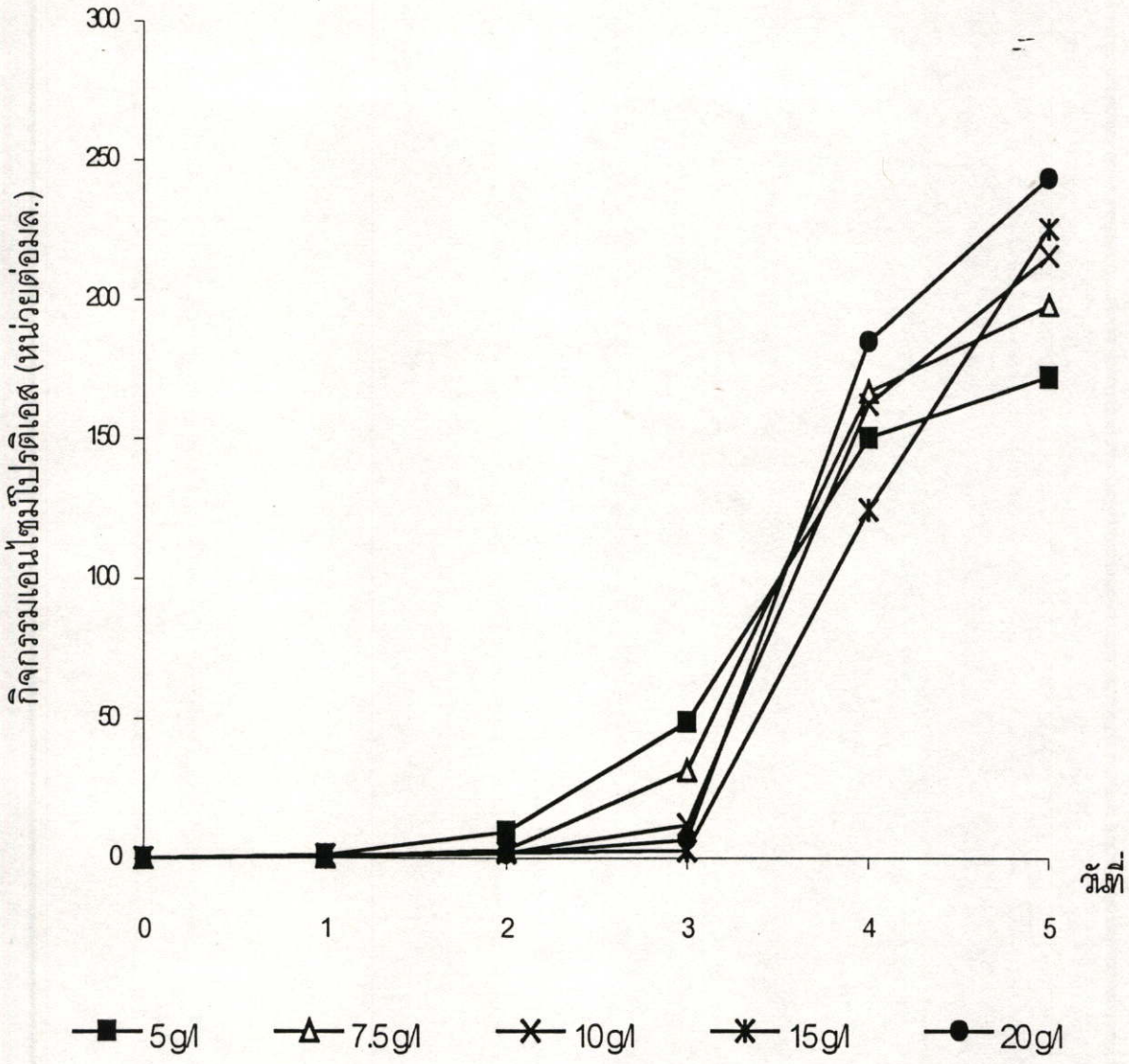


ภาพที่ 4.3 แสดงอิทธิพลของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156

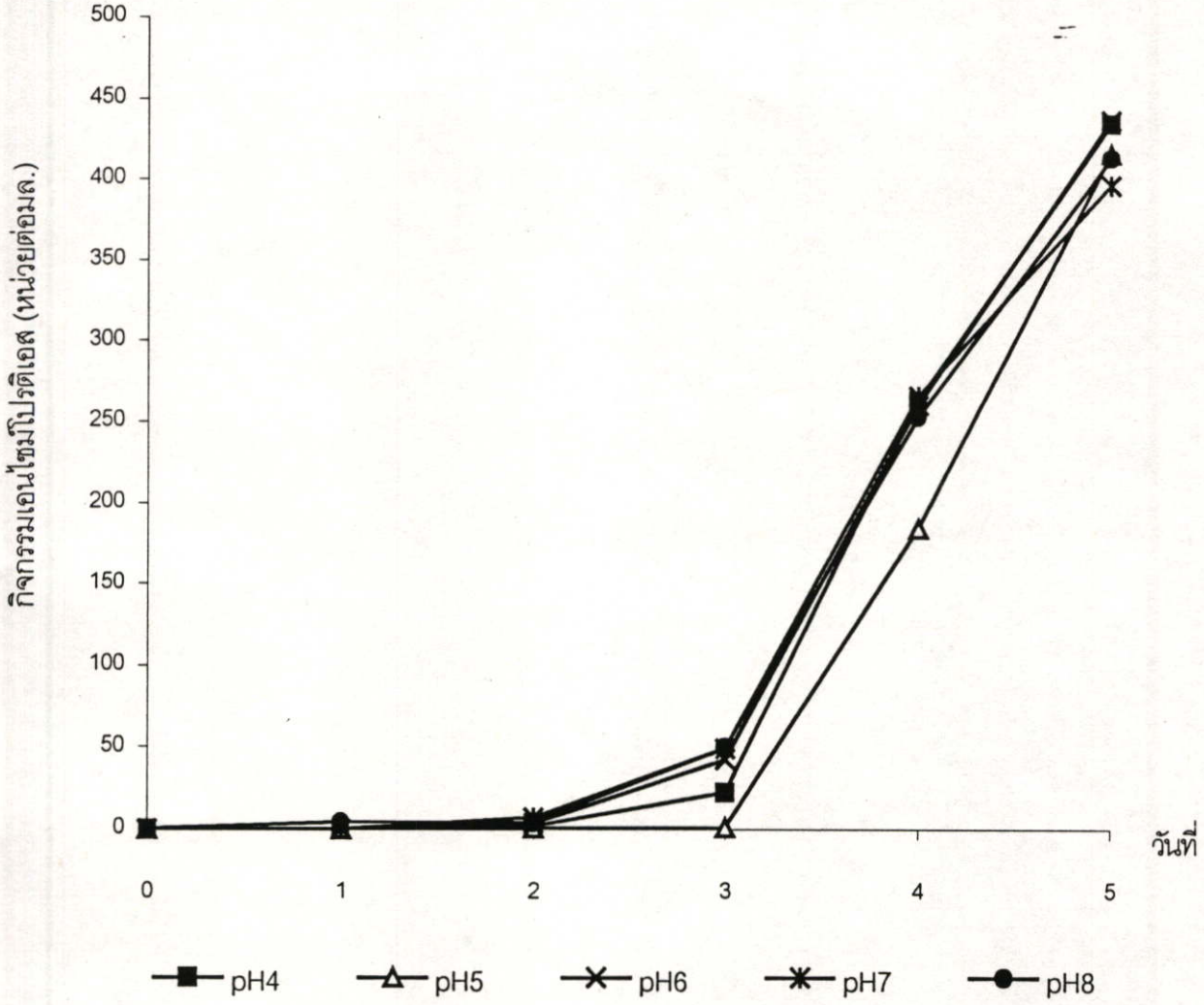
243.25 หน่วยต่อมล. รองลงมาคือที่ปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 224.85 หน่วยต่อมล. ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตรมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 215.23 หน่วยต่อมล. ปริมาณ 7.5 กรัมต่อลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 197.56 หน่วยต่อมล. และปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 171.9 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในภาพที่ 4.4 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแป้งถั่วเหลืองที่ใช้สำหรับการทดลองนี้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 42 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรท 25 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 20 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือเป็นความชื้นและเส้นใย ดังนั้นการใช้ที่ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรจึงทำให้มีปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงเล็กน้อย ซึ่งมีผลทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมาน้อยเมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่ใช้แป้งถั่วเหลืองปริมาณมาก เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกันทางสถิติโดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของแป้งถั่วเหลือง 20 กรัมต่อลิตรจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อทุกคู่เปรียบเทียบ (ภาคผนวก จ) สำหรับพีเอช ปริมาณโปรตีน และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของทุกสูตรอาหารมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงคล้ายคลึงกัน คือพีเอชจะค่อนข้างคงที่ในวันที่ 0-1 แล้วจะลดต่ำลงในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงคือมีพีเอชอยู่ในช่วง 4 และจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 3-5 โดยในวันที่ 5 จะมีพีเอชอยู่ในช่วง 6.5-6.9 ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจะค่อยๆลดลงในวันที่ 2-5 โดยในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงจะมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0.2-0.5 มิลลิกรัมต่อมล. และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 0.025-0.09 มิลลิกรัมต่อมล. ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4 ภาคผนวก ง

4.2.2 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร casein hydrolysis medium ที่เติมแป้งถั่วเหลือง 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมไนเตรท 3 กรัมต่อลิตร แล้วปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่างๆกันคือ 4 5 6 7 และ 8 ตามลำดับ ผลปรากฏว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 และ 4 เชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุด โดยที่พีเอช 6 จะให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 437 หน่วยต่อมล. พีเอช 4 มีกิจกรรมของเอนไซม์ 434.2 หน่วยต่อมล. สำหรับพีเอช 5, 8 และ 7 จะให้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 416 413 และ 396.3 หน่วยต่อมล. ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และเมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกันทางสถิติโดยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 5 7 และ 8 พบว่าทุกคู่ของการเปรียบเทียบยกเว้นที่พีเอช 7 จะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต (ภาคผนวก จ) แต่จากการวัดพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่มีการปรับพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีพีเอชประมาณ 5.8 ดังนั้นจึงเลือกใช้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 สำหรับ



ภาพที่ 4.4 แสดงผลของความเข้มข้นของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156



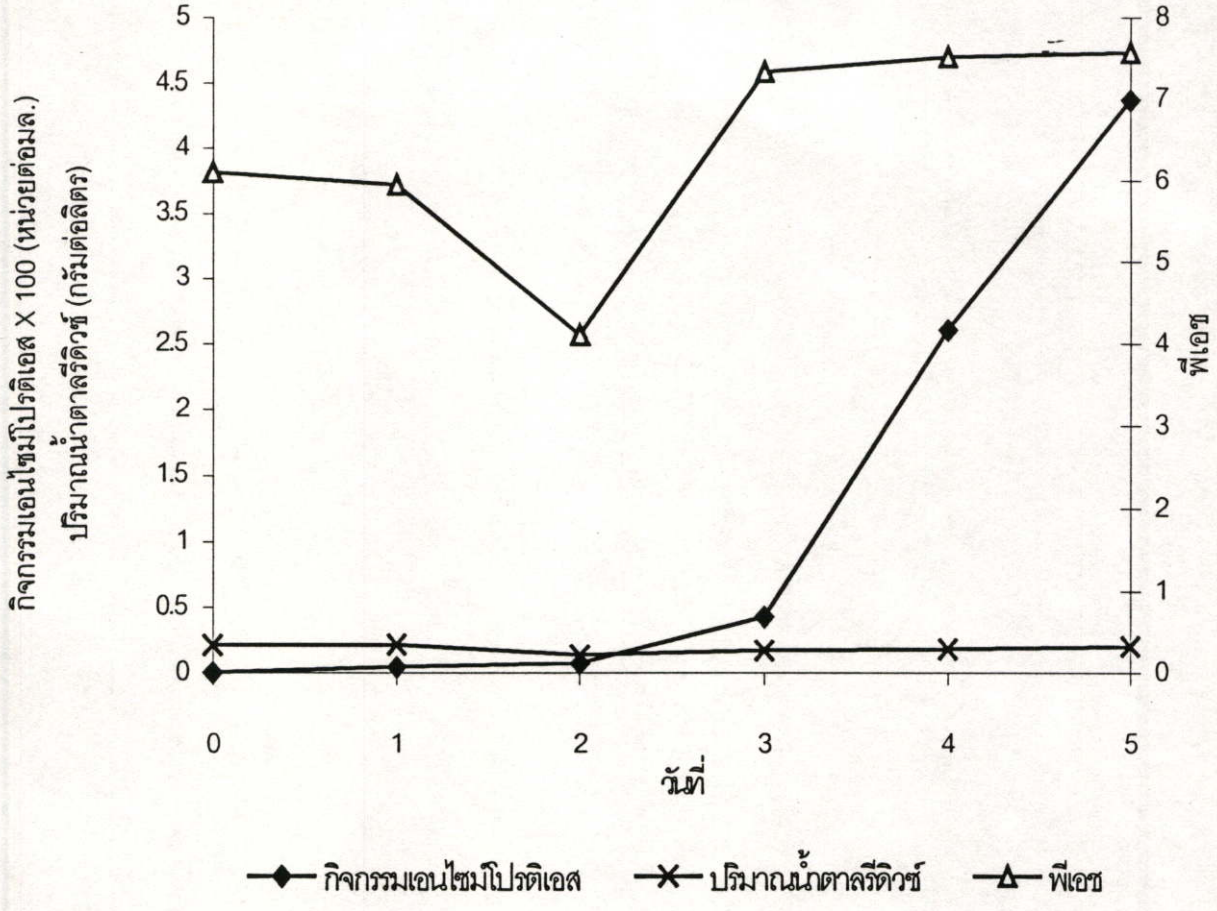
ภาพที่ 4.5 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆกัน

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองต่อไป สำหรับพีเอช ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงไปในทางเดียวกัน คือพีเอชจะคงที่ในวันที่ 0-1 แล้วจะลดต่ำลงในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจะกลับค่อยๆสูงขึ้นในวันที่3-5 โดยในวันที่ 5 จะมีพีเอชอยู่ในช่วง 6.5-7.3 ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์จะเปลี่ยนแปลงโดยในวันที่ 2 จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กจากนั้นในวันที่ 3-5 จะค่อยๆลดลง โดยในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงจะมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0.8-0.97 มิลลิกรัมต่อมล. และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 0.1-0.2 มิลลิกรัมต่อมล. ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 5 ภาคผนวก ง จากการทดลองทั้งหมดข้างต้นทำให้สามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) แป้งถั่วเหลือง 20 แอมโมเนียมไนเตรท 3.0 โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 โพแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท 0.1 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 Abraham *et al.*, (1993) รายงานผลการศึกษาการเพาะเลี้ยง *Ophiostoma piceae* เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆกัน ปรากฏว่าเชื้อ *O. piceae* จะผลิตเอนไซม์ได้ดีในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6

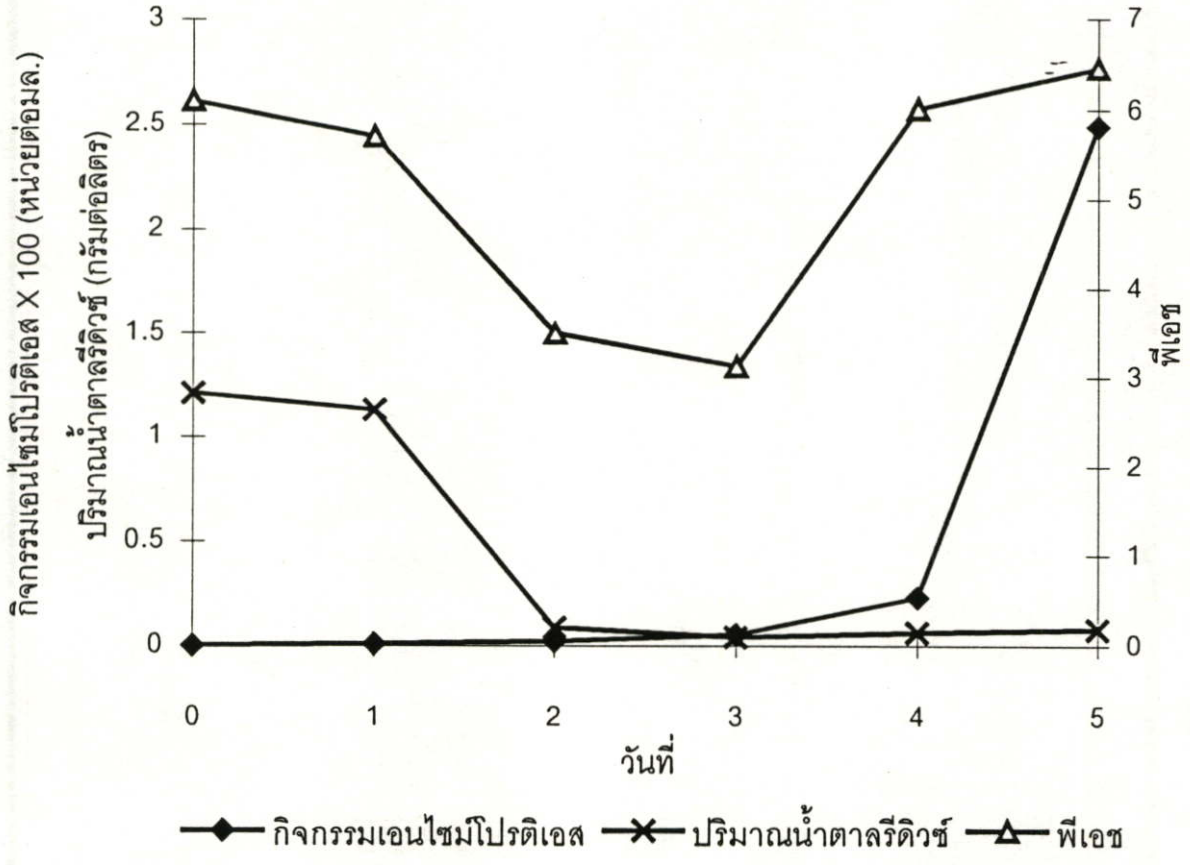
4.2.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ผลจากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร casein hydrolysis medium ที่เติมแป้งถั่วเหลือง 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมไนเตรท 3 กรัมต่อลิตร แล้วเติมกลูโคสความเข้มข้นต่างๆกันคือ 0 2.5 5 7.5 และ 10 กรัมต่อลิตร ผลปรากฏว่า *M. anisopliae* DOA FC 2156 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดในอาหารที่ไม่เติมกลูโคสซึ่งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 437 หน่วยต่อมล. โดยที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงลดต่ำลงไปที่พีเอช 4.11 ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงจากนั้นในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงจากนั้นพีเอชของอาหารจะเพิ่มขึ้นเรื่อยโดยในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงจะมีพีเอชเท่ากับ 7.57 สำหรับในอาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 2.5 5 7.5 และ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อราจะจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำกว่าในสูตรอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส โดยอาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตรจะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 248.56 หน่วยต่อมล. พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนแปลงโดยพีเอชจะลดต่ำลงมากในวันที่ 2 และ 3 ของการเพาะเลี้ยงจะมีพีเอชอยู่ในช่วงพีเอช 3 แล้วจะกลับสูงขึ้นในวันที่ 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยงโดยในวันที่ 5 จะมีพีเอชเท่ากับ 6.45 อาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรจะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 169 หน่วยต่อมล. พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนแปลงลดต่ำลงเรื่อยๆโดยในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงจะมีพีเอชเท่ากับ 2.87 แล้วจะกลับสูงขึ้นวันที่ 3- 5 ของการเพาะเลี้ยงโดยในวันที่ 5 จะมีพีเอชเท่ากับ 6.22 อาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตรจะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 116.23 หน่วยต่อมล. พีเอชของอาหารจะลดต่ำ

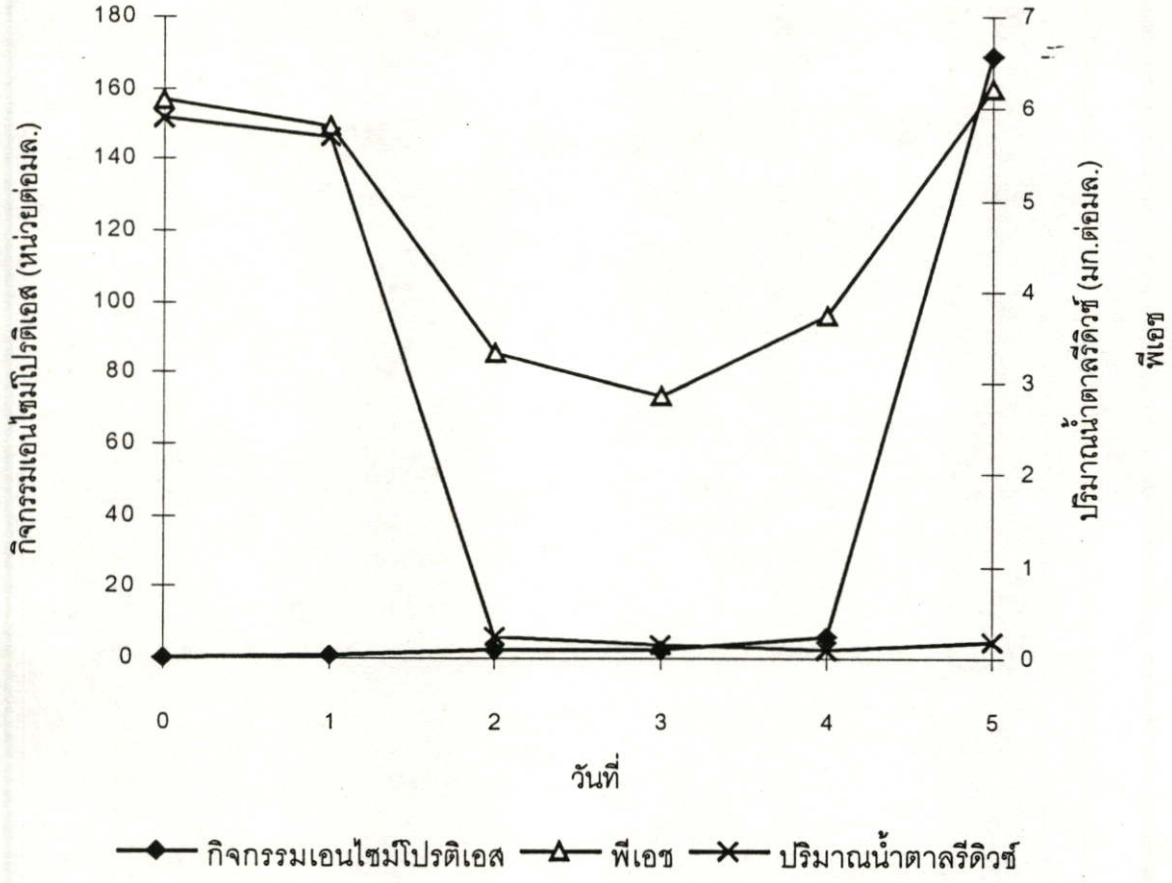
ลงมากในวันที่ 2 และ 3 ของการเพาะเลี้ยงโดยมีพีเอชเท่ากับ 2.48 และ 2.7 ตามลำดับ แล้วจะค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 4-5 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับสูตรอาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรจะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 2.6 หน่วยต่อมล. การเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลดต่ำลงอย่างมากในวันที่ 2-5 ของการเพาะเลี้ยงโดยมีพีเอชอยู่ในช่วงพีเอช 2 ซึ่งการที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดต่ำลงมากนั้นอาจจะมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ที่เชื้อผลิตออกมา สำหรับปริมาณน้ำตาลรดิวซ์นั้นพบว่าในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงเชื้อแทบจะไม่สร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาแต่เมื่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดต่ำลงเชื้อจะกลับมาสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.6 4.7 4.8 4.9 และ 4.10 จากการทดลองทำให้สามารถสรุปความสัมพันธ์ของการลดลงและเพิ่มขึ้นของพีเอชกับการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์และการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเชื้อจะใช้กลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียวที่เชื้อสามารถใช้ได้ง่ายไปใช้ในการเจริญโดยนำเข้าสู่วัฏจักรเครบแล้วผลิตกรดออกมามีผลให้พีเอชของอาหารลดลงในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง และในขณะเดียวกันกลูโคสจะไปกดการสร้างเอนไซม์โปรติเอสมีผลให้ช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้น้อย และเมื่อปริมาณกลูโคสถูกใช้เหลือน้อนยลงเชื้อจะเริ่มใช้แป้งถั่วเหลืองซึ่งมีโปรตีนอยู่ซึ่งเมื่อเชื้อย่อยจะเกิดเป็นแอมโมเนียซึ่งจะส่งผลให้พีเอชของอาหารสูงขึ้นในช่วงหลังของการเพาะเลี้ยง และเชื้อจะสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงขึ้น เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบ เทียบกันทางสถิติโดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างสูตรอาหารที่ไม่เติมกลูโคสกับสูตรอาหารที่เติมกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของทุกคู่ที่เปรียบเทียบ (ภาคผนวก จ) Charnley and St. Leger (1991) ได้กล่าวว่าการเติมกลูโคสลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลให้เกิดกระบวนการแคตาบอลิค รีเพสชัน (catabolic repession) ของเชื้อ *M. anisopliae* โดยจะมีผลไปกดการสร้างเอนไซม์โปรติเอส และกล่าวว่าเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้นในอาหารที่เติมคิวติเคิลของแมลงหรือพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายเช่น เซลลูโลส Kimura and Tsuchiya (1982) ได้รายงานว่าการเติมกลูโคสในอาหารที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้เชื้อ *Cephalosporium* sp. KM 388 ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ช้ากว่าในอาหารที่ไม่เติมกลูโคสและมีการลดลงของพีเอชของอาหารในช่วงแรก Dean and Domnase (1983) ศึกษาผลของกลูโคสต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *Lagenidium giganteum* โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร PYG (เปปโตน-ยีสต์สกัด-กลูโคส) แล้วเติมกลูโคสความเข้มข้นต่างๆกัน ผลปรากฏว่าการเติมกลูโคสจะมีผลไปกดการสร้าง เอนไซม์ของเชื้อและการกดนี้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกลูโคส Bidochka andKhachatourians (1987) แสดงผลการทดลองการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดย *B. bassiana* ในอาหารที่เป็นบัฟเฟอร์ที่มีเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนและเติมกลูโคสความเข้มข้น 0 ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์จะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด แต่ในอาหารชนิดที่ไม่เป็นบัฟเฟอร์จะมีผล



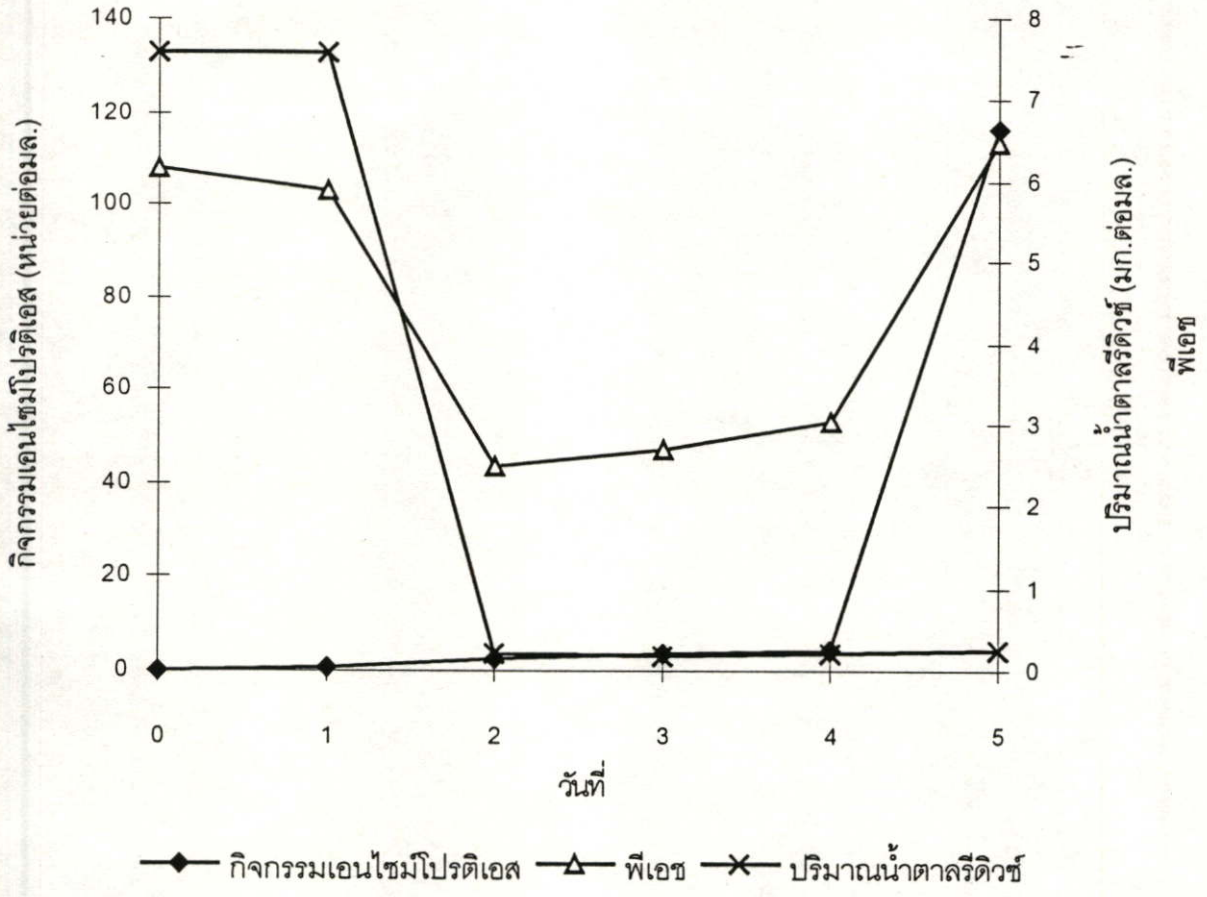
ภาพที่ 4.6 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่ไม่เติมกลูโคส



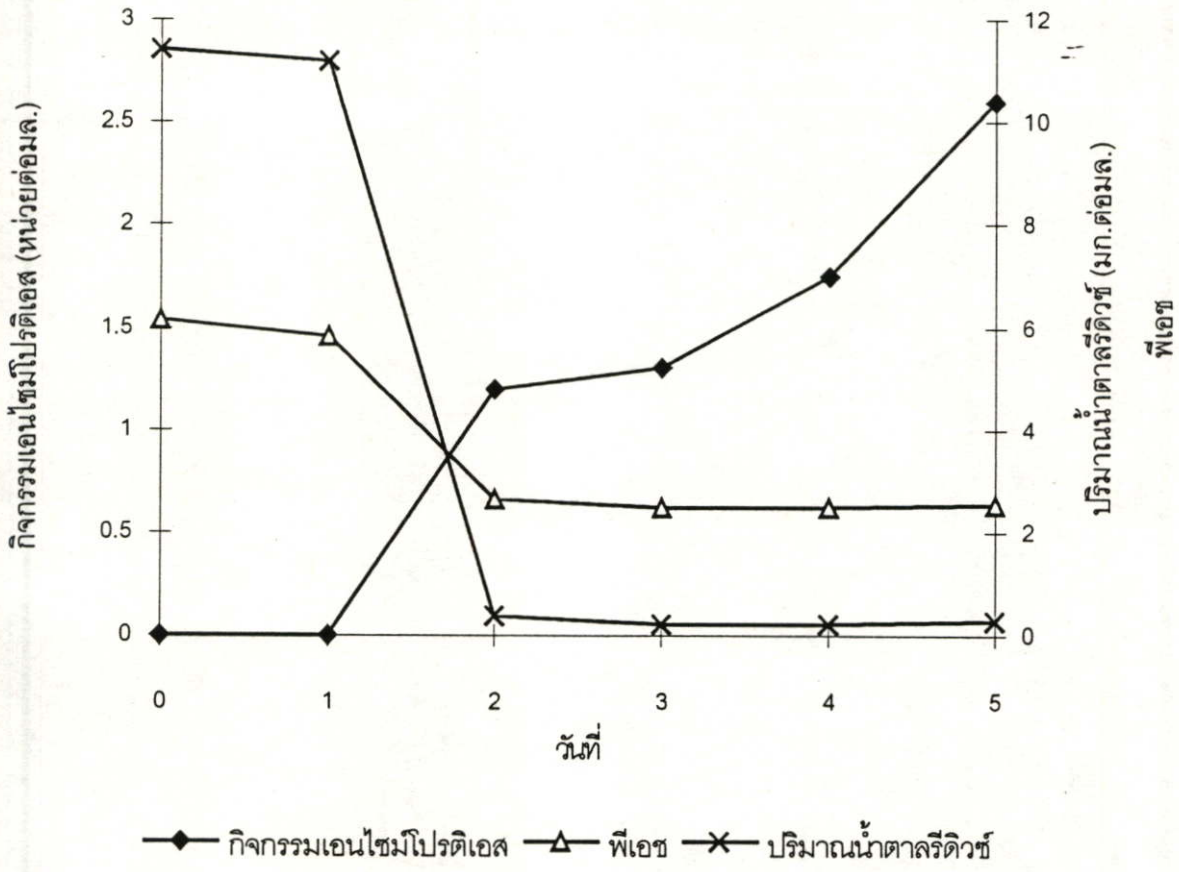
ภาพที่ 4.7 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.8 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.9 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร



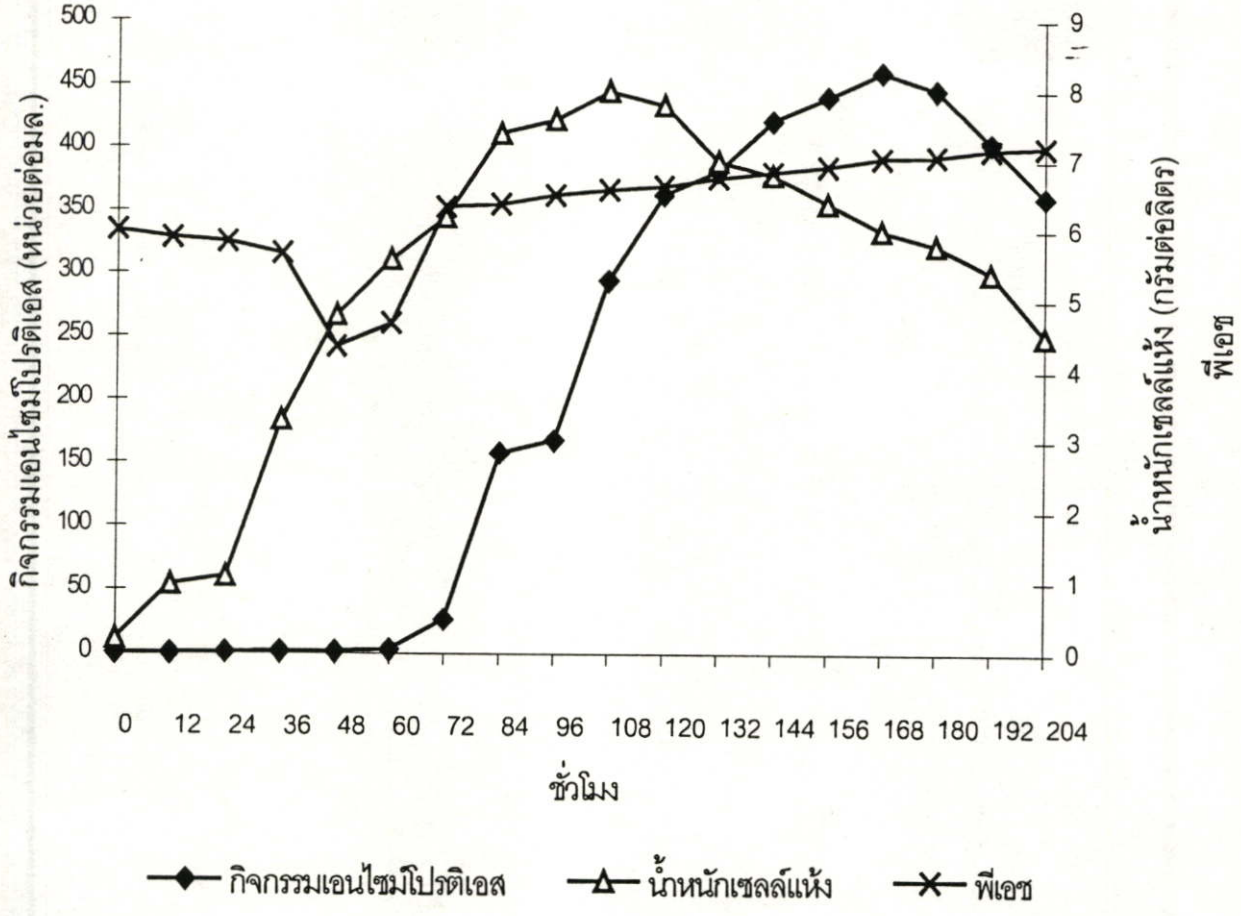
ภาพที่ 4.10 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

ทำให้พีเอชของอาหารต่ำโดย 2 วันแรกของการเจริญของ *B. bassiana* พีเอชลดลงเป็น 4 ทำให้มีผลต่อเอนไซม์โปรติเอสซึ่งจะไม่มีความคงตัวที่พีเอชต่ำกว่า 5

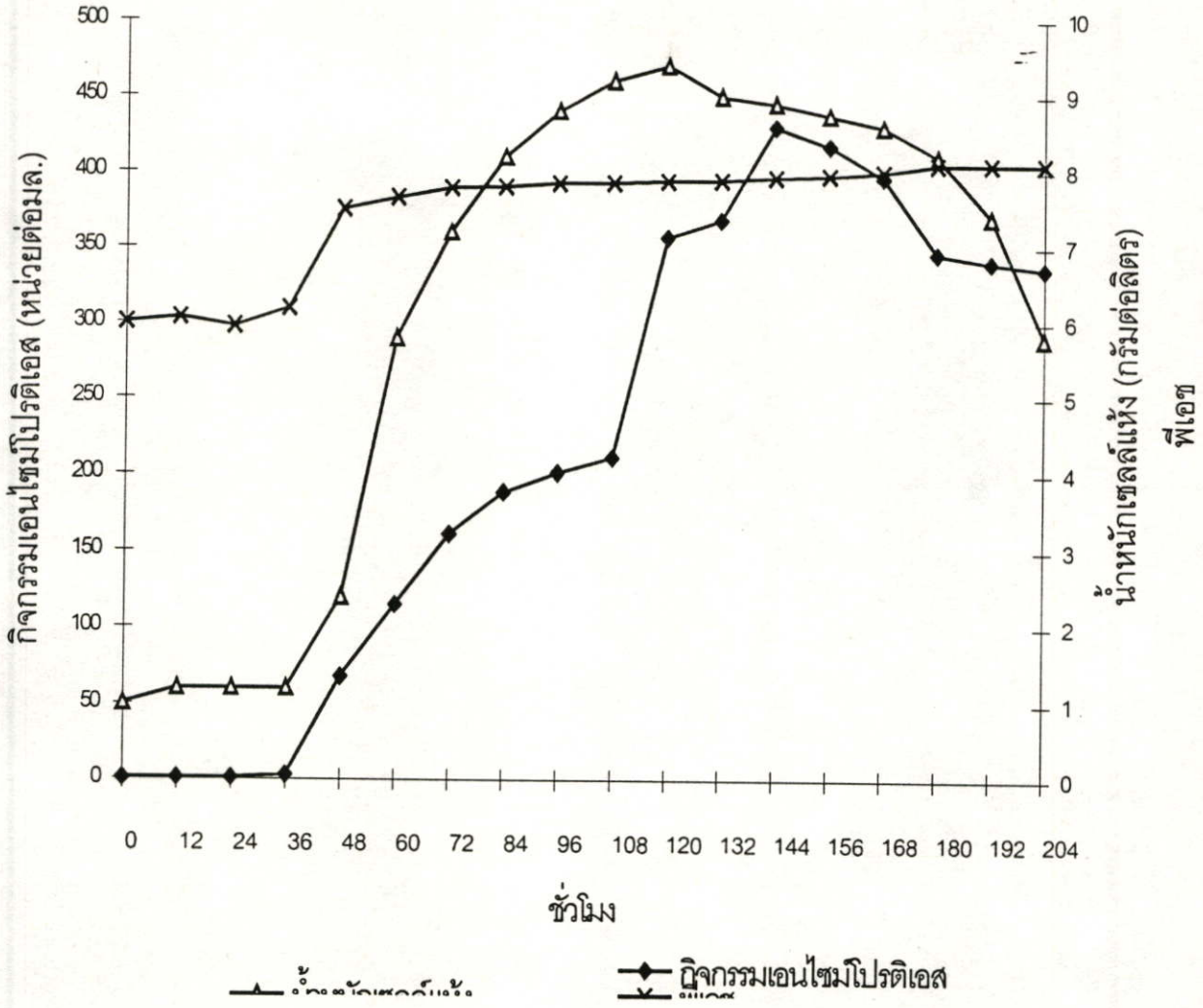
4.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับฟลาสก์เขย่ากับระดับถังหมัก 5 ลิตร

ผลจากการทดลองเลี้ยงเชื้อในระดับฟลาสก์และถังหมักขนาด 5 ลิตรด้วยสูตรอาหารที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ซึ่งทราบจากผลการทดลองข้างต้น พบว่าเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ที่เพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ซึ่งมีสปอร์เริ่มต้นในอาหารเท่ากับ 1.6 X 10^6 สปอร์ต่อปริมาตรอาหาร ในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในชั่วโมงที่ 168 (วันที่ 7) โดยจะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 459 หน่วยต่อมล. และการเจริญของเชื้อเมื่อทดลองนำเชื้อที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดหาปริมาณของเกลูโคซามีนแล้วนำมาคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าในระดับฟลาสก์จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8 กรัมต่อลิตร สำหรับการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าพีเอชจะค่อยๆลดลงในช่วงวันที่ 0-2 ของการเพาะเลี้ยงโดยพีเอชจะอยู่ในช่วงพีเอช 4 แล้วจะกลับสูงขึ้นในวันที่ 3-8 โดยในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงมีพีเอชเท่ากับ 7.04 ดังแสดงในภาพที่ 4.11

สำหรับการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรซึ่งเติมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 3 ลิตร เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีอายุ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที ให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที พบว่าเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 จะเริ่มผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้เร็วกว่าในฟลาสก์โดยจะเริ่มผลิตเอนไซม์ในวันที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง และจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในชั่วโมงที่ 144 (วันที่6) โดยจะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 429.88 หน่วยต่อมล. และการเจริญของเชื้อพบว่าในระดับถังหมักเชื้อจะเจริญได้เร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ เมื่อทดลองนำเชื้อที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดหาปริมาณของเกลูโคซามีนแล้วนำมาคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร สำหรับการเปลี่ยนแปลงพีเอชจะค่อนข้างคงที่ในวันที่ 0 และ 1 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจึงค่อยๆสูงขึ้นในวันที่ 2-8 ของการเพาะเลี้ยง โดยในที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงจะมีพีเอชเท่ากับ 7.93 ดังแสดงในภาพที่ 4.12 จากการทดลองในระดับฟลาสก์และถังหมักพบว่าในระดับฟลาสก์นั้นเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงกว่าในระดับถังหมัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส



ภาพที่ 4.11 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและการเจริญเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในสูตรอาหารที่เหมาะสมในระดับฟลาสก์



ภาพที่ 4.12 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและการเจริญเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในสูตรอาหารที่เหมาะสมในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

4.4 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอส

4.4.1 ผลการเตรียมตัวอย่างเอนไซม์โปรติเอส

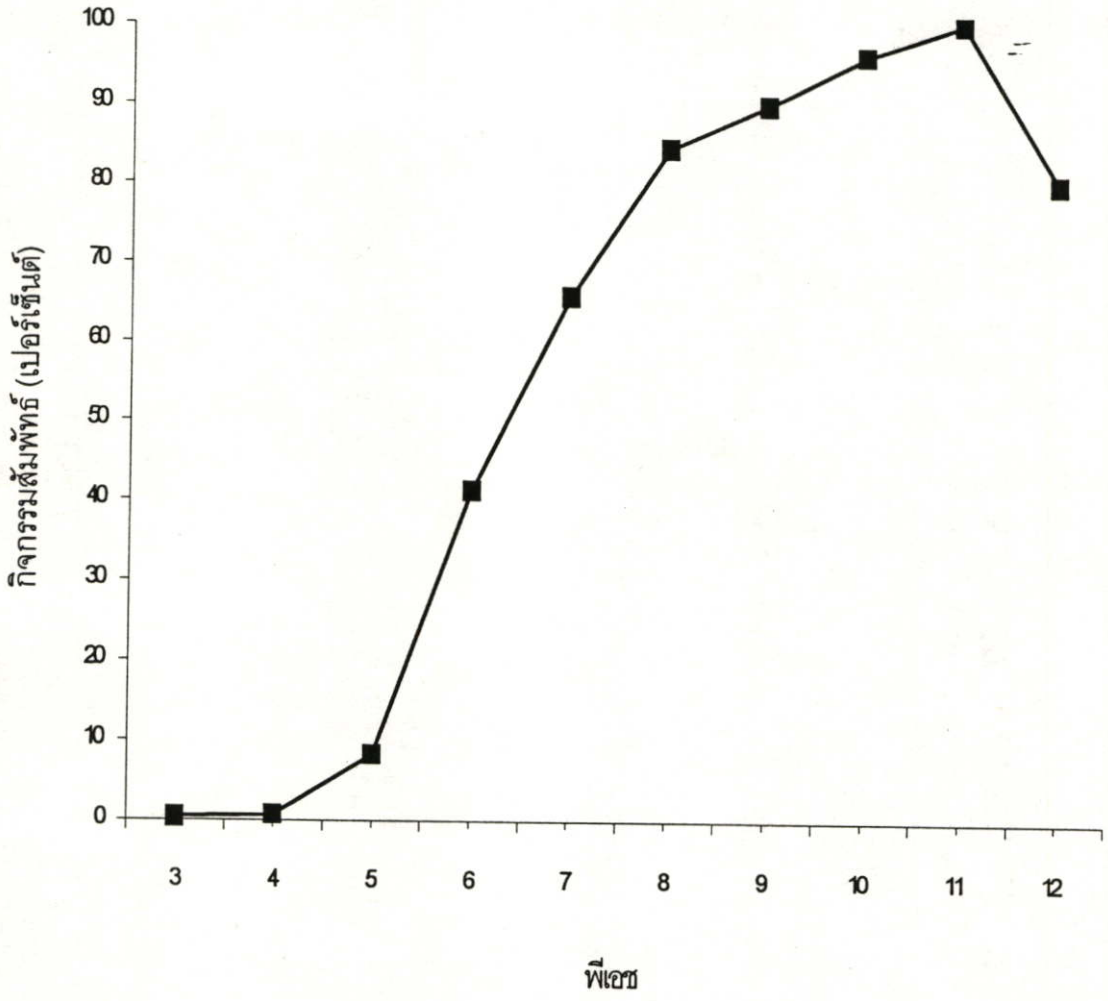
จากการตกตะกอนเอนไซม์โปรติเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 0-40, 40-60 และ 60-80 เปอร์เซ็นต์ ผลปรากฏว่าเอนไซม์โปรติเอสจะตกตะกอนมากที่สุดที่ความอิ่มตัว 60-80 เปอร์เซ็นต์ โดยจะมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1569.0 หน่วยต่อมก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เท่ากับ 7.2 และมีผลได้ของกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 41.0 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 Disanto *et al.* (1992) พบว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดสจาก *Mucor racemosus* จะตกตะกอนที่ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 50-90 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 2.4 หน่วยต่อมก.โปรตีน ความบริสุทธิ์เท่ากับ 4 และมีผลได้ของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 128 เปอร์เซ็นต์ Bidochka and Khachatourians (1987) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สร้างโดย *B. bassiana* จะตกตะกอนที่ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 60-75 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 963.6 หน่วยต่อมก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เท่ากับ 2.8 ผลได้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 47.4 เปอร์เซ็นต์ และ Segers *et al.* (1994) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *Verticillium chlamydosporium* จะตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 29.2 หน่วยต่อมก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เท่ากับ 1.7 และมีผลได้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 42 เปอร์เซ็นต์

4.4.2 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 สามารถทำงานได้ดีที่ช่วงพีเอช 8-11 (ใช้เคซีนเป็นสับสเทรต) โดยมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 11 มีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาจะทำงานได้ดีที่พีเอช 10 โดยจะมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่พีเอช 8 และ 9 จะมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือเท่ากับ 84.36 และ 89.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่พีเอช 5 กิจกรรมเอนไซม์จะลดลงเหลือเพียง 8.24 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.13 แสดงว่าเอนไซม์โปรติเอสที่เชื้อสร้างมานี้สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นด่างสูงมากซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *M. anisopliae* ที่ได้มีการรายไว้ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อที่ใช้ในการศึกษานั้นต่างสายพันธ์กัน อาหารที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์แตกต่างกัน และสับสเทรตที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แตกต่างกัน โดยที่ St. Leger *et al.* (1987) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *M. anisopliae* คือ Pr 1 จะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 8 (ใช้ Suc-$(Ala)_2$-Pro-Phe-NA เป็นสับสเทรต) และ Pr 2 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 9 (ใช้ Bz-Phe-Val-Arg-NA เป็นสับสเทรต) St. Leger

ตารางที่ 4.1 ผลการตกตะกอนเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตโดย *M. anisopliae* DOA FC 2156 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่างๆกัน

ขั้นตอนการตกตะกอนเอนไซม์	ปริมาตร (มล.)	กิจกรรมทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	กิจกรรมจำเพาะ (หน่วยต่อมก.โปรตีน)	ความบริสุทธิ์	ผลได้ของกิจกรรมเอนไซม์ (เปอร์เซ็นต์)
น้ำหมัก	1050	385875.00	1,768.68	218	1	100
ช่วงเปอร์เซ็นอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 0-40 %	60	8,922.4	350.00	25.5	0.12	2.3
ช่วงเปอร์เซ็นอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 40-60 %	44	22,531.00	210.00	107.3	0.49	5.8
ช่วงเปอร์เซ็นอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 60-80 %	60	156,900.00	100.00	1569.0	7.2	41.0
ไดอะไลซีส	80	115,977.00	70.5	1645.0	7.5	30.0



ภาพที่ 4.13 แสดงผลของพีเอชต่างๆต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156

et al. (1994) เอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดสจาก *M. anisopliae* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 6.8 St. Leger *et al.* (1993) พบว่าเอนไซม์อะมิโนเปปติเดสและไดเปปติดิลเปปติเดส IV จาก *M. anisopliae* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 7 (ใช้ Ala- βNA เป็นสับสเทรต) และ 8 (Gly-Pro- βNA เป็นสับสเทรต)

4.4.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

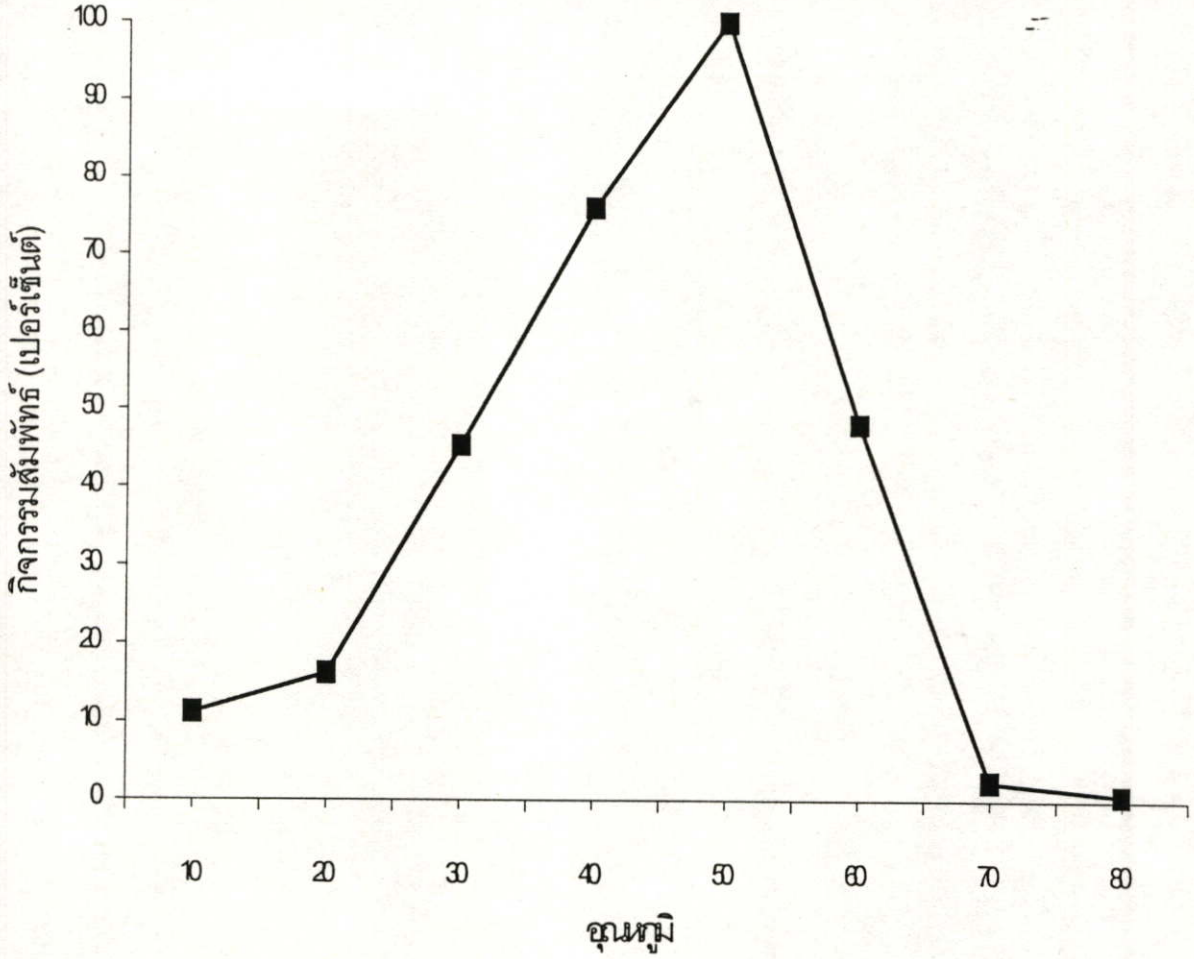
จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *M. anisopliae* DOA FC 2156 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 50 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 40 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 76 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่อุณหภูมิ 30 และ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์จะลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.14 Bedelu *et al.* (1998) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Arthobotrys* spp. มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 50 องศาเซลเซียส Bonants *et al.* (1995) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *P. lilacinus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 60 องศาเซลเซียส

4.4.4 ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

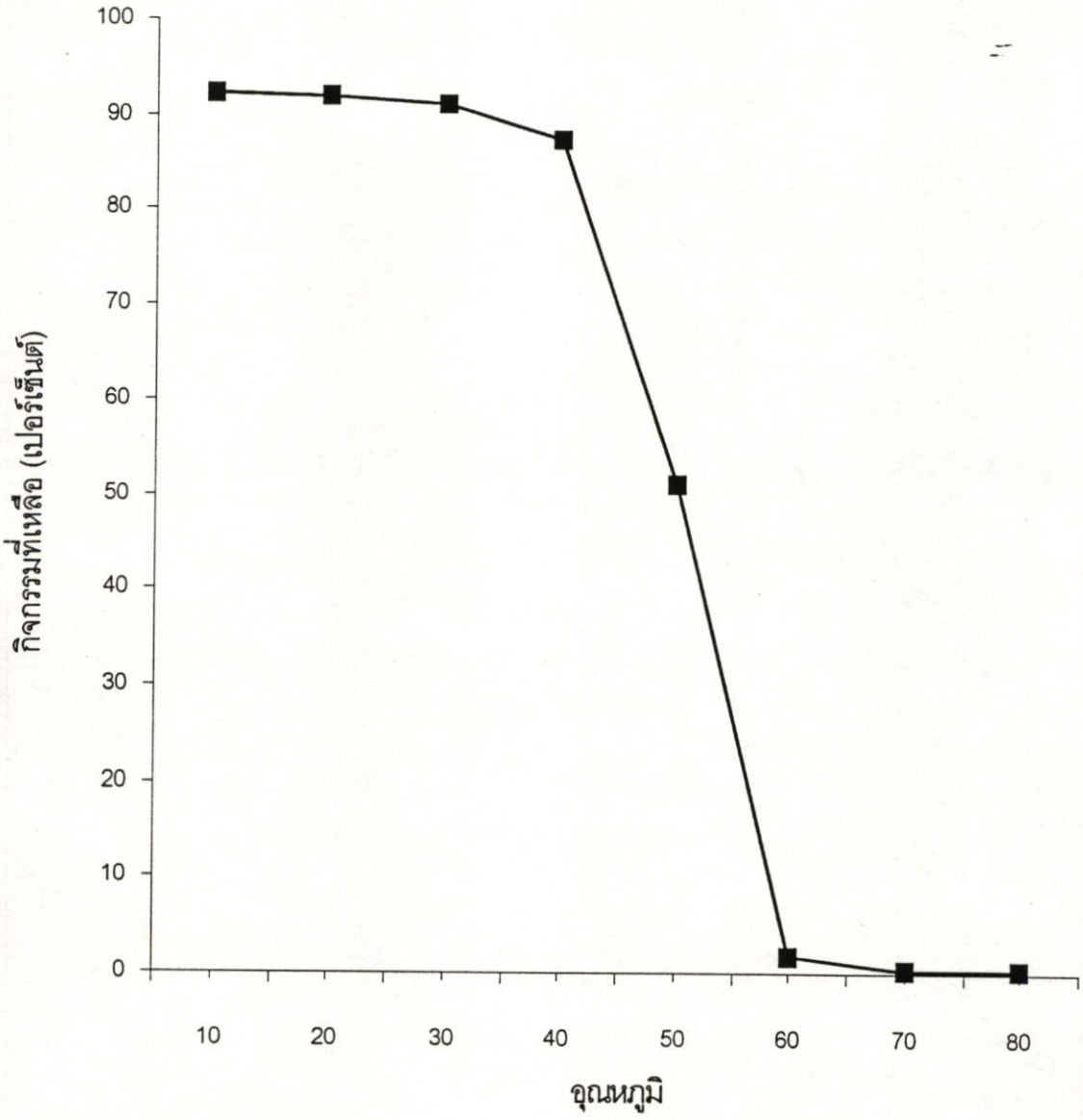
จากการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตโดย *M. anisopliae* DOA FC 2156 ต่ออุณหภูมิต่างๆ โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พบว่าเอนไซม์จะมีความคงตัวที่อุณหภูมิระหว่าง 10-40 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 10-30 องศาเซลเซียสกิจกรรมเอนไซม์จะอยู่ในช่วง 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสกิจกรรมของเอนไซม์จะเหลือเท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสกิจกรรมของเอนไซม์จะเหลือเพียง 51 เปอร์เซ็นต์ และจะเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 4.15 St. Leger *et al.* (1987) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *M. anisopliae* คือ Pr 1 และ Pr2 จะเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (บ่มนาน 10 นาที)

4.4.5 ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่พีเอชต่าง ๆ

จากการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตโดย *M. anisopliae* DOA FC 2156 ต่อพีเอชต่างๆ โดยการบ่มเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่าเอนไซม์โปรติเอสจะมีความคงตัวที่ช่วงพีเอช 5-11 โดยจะมีความคงตัวมากที่สุดพีเอช 7 โดยจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือเท่ากับ 92.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่พีเอช 11 ซึ่งเป็นพีเอช ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้นเอนไซม์จะมีกิจกรรมเหลือเท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์จะเสียสภาพธรรมชาติที่พีเอชต่ำกว่า 5 โดยที่พีเอช 4 กิจกรรมเอนไซม์จะเหลือเท่ากับ 7.4



ภาพที่ 4.14 แสดงผลของอุณหภูมิต่างๆต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156



ภาพที่ 4.15 แสดงความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ที่อุณหภูมิต่างๆ

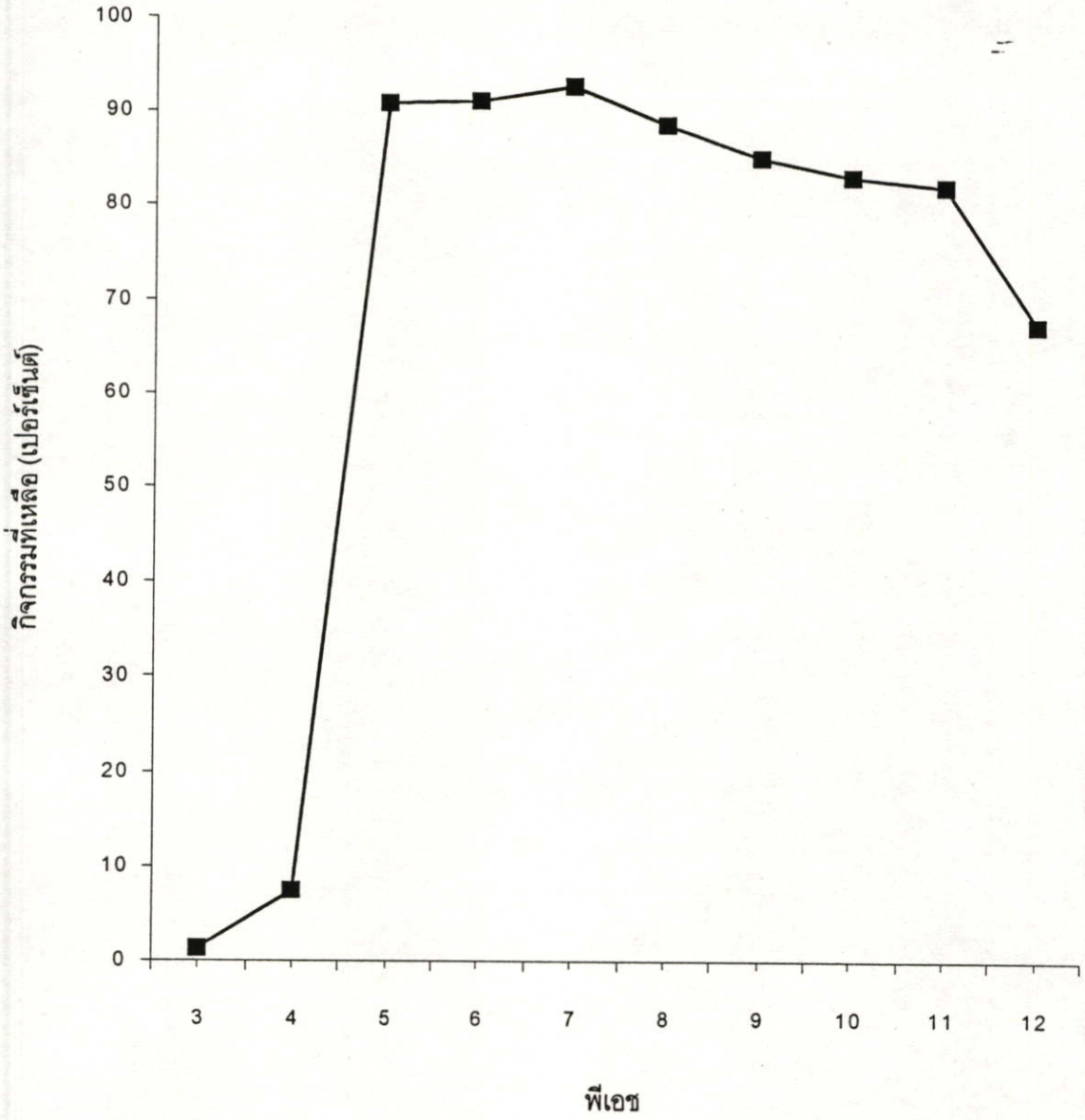
เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.16 St. Leger *et al.* (1987) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *M. anisopliae* คือ Pr 1 และ Pr2 จะมีความคงตัวที่ช่วงพีเอช 5-9

4.4.6 ผลการศึกษาผลของอิออนของโลหะบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

จากการศึกษาผลของอิออนของโลหะหนักและโลหะบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *M. anisopliae* DOA FC 2156 ผลปรากฏว่าเอนไซม์โปรติเอสจะมีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีอิออนของโลหะและเกลือบางชนิดคือ Cu^{2+} Mn^{2+} Co^{2+} Mg^{2+} Ni^{2+} และ Ca^{2+} โดยเมื่อเติม Cu^{2+} ลงไปจะทำเอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 129 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งกิจกรรมอย่างสมบูรณ์ด้วย Hg^{2+} และ Ag^{+} ซึ่งกลไกการยับยั้งจะเกิดโดย Hg^{2+} หรือ Ag^{+} จะเข้าไปจับกับหมู่ -SH ของเอนไซม์ โดยการสร้างพันธะเมอร์แคบไทด์ ทำให้เอนไซม์หมดประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา การยับยั้งแบบนี้เป็นการยับยั้งแบบผันกลับได้ชนิดไม่แข่งขัน (non competition inhibition) (อรไท สุขเจริญ 2538) สำหรับ K^{+} Na^{+} Zn^{+} Fe^{2+} และ Pb^{2+} มีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 4.2 Lopez-Llorca (1990) รายงานผลการศึกษาผลของอิออนของโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *V. suchasporium* โดยพบว่าเอนไซม์จะมีกิจกรรมสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นเมื่อมี Ca^{2+} และเอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งการทำงานด้วย Hg^{2+} St. Leger *et al.* (1994) รายงานว่า Cd^{2-} Zn^{2+} และ Co^{2+} ไม่มีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดสที่ผลิตจากเชื้อ *M. anisopliae*

4.4.7 ผลการศึกษาสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสบางชนิดที่มีต่อเอนไซม์โปรติเอสจาก *M. anisopliae* DOA FC 2156

จากการทดลองนำสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF) ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดซีรีนโปรติเอส มีกลไลการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible inhibition) พารา-คลอโรเมอร์คิวรีเบนโซอิกแอซิด (PCMB) เป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปร ติเอสชนิดซีสเตอีนโปรติเอส มีกลไกการยับยั้งแบบผันกลับได้ (reversible inhibition) โดยจะสร้างพันธะเมอร์แคบไทด์กับหมู่ -SH ของเอนไซม์ เอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA) เป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดเมทิลโลโปรติเอส มีกลการยับยั้งเป็นแบบผันกลับได้ โดยจะเข้าไปจับกับอิออนของโลหะที่จำเป็นในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ และเปปสตาติน (pepstatin) ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดแอสปาร์ติกโปรติเอส มีกลไกการยับยั้งแบบผันกลับได้ (Beynon and Salvesen, 1990) เมื่อนำสารเหล่านี้มาทดสอบกับเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *M. anisopliae* DOA FC 2156 ผลปรากฏว่าสารยับยั้งเปปสตาตินของทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบ จะไม่มีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นี้



ภาพที่ 4.16 แสดงความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ที่พีเอชต่างๆ

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของอิออนของโลหะหนักและโลหะบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156

ชนิดของโลหะ	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
ไม่เติมโลหะ	100
$CoCl_2$	113
$CaCl_2$	105
KCl	85
NaCl	87
$MgCl_2$	103
$MnCl_2$	123.6
$HgCl_2$	0
$ZnCl_2$	96.7
FeSO4	72
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	129
$AgNO_3$	0
$Pb(AcO)_2 \cdot 3H_2O$	97.9
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	110.9
$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	109.4
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	86.8

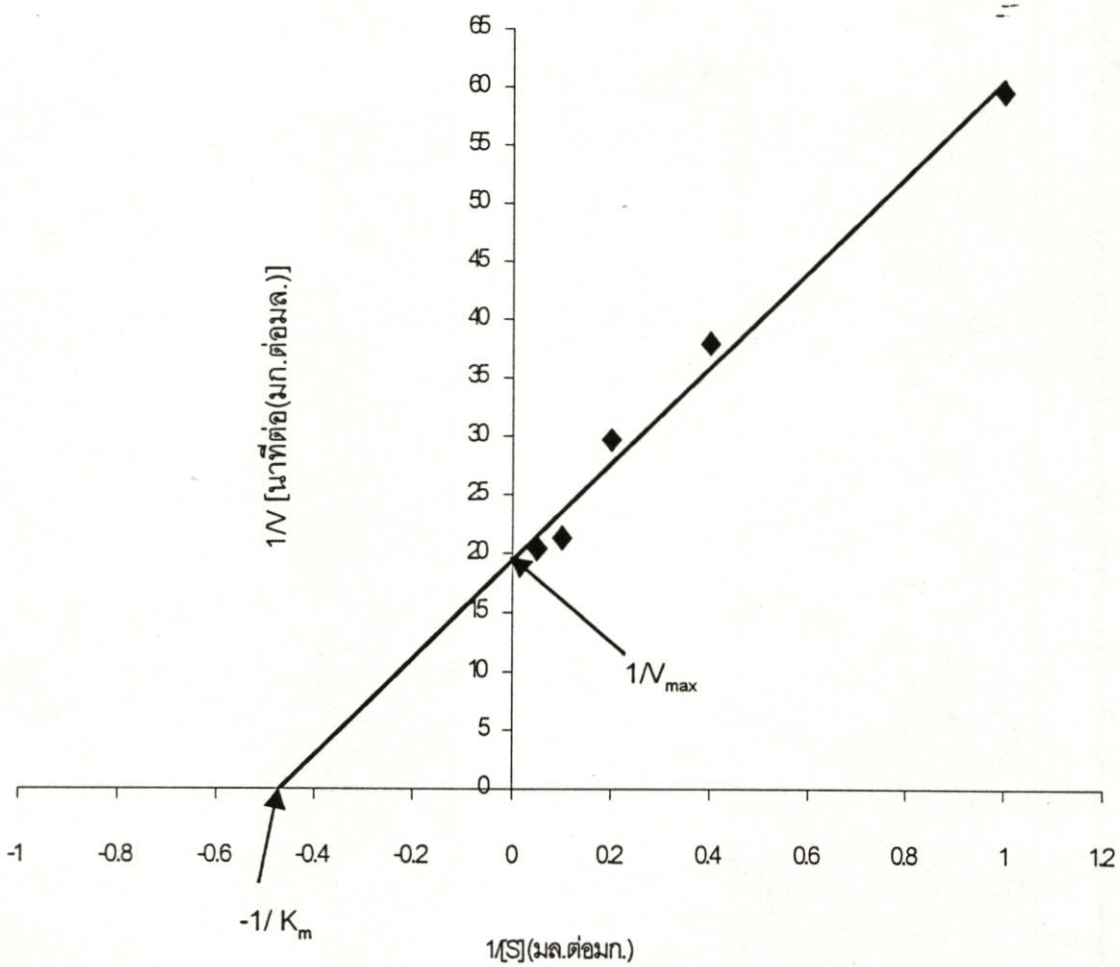
ส่วนฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ พารา-คลอโรเมอร์คิวรีเบนโซอิกแอซิด และเอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอสลดลงเหลือเท่ากับ 93.2 85 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอสลดลงเหลือเท่ากับ 5.9 4.8 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบว่าทั้งฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ พารา-คลอโรเมอร์คิวรีเบนโซอิกแอซิด และเอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิดนั้นสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นี้ได้อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตโดย *M. anisopliae* DOA FC 2156 เป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดซีรีนอัลคาไลน์โปรติเอสที่ต้องการอิออน ของโลหะบางชนิดในการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากเอนไซม์นี้ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยสาร ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์และเอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด สำหรับสารพารา-คลอโรเมอร์คิวรีเบนโซอิกแอซิด ซึ่งเป็นสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีสเตอีนโปรติเอส เหตุที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีรีนโปรติเอสได้นั้น North (1982) ได้อธิบายว่าเนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสจาก เชื้อราจะมีอนุมูลของซีสเตอีนอยู่ใกล้กับบริเวณเร่งของเอนไซม์ Disanto *et al.* (1992) พบว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดสจาก *Mucor racemosus* จะถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์และไดคลอโรไอโซคูมารีน (DCI) ซึ่งเป็นสารยับยั้งซีรีนโปรติเอส และจะถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วยสารประกอบเมอร์คิวรี พารา-คลอโรเมอร์คิวรีเบนโซอิกแอซิด

4.5 ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ค่า K_m และค่าV_{max} ของเอนไซม์โปรติเอส

จากการทดลองเมื่อนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟ Lineweaver-Bark ระหว่าง 1/[S] กับ 1/*V* ผลปรากฏว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *M. anisopliae* DOA FC 2156 มีค่า K_m จากกราฟเท่ากับ 2.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า V_{max} 53 ไมโครกรัมต่อนาที ดังแสดงในภาพที่ 4.17 St. Leger *et al.* (1987) ได้รายงานว่าเอนไซม์โปรติเอส (Pr 1) ที่ผลิตจากเชื้อ *M. anisopliae* มีค่า K_m เท่ากับ 7.06 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ Suc-$(Ala)_3$-NA ความเข้มข้น 0.4-7.5 มิลลิโมลาร์เป็นสับสเทรต และเท่ากับ 2.65 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้ Ac-$(Ala)_3$-NA ความเข้มข้น 0.05-0.75 มิลลิโมลาร์เป็นสับสเทรต St. Leger *et al.* (1994) ได้รายงานว่าเอนไซม์โปรติเอส (Pr 1) ที่สร้างจาก *M. anisopliae* ที่มีค่าพีไอเท่ากับ 10.2 9.8 และ 9.3 มีค่า Km เท่ากับ 0.25 0.32 และ 0.39 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับเมื่อใช้ Suc-$(Ala)_2$-Pro-Phe-pNA เป็นสับสเทรต

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสบางชนิดที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *M. anisopliae* DOA FC 2156

ชนิดของสารยับยั้งเอนไซม์	ความเข้มข้น	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
ไม่เติมสารยับยั้ง	-	100
EDTA	0.1 มิลลิโมลาร์	93.2
	1.0 มิลลิโมลาร์	5.9
	10 มิลลิโมลาร์	0
PMSF	0.1 มิลลิโมลาร์	85
	1.0 มิลลิโมลาร์	4.8
	10 มิลลิโมลาร์	0
PCMB	0.1 มิลลิโมลาร์	10
	1.0 มิลลิโมลาร์	5
	10 มิลลิโมลาร์	0
pepstatin	1 ไมโครโมลาร์	100
	10 ไมโครโมลาร์	100
	100 ไมโครโมลาร์	100



ภาพที่ 4.17 แสดงการเขียนกราฟ Lineweaver-Bark ระหว่าง 1/[S] กับ 1/V เพื่อคำนวณหาค่า K_m และค่า V_{max}

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 สามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสประกอบด้วย แป้งถั่วเหลือง 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมไนเตรท 3 กรัมต่อลิตร โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร โพแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท 0.2 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท 0.1 กรัมต่อลิตร, ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในระดับฟลาสก์เขย่า พบว่าเชื้อจะให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 459 หน่วยต่อมล. ในชั่วโมงที่ 168 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่าให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร casein hydrolysis medium สูตรเดิมประมาณ 156 เท่า สำหรับการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าเชื้อจะให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 429.88 หน่วยต่อมล.ในชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสคิดเป็น 94 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับฟลาสก์เขย่า

5.1.2 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอส

ผลจากการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *M. anisopliae* DOA FC 2156 ทำให้สามารถสรุปได้ดังนี้ คือ เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จะถูกทำให้ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์โปรติเอสนี้มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับพีเอช 11 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีความคงตัวที่ช่วงพีเอช 5-11 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมี Cu^{2+} Mn^{2+} Co^{2+} Mg^{2+} และ Ni^{2+} แต่เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งการทำงานอย่างสมบูรณ์โดย Ag^{+} และ Hg^{2+} ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้นี้จะถูกยับยั้งการทำงานอย่างสมบูรณ์โดยสารฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ สารเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด และสารพาราคลอโรเมอร์คิวรีเบนโซอิกแอซิดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 จะมีค่า K_m เท่ากับ 2.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า V_{max} เท่ากับ 53 ไมโครกรัมต่อนาที (ใช้เคซีนเป็นสับสเทรต) จากผลการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์นี้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *M.*

anisopliae DOA FC 2156 เป็นเอนไซม์โปรติเอสซนิดซีรีนอัลคาไลน์โปรติเอสที่ต้องการอิออนของโลหะร่วมในการเกิดปฏิกิริยา

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ผลจากการวิจัยนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาและพัฒนาเพื่อจะนำเอนไซม์โปรติเอสไปใช้ในอุตสาหกรรมที่ต้องการเอนไซม์โปรติเอสที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างสูงๆ เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากการวิจัยครั้งนี้สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นด่างสูง ซึ่งจะแตกต่างจากเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆที่ส่วนใหญ่จะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง กรด หรือด่างอ่อนๆ

5.2.2 สำหรับการที่จะพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมนั้นจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับถังหมักเพื่อจะหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ต่อไป

บรรณานุกรม

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. "เอนไซม์โปรติเอส" เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่1. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 171-191.

อรไท สุขเจริญ. 2538. "ซีวสาร" วิศวกรรมชีวเคมี. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. หน้า 18-23.

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.

Bakar, J., and Hashim, S. 1996. The milk curdling ability of crude protease of sardine (*Sardinops melanastictus*) offal in the production of daaih. Asean Food J. 11: 95-98.

Beynon, R.J. and Salvesen, G. 1990. Commercially available protease inhibitors. *In* Proteolytic enzyme a practical approach. Beynon, R. J. and Bond, J. S. Eds. IRL. Press Eynsham Oxford England. pp. 241-249.

Bidochka, M. J. and Khachatourian, G. G. 1987 (a). Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1679-1684.

Bidochka, M. J. and Khachatourian, G. G. 1987 (b). Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Exper. Mycol. 12: 161-168.

Böckle, B., Galunsky, B., and Müller, R. 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3705-3710.

Bonants, p. J. m., Fitters, P. F. l., Thijs, H., Belder, E., Waalwijk, C. and Hanfling, J. W. D. M. 1995. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity againts *Meloidogyne hapla* egg. Microbiology 141: 775-784.

Chambers, J. A. A. 1993. Buffer, Chelating agents and denaturant. *In* Biochemistry LAB FAX. Chambers, J. A. A. and Rickwood, D. Eds. BIOS Scientific Publishers limited, Oxford. pp.1-36.

Channe, P. S., and Shewale, J. G. 1998. Influence of culture conditions on the formation

of milk-clotting protease by *Aspergillus niger* MC 4. World J. Microbiol. biotechnol. 14: 11-15.

Charnley, A. K. and St. Leger R.J. 1991. The role of cuticle-Degrading enzyme in fungal pathogenesis in insects. *In.* The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Cole, G. T. and Hoch, H. C., Eds. Plenum Press, New York. pp 267-286.

Chen, G. C., and Johnson, B. R. 1983. Improved colorimetric determination of cell wall chitin in wood decay fungi. Appl. Environ. Microbiol. 46: 13-16.

Chowdhury, M. A. R., Miyoshi, S. I., and Shinoda, S. 1990. Purification and characteriza tion of a protease produced by *Vibio mimicus*. Infect. Immun. 58: 4159-4162.

ChuSi, L., ShuYu, L., ZhenPei, Y., Liang, C. S., Li, S. Y., and Yang, Z. P. 1999. Purification and some properties of protease from *Actinidia eriantha* Bentha. J. Plant Res. Environ. 8: 1-6.

Cowan, D. A., Smolenski, K. A., Deniel, R. M. and Morgan, H. W. 1987. An extremely thermostable extracellular proteinase from a strain of the archaebacterium *Desulfurococcus* growing at 88°C. Biochem. 247:121-133.

Dalton, J. P. and Heffernan, M. 1989. Thiol proteases relased *in vitro* by *Fasciola hepatica*. Mol. Biochem. Parasitol. 35: 161-166.

Dean, D. D., and Domnas, A. J. 1983. The extracellular proteolytic enzyme of the mosquito-parasitizing fungus *Lagenidium giganteum*. Exp. Mycol. 7: 31-39.

Disanto, M. E., Li, Q., and Logan, D. A. 1992. Purification and characterization of a developmentally regulated carboxypeptidase from *Mucor racemosus*. J. bacteriol. 174: 447-455.

Dobinson, K. F., Lecomte, N. and Lazarovits, G. 1997. Production of an extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. Can. J. Microbiol. 43: 227-233.

Donaghy, J. A., and McKay, A. M. 1993. Production and properties of an alkaline protease by *Aureobasidium pullulans*. J. Appl. Bacteriol. 74: 662-666.

Dunn, B. N. 1990. Determination of protease mechanism. *In* Proteolytic enzyme a practical approach. Beynon, R. J. and Bond, J. S. Eds. IRL. Press Eynsham Oxford England. pp. 57-65.

Elad, Y., and Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianium* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. Euro. J. Plant Pathol. 105: 177-189.

Fletcher, m. H., Schenkein, H. A., and macrina, F. L. 1994. Cloning and characterization of a new protease gene *prt H* from *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 62: 4279-4286.

Geremia, R. A., Goldman, G. H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S. B., Montagu, M. V., and Herrera-Estrella, A. 1993. Molecular characterization of the proteinase encoding gene, *prb 1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma hazianum*. Mol. Microbiol. 8: 603-613.

Guevara, M. G., Oliva, C. R., Machinandiarena, M., and Daleo, G. R. 1999. Purification and properties of an aspartic protease from potato tuber that is inhibited by a basic chitinase. Physiol. Plantar. 106: 164-169.

Hislop, E. C., Paver, J. L. and Keon, J. P. R. 1982. An acid protease produced by *Monilinia fructigena in vitro* and in infected apple fruits and its possible role in pathogenesis. J. Gen. Microbiol. 128: 799-807.

Jonsson, A. G. 1968. Protease production by species of *Entomophthora*. Appl. Microbiol. 16: 450-457.

JungKee, L., YoungOk, K., HyungKwoun, K., YiungSeo, P., and TacKwang, O. 1996. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Thermoactinomyces* sp. E 79 and the DNA sequence of the encoding gene. Biosci. Biotech. Biochem. 60: 840-846.

Kimura, T., and Tsuchiya, K. 1982. Characteristics of protease production by *Cephalosporium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 43: 654-658.

Labbe, J. P., Rebegrotle, P., and Turpine, M. 1974. Demonstrating extracellular leucine aminopeptidase (EC. 3.4.1.1) of *Aspergillus oryzae* (IP 410) : leucine aminopep tidase 2 fraction. C. R. Acad. Sci. (Paris) 287D : 2699.

Lambert, F., and Pujarniscle, S. 1984. Purification and properties of the proteinase produced *in vitro by Verticillium dahliae*. Can. J. Microbiol. 30: 1488-1493.

Li Duo-Chuan, Yang Yi-Jaun and Shen Chong-Yao. 1997. Protease production by the themophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Mycol. Res. 101(1): 18-22.

Lindgerg, R. A., Eirich, L. D., Price, J. S., Wolfinbarger, L., and Drucker, H. 1981.

Alkaline protease from *Neurospora crassa* purification and partial characteriza tion. J. Biol. Chem. 256: 811-814.

Linsmaier-Bednar, E. M. 1998. Industrial enzyme and their application. John Wiley & sons, Inc. pp. 147-179.

Lopez-Llorca. L. V. 1990. Purification and properties of extracellular proteases produced by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. Can. J. Microbiol. 36: 530-537.

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

Lu, S.-F. and Chang, P.-P. 1996. A thermostable neutral protease from *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541. Lett. Appl. Microbiol. 22: 5-9.

Luz, C., Tigano, M. S. Silva, G., Cordeiro, C. M. and Aljanabi, S. M. 1998. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolate to control *Triatoma infestans*. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 93: 839-46.

Nakadia, T., Nasuno, S., and Iguchi, N. 1973 (a). Purification and properties of leucine aminopeptidase I from *Aspergillus oryzae*. Agr. Biol. Chem. 37: 757-756.

Nakadia, T., Nasuno, S., and Iguchi, N. 1973 (b). Purification and properties of leucine aminopeptidase II from *Aspergillus oryzae*. Agr. Biol. Chem. 37: 757-756.

Nakadia, T., Nasuno, S., and Iguchi, N. 1973 (c). Purification and properties of leucine aminopeptidase III from *Aspergillus oryzae*. Agr. Biol. Chem. 37: 757-756.

Neurath, H. 1990. The diversity of proteolytic enzyme. *In* proteolytic enzyme a practical approach, beynon, R. J., and Bond, J. S. Eds. IRL Press Eynsham Oxford England. pp. 1-13.

Nilsson, K., and Bjurman, J. 1998. Chitin as an indicator of the biomass of two wood-decay fungi in relation to temperature, incubation time, and media composition. Can. J. Microbiol. 44: 575-581.

North, M. J. 1982 Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorga nisms. Microbiol. Rev. 46: 308-340.

Okenu, D. M. N., Opara, K. N., Nwuba, R. I., and Nwagwu, M. 1999. Purification and characterization of an extracellularly released protease of *Trypanosoma brucei*. Parasitol. Res. 85: 424-428.

Paterson, I. C., Charnley, A. K., Cooper, R. M., amd Clarkson, J. M. 1994. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Microbiol. 140: 185-189.

Paterson, R. P, M. and Bridge, P. D. 1994. " Casein hydrolysis medium" *In* biochemical techniques for filamentous fungi. CAB International Walling ford UK p. 21.

Patke, D. and Dey, S. 1998. Proteolytic activity from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SDP4. Lett. Appl. Microbiol. 26: 171-174.

Phutrakul, S., and Kanasawod, P. 1996. Exploring of thermostable proteases produced by bacteria from Thai hot spring. J. Sci. Fac. CMU. 23: 1-8.

Poilane, I., Kaejalainen, T., Barc, M.C., Bourlioux, P., and Collignon,A. 1998. Protease activity of *Clostridium difficile* strains. Can. J. Microbiol. 44: 157-161.

Preetha, S. and Boopathy, R. 1997. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor michei*. World J. Microbiol. Biotechnol. 13: 573-578.

Priest, F. G. 1985. Extracellular enzyme protease. *In* Commercial enzyme. New York Chapman & Hall. pp. 38-42.

Radlowski, M., Kalinowski, A., Krolikowski, Z., and Bartkowiank, S. 1994. Protease activity from maize pollen. phytochem. 35: 853-856.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V. 1998. Molecullar and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 597-635.

Rauscher, M., Mendgen, K., and Deising, H. 1995. Extracellular proteases of the rust fungus *Uromyces viceae-fabae*. Exper. Mycol. 19: 26-34.

Saleh, Al. AA., and Zahran, AS. 1998. Some properties of an extracellular protease produced by *Pseudomonase aeruginosa* S3 isolated from raw camal milk. Egyp. J. Dairy Science. 26: 241-250.

Santinanalert, P., pattanayaiying, S. and Hutadilok-Towatana, N. 1998. Production of protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. PS719. Songklanakarin J. Sci. technol. 20(3): 333-345.

Segers, R., Butt, T. M., Kerry, B. R., and Peberdy, J. F. 1994. The nematophagous fungus *Verticilliun chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins *in situ*. Microbiol. 140: 2715-2723.

Spiridonov, N. A., Kashparova, E. V., and Baskunov, B. P. 1992. On chemical composition of a biologically active preparation from *Galleria mellonella*. Com. Biochem. Physiol. 102: 199-203.

St. Leger, R. J., Charnley, A. K. and Cooper, R. M. 1987. Characterization of cuticle-degrading protease produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. Arch. Biochem. Biophys. 253: 221-232.

St. Leger, R. J., Cooper, R. M., and Charnley, A. K. 1987. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticle from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. J. Gen. Microbiol. 133: 1371-1382.

St. Leger, R. J., Cooper, R. M., and Charnley, A. K. 1993. Analysis of aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Gen. Microbiol. 139: 237-243.

St. Leger, R. J., Bidochka, M. J., and Roberts, D. W. 1994. Characterization of novol carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Arch. Biochem. Biophys. 314: 392-398.

St. Leger, R. J., Bidochka, M. J., and Roberts, D. W. 1994. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinese and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. Arch. Biochem. Biophys. 313: 1-7.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.

Taguchi, H., Hamaoki, M., Matsuzawa, H., and Ohta, T. 1983. Heat-stable extracellular proteolytic enzyme produced by *Thermus caldophilus* strain GK 24 an extremely thermophilic bacterium. J. Biochem. 93: 7-13.

Townsed, G. E. and Lindgren, A. A. 1953. Viable yeast count. Cytologia. 18:183

Tunlid, A., and Jansson, S. 1991. Protease and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. Appl. Environ. microbiol. 57: 2868-2872.

Uchikoba, T., Yonezawa, H., Shimada, M., and Kaneda, M. 1998. Comparision of phytolacain G, a cysteine protease from fruit of *Phytolacca americana*, with phytolacain R. Bios. Biotechnol. Biochem. 62: 2058-2064.

Vazquez, R. AB., Balcazar, O. R., and Flores, C. A. 1993. Biosynthesis of glycoproteins

in *Candida albicans* : biochemical characterization of a soluble alpha-mannosidase. FEMS. Microbiol. Lett. 106: 321-325.

Yamashita, T., Tonouchi, N., Uozumi, T. and Beppu, T. 1987. Secretion of Mucor rennin, a fugal aspertic protease of *Mucor pusillus*, by recombinant yeast cells. Mol. Gen. Genet. 210: 462-467.

Yang, HP., Tong, SY., and Wang, ZC. 1997. The study of protease in *Holiotis discus* hannia Ino. J. Fish. Chi. 21: 128-133.

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

Wong, D. W. S. 1995. Food enzyme structure and mechanism. New York Chapman & Hall. pp. 124-157.

Zhiona, E., Browning, M. Johnson, P. W., Ginsberg, h. S. and Le Brun, R. A. 1997. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Deutero mycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J. Parasitol. 83: 815-818.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 การเตรียมอาหารสูตร casein hydrolysis medium (Paterson and Bridge, 1994)

สูตรอาหาร casein hydrolysis medium ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
KCl	0.5	"
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	"
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1	"
กลูโคส	10	"
ผงวุ้น	12	"
หางนม (skim milk) 15%	25	มล.ต่อลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

หางนม 15 เปอร์เซ็นต์เตรียมโดยละลายหางนม 3.75 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มล. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้มาปรับพีเอชเป็น 5.4 ด้วย 0.1 โมลาร์ NaOH และ 0.1 โมลาร์ HCl และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

1.2 การเตรียมอาหารสูตรดัดแปลงจาก casein hydrolysis medium (ดัดแปลงจาก Paterson และ Bridge, 1994)

ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
KCl	0.5	"
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	"
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1	"
หางนม	5.0	"
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.0 ด้วย 0.1 โมลาร์ NaOH และ 0.1 โมลาร์ HCl และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 การเตรียมอาหารสูตร potato dextrose agar

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
เด็กโตรส	20.0	"
ผงวุ้น	17.0	"
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เตรียมโดยนำมันฝรั่งมาหั่นเป็นชิ้นขนาดเท่าลูกเต๋าแล้วนำไปต้มพอนิ่ม จากนั้นกรองเอาส่วนน้ำมาต้มแล้วเติมเด็กโตรสและผงวุ้นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 องค์ประกอบของสารในแหล่งสารอินทรีย์ไนโตรเจน

1.4.1 แป้งถั่วเหลือง ประกอบด้วย

คาร์โบไฮเดรท	25	เปอร์เซ็นต์
โปรตีน	42	"
ไขมัน	20	"
เส้นใย	4	"
ความชื้น	9	"

1.4.2 นมผงขาดมันเนยเสริมแคลเซียม ประกอบด้วย

แลคโตส	45.72	กรัมต่อ100 กรัม
โปรตีน	34.61	"
ไขมัน	0.75	"
ความชื้น	4.85	"
แคลเซียม	1309	มก.ต่อ100 กรัม

1.4.8 เนื้อสกัด ประกอบด้วย (Merck)

อะมิโนไนโตรเจน	1.1	เปอร์เซ็นต์
ไนโตรเจนทั้งหมด	12	"
ความชื้น	6	"
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	7.2	"
แคลเซียม (Ca)	300	พีพีเอ็ม
แมกนีเซียม (Mg)	200	"
คอปเปอร์ (Cu)	1	"
เหล็ก (Fe)	112	"

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสดัดแปลงจากวิธีการของ Wang และ Hesseltin (Wang and Hesseltin, 1965)

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์

ละลายเคซีน 1 กรัม ในบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 50 มล. ต้มด้วยไฟอ่อนจนเคซีนละลาย เมื่อเย็นนำมาปรับพีเอชตามต้องการ จากนั้นปรับปริมาตรทั้งหมดให้ได้ 100 มล. ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน

2. สารละลายไตรคลอโรอะซีติกแอซิด (TCA) 5 เปอร์เซ็นต์

ละลาย TCA 5 กรัม ในน้ำกลั่นคนจนละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

3. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.4 M

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 42.396 กรัม ในน้ำกลั่นคนจนละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. โฟลินรีเอเจนท์ 1 นอร์มอล

นำโฟลินรีเอเจนท์ 2 นอร์มอล มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

5. สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนไทโรซีน

ละลายกรดอะมิโนไทโรซีน 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร สารละลายนี้มีความเข้มข้นของกรดอะมิโนไทโรซีนเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมล.

วิธีการ

1. นำตัวอย่าง (ที่มีความเจือจางที่เหมาะสม) 1 มล. ใส่ในหลอดทดลองนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายเคซีนที่อุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ลงในหลอดทดลองหลอดละ 1.0 มล. ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที

2. นำสารละลายผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการเติมสารละลาย TCA 5 เปอร์เซ็นต์ 3.0 มล. เขย่าตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที กรองตะกอนโปรตีนออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

4. นำส่วนน้ำใส 1.0 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.4 โมลาร์ 5.0 มล. เติมโฟลินรีเอเจนท์ 0.5 มล. ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน หลอดควบคุมทำโดยเติมสารละลาย TCA 3.0 มล. ก่อน จากนั้นเติมสารละลายเคซีน 1.0 มล. สำหรับแบลงค์ใช้น้ำกลั่น 1.0 มล. แทนตัวอย่างเอนไซม์

6. ทำกราฟมาตรฐานกรดอะมิโนไทโรซีน โดยใช้สารละลายกรดอะมิโนไทโรซีนความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมล. นำสารละลายความเข้มข้นต่างๆ มา 1.0 มล. ใส่ในหลอดทดลองดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 4-5 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดอะมิโนไทโรซีน ดังแสดงในภาพภาคผนวก ข-1

1 หน่วยของเอนไซม์โปรติเอส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเทรต และให้กรดอะมิโนไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry's method)

(Lowry *et al.* 1951)

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย ก : 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) $CuSO4 \cdot 5H2O$

สารละลาย ข : 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรต

สารละลาย ค : 0.2 โมลาร์ NaOH

สารละลาย ง : 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) Na_2CO_3

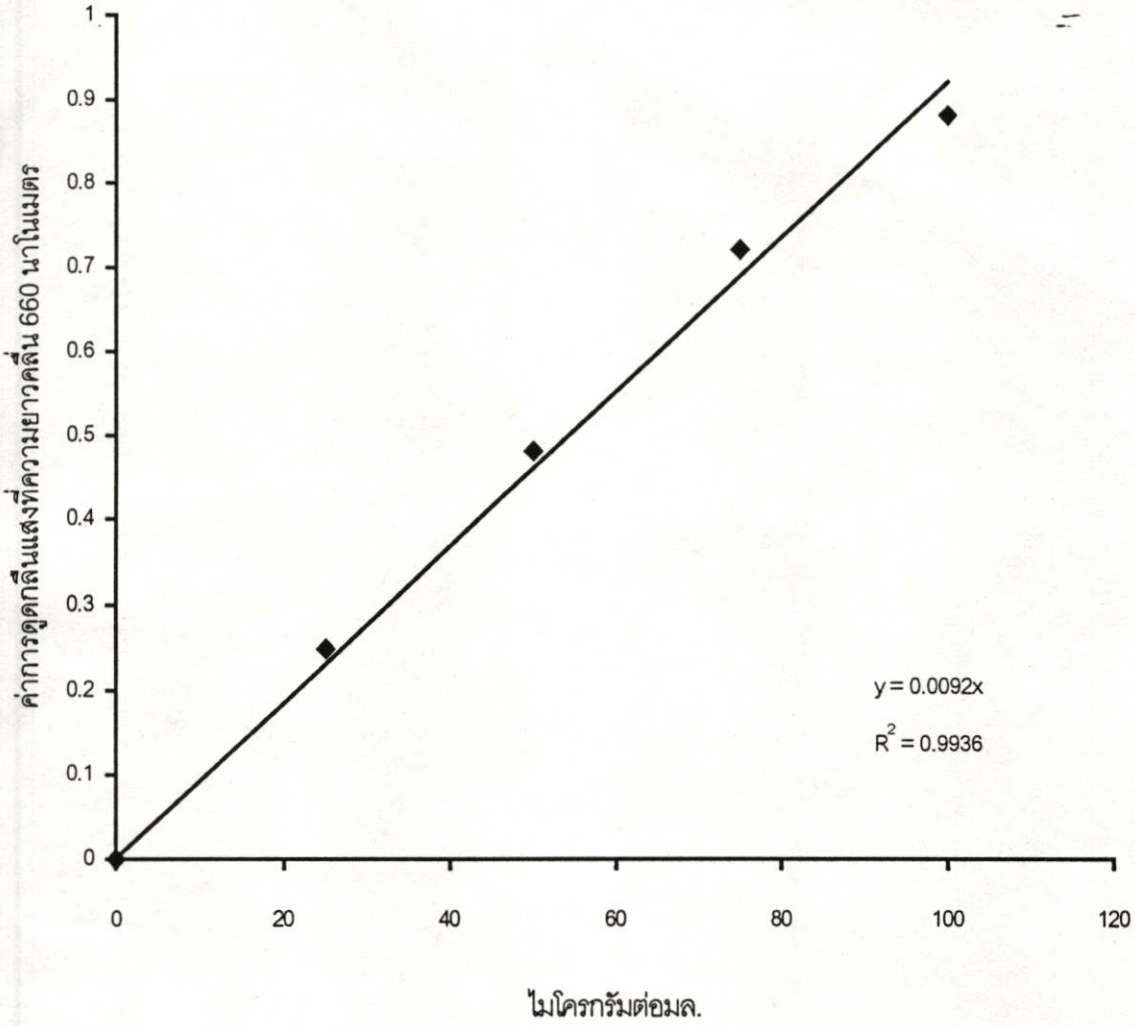
สารละลาย จ : เตรียมโดยผสมสารละลาย ค 49 มล. กับสารละลาย ง 49 มล. แล้วเติมสารละลาย ก 1 มล. จากนั้นจึงเติมสารละลาย ข 1 มล. (สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)

สารละลาย ฉ : โฟลินรีเอเจนท์ 1 นอร์มอล เตรียมโดยเจือจางโฟลินรีเอเจนท์ 2 โมลาร์ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

วิธีการ

1. ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน (โดยมีค่าโปรตีนไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม) 1 มล. เติมสารละลาย จ 5 มล. เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที

2. ใส่สารละลาย ฉ 0.5 มล. ลงในหลอดในข้อ 1 เขย่าให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที



ภาพภาคผนวก ข-1 แสดงกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนไทโรซีน

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แบลงค์ทำตามขั้นตอนที่ 1-2 โดยใช้น้ำกลั่นตัวอย่าง

4. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ซีรัมอัลบูมินความเข้มข้นระหว่าง 0.05-0.3 มิลลิกรัมต่อ มล. ดังแสดงในภาพภาคผนวก ข-2

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi Nelson

(Somogyi, 1952)

การเตรียมสารละลาย

คอปเปอร์ รีเอเจนท์ (copper reagent)

1. 10 เปอร์เซ็นต์ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 100 มล. (10 กรัมต่อ 100 มล.)

2. สารละลายฟอสเฟต-ทาร์เทรต (phosphate-tartrate) เตรียมโดยละลาย Na_2HPO_4 28 กรัม (หรือ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 70.5495 กรัม) ในน้ำกลั่น 700 มล. เติมโซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรต 40 กรัม ทำให้ละลายแล้วเติม 1 นอร์มอล NaOH 100 มล. ตามด้วย Na_2SO_4 (anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับให้ได้ปริมาตร 900 มล. วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง

3. นำสารละลายในข้อ 1 และ 2 ผสมเข้าด้วยกัน

เนลสันอาร์ซีโนโมลิบเดตคอเลอร์รีเอเจนท์ (Nelson's arsenomplybdate coler reagent)

1. ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O]$ 25 กรัมในน้ำกลั่น 450 มล. เติมกรดกำมะถัน 21 มล. ผสมให้เข้ากัน

2. ไดโซเดียมอาร์ซีเนต $(Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O)$ 3 กรัมในน้ำ 25 มล.

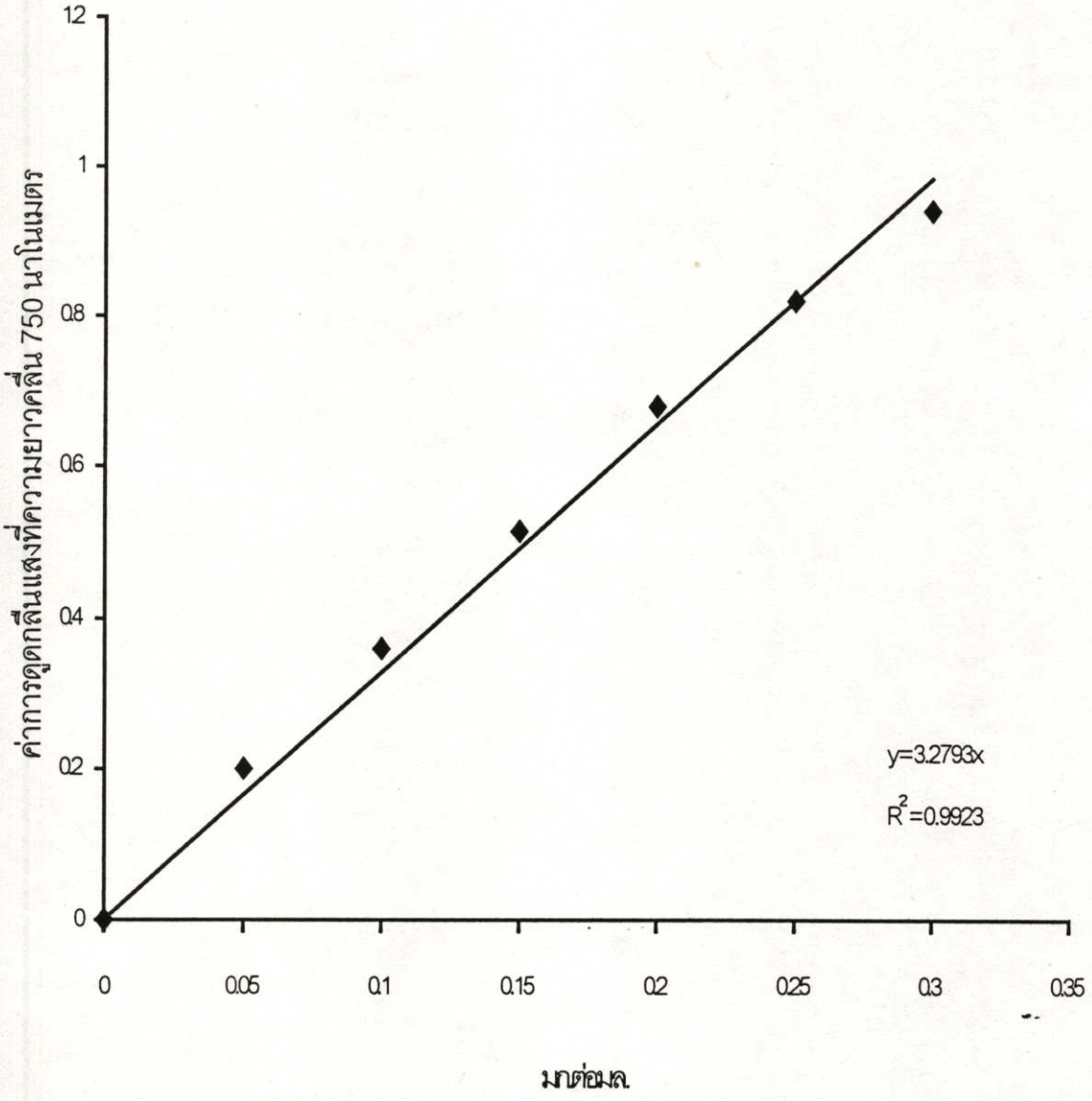
3. นำสารละลายในข้อ 1 และ 2 ผสมให้เข้ากัน (ควรเก็บไว้ในขวดสีชา)

วิธีการ

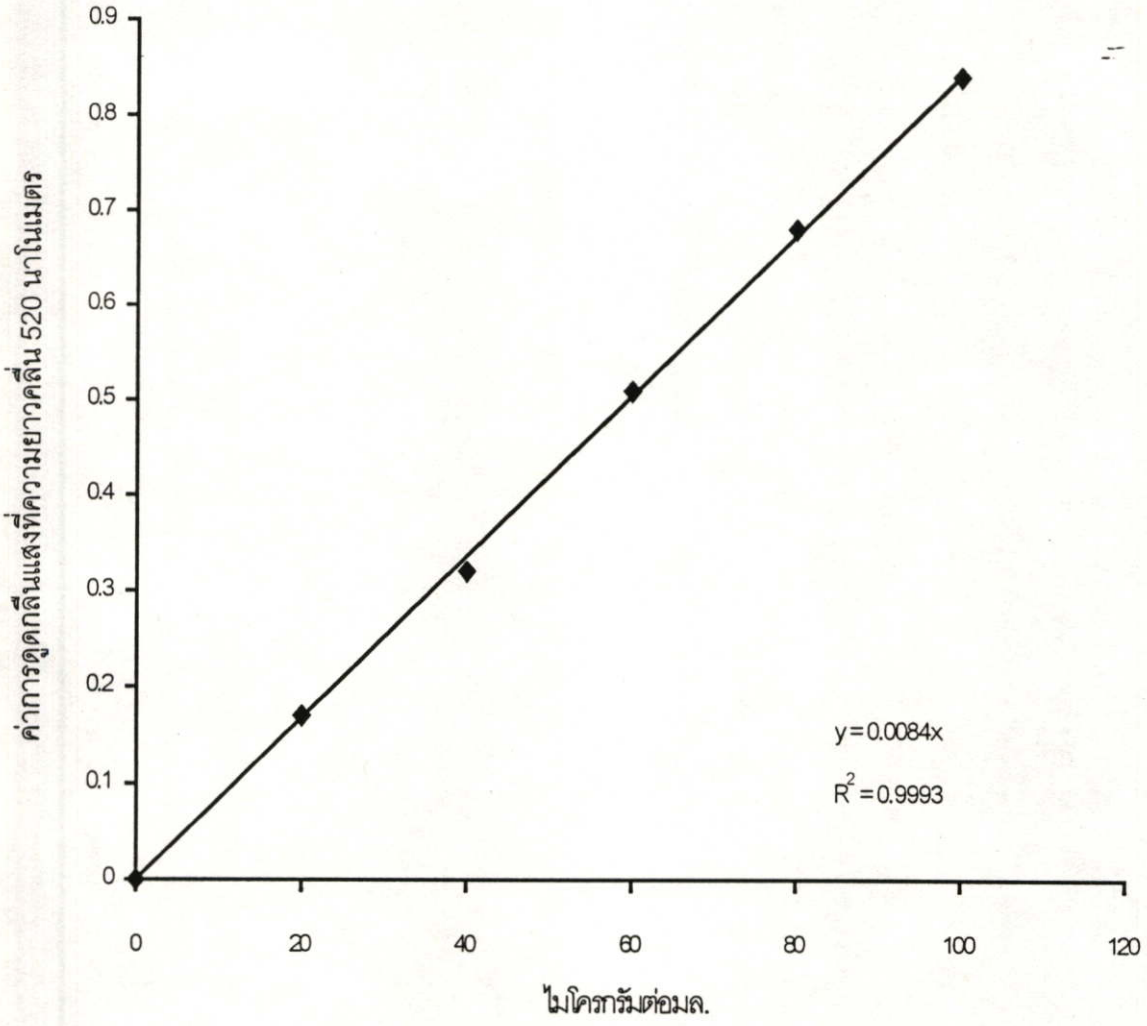
1. เติมตัวอย่าง 1 มล. ในหลอดทดลอง เติมคอปเปอร์รีเอจนท์ 1 มล. แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที

2. ทำให้เย็นโดยการแช่ในอ่างน้ำเย็น จากนั้นเติมอาร์ซีโนโมลิบเดตรีเอเจนท์ 1 มล.ผสมให้เข้ากันดีทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียวหรือน้ำเงินเขียว

3. เติมน้ำ 2 มล. (ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มล.) ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส ดังแสดงในภาพภาคผนวก ข-3



ภาพภาคผนวก ข-2 แสดงกราฟมาตรฐานซีรัมอัลบูมิน



ภาพภาคผนวก ข-3 แสดงกราฟมาตรฐานกลูโคส

4. การวัดการเจริญของเชื้อราโดยการวัดปริมาณกลูโคซามีน (glucosamine) ในผนังเซลล์

4.1 วิธีการสกัดกลูโคซามีนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มล. นำมากรองแยกส่วนที่เป็นของเหลวออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วไปย่อยเพื่อสกัดกลูโคซามีนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (ตัวอย่าง 0.2 กรัมต่อกรดไฮโดรคลอริก 5 มล.) บ่มในน้ำเดือด 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนทิ้ง แล้วนำส่วนใส (supernatant) ไปปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์ นำไปหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนทิ้งอีกครั้ง จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนโดยดัดแปลงจากวิธีของ Elson-Morgan (Chen and Johnson, 1983)

การเตรียมสารละลาย

1. 4 เปอร์เซ็นต์ อะเซทิลอะซีโตน (acetyl acetone)

ทำโดยละลาย 4 เปอร์เซ็นต์อะเซทิลอะซีโตนในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1.5 นอร์มอล (ปริมาตรต่อปริมาตร)

2. เออร์ลิกรีเอเจนท์ (Erhlich's reagent)

เตรียมโดยละลายสารพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ในสารละลายเอธานอล-กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นอัตราส่วน 30:30 มล.

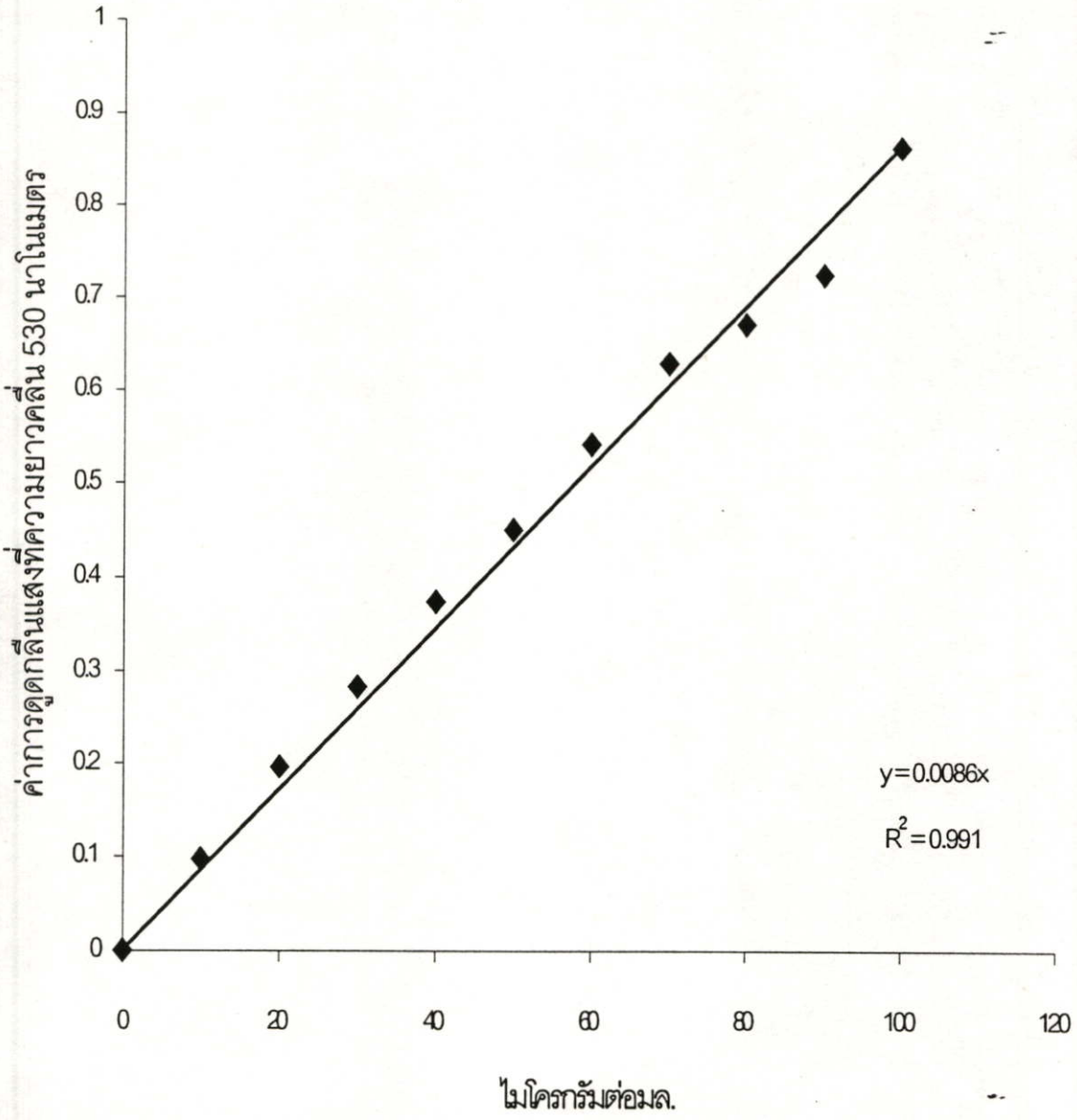
วิธีการ

1 นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการสกัดกลูโคซามีนปริมาตร 1 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลายอะเซทิลอะซีโตน 4 เปอร์เซ็นต์ 0.25 มล. เขย่าให้เข้ากัน

2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำให้เย็น

3 เติมเอธานอล 2 มล. เขย่าเพื่อละลายส่วนที่ตกตะกอน จากนั้นเติมเออร์ลิกรีเอเจนท์ 0.25 มล. เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ ดังแสดงในภาพภาคผนวก ข-4



ภาพภาคผนวก ข-4 แสดงกราฟมาตรฐานกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์

ภาคผนวก ค

1. วิธีการนับจำนวนสปอร์เชื้อรา (ดัดแปลงจาก Townsed and Lindgren, 1953)

วัสดุอุปกรณ์

-ที่นับสปอร์ (haemacytometer)

-กล้องจุลทรรศน์

-ที่นับ

วิธีการ

1. วาง cover slip ลงบน couting chamber ให้อยู่ตรงกลางพอดี
2. บรรจุสปอร์เชื้อราที่เจือจางแล้วเข้า chamber ด้วยความเร็วสม่ำเสมอ
3. ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที เพื่อให้จำนวนสปอร์ขยายตัวอย่างสม่ำเสมอและนอนก้นเรียบร้อย
4. ใช้กล้องจุลทรรศน์ objective lens กำลังขยายต่ำ (X10) และ occular lens (X 10) หาตารางที่จะนับ จากนั้นเริ่มทำการนับด้วย objective lens กำลังขยาย X40
5. นับสปอร์ใน 5 ช่องจาก 25 ช่องเล็กของสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ที่อยู่ตรงกลาง หรือ 30 ช่องใน 400 ช่องเล็ก
6. เมื่อนับครบ 5 ช่องนำจำนวนสปอร์ทั้ง 5 ช่องมารวมกัน แล้วคำนวณหาจำนวนสปอร์ต่อ มล.

วิธีการคำนวณ

จำนวนสปอร์ตั้งต้น = 5A X 104 X dilution factor สปอร์ต่อมิลลิลิตร

A คือ จำนวนสปอร์ที่นับได้ใน 5 ช่อง

2. วิธีการเตรียมบัฟเฟอร์

2.1 การเตรียม citrate-phosphate buffer

การเตรียมสารละลาย

ก: สารละลาย citric acid 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่ง citric acid 19.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มล.

ข: สารละลาย dibasic sodium phosphate 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งสาร Na_2HPO_4 $7H_2O$ 26.825 กรัม หรือ Na_2HPO_4 $12H_2O$ 35.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มล.

วัดพีเอชสารละลายทั้ง 2 เพื่อดูว่าสารละลายชนิดใดมีพีเอชใกล้เคียงกับพีเอชที่ต้องการ จากนั้นนำสารละลายอีกชนิดหนึ่งมาเติมเพื่อปรับให้ได้พีเอชที่ต้องการ (บัฟเฟอร์ชนิดนี้ควรใช้ในช่วงพีเอช 2.6-7.0)

2.2 การเตรียม phosphate buffer

การเตียมสารละลาย

ก: สารละลาย monobasic sodium phosphate 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งสาร monobasic sodium phosphat 13.9 กรัมละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มล.

ข: สารละลาย dibasic sodium phosphate 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งสาร $Na_2 HPO_4 \cdot 7H_2O$ 26.825 กรัม หรือ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 35.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มล.

วัดพีเอชสารละลายทั้ง 2 เพื่อดูว่าสารละลายชนิดใดมีพีเอชใกล้เคียงกับพีเอชที่ต้องการ จากนั้นนำสารละลายอีกชนิดหนึ่งมาเติมเพื่อปรับให้ได้พีเอชที่ต้องการ (บัฟเฟอร์ชนิดนี้ควรใช้ในช่วงพีเอช 5.7-8.0)

2.3 การเตรียม glycine-NaOH

การเตรียมสารละลาย

ก: สารละลาย glycine 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งสาร glycine 7.505 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มล.

ข: สารละลาย NaOH 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งสาร NaOH 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มล.

วัดพีเอชสารละลายทั้ง 2 เพื่อดูว่าสารละลายชนิดใดมีพีเอชใกล้เคียงกับพีเอชที่ต้องการ จากนั้นนำสารละลายอีกชนิดหนึ่งมาเติมเพื่อปรับให้ได้พีเอชที่ต้องการ (บัฟเฟอร์ชนิดนี้ควรใช้ในช่วงพีเอช 8.6-10.6)

3. ตารางแสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัว) ที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน

ความเข้มข้นเริ่มต้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์อิ่มตัวที่ 0 °ซ)	ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์อิ่มตัวที่ 0 °ซ)											
	20	30	40	50	60	70	75	80	85	90	95	100
	กรัมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในสารละลาย 100 มิลลิลิตร											
0	10.7	16.6	22.9	29.5	36.6	44.2	48.3	52.3	56.7	61.1	65.9	70.7
10	5.4	11.1	17.1	23.6	30.5	37.9	41.8	45.8	50.0	54.4	58.9	63.6
20	0	5.6	11.5	17.7	24.4	31.6	35.4	39.2	43.3	47.5	51.9	56.5
30		0	5.7	11.9	18.4	25.3	28.9	32.8	36.7	40.8	45.1	49.5
40			0	5.9	12.2	19.0	22.5	26.2	30.0	34.0	38.1	42.4
50				0	6.1	12.7	16.1	19.7	23.3	27.2	31.2	35.3
60					0	6.3	9.6	13.1	16.6	20.4	24.2	28.3
70						0	3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	21.2
75							0	3.2	6.7	10.2	13.9	17.6
80								0	3.3	6.8	10.4	14.1
85									0	3.4	6.9	10.6
90										0	3.4	7.1
95											0	3.5
100												0

ที่มา: Chambers, 1993

ภาคผนวก ง

ตารางที่ 1 แสดงการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* DOA FC 2156 ในอาหารสูตร casein hydrolysis medium

วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมล.)	ปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.)
0	5.06	0.72	0.09
1	4.85	0.95	0.1
2	4.25	1.95	0.085
3	5.00	2.3	0.07
4	5.04	3.0	0.065
5	5.16	2.95	0.06

ตารางที่ 2 แสดงผลการศึกษาแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

แหล่งอินทรีย์ ไนโตรเจน	วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมล.)	ปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.)
หางนม	0	5.13	0.6	0.1679
	1	5.1	0.86	0.2238
	2	5.63	1.95	0.2182
	3	7.14	8.0	0.1806
	4	7.7	38.94	0.1544
	5	7.64	50.2	0.1885
แป้งถั่วเหลือง	0	5.28	0	0.1974
	1	5.28	0.78	0.2252
	2	5.31	1.32	0.2163
	3	6.32	9.17	0.1872
	4	7.41	43.94	0.1771
	5	7.49	54.5	0.1971
นมผงขาดมันเนยเสริมแคลเซียม	0	5.18	0	0.2387
	1	5.18	0.144	0.2574
	2	6.27	0.4	0.2385
	3	6.75	23.45	0.1915
	4	7.25	51.24	0.1685
	5	7.41	53.7	0.1701
เคซีน	0	4.83	0	0.1931
	1	4.8	0	0.1896
	2	5.05	0.69	0.1424
	3	5.25	0.75	0.06527
	4	5.96	1.75	0.1712
	5	5.91	9.7	0.2208
พอลิเปปโตน	0	5.06	0.95	0.588
	1	5	1.26	0.5744
	2	5.3	2.17	0.5585
	3	6.3	2.36	0.5358
	4	7.23	6.6	0.473
	5	7.4	23.9	0.3979

ตารางที่ 2 (ต่อ)

เปปโตนจากเคซีน	0	4.98	0.46	0.5988
	1	4.94	0.8	0.6249
	2	5.05	1.4	0.6137
	3	5.87	1.6	0.5889
	4	6.86	2.62	0.5675
	5	7.19	11.0	0.4988
เนื้อสกัด	0	5.18	0	0.6756
	1	5.14	0.488	0.688
	2	6.11	4.1	0.6733
	3	7.7	10.17	0.4861
	4	8.39	32.9	0.4311
	5	8.2	39.3	0.441
นมสดพาสเจอร์ไรซ์	0	5.12	0.11	0.101
	1	5.1	1.12	0.1407
	2	5.53	2.36	0.1229
	3	4.83	3.33	0.07023
	4	5.47	29.0	0.08142
	5	5.52	42.9	0.1081
นมสดขาดมันเนยเสริม	0	5.12	0	0.1106
แคลเซียมพาสเจอร์ไรซ์	1	5.14	0	0.1536
	2	5.81	2.38	0.1052
	3	6.05	32.4	0.08909
	4	6.34	41.5	0.092
	5	6.3	43.5	0.1097

ตารางที่ 3 แสดงผลการศึกษาแหล่งของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน	วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมล.)	ปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก.ต่อมล.)
ไม่เติมสารอนินทรีย์	0	5.29	0	0.1958	0.09
	1	5.29	0.52	0.224	0.067
	2	5.53	3.97	0.2145	0.044
	3	6.1	36.9	0.2101	0.026
	4	6.38	44.4	0.2008	0.028
	5	6.54	47.78	0.2077	0.029
โซเดียมไนเตรท	0	5.18	0	0.1997	0.082
	1	5.21	0.43	0.2385	0.079
	2	5.63	6.24	0.212	0.045
	3	6.17	52.8	0.216	0.027
	4	6.44	125.6	0.2203	0.028
	5	6.59	157.6	0.2241	0.032
โพแตสเซียมไนเตรท	0	5.23	0	0.2086	0.098
	1	5.23	.023	0.239	0.078
	2	5.76	4.6	0.2011	0.045
	3	6.07	45.9	0.2302	0.028
	4	6.3	95.1	0.2321	0.032
	5	6.47	157.47	0.2555	0.033
แอมโมเนียมซัลเฟต	0	5.18	0	0.2181	0.053
	1	5.21	0.29	0.2094	0.048
	2	4.18	4.2	0.1089	0.017
	3	6.27	41.7	0.2062	0.023
	4	6.56	108.3	0.2147	0.024
	5	6.74	146.12	0.2235	0.028
แอมโมเนียมไนเตรท	0	5.17	0	0.2157	0.056
	1	5.18	1.3	0.2147	0.046
	2	4.3	9.7	0.1	0.014
	3	6.33	49.6	0.1995	0.0198
	4	6.44	150.4	0.2197	0.0257
	5	6.59	172.98	0.2297	0.031

ตารางที่ 4 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมล.)	ปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก.ต่อมล.)
5.0	0	5.19	0	0.1771	0.051
	1	5.22	1.0	0.2288	0.064
	2	4.21	9.2	0.1017	0.021
	3	6.29	48.5	0.2065	0.023
	4	6.52	150.0	0.2137	0.023
	5	6.71	171.9	0.2273	0.028
7.5	0	5.18	0	0.3507	0.106
	1	5.19	0.37	0.42	0.1
	2	4.07	2.6	0.3999	0.029
	3	6.36	31.1	0.1536	0.036
	4	6.8	166.5	0.2714	0.042
	5	6.88	197.56	0.3077	0.046
10.0	0	5.05	0	0.4695	0.162
	1	5.05	1.1	0.5193	0.165
	2	4.13	1.8	0.2064	0.06
	3	4.81	11.52	0.2735	0.022
	4	6.72	162.1	0.3188	0.047
	5	6.8	215.23	0.3757	0.064
15.0	0	5.07	0	0.579	0.205
	1	5.13	0.8	0.5649	0.191
	2	4.1	1.6	0.2865	0.104
	3	4.0	2.3	0.2994	0.036
	4	7.07	124.3	0.4741	0.069
	5	6.85	224.85	0.4901	0.082
20.0	0	5.17	0	0.7875	0.256
	1	5.21	0.29	0.7998	0.266
	2	4.11	1.44	0.3318	0.141
	3	4.5	6.2	0.4215	0.065
	4	6.86	184.5	.05026	0.075
	5	6.52	243.25	0.5561	0.088

ตารางที่ 5 แสดงผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

พีเอชเริ่มต้นของอาหาร	วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมล.)	ปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก.ต่อมล.)
พีเอช 4	0	4.0	0	0.903	0.713
	1	4.08	0	1.322	0.677
	2	4.15	2.13	0.4135	0.796
	3	6.64	22.5	0.702	0.231
	4	6.75	263	0.7545	0.225
	5	6.53	434.2	0.82	0.108
พีเอช 5	0	5.12	0	0.8515	0.33
	1	5.09	0	0.708	0.259
	2	3.88	0.69	0.3056	0.118
	3	4.10	0.98	0.3424	0.068
	4	6.91	184	0.9225	0.095
	5	6.75	416.1	0.932	0.114
พีเอช 6	0	6.01	0	1.0425	0.26
	1	6.01	0	1.395	0.23
	2	5.38	3.33	1.036	0.432
	3	6.35	42.5	0.7795	0.116
	4	6.36	260	0.911	0.113
	5	6.40	437	0.925	0.096
พีเอช 7	0	6.95	0	1.912	0.235
	1	6.70	0	1.7985	0.169
	2	5.59	7.27	1.194	0.388
	3	6.85	49.1	0.694	0.207
	4	7.11	266	0.8695	0.157
	5	7.21	396.3	0.944	0.184
พีเอช 8	0	7.90	0	2.72	0.212
	1	6.93	3.85	1.976	0.164
	2	5.25	4.5	1.113	0.293
	3	6.88	49.5	0.78	0.178
	4	7.13	253	0.812	0.171
	5	7.14	413	0.961	0.188

ตารางที่ 6 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมล.)	ปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก.ต่อมล.)
0 (ไม่เติมกลูโคส)	0	6.1	0	0.6456	0.339
	1	5.95	4.5	0.5913	0.345
	2	4.11	7.7	0.6291	0.218
	3	7.33	117.2	1.035	0.272
	4	7.51	226.3	1.044	0.296
	5	7.57	437	1.3035	0.321
2.5	0	6.1	0	0.54	2.82
	1	5.7	1.0	0.4749	2.63
	2	3.5	2.1	0.4965	0.202
	3	3.12	5.11	0.8154	0.086
	4	6.01	22.6	0.8895	0.137
	5	6.45	248.56	0.9054	0.175
5.0	0	6.1	0	0.561	5.9
	1	5.8	0.5	0.4095	5.7
	2	3.33	2.47	0.4326	0.22
	3	2.87	2.48	0.7869	0.145
	4	3.72	5.9	0.849	0.101
	5	6.22	169	0.8868	0.163
7.5	0	6.15	0	0.9846	7.59
	1	5.9	0.4	0.3507	7.6
	2	2.48	2.32	0.3687	0.22
	3	2.7	3.45	0.8178	0.182
	4	3.03	4.2	0.8412	0.2
	5	6.46	116.23	0.92	0.24
10.0	0	6.13	0	1.1979	11.4
	1	5.8	0	1.1799	11.19
	2	2.61	1.2	0.8028	0.35
	3	2.47	1.3	0.7746	0.2
	4	2.45	1.75	0.681	0.234
	5	2.52	2.6	0.4854	0.27

ตารางที่ 7 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับฟลาสก์เขย่ากับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชม.)	พีเอช		กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อมล.)		ปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.)		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก.ต่อมล.)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ 50 มล.)	
	ฟลาสก์	ถังหมัก	ฟลาสก์	ถังหมัก	ฟลาสก์	ถังหมัก	ฟลาสก์	ถังหมัก	ฟลาสก์	ถังหมัก
(0) 0	6.01	6.0	0	0.4	1.06	1.003	0.254	0.412	0.01	0.05
4	5.95	6.05	0	0.6	1.09	1.03	0.256	0.42	0.01	0.05
8	5.95	6.08	0	0.7	1.10	1.10	0.257	0.392	0.01	0.05
12	5.9	6 .06	0	0.92	1.15	1.15	0.339	0.389	0.02	0.06
(1) 24	5.85	5.95	0.52	1.1	1.18	1.25	0.239	0.334	0.02	0.06
28	5.78	6.0	0.55	1.2	1.37	1.21	0.228	0.312	0.03	0.06
32	5.75	6.08	1.15	1.2	1.23	1.16	0.227	0.294	0.03	0.06
36	5.68	6.19	1.18	2.6	1.22	1.13	0.225	0.275	0.04	0.06
(2) 48	4.35	7.5	1.3	67.53	0.92	1.03	0.224	0.272	0.04	0.12
52	4.27	7.5	1.61	108.0	0.89	0.975	0.22	0.27	0.06	0.21
56	4.57	7.61	2.2	111.0	0.89	0.96	0.211	0.251	0.06	0.27
60	4.68	7.65	2.9	115.0	0.87	0.95	0.204	0.248	0.07	0.29
(3) 72	6.34	7.78	26.2	160.6	0.83	0.94	0.196	0.247	0.09	0.36
84	6.38	7.8	157.8	188.2	0.83	0.94	0.147	0.243	0.10	0.41
(4) 96	6.52	7.84	167.67	201.0	0.81	0.93	0.139	0.242	0.10	0.44
108	6.6	7.85	295.1	211.0	0.756	0.93	0.127	0.241	0.10	0.46
(5) 120	6.65	7.88	363.0	357.0	0.75	0.86	0.121	0.238	0.08	0.47
132	6.76	7.89	382.0	368.0	0.73	0.87	0.121	0.236	0.08	0.46
(6) 144	6.85	7.93	421.0	429.8	0.61	0.917	0.115	0.226	0.08	0.46
156	6.93	7.95	440.0	417.2	0.65	0.917	0.102	0.233	0.07	0.44
(7) 168	7.04	8.0	459.0	396.4	0.67	0.94	0.1	0.234	0.06	0.43
180	7.07	8.1	445.0	346.0	0.67	0.96	0.1	0.235	0.05	0.41
(8) 192	7.16	8.1	403.0	340.0	0.71	0.97	0.109	0.238	0.04	0.37
204	7.2	8.1	359.8	335.7	0.73	0.97	0.11	0.239	0.04	0.29

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

1. การศึกษาแหล่งของสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ตารางแสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

แหล่งสารอินทรีย์ไนโตเจน	หางนม	แป้งถั่วเหลือง	นมผงขาดมันเนย + Ca	เคซีน	เนื้อสกัด	พอลิเปปโตน	เปปโตน	นมสดพาสเจอร์ไรซ์	นมสดขาดมันเนย + Ca พาสเจอร์ไรซ์
กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส	50.2	54.5	53.7	9.7	39.35	23.9	11.11	43.15	43.85
	b	a	a	c	d	e	f	g	g

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงผลการเปรียบที่ไม่มีความแตกต่างกัน

ตัวอักษรแตกกันแสดงผลการเปรียบเทียบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

2. การศึกษาผลของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ตารางเปรียบเทียบผลทางสถิติโดยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

แหล่งสารอนินทรีย์ไนโตรเจน	ไม่เติมสารอนินทรีย์	โซเดียมไนเตรท	โพแตสเซียมไนเตรท	แอมโมเนียมซัลเฟต	แอมโมเนียมไนเตรท
กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส	47.8	157.6	157.46	146.1	173
	a	b	c	d	e

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงผลการเปรียบที่ไม่มีความแตกต่างกัน

ตัวอักษรแตกกันแสดงผลการเปรียบเทียบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3. การศึกษาความเข้มข้นของสารอินทรีย์นโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ตารางเปรียบเทียบผลทางสถิติโดยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้นของแป้งถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)	5	7.5	10	15	20
กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส	171.7	197.55	215.2	224.85	243.24
	a	b	c	d	e

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงผลการเปรียบที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรแตกกันแสดงผลการเปรียบเทียบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

4. การศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ตารางเปรียบเทียบผลทางสถิติโดยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	พีเอช 4	พีเอช 5	พีเอช 6	พีเอช 7	พีเอช 8
กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส	434.2	416.09	436.77	396.26	413.21
	a	a	a	b	a

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงผลการเปรียบที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรแตกกันแสดงผลการเปรียบเทียบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

5. การศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ตารางเปรียบเทียบผลทางสถิติโดยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	0	2.5	5	7.5	10
กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส	437	248.56	168.97	116.23	2.6
	a	b	c	d	e

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงผลการเปรียบที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรแตกกันแสดงผลการเปรียบเทียบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวนาฏฤดี มีศิลป์

วัน เดือน ปี เกิด 19 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2518

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	2539